

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Ibn Khaldoun–Tiaret  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

**Activité antifongique du miel, de la cire et leur effet  
antifongique synergique contre *Candidas albicans***

Présenté par :

Ould Hocine Lidya

Yahia Cherif Aya

Soutenu publiquement le 18 juin 2023

**Jury :**

**Grade**

<b>Président :</b>	Mme. Bourabeh Akila	MCA	Université Ibn Khaldoun Tiaret
<b>Encadrant :</b>	Mr. Ahmed Moussa	MCA	Université Ibn Khaldoun Tiaret
<b>Examineur :</b>	Mr. Hamdi Mohammed	MCB	Université Ibn Khaldoun Tiaret

Année universitaire 2022-2023

## سورة النحل

بِسْمِ اللَّهِ  
الرَّحْمَنِ  
الرَّحِيمِ

وَأَوْحَىٰ رَبُّكَ إِلَى النَّحْلِ أَنْ  
اتَّخِذِي مِنَ الْجِبَالِ بُيُوتًا وَمِنَ الشَّجَرِ  
وَمِمَّا يَعْرِشُونَ ﴿68﴾ ثُمَّ كُلِي مِن كُلِّ  
الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلًا  
يَخْرُجُ مِنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ مُّخْتَلِفٌ  
أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ ۗ  
إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ  
يَتَفَكَّرُونَ ﴿69﴾

{69-68}



## Sourate An-Nahl

Au nom de Dieu le  
Miséricordieux

[Et voilà] ce que ton Seigneur  
révéla aux abeilles: «Prenez des demeures  
dans les montagnes, les arbres, et les treillages  
que [les hommes] font (68) Puis mangez de  
toute espèce de fruits, et suivez les sentiers de votre  
Seigneur, rendus faciles pour vous. De leur  
ventre, sort une liqueur, aux couleurs variées,  
dans laquelle il y a une guérison pour  
les gens. Il y a vraiment là une  
preuve pour des gens qui  
réfléchissent (69)

(68-69)



# Remercîment

*Nous exprimons notre profonde gratitude envers le Tout-Puissant, Allah, pour nous avoir donné la force, le courage et les ressources nécessaires pour mener à bien cette tâche.*

*Nous exprimons nos sincères remerciements et notre profonde gratitude envers Mr. **Moussa Ahmed**, qui a généreusement accepté de nous encadrer et de diriger ce travail, apportant une aide inestimable.*

*Nous tenons à exprimer notre reconnaissance envers Mme. **Bourabeh Akila** d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire, nous sommes honorés par sa participation.*

*Nous exprimons également notre sincère gratitude envers Mr. **Hamdi Mohammed** d'avoir accepté d'examiner attentivement notre travail, ses contributions ont été précieuses.*

*Nous souhaitons également rendre hommage à tous nos enseignants de l'université Ibn Khaldoun qui, tout au long de notre cursus, ont partagé leur savoir et nous ont guidés dans les méandres de nos études. Un remerciement particulier est adressé à notre responsable Mr. **Laredj Hocine**.*

*Nous souhaitons également exprimer notre reconnaissance envers toutes personnes participant de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réussite de ce travail.*



# Dédicace

*Je dédie humblement ce modeste travail en guise de remerciement*

*À la mémoire d'une personne qui nous a quittés bien trop tôt, à mon père. Tu étais une personne extraordinaire, et c'est seulement après ton départ que j'ai réalisé l'amour que tu me portais. Tu m'as toujours encouragé à donner le meilleur de moi-même, et j'aurais tant aimé que tu sois présent à un événement aussi important à mes yeux. Je suis sûr que tu aurais été fier de moi, du moins j'espère que tu l'es de là où tu te trouves maintenant.*

*À ma mère, je souhaite exprimer ma gratitude infinie pour ton soutien constant, ta bienveillance et ton soutien inconditionnel. Ce sont ces éléments essentiels qui m'ont permis de persévérer dans les moments les plus difficiles. Du fond du cœur, je te remercie pour tout ce que tu as fait et continue de faire pour moi. Je suis fière d'être ton enfant et reconnaissante de l'amour et du soutien que tu m'as apporté tout au long de ma vie. Que Dieu te protège et te bénisse.*

*À mes deux frères, qui ont toujours été présents pour moi et qui ont veillé sur moi, je vous suis infiniment reconnaissante. Votre soutien constant et votre affection ont été réconfortants. Merci d'avoir été là à chaque étape de mon parcours.*

*À la famille de ma cousine, qui m'a accueillie à bras ouverts pendant presque toutes mes années d'études à la faculté. Votre soutien et votre générosité qui ont été d'une valeur inestimable m'ont permis de poursuivre mes études dans les meilleures conditions, je vous suis énormément reconnaissante d'avoir fait partie de votre famille.*


*À toute ma famille, en particulier à ceux qui ont toujours été là lorsque j'en avais besoin, dont mes tantes, je vous adresse ma sincère gratitude. Votre présence et votre soutien ont été une source de réconfort.*

*À mes amis et camarades, je souhaite vous remercier pour tous les merveilleux moments de joie, de plaisir et surtout de fous rires que nous avons partagés au cours de ces dernières années d'études. Votre présence et votre amitié ont rendu cette expérience mémorable.*

*Enfin, j'aimerais adresser une reconnaissance spéciale à mon binôme **Aya**. Je te remercie pour ta patience, ta compréhension et surtout ton soutien moral. Grâce à notre équipe solide, nous avons pu accomplir ce travail avec succès.*

*Que Dieu vous protège et vous bénisse tous.*

*Avec toute mon affection et ma gratitude, [Lidya]*





# Dédicace

*Je dédie ce travail en signe de gratitude*

*À ceux qui donnent un sens à ma vie , et qui m'ont permis avec beaucoup de sacrifices de mener à bien ces longues études, mes chers et respectueux parents en reconnaissance de leur amour, de leur appui et de leurs encouragements tout au long de ma vie. J'espère qu'ils seront fiers de moi, et je prie pour que Dieu leur donne une longue vie pleine de joie et de bien-être.*

*À l'homme qui partage ma vie, qui me soutient et qui me donne la force de progresser chaque jour, mon époux Mohamed et sa famille.*

*À mon fils, Khaled Houssam, qu'il soit béni par le bon DIEU, grandissant dans la sagesse, jouissant d'une bonne santé et doté de l'intelligence nécessaire.*

*À ma sœur Amel et son mari pour l'amour qu'elle me réserve.*


*À mon petit frère Mohamed, et à mes frères Djamel et Toufik, ainsi que leurs femmes.*

*À mes neveux et nièces adorés.*

*À toute ma famille, particulièrement ma grand-mère et ma tante.*

*À ma binôme Lidya pour son soutien moral, sa patience, sa compréhension et pour tous les bons moments passés ensemble.*

*Avec tout mon amour et ma reconnaissance, [Aya]*



# Résumé

Les infections fongiques sont des problèmes de santé croissants, avec une résistance croissante aux antifongiques. Le miel et la cire d'abeille, connus pour leurs propriétés antimicrobiennes, notamment antifongiques, offrent une alternative prometteuse dans le traitement de ces infections, nécessitant cependant davantage de recherches pour évaluer leur efficacité.

Dans ce contexte une étude a été effectuée afin d'évaluer l'activité antifongique in vitro de trois variétés de miel, de cire ainsi leur activité antifongique synergique vis-à-vis une souche fongique "*Candida albicans*", en ajoutant de l'amidon et en comparaison avec un antifongique pharmaceutique. Les trois variétés de miel de différente origine botanique (Roquette, Jujubier, Euphorbe) proviennent de la région du sud Algérien.

L'étude a été réalisée en deux parties ; Pour la première partie, des analyses physicochimiques du miel tel que le pH, l'acidité libre, la teneur en eau et en cendre ainsi la conductivité électrique ont été effectuées pour les trois variétés de miel. Quant à la deuxième partie, deux techniques d'analyse de l'activité antifongiques ont été réalisées ; la technique de diffusion par puits et la technique de la CMI (concentration minimale inhibitrice).

Les résultats des analyses physicochimiques ont tous été conformes aux normes standards. Quant à l'analyse de l'activité antifongique, la première technique a révélé un effet antifongique que pour l'antifongique et le mélange d'antifongique et de miel, indiquant une synergie entre ces deux derniers, tandis que la technique de la CMI a révélé différentes CMI pour les trois variétés de miel et différentes CIS (concentration minimale inhibitrice synergique) pour le mélange de miel-amidon et miel-amidon-cire, indiquant également une synergie entre ces deux derniers mélanges.

En conclusion, des études complémentaires sont requises pour évaluer l'activité individuelle et combiné de chaque type de miel et de cire, ainsi pour développer des tests quantitatifs mesurant leur contribution à l'activité antimicrobienne, tout en approfondissant notre compréhension de leur mécanisme d'action.

**Mots Clés :** miel, cire, amidon, *C.albicans*, antifongique, CMI, puits, activité antifongique, synergie.

# ملخص

العدوى الفطرية هي مشكل صحي متزايد، مع زيادة المقاومة لمضادات الفطريات. يقدم العسل وشمع العسل المعروفان بخصائصهما المضادة للميكروبات بما في ذلك الخصائص المضادة للفطريات بديلاً واعدًا في علاج هذه العدوى، ولكن هناك حاجة إلى مزيد من البحث لتقييم فعاليتها وآلية عملهما.

في هذا السياق، أجريت دراسة لتقييم النشاط المضاد للفطريات لثلاثة أنواع من العسل والشمع ونشاطهما المضاد للفطريات ضد السلالة الفطرية "snacibla adidnaC"، عن طريق إضافة النشا وبالمقارنة مع مضاد الفطريات الصيدلاني. الأنواع الثلاثة من العسل من أصول نباتية مختلفة (الجرجير، السدر، البيينة) آتية من منطقة جنوب الجزائر.

تم إجراء الدراسة على جزأين؛ بالنسبة للجزء الأول، تم إجراء التحاليل الفيزيائية والكيميائية للعسل مثل pH والحموضة الحرة ومحتوى الماء والرماد وكذلك الناقلية الكهربائية لأنواع العسل الثلاثة. بالنسبة للجزء الثاني، تم إجراء طريقتين لتحليل النشاط المضاد للفطريات؛ تقنية انتشار البئر وتقنية IMC (التركيز المثبط الأدنى).

كانت نتائج التحاليل الفيزيائية والكيميائية كلها موافقة للمعايير القياسية. أما بالنسبة لتحليل النشاط المضاد للفطريات، فقد كشفت التقنية الأولى عن تأثير مضاد للفطريات فقط لمضاد الفطريات ومزيج من مضاد الفطريات والعسل، مما يشير إلى وجود تآزر بين الأخيرين، بينما كشفت تقنية IMC عن وجود IMC مختلفة لأنواع العسل الثلاثة و SIC مختلفة لمخاليط نشا العسل ونشا العسل والشمع، مما يشير إلى التآزر بين هذين الخليطين الأخيرين.

في الختام، هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات لتقييم النشاط الفردي والمجمع لكل نوع من أنواع العسل والشمع، مع تعميق فهمنا لآلية عملهما.

الكلمات المفتاحية : عسل، شمع، نشا، مضاد للفطريات، IMC، نشاط مضاد للفطريات، تآزر.

# Summary

Fungal infections are growing health problems, with increasing resistance to antifungals. Honey and beeswax, known for their antimicrobial properties, including antifungal properties, offer a promising alternative in the treatment of these infections. However, more research is needed to assess their effectiveness and mechanism of action.

In this context, a study was conducted to evaluate the *in vitro* antifungal activity of three varieties of honey, wax and their synergistic antifungal activity against a fungal strain "Candida albicans", by adding starch and in comparison with a pharmaceutical antifungal. The three varieties of honey of different botanical origin (Rocket, Jujuba, Euphorbia), come from the region of southern Algeria.

The study was carried out in two parts ; For the first part, physicochemical analyzes of honey such as pH, free acidity, water and ash content as well as electrical conductivity were carried out for the three varieties of honey. As for the second part, two antifungal activity analysis techniques were carried out ; the well diffusion technique and the MIC (minimum inhibitory concentration) technique.

The results of the physicochemical analyzes were all in accordance with the standard norms. As for the analysis of the antifungal activity, the first technique revealed an antifungal effect only for the antifungal and the mixture of antifungal and honey, indicating a synergy between the latter two, while the technique of the CMI has revealed different MICs for honey, CISs for the honey-starch and honey-starch-wax mixtures, thus indicating a synergy between these last two mixtures.

In conclusion, further studies are required to assess the individual and combined activity of each type of honey and wax, as well as to develop quantitative tests measuring their contribution to antimicrobial activity, while deepening our understanding of their mechanism of stock.

**Keywords** : honey, wax, starch, C.albicans, antifungal, CMI, sinks, antifungal activity, synergy.



## Liste des abréviations

<b><i>C.albicans</i></b>	: <i>Candida albicans</i>
<b>pH</b>	: Potentiel d'hydrogène
<b>pHe</b>	: pH du point équivalent
<b>meq</b>	: Milliéquivalent
<b>mS</b>	: Milisiemens
<b>M</b>	: Molarité / Concentration molaire
<b>v/v</b>	: volume sur volume
<b>McF</b>	: McFarland
<b>UFC</b>	: Unité formant colonie
<b>Ø</b>	: Diamètre
<b>cc</b>	: Centimètre cube
<b>BP</b>	: Boîte de pétri
<b>D</b>	: Miel de roquette
<b>S</b>	: Miel de jujubier
<b>E</b>	: Miel d'euphorbe
<b>CMI</b>	: Concentration minimale inhibitrice
<b>CMA</b>	: Concentration minimale inhibitrice additive
<b>CMS</b>	: Concentration minimale inhibitrice synergique

## Liste des tableaux

<b>Tableau N°1</b> : Origines des échantillons de miel .....	4
<b>Tableau N°2</b> : Caractéristiques des échantillons de miel .....	4
<b>Tableau N°3</b> : Détails de la technique de diffusion par puits dans les boites de 90mm Ø .....	13
<b>Tableau N°4</b> : Détails de la technique de diffusion par puits dans les boites de 60mm Ø .....	13
<b>Tableau N°5</b> : Détails de la technique de la CIM.....	15
<b>Tableau N°6</b> : Résultats des analyses physico-chimiques des échantillons de miels .....	16
<b>Tableau N°7</b> : Résultats de la technique de diffusion par puits dans les boites de 90mm Ø ..	20
<b>Tableau N°8</b> : Résultats de la technique de diffusion par puits dans les boites de 60mm Ø ..	20
<b>Tableau N°9</b> : Résultats de la technique de la CMI .....	22

## Liste des figures

<b>Figure N°1</b> : Protocole expérimental.....	6
<b>Figure N°2</b> : Echantillons des trois variétés de miel .....	11
<b>Figure N°3</b> : Réalisation des puits .....	12

<b>Remercîment</b>	
<b>Dédicace</b>	
<b>Résumé</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Liste des figures</b>	

## **Table des matières**

Introduction .....	1
<b>Chapitre I</b> .....	5
I.1. Objet d'étude.....	4
I.2. Lieu et durée d'étude .....	4
I.3. Matériel et méthodes.....	4
I.3.1. Matériel expérimental .....	4
I.3.1.1. Matière première.....	4
I.3.1.2. Matériel biologique.....	5
I.3.1.3. Matériel de laboratoire, instruments et réactifs .....	5
I.3.2. Méthodes expérimentales .....	6
I.3.2.1. Protocole expérimental .....	6
I.3.2.2. Analyses physico-chimique .....	6
I.3.2.3. Analyses de l'activité biologique (activité antifongique).....	11
<b>Chapitre II</b> .....	16
II. Résultats et discussion .....	16
II.1. Analyses physicochimiques .....	16
II.1.1. pH et acidité libre .....	17
II.1.2. Teneur en eau .....	17
II.1.3. Teneur en cendre .....	18
II.1.4. Conductivité électrique .....	18
II.2. Analyses de l'activité antifongique.....	20
II.2.1. Technique de diffusion par puits .....	20
II.2.2. Technique de la CMI.....	22
Conclusion.....	25
<b>Références bibliographiques</b> .....	26
<b>Annexes</b> .....	30

# **Introduction**

### Introduction

Les maladies infectieuses fongiques constituent un problème croissant dans le domaine de la santé, avec une incidence en constante augmentation. Ces infections également connues sous le nom de mycoses, sont provoquées par des agents pathogènes fongiques, aussi connus sous le nom de champignons. Ces organismes microscopiques généralement opportunistes sont omniprésents dans notre environnement, mais ils peuvent parfois devenir des agents pathogènes redoutables chez les individus dont l'affaiblissement du système immunitaire ou chez ceux qui sont exposés à des facteurs favorisant leur prolifération (ANOFEL, 2013).

Les mycoses affectent une grande diversité de tissus et d'organes chez l'homme, allant des infections superficielles de la peau et des ongles aux infections systémiques potentiellement mortelles. Ils peuvent également toucher les individus de tout âge et de tout milieu. Leur diversité est remarquable, avec une grande variété de champignons responsables de ces infections (Calderone et Fonzi, 2001).

La diversité des infections fongiques est impressionnante. Il existe une multitude d'espèces de champignons capables de provoquer des infections chez les humains, allant des espèces les plus courantes, telles que *Candida* et *Aspergillus*, aux espèces plus rares, telles que *Cryptococcus* et *Histoplasma*. Chaque type d'infection fongique présente des caractéristiques spécifiques, des symptômes différents et peut nécessiter des approches de traitement distinctes (ANOFEL, 2013). Parmi les maladies infectieuses mycologiques les plus répandues on trouve la candidose :

La candidose qui est causée par le *Candida*, un type de levure qui fait naturellement partie de la flore microbienne présente dans notre corps, en particulier dans la bouche, le tube digestif et le vagin, pouvant se retrouver également sur la peau. Cependant, des facteurs tels qu'un système immunitaire affaibli, une prise d'antibiotiques à large spectre, une humidité abusive ou des déséquilibres hormonaux, le diabète et la grossesse peuvent entraîner une prolifération excessive de *Candida*, provoquant ainsi une infection. Les symptômes courants de la candidose comprennent des éruptions cutanées, des démangeaisons, des brûlures, des pertes vaginales anormales et des infections des ongles (ANOFEL, 2013).

Outre la candidose, il existe d'autres types de maladies infectieuses mycologiques causées par d'autres champignons tels que l'*Aspergillus*, le *Cryptococcus* et le *Pneumocystis*. Ces infections peuvent être contractées par inhalation de spores fongiques présentes dans l'air, par contact avec des surfaces contaminées ou par le biais de relations sexuelles non protégées dans le cas de la candidose génitale (ANOFEL, 2013).

Le traitement traditionnel des infections fongiques repose souvent sur l'utilisation d'antifongiques chimiques, tels que les azolés, les polyènes et les échinocandines. Cependant, l'émergence de la résistance aux antifongiques est devenue un défi majeur dans la gestion de ces infections. La résistance aux médicaments antifongiques peut être innée ou acquise, résultant de mutations génétiques ou de l'expression de mécanismes de résistance par les champignons, ceci due à l'utilisation fréquente ou inappropriée d'antifongiques, des doses insuffisantes ou une durée de traitement inadéquate. La résistance aux antifongiques est un problème croissant et préoccupant en matière de santé publique, car cela limite les options de traitement efficaces et augmente la morbidité et la mortalité associées à ces infections (Sanglard D et al., 2002).

Face à cette problématique, de nombreuses recherches se sont concentrées sur l'exploration de remèdes naturels et alternatifs. Parmi ces options, le miel et la cire d'abeille qui ont suscité un intérêt particulier en raison de leurs propriétés antimicrobiennes, notamment leur activité antifongique.

Depuis l'Antiquité, le miel et la cire d'abeille sont utilisés à des fins médicales et thérapeutiques. Leur utilisation remonte à des civilisations anciennes, et des écrits historiques font référence à leur utilisation par des médecins renommés, notamment Hippocrate, considéré comme le père de la médecine moderne. Hippocrate, dans ses traités médicaux, mentionnait l'utilisation du miel comme un remède polyvalent pour diverses affections. Il reconnaissait ses propriétés antimicrobiennes, antibactériennes et antifongiques, et l'utilisait pour traiter des problèmes de peau, des infections, des plaies et des ulcères (**O.Belhaj et al., 2015**).

Le miel est un produit sucré et visqueux produit par les abeilles à partir du nectar des fleurs ou des sécrétions sucrées d'insectes appelées miellats. Il est récolté et utilisé par les abeilles comme une source de nourriture pour leur colonie. Le miel présente une composition complexe, avec une combinaison de sucres principalement de glucose et de fructose, d'enzymes, de polyphénols, flavonoïdes et d'autres composés bioactifs tels que des acides aminés, des vitamines, des minéraux, des antioxydants (**O.Belhaj et al., 2015**).

Les composants du miel lui confèrent des caractéristiques uniques et de propriétés bénéfiques pour la santé. Il possède des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, cicatrisantes, énergétiques et antimicrobiennes, notamment des effets antifongiques. Le miel est capable d'inhiber la croissance des champignons et des levures de par son environnement hyperosmotique qui déshydrate les cellules fongiques, ainsi qu'à la production de peroxyde d'hydrogène. Les propriétés spécifiques du miel peuvent varier en fonction de sa variété, de son origine géographique et des conditions de production (**O.Belhaj et al., 2015**).

La cire d'abeille, quant à elle, est une substance naturelle cireuse sécrétée par les glandes cirières des abeilles ouvrières. Elle est utilisée par les abeilles pour construire les alvéoles hexagonaux des rayons de la ruche, où elles stockent le miel, le pollen et élèvent leurs larves. En outre, elle possède des propriétés protectrices et émoullientes, elle a également des propriétés anti-inflammatoires et antiseptiques légères ainsi que des propriétés antimicrobiennes, y compris des effets antifongiques (**Filippo Fratini et al., 2016**).

La cire d'abeille est principalement composée d'esters de différents acides gras et d'alcools, tels que l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide oléique et l'alcool cétylique, perturbant les membranes cellulaires des champignons, inhibant leur croissance et leur reproduction. De plus, la cire d'abeille crée une barrière physique qui empêche la pénétration des champignons et peut aider à prévenir les infections fongiques. Elle contient également de petites quantités de composés tels que des hydrocarbures, des pigments et des traces de pollen. Sa composition exacte peut varier légèrement en fonction de la source florale et de la région géographique (**Filippo Fratini et al., 2016**).

L'utilisation du miel et de la cire d'abeille comme alternatives naturelles aux antifongiques conventionnels présente plusieurs avantages. Tout d'abord, ces substances sont disponibles et facilement accessibles. De plus, elles sont généralement bien tolérées par l'organisme, ce qui réduit les risques d'effets secondaires indésirables. Enfin, l'utilisation de produits naturels tels

que le miel et la cire d'abeille pourrait potentiellement contribuer à prévenir le développement de résistances aux antifongiques.

En revanche des études sont nécessaires pour évaluer plus en détail leur activité antifongique, notamment leur efficacité contre différents types de champignons pathogènes et leur mécanisme d'action. Une meilleure compréhension de ces propriétés antimicrobiennes permettrait de développer des stratégies thérapeutiques novatrices et d'explorer leur potentiel dans la prévention et le traitement des infections fongiques.

Dans cette étude, nous avons exploré les propriétés antimicrobiennes du miel et de la cire d'abeille, en mettant particulièrement l'accent sur leur activité antifongique contre *Candida albicans*. Nous avons examiné l'effet inhibiteur de trois variétés de miel sur la croissance fongique et évalué leur potentiel en tant qu'additifs ou qu'alternatives antifongiques prometteuses. Les résultats de cette étude pourraient ouvrir de nouvelles perspectives dans la lutte contre les infections fongiques et aider à développer des stratégies thérapeutiques efficaces et naturelles pour faire face à la résistance aux antifongiques conventionnels.





# Chapitre I

---

## *Matériel et méthodes*

---

## I.1. Objet d'étude

Cette étude a pour objectif de déterminer l'activité antifongique de trois variétés de miel vis à vis une espèce fongique "*Candida albicans*", ainsi de démontrer quelconque synergie antifongique entre ces miels et une cire d'abeille.

## I.2. Lieu et durée d'étude

L'étude a été réalisée en deux parties, l'analyse physico-chimique et l'activité antifongique :

- **L'analyse physico-chimique**, l'étude a été effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie, et de biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Ibn khaldoun-Tiaret, pendant une période allant du 8 Mars au 16 Mars 2023.
- **L'activité antifongique**, l'étude a été effectuée au niveau du laboratoire de Microbiologie de la faculté des Sciences vétérinaires Université Ibn Khaldoun de Tiaret, pendant une période allant du 12 Février au 22 Mars 2023.

## I.3. Matériel et méthodes

### I.3.1. Matériel expérimental

#### I.3.1.1. Matière première

- **Miel**

L'étude a été porté sur trois variété de miels de diffèrent origine botanique, tous provenant d'une récolte de 2022, ces miels nous ont été fourni par un apiculteur professionnel 'Bouabdelli Elhadj', tous conservés dans des pots en verre hermétiquement fermés d'une contenance de 250g. Les miels étaient conservés à la température ambiante du laboratoire (envirant 20°C) dans une zone obscure empêchant toute altération avec les rayons du soleil, ceci durera tout le long du travail.

**Tableau N°1** : Origines des échantillons de miel

Echantillon de miel	Origine botanique	Nom scientifique de l'O.B	Origine géographique
Echantillon 1 (D)	Roquette	Eruca sativa	Tindouf
Echantillon 2 (S)	Jujubier	Ziziphus jujuba	Laghouat
Echantillon 3 (E)	Euphorbe	Euphorbia guyoniana boiss	Laghouat

**Tableau N°2** : Caractéristiques organoleptiques des échantillons de miel

Echantillon de miel	Couleur	Texture	Goût
Echantillon 1 (D)	Jaune pâle claire jusqu'à blanchâtre.	Onctueux, crémeux, cristallisant rapidement.	Saveur douce légèrement florale, sobre et tenace. Peu sucré.
Echantillon 2 (S)	Ambre dorée, brun clair et translucide.	Onctueux, doux et suave, liquide épais.	Saveur délicate de caramel, parfumée d'une légère note florale. Moyennement sucré.
Echantillon 3 (E)	Caramel foncé et ambré.	Onctueux, peu visqueux et crémeux, liquide remarquablement épais.	Goût légèrement épicé, piquant et intense, fort et prononcé, avec un arrière-goût de caramel. Assez à fortement sucré.

- **Cire**

La cire utilisée s'agit d'une cire jaune en forme de pain d'à peu près 20cm de long et 8cm de large, extraite manuellement. Cette cire provenait de Laghouat et du même apiculteur cité auparavant.

### **I.3.1.2. Matériel biologique**

- **Souche fongique**

Nous avons utilisé pendant l'étude un isolat de '*Candida albicans*', cet isolat nous a été fourni par 'le laboratoire de Microbiologie de la faculté des Sciences vétérinaires Université Ibn Khaldoun de Tiaret', cet isolat est d'origine animal, provenant des métrites 'infection de l'utérus' d'une jument.

- **Milieu de culture**

Le milieu de culture utilisé dans cette étude est la gélose Sabouraud.

### **I.3.1.3. Matériel de laboratoire, instruments et réactifs**

- **Appareillages**

- Balance analytique (Ohaus).
- Plaque agitatrice.
- PH-mètre (Mettler Toledo).
- Réfractomètre (Abbe avec thermomètre intégré).
- Four à moufle (Heraeus).
- Conductimètre (Hanna EC 214 avec thermomètre intégré).
- Micro-onde (Wairlpool).
- Spectrophotomètre (Pharmacia Biotech Nova spec).
- Etuve (Heraeus).
- Bain marie thermostaté (Heidolph).

- **Produits**

- Eau de javel, alcool.
- Eau distillée et/ou physiologique.
- Solutions de tampon pH 4 et pH 7.
- Hydroxyde de sodium NaOH (0.05M).
- Chlorure de potassium KCl (0.1M).
- Amidon de pomme de terre.
- Pommade antifongique 'Dermofix'.

- **Consommables, instruments et verreries de laboratoire**

- Blouse, gants, masque.
- Bêchers, fiole jaugée de 50 ml, burette graduée, bêchers forme haute/éprouvette, creuset en porcelaine, dessiccateur, tubes à essai, seringue en verre, pipettes pasteur.
- Bec benzène.
- Petit flacon en plastique, règle graduée, cuve du spectrophotomètre, boîtes de pétri de Ø de 90mm et 60mm, portoirs à tube, écouvillons stériles.
- Anse de platine, barreau magnétique, spatules.

### I.3.2. Méthodes expérimentales

#### I.3.2.1. Protocole expérimental

Le protocole expérimental adapté pour notre travail se résume dans la figure ci-dessous :

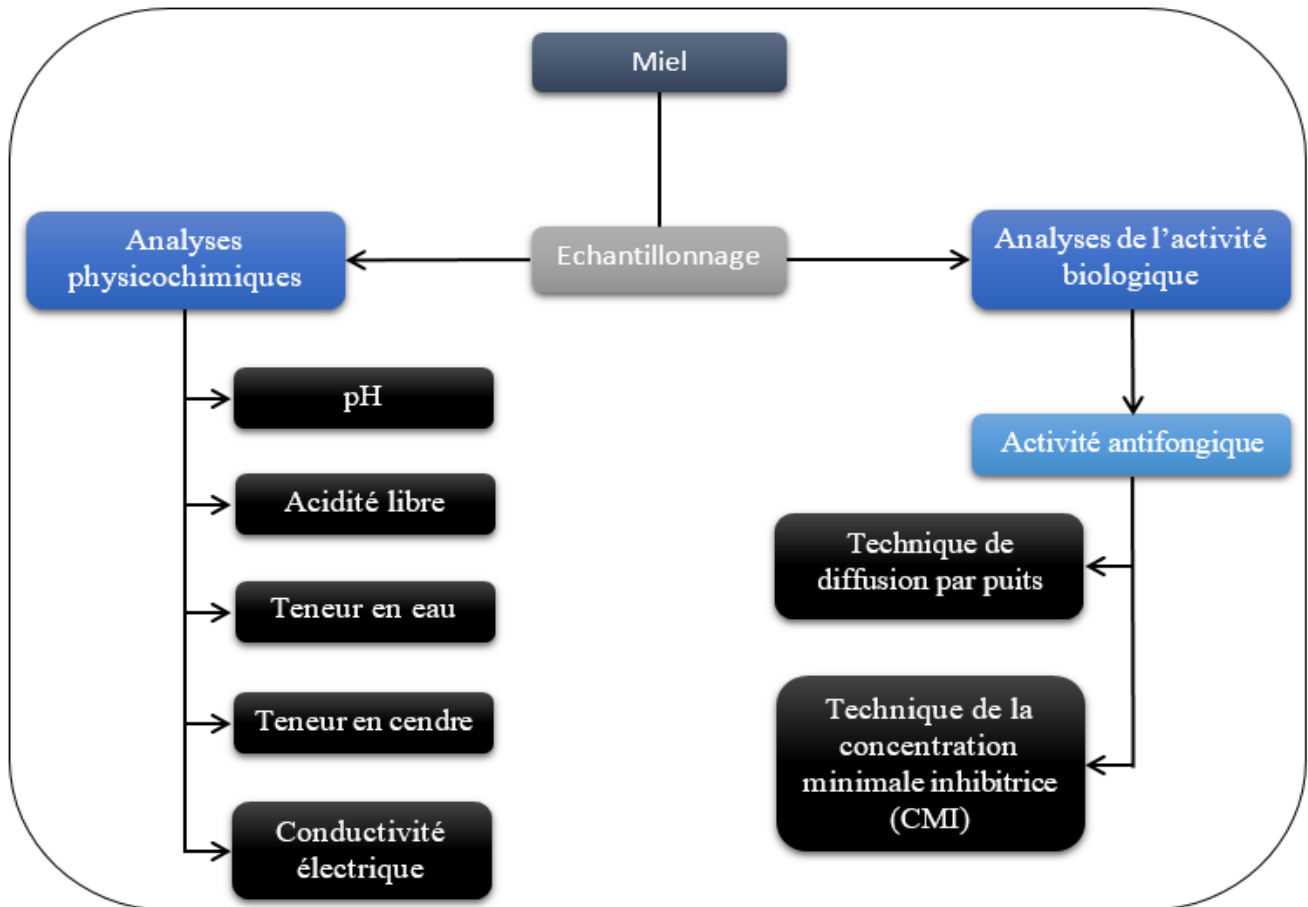


Figure N°1 : Protocole expérimental

#### I.3.2.2. Analyses physico-chimique

Diverses analyses physico-chimiques ont été effectuées sur nos échantillons de miel dont on disposait : le pH, la teneur en eau et en cendre ainsi que la conductivité électrique.

##### I.3.2.2.1. pH et acidité libre

- **Principe**

Le pH ou potentiel d'hydrogène, est la mesure du coefficient spécifiant l'acidité ou la basicité d'un milieu. Il représente la concentration des ions  $H^+$  d'une solution à 10% (Nair, 2014). L'acidité libre du miel est la teneur de tous les acides libres, exprimée en milliéquivalents/kg de miel.

Le pH est mesuré sur une solution de miel à 10%. L'acidité libre est obtenue en traçant la courbe de neutralisation avec une solution d'hydroxyde de sodium et en déterminant le pH du point d'équivalence (pHe) (Bogdanov et al., 1997).

- **Procédure**

Les étapes à suivre pour y procéder selon Bogdanov et al., (1997) sont les suivantes :

**Etape 01 : Etalonnage de l'appareille**

Pour l'étalonnage du pH-mètre on a utilisé deux solutions tampons de pH 4 et pH 7.

On plonge l'électrode dans chaque solution de calibration et on attend la stabilisation de la mesure, après chaque mesure on rince l'électrode avec de l'eau distillé et on essuie avec du papier Josef.

**Etape 02 : Préparation de l'échantillon à analyser**

On pèse dans un petit bécher 5g de miel et on le dissout dans quelques millilitres d'eau 50ml d'eau distillé on transpose quantitativement dans une fiole jaugée de 50ml et on remplit jusqu'au trait de jauge avec de l'eau (dilution  $\frac{1}{10}$ , v/v), puis on homogénéise en agitant.

**Etape 03 : Analyse**

On rince l'électrode à l'eau distillée et on sèche avec du papier joseph, ensuite on pipete 25ml de la solution de miel dans un bécher, on place ce dernier sur un agitateur magnétique en y introduisant un barreau magnétique, puis on plonge l'électrode propre et sèche dans la solution à analyser, on attend la stabilisation de la valeur du pH et on note la valeur du pH initial (pHi), ensuite on titre avec du NaOH 0,05M jusqu'au point équivalent ('pHe' = pH compris entre 8,3 et 9).

**Note** : le titrage doit être rapide, l'effectuant en 2 minutes près.

**Etape 04. Expression des résultats**

- Pour le pH ; la valeur du est directement lue sur l'écran de l'appareil (pHi).
- Pour l'acidité libre ; l'acidité libre est exprimée en milliéquivalents de soude nécessaire pour neutraliser 1kg de miel, on obtient la valeur de l'acidité libre en la calculant à l'aide de la formule suivante :

$$AL = \frac{V \times C \times 50/25 \times 1000}{M}$$

Où :

$AL_{(meq/kg)}$  : Acidité libre.

$V_{(ml)}$  : Volume d'hydroxyde de sodium versé pour atteindre le pH du point équivalent E lors de la neutralisation du miel.

$C_{(N)}$  : Normalité d'hydroxyde de sodium.

$50/25$  : Rapport du volume de solvant initial du miel sur le volume de solution de miel pris à l'analyse.

$M_{(g)}$  : Prise d'essai (masse de miel utilisé).

**I.3.2.2.2. Teneur en eau**

- **Principe**

La détermination de la teneur en eau s'effectue par la mesure optique de l'indice de réfraction du miel à 20°C à l'aide d'un réfractomètre (type Abbe accompagné d'un thermomètre), par référence à une table standard. La méthode est basée sur le principe que l'indice de réfraction augmente avec la teneur en solides (**Bogdanov et al., 1997**).

- **Procédure**

Les étapes à suivre pour y procéder selon **Bogdanov et al., (1997)** sont les suivantes :

**Etape 01 : Etalonnage de l'appareille**

Pour l'étalonnage du Refractomètre type Abbe, on a utilisé de l'eau distillée.

On recouvre uniformément toute la surface du prisme propre et sèche du refractomètre avec de l'eau distillée en couche mince, on ferme notre appareil puis on fait la lecture, L'indice de réfraction de l'eau à 20°C est de 1,3330.

**Etape 02 : Préparation de l'échantillon à analyser**

On pèse dans un tube à essai 5g de miel et on le dissout dans 50ml d'eau distillé (dilution $\frac{1}{10}$ , v/v), on referme bien notre tube et on homogénéise en agitant ensuite on fait chauffer au bain marie à une température de 50°C ( $\pm 0,2^\circ\text{C}$ ) jusqu'à ce que tous les cristaux de sucre soient dissous, puis on laisse refroidir la solution à température ambiante et on agite à nouveau.

**Etape 03 : Analyse**

On dépose une goutte de la solution de miel préparé sur le prisme propre et sèche du réfractomètre et on répartit uniformément en couche mince, on ferme notre appareil et on attend 2min pour faire la lecture sans oublier de noter la température du prisme.

**Note** : il faut nettoyer soigneusement le prisme après utilisation.

**Etape 04. Expression des résultats**

On mesure chaque miel deux fois et on prend la valeur moyenne.

Après 2 minutes on fait notre lecture d'indice de réfraction, puis on obtient la valeur de la teneur en eau en se référant au tableau de 'Chataway' (Annexe N°1).

**Note** :

- Si la mesure a été effectuée à une température différente de 20°C, la lecture doit être corrigée pour ramener l'indice de réfraction à 20°C ; la correction est additive, si la mesure est faite au-dessus de 20°C, soustractive dans le cas contraire. Le facteur de correction est de 0,00023 par degré Celsius.
- La méthode se réfère uniquement à l'utilisation du réfractomètre d'Abbé, pas aux instruments numériques.

**I.3.2.2.3. Teneur en cendre****• Principe**

Le principe de cette analyse est la destruction de la matière organique contenu dans le miel après incinération de ce dernier à une température ne dépassant pas 600°C, le résidu obtenu représente la matière minéral contenu dans le miel ou autrement dit la teneur en cendre du miel (**Bogdanov et al., 1997**)

**• Procédure**

Les étapes à suivre pour y procéder selon le **Codex alimentarius (2001)** sont les suivantes :

**Etape 01 : Préparation de l'échantillon à analyser**

On pèse dans un creuset 5g de miel à 0,001g près.

**Note** : la capsule/creuset doit être pesée vide.

**Etape 02 : Analyse**

Afin d'éviter la production de mousse, on carbonise l'échantillon de miel se trouvant dans la capsule à l'aide du bec Bunsen, ensuite on place l'échantillon de miel dans un four à moufle à 550°C pendant 3h-5h, jusqu'à l'obtention d'une couleur grise claire ou blanchâtre, on retire la capsule du four et on la mets à refroidir dans un dessiccateur, puis on pèse le poids final de la capsule.

**Etape 03. Calcul et expression des résultats**

On obtient la valeur de la teneur en cendre en la calculant à l'aide de la formule suivante :

$$M_m = \left( \frac{m_2 - m_1}{m_0} \right) 100$$

Où :

$M_m(\%)$  : Matière minérale.

$m_0(g)$  : Masse initiale du miel.

$m_1(g)$  : Masse de la capsule vide.

$m_2(g)$  : Masse de la capsule après incinération.

**I.3.2.2.4. Conductivité électrique**

- **Principe**

La conductivité électrique d'une solution de 20g de matière sèche de miel dans 100 ml d'eau distillée (20% poids en volume dans de l'eau) à 20°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ), où les 20% désignent la matière sèche du miel, est mesurée à l'aide d'une cellule de conductivité électrique, la détermination de la conductivité électrique est basée sur la mesure de la résistance électrique, dont la conductivité électrique est l'inverse. Le résultat est exprimé en milliSiemens par centimètre (mS.cm-1) **Bogdanov et al., (1997)**.

- **Procédure**

Les étapes à suivre pour y procéder selon **Bogdanov et al., (1997)** sont les suivantes :

**Etape 01 : Etalonnage de l'appareille**

Pour le calibrage du conductimètre, on a utilisé du KCl 0.1M fraîchement préparé.

- Dans le cas où la constante de cellule de la cellule de conductivité est connue, on s'en passe de la méthode décrite par la suite et on procède directement à l'analyse.
- Dans le cas où la constante de cellule de la cellule de conductivité n'est pas connue, on y procède comme suit : on verse 40 ml de la solution de chlorure de potassium dans un bécher, ensuite on connecte la cellule de conductivité au conductimètre, puis on rince soigneusement la cellule avec la solution de chlorure de potassium et on plonge la cellule dans la solution, une fois la température 20°C est atteinte on fait notre lecture de la conductivité électrique de la solution de KCl en mS.

\* On calcule la constante de cellule K à l'aide de la formule suivante :

$$K = 11,691 \times \frac{1}{G}$$

Où :

$K_{(\text{cm}^{-1})}$  : Constante de cellule.

$G_{(\text{mS})}$  : Conductivité électrique, mesurée avec la cellule de conductivité.

$11,691_{(\text{mS.cm}^{-1})}$  : Somme de la valeur moyenne de la conductivité électrique de l'eau fraîchement distillée et de la conductivité électrique d'une solution de chlorure de potassium 0,1M à 20 °C.

**Note :**

- Rincer soigneusement l'électrode avec de l'eau distillée après la détermination de la constante de cellule.
- Lorsqu'elle n'est pas utilisée, conserver l'électrode dans de l'eau distillée afin d'éviter le vieillissement de l'électrode de platine.

### Etape 02 : Préparation de l'échantillon à analyser

On pèse dans une fiole 20g de miel et on le dissout dans 100ml d'eau distillé (dilution  $\frac{1}{5}$ , v/v), puis on homogénéise en agitant.

### Etape 03 : Analyse

On verse environ 40ml ( $\frac{2}{5}$ , v/v) de la solution d'échantillon dans un bécher forme haute et on place ce dernier dans un bain-marie réglé à 20°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ). On rince soigneusement la cellule de conductivité avec le reste de la solution d'échantillon, puis on plonge la cellule de conductivité dans la solution d'échantillon, une fois la température voulu est atteinte on fait notre lecture.

**Note :** La plupart des conductimètres sont à courant continu, afin d'éviter les faux résultats dus aux effets de polarisation, le temps de mesure doit être le plus court possible.

### Etape 04. Calcul et expression des résultats

On fait la lecture de la valeur de conductance à 20°C qui s'affiche de l'écran du conductimètre.

**Note :** Si la détermination est effectuée à une température différente de 20°C, faute de cellule thermostatée, la lecture doit être corrigée pour ramener le calcul de la valeur de conductance à 20°C ; la correction est additive, si la mesure est faite au-dessous de 20°C, soustractive dans le cas contraire. Le facteur de correction est de 3,2% de la valeur par °C (Degré Celsius).

\* On calcule la conductivité électrique de la solution de miel à l'aide de la formule suivante :

$$S_H = K \cdot G'$$

Où :

$S_H_{(\text{mS.cm}^{-1})}$  : Conductivité électrique de la solution de miel.

$K_{(\text{cm}^{-1})}$  : Constante de cellule.

$G'_{(\text{mS})}$  : Conductance mesurée avec le conductimètre.

\* Le résultat est exprimé à  $0.01_{\text{mS.cm}^{-1}}$  près.



### I.3.2.3. Analyses de l'activité biologique (activité antifongique)

Le travail doit être réalisé dans les conditions d'asepsie (après avoir désinfecté la paillasse et allumer le Bec B).

Afin d'éviter quelque contamination, on a prélevé les échantillons de miel dans des flacons en plastique en les marquant pour pouvoir les différenciés l'un de l'autre en plus de facilité le travail.

**D (Djerdjir)** pour le miel de **Roquette**

**S (Sidr)** pour le miel de **Jujubier**

**E (Elbina)** pour le miel d'**Euphorbe**

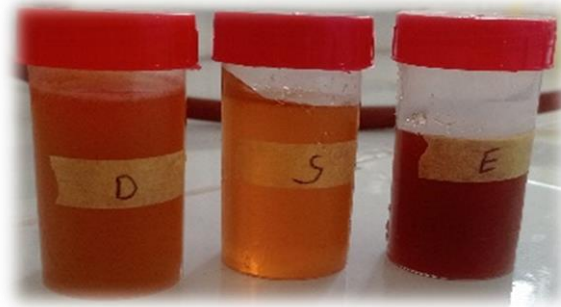


Figure N°2 : Echantillons des trois variétés de miel

#### • Préparation de l'inoculum

Afin de préparer un inoculum selon **Eucast (2000)** et **Sib (2007)**, on y procède comme suit :

- On réalise tout d'abord un repiquage, en utilisant une anse de platine stérile on prélève un inoculum et on l'ensemence à la surface du milieu Sabouraud (préalablement coulé dans une boîte de pétri stérile) par la méthode d'épuisement, puis on incube à une température de 37°C pendant 24 à 48 h.
- À partir des cultures jeunes de 18 à 24 h, on prélève quelques colonies à l'aide d'une pipette pasteur stérile, puis on introduit la pipette dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile se trouvant dans un tube à essai stérile, on agite bien afin d'homogénéiser notre suspension, ensuite on ajuste sa concentration à une densité optique de 0.08 à 0.13 (0.5McF) par le spectrophotomètre UV visible lue à 625nm équivalent à  $10^8$ UFC/ml.

**Note** : lors de l'ensemencement il ne faut dépasser les 15min après la standardisation de la suspension, afin d'éviter l'augmentation de la charge microbienne.

Toute incubation de la culture *C.albicans* se fait à une température de 37°C.

#### I.3.2.3.1. Technique de diffusion par puits

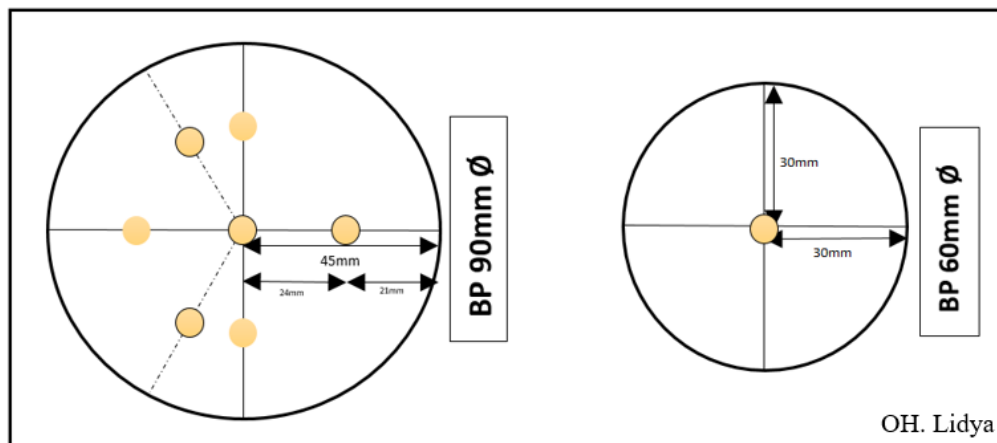
##### • Principe

Cette technique a pour but de déterminer une zone d'inhibition et par la suite en déduire la sensibilité microbienne ou autrement dit le pouvoir inhibitoire de la substance étudiée, ceci est effectué grâce à un criblage et/ou diffusion dans le milieu de culture (**Perez et al., 1990**).

- **Procédure**

Les étapes à suivre pour y procéder selon **Melissa et al., (2004)** sont les suivantes :



- On prépare les boîtes de pétri à ensemercer en inscrivant au-dessous de chaque boîte un code propre à chaque test afin de faciliter le travail.
- On coule 5ml de gélose dans les boîtes de pétri, et on laisse sécher.
- Après standardisation de la culture, on ensemece sur la surface nos boîtes préalablement coulées avec l'inoculum à l'aide d'un écouvillon stérile, puis on incube pendant 15 min.
- À l'aide de la partie inférieure d'une pipette pasteur on perfore la gélose ensemençée préparé précédemment pour y laisser des puits de (6mm Ø).
- **Dans les boîtes de pétri de 90mm Ø ; de 1 jusqu'à 5 puits**
- **Dans les boîtes de pétri de 60mm Ø ; 1 seul puits au centre, petite boîte afin de réduire ou autrement dit restreindre la zone de diffusion.**




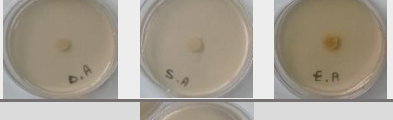







**Figure N°3** : Réalisation des puits

- On prépare les échantillons de miel, amidon, cire à tester, en faisant fondre le miel dans un bain marie à une température qui ne dépasse pas les 50°C, la cire soit au bain marie soit aux micro-ondes et en pesant l'amidon à la balance, (les concentrations sont précisées dans le tableau ci-dessous)
  - À l'aide d'une anse de platine ou d'une seringue, on remplit nos puits avec les préparations précédentes (selon leur code inscrit).
  - On incube pendant 24h à une température de 37°C.
  - Après 24h on fait notre lecture.
- \* Si aucune zone d'inhibition n'apparaît ; le résultat est négatif (-).
  - \* Si une zone d'inhibition apparaît ; le résultat est positif (+), on mesure la zone d'inhibition avec une règle.
  - \* On considère une souche sensible si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 10mm, résistante si le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 10mm, la sensibilité est intermédiaire si le diamètre est égal à 10mm (**Merah et al., 2010**).

**Tableau N°3** : Détails de la technique de diffusion par puits dans les boîtes de 90mm Ø

Ingrédients	Codes	Dose (cc/ml, mg)	Photos
Miel	M : D, S, E	1M	
Miel/Amidon	MA : D, S, E	1M + 1/2A	

**Tableau N°4** : Détails de la technique de diffusion par puits dans les boîtes de 60mm Ø

Ingrédients	Codes	Dose (cc/ml, mg)	Photos
Miel	D, S, E	1M	
Miel/Amidon	AD, AS, AE	1M + 1/2A	
Témoin amidon	TA	1A	
Miel + Cire	CD, CS, CE	1M + 1/2C	
Cire + Amidon	CA	1C + 1A	
Témoin cire	TC	1C	
Miel + Cire + Amidon	CAD, CAS, CAE	1M + 1/2A + 1/2C	
Antifongique	AF	1AF	
Antifongique + Miel	AFD, AFS, AFE	1/2AF + 1/2M	

### I.3.2.3.2. Technique de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

- **Principe**

Cette technique a pour but de déterminer l'estimation de la Concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est la concentration d'une substance empêchant totalement la croissance microbienne, ceci se fait par incorporation de substance inhibitrice au milieu de culture [(Molan, 1992) ; (Kempf M et al., 2011)].

Selon **É. Denes et al., (2009)** d'autres termes sont utilisés pour désigner les concentrations minimales inhibitrices, tel que :

➤ **Concentration minimale inhibitrice à effet additif (CIA) :**

**Addition** : phénomène qui survient lorsque l'effet combiné d'au moins deux substances est égal à la somme des effets de chaque substance pris individuellement (aucune interaction directe) ; l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque substance étudié séparément à la même concentration que dans l'association.

**CIA** : la concentration d'une substance associée à une autre empêchant totalement la croissance microbienne, dans ce cas la valeur de la CIA est similaire à celle de la CMI.

➤ **Concentration minimale inhibitrice à effet synergique (CIS) :**

**Synergie** : désignant l'interaction entre au moins deux substances dont les effets combinés sont supérieurs à la somme de leurs propres effets (effets de type « un plus un est supérieur à deux » ; l'effet de l'association est significativement supérieur à la somme des activités de chaque substance étudié séparément à la même concentration.

**CIS** : la concentration d'une substance associée à une autre empêchant totalement la croissance microbienne, dans ce cas la valeur de la CIS est inférieure à celle de la CMI.

• **Procédure**

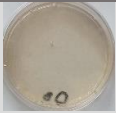

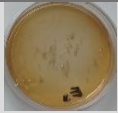


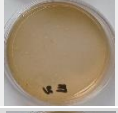

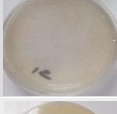






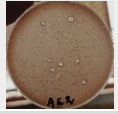











Les étapes à suivre pour y procéder selon **Molan, (1992)** et **Kempf M et al., (2011)** sont les suivantes :

- On prépare les boîtes de pétri à ensemercer en inscrivant au-dessous de chaque boîte un code propre à chaque test afin de faciliter le travail.
- On prépare les échantillons de miel, amidon, cire a incorporé au milieu de culture, en faisant fondre le miel dans un bain marie à une température qui ne dépasse pas les 50°C, fondre la cire sois au bain marie sois aux micro-ondes, fondre
- Le milieu de culture aux micro-ondes et en pesant l'amidon à la balance (les concentrations sont précisées dans le tableau ci-dessous).
- On coule 5ml des préparations précédentes dans les boîtes de pétri (selon leur code inscrits), et on laisse sécher.
- Après standardisation de la culture, on ensemece sur la surface de nos boîtes précédemment préparées avec l'inoculum à l'aide d'un écouvillon stérile.
- On incube pendant 24h à une température de 37°C.
- Après 24h on fait notre lecture.

\* si on aperçoit une croissance de culture fongique ; le résultat est positif (+).

\* si on n'aperçoit aucune croissance de culture fongique ; le résultat est alors négatif (-).

Tableau N°5 : Détails de la technique de la CIM

Ingrédients	Codes	Dose (cc/ml, mg)	Photos
Miel Incorporé à la gélose	D1, S1, E1	3M + 1G	  
	D2, S2, E2	2 M + 2 G	  
	D3, S3, E3	1 M + 3G	  
	<b>Témoin ; T</b>	4G	
Miel + Amidon Incorporé à la gélose	AD1, AS1, AE1	3M + 1A + 1G	  
	AD2, AS2, AE2	2 M + 1A + 2 G	  
	AD3, AS3, AE3	1 M + 1A + 3G	  
	<b>Témoin amidon ; TA</b>	1A + 4G	
Miel + Amidon + Cire Incorporé à la gélose	CAD1, CAS1, CAE1	2M + 1C + 1A + 1G	  
	CAD2, CAS2, CAE2	1M + 1C + 1A + 2 G	  
	<b>Témoin cire ; TC</b>	1C + 4G	

# Chapitre II

---

## *Résultats et discussion*

---

## II. Résultats et discussion

### II.1. Analyses physicochimiques

Les données des résultats des analyses physicochimiques des échantillons étudiés sont données dans le tableau suivant :

**Tableau N°6** : Résultats des analyses physico-chimiques des échantillons de miels

Analyse physico-chimique	Type de miel	Valeur moyenne + Ecart-type	Valeur minimale et maximale	Limite standard international
PH	Roquette ; D	$3.46 \pm 0.19$	3.45 – 3.82	Miel de nectar : 3.5 – 4.5 Miel de miellat : 5 – 5.5 Mélanges des deux sortes de miels : 3.5 – 5.5
	Jujubier ; S	$4.20 \pm 0.02$	4.18 – 4.22	
	Euphorbe ; E	$3.49 \pm 0.17$	3.32 – 3.66	
Acidité libre ( <i>meq/kg</i> )	Roquette ; D	$22 \pm 2$	20 – 24	Pas plus de 50 <sub>meq/kg</sub>
	Jujubier ; S	$21 \pm 3$	18 – 24	
	Euphorbe ; E	$35 \pm 1$	34 – 36	
Teneur en eau (%)	Roquette ; D	$18.2 \pm 0.60$	17.6 – 18.8	Pas plus de 20%
	Jujubier ; S	$14.3 \pm 0.70$	13.6 – 15	
	Euphorbe ; E	$13.8 \pm 0$	13.8	
Teneur en cendre (%)	Roquette ; D	$0.072 \pm 0$	0.072	Miel de nectar : Pas plus de 0.6% Miel de miellat : Pas de moins 0.6% Pas plus de 1.2%
	Jujubier ; S	$0.137 \pm 0$	0.137	
	Euphorbe ; E	$0.159 \pm 0$	0.159	
Conductivité électrique ( <i>mS.cm<sup>-1</sup></i> )	Roquette ; D	$0.03 \pm 0$	0.03	Miel de nectar : Pas de plus de 0.8 <sub>mS.cm<sup>-1</sup></sub> Miel de miellat : Pas de moins de 0.8 <sub>mS.cm<sup>-1</sup></sub>
	Jujubier ; S	$0.065 \pm 0.005$	0.06 – 0.07	
	Euphorbe ; E	$0.08 \pm 0$	0.08	

\* Les résultats des analyses physico-chimiques des trois variétés de miel respectent les normes du **Codex Alimentarius (2001)**. Ils indiquent également que nos trois variétés de miels sont d'origine nectarifère.

### II.1.1. pH et acidité libre

La mesure du pH et de l'acidité revêt une grande importance dans la détermination du type de miel, comme le soulignent plusieurs études. Le pH et l'acidité libre jouent un rôle crucial dans la stabilité et la conservation du miel contre la fermentation et sa résistance à la détérioration microbienne. De plus, ils fournissent des informations précieuses sur l'origine géographique ou botanique du miel.

En général, les miels frais de haute qualité sont caractérisés par leur acidité, attribuable à la présence d'acides organiques tels que les acides gluconiques, maliques et citriques, qui peuvent être issus des sécrétions digestives des abeilles pendant la production du miel ou de l'origine botanique des fleurs butinées. Ces acides contribuent à la saveur caractéristique du miel. L'analyse de l'acidité libre permet de quantifier ces acides et d'évaluer la qualité du miel, y compris son origine botanique, sa conservation et sa résistance à la détérioration microbienne (Naman et al., 2005). Le seuil à ne pas dépasser pour ces acides est de  $50_{\text{meq/kg}}$  (Codex Alimentarius 2001).

Habituellement les miels provenant du nectar ont un pH variant entre 3,5 et 4,5, tandis que ceux issus des miellats ont un pH variant entre 5 et 5,5. Les valeurs intermédiaires correspondent souvent à des mélanges de nectar et de miellat (Gonnet, 1986).

- \* Les échantillons de miel examinés affichaient un pH variant de 3.49 à 4.20. Ainsi une acidité libre qui varie de 21 à  $35_{\text{meq/kg}}$ . Aucun des échantillons étudiés ne dépassait la limite autorisée, ce qui indique leur fraîcheur.
- \* Les résultats du pH et de l'acidité libre obtenus pour le miel du jujubier (pH 4.20 et acidité libre de  $21_{\text{meq/kg}}$ ) sont proches de ceux obtenus pour le même type de miel rapportées par Bakchiche et al., (2017), leurs valeurs étaient d'une moyenne de 4.38 ( $\pm 0.008$ ) pour le pH, et d'une moyenne de  $26_{\text{meq/kg}}$  ( $\pm 0.2_{\text{meq/kg}}$ ) pour l'acidité libre. De même, pour le miel d'euphorbe, les résultats du pH et de l'acidité libre (pH 3.49 et acidité libre de  $35_{\text{meq/kg}}$ ) se rapprochent de ceux obtenus pour le même type de miel et rapportées par O.Belhadj et al., (2016), avec des valeurs moyennes de 4.38 pour le pH, et de  $22_{\text{meq/kg}}$  pour l'acidité libre.
- \* En revanche nos résultats obtenus pour le miel de jujubier étaient nettement différents de ceux obtenus par Hafsa Y.A et al., (2014) pour le même type de miel, la moyenne pour le pH était de 6.33 ( $\pm 0.01$ ), tandis que la moyenne pour l'acidité libre était de  $10_{\text{meq/kg}}$  ( $\pm 0.31_{\text{meq/kg}}$ ). Les résultats concernant le pH suggèrent que le miel analysé ne satisfaisait pas aux normes standards. Ainsi une nette variation de l'acidité qui peut être lié à son origine géographique ou à son conditionnement.

### II.1.2. Teneur en eau

La teneur en eau du miel est un facteur crucial pour évaluer sa maturité et sa stabilité lors du stockage, elle joue un rôle essentiel dans la conservation du miel, en prévenant la fermentation et la cristallisation. La teneur en eau du miel est liée à sa teneur en sucre, tandis que sa forte interaction entre les molécules de sucre et d'eau limite la disponibilité d'eau pour le développement des micro-organismes. Elle est influencée par des facteurs tels que la saison de récolte, le degré de maturité dans la ruche et les conditions climatiques, ainsi la composition et l'origine florale du miel [(Naman et al., 2005) ; (De Rodriguez et al., 2004)].

Si la teneur en eau du miel au-dessous de 20%, cela témoigne d'un degré de maturité optimal et d'une conservation appropriée du miel (Codex Alimentarius 2001).



- \* Les échantillons de miel examinés révèlent des niveaux d'humidité compris entre 13.8 et 18.2 %. Aucun échantillon examiné ne dépassait la limite autorisée, ce qui indique leur fraîcheur et leur bon conditionnement.
- \* Le résultat de la teneur en eau obtenu pour le miel de Jujubier (14.3%) est proche de celui obtenu et rapporté par **Hafsa Y.A et al., (2014)**, où sa valeur moyenne était de 14.3% ( $\pm 0.51\%$ ).
- \* Cependant, ce résultat diffère légèrement de celui obtenu par **Bakchiche et al., (2017)** pour le miel de Jujubier, avec une moyenne de 15.08% ( $\pm 0.51\%$ ). De même, pour le miel d'euphorbe, dont la teneur en eau d'une moyenne de 13.8% diffère considérablement de celle rapportée par **O.Belhadj et al., (2016)**, avec une moyenne de 18.4%. Ces différences pourraient être attribuées à la maturité du miel, à la saison de récolte, ou aux conditions climatiques de conservation.

### II.1.3. Teneur en cendre

L'analyse de la teneur en cendres est utilisée comme un indicateur de la pureté et de la qualité du miel. La teneur en cendres représente la quantité de matières minérales présente dans le miel. Ces matières minérales et leurs variations peuvent provenir de diverses sources telles que le sol, les fleurs, les polluants environnementaux ou les pratiques de manipulation du miel. Elle peut donc nous renseigner sur l'origine géographique et botanique du miel (**Finola et al., 2007**).

Il est généralement préférable que la teneur en cendres du miel soit faible, idéalement inférieure à 0,6% pour les miels provenant du nectar et comprise entre 0,6 et 1,2 % pour les miels provenant du miellat (**Codex Alimentarius 2001**).

- \* Les échantillons de miel analysés révèlent une variation de la teneur en cendres, allant de 0.072 à 0.195 %. Aucun des échantillons étudiés n'a dépassé la limite autorisée, ce qui confirme leur pureté. En conclusion, tous nos échantillons sont de type nectarifère.
- \* Le résultat de la teneur en cendre obtenu pour le miel d'euphorbe (0.159%) sont similaires à ceux rapportés pour le même type de miel par **O.Belhadj & al., (2016)**, où leur moyenne était de 0.1%.
- \* Le résultat de la teneur en cendre obtenu pour le miel de jujubier (0.137%) est différent de celui obtenu et rapporté pour le même type de miel par **Bakchiche et al., (2017)**, avec une moyenne de 0.46% ( $\pm 0.003\%$ ). La différence peut être liée aux différentes pratiques agricoles concernant l'origine botanique des miels.

### II.1.4. Conductivité électrique

La conductivité électrique du miel permet d'évaluer sa qualité et sa pureté en fournissant des informations sur sa composition et sa contamination éventuelle. Elle est influencée par le pH et l'acidité du milieu. C'est critère fiable lié à l'origine botanique du miel, et très souvent utilisé dans les routines de contrôle du miel au lieu de la teneur en cendres (**Terrab et al., 2003**).

Une conductivité électrique spécifique et stable est généralement associée à un miel pur de haute qualité Il est recommandé que la conductivité électrique du miel soit basse, idéalement inférieure à  $0.8_{mS.cm^{-1}}$  pour les miels provenant du nectar et supérieur à pour les miels provenant du miellat (**Codex Alimentarius 2001**).



- \* Les échantillons de miel examinés indiquent une conductivité électrique allant de 0.03 à 0.08 ( $mS.cm^{-1}$ ). Aucun échantillon ne dépasse la limite autorisée, confirmant ainsi leur pureté. Tous les échantillons sont de type nectarifère.
- \* Le résultat de conductivité électrique obtenu pour le miel de jujubier ( $0.07_{mS.cm^{-1}}$ ) diffère considérablement de celui obtenu et rapporté par **Hafsa Y.A et al., (2014)**, sa valeur était d'une moyenne de  $0.47_{mS.cm^{-1}} (\pm 0.01_{mS.cm^{-1}})$ , ainsi que celui rapporté par **Bakchiche et al., (2017)**, sa valeur était d'une moyenne de  $0.55_{mS.cm^{-1}} (\pm 0.004_{mS.cm^{-1}})$ . De même, pour le miel d'euphorbe, dont la conductivité électrique d'une moyenne de  $0.08_{mS.cm^{-1}}$  diffère de celle rapportée par **O.Belhadj et al., (2016)**, qui est d'une moyenne de  $0.32_{mS.cm^{-1}}$ . La différence peut être liée à la variation de l'acidité du miel, à la saison de récolte ou de conservation, ainsi qu'aux conditions climatiques.

## II.2. Analyses de l'activité antifongique










La résistance aux antifongiques couramment utilisés s'aggrave progressivement, comme en témoigne le cas des azoles tels que le fluconazole. Bien que ce dernier inhibe la croissance du pathogène, il ne parvient pas à le tuer, favorisant ainsi la sélection de souches résistantes. Dans cette optique, notre étude vise à explorer l'utilisation du miel, de l'amidon et de la cire d'abeille comme substituts potentiels.

### II.2.1. Technique de diffusion par puits

**Tableau N°7** : Résultats de la technique de diffusion par puits dans les boîtes de 90mm Ø

Ingrédients	Codes	Résultat	Photos
Miel	M : D, S, E	D(-), S(-), E(-)	
Miel/Amidon	MA : D, S, E	D(-), S(-), E(-)	

**Tableau N°8** : Résultats de la technique de diffusion par puits dans les boîtes de 60mm Ø

Ingrédients	Codes	Résultats	Photos
Miel	D, S, E	D(-), S(-), E(-)	
Miel/Amidon	AD, AS, AE	AD(-), AS(-), AE(-)	
Témoin amidon	TA	TA(-)	
Miel + Cire	CD, CS, CE	CD(-), CS(-), CE(-)	
Cire + Amidon	CA	CA(-)	
Témoin cire	TC	TC(-)	
Miel + Cire + Amidon	CAD, CAS, CAE	CAD(-), CAS(-) CAE(-)	
Antifongique	AF	AF(+) ; 14mm Ø	
Antifongique + Miel	AFD, AFS, AFE	AFD(+) ; 15mm Ø AFS(+) ; 17mm Ø AFE(+) ; 20mm Ø	

Initialement, nous avons entrepris une analyse antifongique en utilisant la technique de diffusion par puits dans des BP de (90mm Ø), Nous avons testé différentes substances, à savoir le miel pur, le mélange de miel et d'amidon. Pour améliorer les résultats, la taille des BP a été réduite à (60mm Ø) afin de limiter le milieu de diffusion. Les substances testées comprenaient le miel pur, l'amidon pur, la cire pure, le mélange de miel et d'amidon, le mélange de miel et de cire, le mélange de miel, d'amidon et de cire, l'antifongique seul et le mélange d'antifongique et de miel.

- \* Les résultats obtenus pour les BP de (90mm Ø) étaient négatifs, ce qui signifiait qu'aucune inhibition fongique n'était observée.
- \* Les résultats obtenus pour les BP de (60mm Ø) étaient encore une fois négatifs pour la plupart des substances testées, à l'exception de l'antifongique seul (14mm) et du mélange d'antifongique et de miel, qui présentaient clairement des zones d'inhibition fongique. Cela indique que *C.albicans* est sensible à ces substances combinées. Les résultats du mélange d'antifongique et de miel étaient particulièrement importants, avec le mélange contenant du miel d'euphorbe présentant la plus forte inhibition (20mm), tandis que celui contenant du miel de roquette présentait la plus faible inhibition (15mm). Ces résultats suggèrent que le mélange d'antifongique et de miel pourrait avoir un potentiel antifongique intéressant, en particulier avec certains types de miel.
  - Nous constatons donc que contrairement au résultat de l'utilisation de l'antifongique seul, les résultats de la combinaison de l'antifongique avec le miel révélaient une inhibition plus importante malgré le fait que le miel seul soit inactif sur *C.albicans*, ceci peut être justifié par une synergie entre le miel et l'antifongique. Cette synergie peut être attribuée au peroxyde d'hydrogène présent dans le miel, qui a été libéré grâce à l'enzyme glucose oxydase qui cette dernière ait été stimulé par le liquide contenu dans l'antifongique. Cependant, les variations de la zone d'inhibition entre les trois variétés de miel peuvent être dues à leur composition, en particulier leur teneur en sucre. En effet, la zone d'inhibition la plus élevée a été observée avec le miel le plus sucré (miel d'euphorbe), et inversement.
  - L'absence d'activité antifongique du miel et de cire individuellement peut être attribuée à la résistance de *C.albicans*. Sachant que ce dernier peut se développer à des pH compris entre 4 et 7.5 (Segretain et al., 1987 ) ce qui est presque le cas de nos miel.
- \* Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par Moulai Nafissa et al., (2022), qui ont montré des zones d'inhibition de 35 mm et 43 mm respectivement pour le miel de jujubier et d'euphorbe. Ils diffèrent également des résultats obtenus par Filippo Fratini et al., (2016) pour la cire brute extraite à l'alcool, qui présentait une zone d'inhibition de 3mm, ainsi que pour la mixture de miel, cire et huile d'olive qui révélait une zone d'inhibition de 3.5mm.

La différence des résultats peut être expliquée par plusieurs aspects, à savoir les suivants :

- Il est possible que *C.albicans* ait développé une certaine résistance au fil du temps.
- Il est aussi envisageable que, les études antérieures aient utilisé des espèces et/ou souches de *C.albicans* ainsi que des types de miel d'origines différents, ce qui peut entraîner des variations dans leurs propriétés et caractéristiques (Cavanaugh et al., 1970).

## II.2.2. Technique de la CMI

Tableau N°9 : Résultats de la technique de la CMI

Ingrédients	Codes	Résultat	Photos
Miel (Incorporé à la gélose)	D1, S1, E1	D1(-), S1(-), E1(-)	
	D2, S2, E2	D2(CMI), S2(CMI), E2(CMI)	
	D3, S3, E3	D3(+), S3(+), E3(+)	
	<b>Témoin ; T</b>	<b>Témoin ; T(+)</b>	
Miel + Amidon (Incorporé à la gélose)	AD1, AS1, AE1	AD1(IA), AS1(IA), AE1(IA)	
	AD2, AS2, AE2	AD2(IA), AS2(IA), AE2(CIA)	
	AD3, AS3, AE3	AD3(CIA), AS3(CIA), AE3(+)	
	<b>Témoin amidon ; TA</b>	<b>Témoin amidon ; TA(+)</b>	
Miel + Amidon + Cire (Incorporé à la gélose)	CAD1, CAS1, CAE1	CAD1(IS), CAS1(IS), CAE1(IS)	
	CAD2, CAS2, CAE2	CAD2(CIS), CAS2(CIS), CAE2(CIS)	
	<b>Témoin cire ; TC</b>	<b>Témoin cire ; TC(+)</b>	

+ : Croissance.

**CMI** : concentration minimale inhibitrice.

- : Inhibition totale.

**CIA** : concentration minimale inhibitrice additive.

**IA** : Inhibition additive totale.

**CIS** : concentration minimale inhibitrice synergique.

**IS** : Inhibition synergique totale.

Dans cette méthode, on avait évalué l'activité antifongique de pratiquement les mêmes substances et mélanges que ceux utilisés dans la méthode précédente. Les substances évaluées comprenaient le miel, l'amidon, la cire, ainsi que des combinaisons de miel et d'amidon, et de miel, d'amidon et de cire, en plus du témoin du milieu de culture.

- \* Les résultats des analyses du témoin, de la cire seule et de l'amidon seul ont tous révélé une croissance de *C.albicans*.
- \* Nos trois variétés de miels étudiés ont montré un effet antifongique vis-à-vis *C.albicans*. La CMI obtenue pour l'analyse du miel seul était de 50% (v/v), et ce résultat était similaire pour toutes les variétés.
- \* Pour l'analyse du mélange de miel et d'amidon, une CIA de 20% (v/v) a été obtenue, ce résultat était aussi bien valide pour le miel de roquette que pour celui de jujubier. Néanmoins, une croissance légère a été constatée à la même concentration pour le miel d'euphorbe, ce qui indique que la CIA pour le miel d'euphorbe pouvait bien se situer entre 20 et 40% (v/v) (cette différence peut bien être attribuée à son origine floral et/ou sa composition).
- \* Dans le cas de l'analyse du mélange de miel, de cire et d'amidon, la CIS obtenue était de 20% (v/v), ce résultat était identique pour les trois variétés de miel. Les résultats précédents laissent à suggérer que la CIS des trois variétés pouvait bien se trouver au-dessous de 20% (v/v).
  - Il existait un effet synergique entre le miel, l'amidon et la cire contre *C.albicans*. Cet effet synergique est dû à leur combinaison. Le miel inhibe les champignons en créant un environnement hyperosmotique qui déshydrate leurs cellules, en fournissant du peroxyde d'hydrogène qui endommage leurs membranes cellulaires, en plus de contenir des composés phénoliques et des flavonoïdes aux propriétés antimicrobiennes. L'amidon étant hydrolysé par la présence de l'amylase contenu dans le miel augmentant l'osmolarité du milieu, ainsi ce fait la perturbation du métabolisme des champignons en les déshydratants par l'absorption de l'eau. La cire, quant à elle, perturbe les membranes cellulaires des champignons grâce à ses esters, alcools gras, acides gras et hydrocarbures et crée une barrière physique contre leur pénétration. Cela permet au miel d'exercer son action antifongique de manière plus efficace [(Bogdanov et Blumer, 2001) ; (Filippo Fratini et al., 2016)].
  - Contrairement à la technique de diffusion par puits le miel le moins efficace parmi les trois variétés est celui le plus sucré (euphorbe), ceci indique que d'autres composants du miel sont plus impliqués dans l'activité antifongique synergique, tel que les peptides, les polyphénols et les flavonoïdes.
  - Selon Brudzynski K et al., (2012) et Kwakman PHS et al., (2012), les polyphénols, les flavonoïdes et les peptides altèrent la structure et la fonction de la membrane cellulaire des champignons, ce qui perturbe leur intégrité et leur viabilité. Certains d'entre eux interfèrent également avec les processus de division cellulaire et de croissance des champignons, ce qui limite leur propagation.
  - De plus, les polyphénols et les flavonoïdes agissent en neutralisant les radicaux libres et en réduisant le stress oxydatif dans les cellules fongiques. Cela peut entraîner des dommages cellulaires. Ils perturbent également la membrane cellulaire des champignons, provoquant une fuite de substances essentielles et altérant l'intégrité cellulaire. Certains polyphénols ont la capacité d'inhiber des enzymes spécifiques

nécessaires à la croissance et à la survie des champignons [(Brudzynski K et al., 2012) ; (Kwakman PHS et al., 2012)].

- En outre, les polyphénols et les flavonoïdes interagissent avec les protéines fongiques, perturbant ainsi leur fonctionnement normal. Cela peut avoir un impact sur des processus vitaux tels que la réponse immunitaire, la synthèse des acides nucléiques, la réplication de l'ADN et la biosynthèse des protéines, ce qui entraîne une inhibition de la croissance fongique [(Brudzynski K et al., 2012) ; (Kwakman PHS et al., 2012)].
- Bien que des hypothèses aient été avancées, les mécanismes précis par lesquels les polyphénols, flavonoïdes et peptides antimicrobiens agissent dans l'activité antifongique du miel restent encore largement méconnus.

\* Les résultats de notre étude présentent de légères différences par rapport à ceux rapportés par **Ahmed Moussa (2007)** et **Boukraa et al., (2006)**, qui ont examiné l'effet antifongique de divers variétés de miel sur *C.albicans*. Leurs études ont révélé des moyennes de CMI respectives de 42,4% et 43,6%. Elles ont aussi constaté une existence d'une synergie entre le miel et l'amidon dans leur capacité à inhiber la croissance fongique, avec des moyennes respectives de CIS de 34,6% et 33,3%. Nos résultats différents également de ceux rapportés par **Filippo Fratini et al., (2016)** dans leur étude des 'effets antimicrobiens de la cire d'abeille'. Selon cette étude la croissance de *C.albicans* a été inhibée dans les milieux avec gélose – miel, avec le mélange miel, cire d'abeille et huile d'olive (1:1:1) et avec gélose-mélange 66% (CIS ; 66%), tandis que dans d'autres milieux une croissance a été observée allant de modérée à forte.

Plusieurs points peuvent justifier les différences de résultats, notamment :

- Les concentrations de miel employées différaient des nôtres, ainsi que le milieu de culture utilisé, tout comme l'utilisation d'autres produits, tels que l'huile d'olive qui a été employé par **Filippo Fratini et al., (2016)**, tandis que nous avons opté pour l'utilisation de l'amidon.
- Il est possible que *C.albicans* ait développé une certaine résistance au fil du temps.
- La divergence des miels est des souches fongiques. L'inhibition de la croissance de *C.albicans* par le miel est obtenue entre des concentrations de 1,6 et 100 %. L'effet antifongique du miel diffère selon l'origine de ce dernier et l'espèce ou la souche fongique utilisée (**Cavanaugh et al., 1970**).

# **Conclusion**



### Conclusion

En premier lieu, la combinaison des miels et de l'antifongique a entraîné une inhibition significative de la croissance de *C.albicans*, suggérant une synergie entre ces substances. Cependant, les variations d'inhibition entre les différentes variétés de miel peuvent être attribuées à leur composition, en particulier à leur teneur en sucre. Le miel le plus sucré, comme celui d'euphorbe, a montré une plus grande efficacité antifongique, tandis que celui de roquette, le moins sucré, a été le moins efficace.

En second lieu, non seulement les trois variétés de miel ont des propriétés antifongique mais il existe également un effet synergique entre les trois variétés de miel, l'amidon et la cire d'abeille vis-à-vis de *C.albicans*. Ces substances agissent en perturbant les cellules fongiques de différentes manières, par combinaison de leurs composants antifongiques. Cependant, les variations d'inhibition entre les différentes variétés de miel peuvent également être attribuées à leur composition également leur origine.

Néanmoins, nos résultats différents de ceux des études antérieures cette divergence est en raison de divers facteurs tels que les concentrations utilisées, le milieu de culture utilisé, l'origine des miels et des souches fongiques, ainsi que l'utilisation d'autres substances dans les études précédentes.

En ultime analyse, ces résultats préconisent le fait que le miel, l'amidon et la cire d'abeille pourraient être envisagés comme des alternatives antifongiques potentielles, notamment en combinaison avec des antifongiques conventionnels. En revanche, il serait opportun de mener des études complémentaires pour évaluer leur activité antimicrobienne individuelle ainsi que leur efficacité en combinaison ou en association avec d'autres produits naturels, y compris les produits de la ruche. De plus, le développement de tests quantitatifs intégrant l'utilisation de la CMI pourrait mesurer de manière précise la contribution réelle de ces produits à l'activité antimicrobienne, ouvrant ainsi la voie à leur exploration dans d'autres applications cliniques.

## **Références bibliographiques**

## A

1. **Ahmed Moussa.** (2007). Mémoire de fin d'étude de Magister 'Evaluation in vitro de l'effet synergique de l'amidon sur l'activité antifongique du miel, en relation avec l'indice de diastase vis-à-vis de deux espèces pathogènes : *Candida albicans* et *Aspergillus niger*'.
2. **ANOFEL.** (2013). 'Association française des enseignants et praticiens hospitaliers de parasitologie et mycologie médicales' Parasitose et mycoses des régions tempérées et tropicales, 3ème édition ; (273-314)p.

## B

3. **B. Bakchiche, M. Habati, A. Benmebarek, A. Gherib.** (2017). Caractéristiques physico-chimiques, concentrations en composés phénoliques et pouvoir antioxydant de quatre variétés de miels locales (Algérie).
4. **Bogdanov S., Martin P., Lüllman C., Borneck R., Morlot M., Heritier J., Vorwohl G., Russmann H., Persano-Oddo L., Sabatini A.G., Marcazzan G.L., Marioleas P., Tsigouri A., Kerkvliet J., Ortiz A., Ivanov T.** (1997). Harmonised methods of the European honey commission. *Apidologie*, (1– 59)p.
5. **Bogdanov, S, Blumer, P.** (2001). Propriétés antibiotiques naturelles du miel. *Revue Suisse d'Agriculture*, 98(3) : (107–114)p.
6. **Boukraa L, Amara K, Aggad H.** (2006). Synergistic effect of starch on the antibacterial activity of honey against *Staphylococcus aureus*. 1st International Conference on the Medical Uses of Honey. USM, Kota Bharu, Malaysia. 26-28 August 2006.
7. **Brudzynski Katrina, Abubaker Kamal, Miotto Danielle.** (2012). Dévoiler un mécanisme d'action antibactérienne du miel : effet oxydatif induit par le polyphénol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la croissance des cellules bactériennes et sur la dégradation de l'ADN.

## C

8. **Calderone RA, Fonzi WA.** (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* ; (327-3)p.
9. **Cavanaugh D, Beazley J, Ostapowickz F.** (1970) Radical operation for carcinoma of the vulva : a new approach to wound healing, *J. Obstet. Gynaecol. Brit. Commonw.* 77, (1037–1040)p.
10. **Codex Alimentarius.** (2001). Programme Mixte FAO/OMS Sur Les Normes Alimentaires. Commission du Codex Alimentarius. 'Composition physicochimique des miels algériens. Détermination des éléments traces et des éléments potentiellement toxiques'. ALINORM 01/25, (1-31)p.

## E

11. **É. Denes, N. Hidri.** (2009). Synergie et antagonisme en antibiothérapie.

12. **Eucast.** (2000). Definitive Document E. Def3.1.2000. «Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) of antibacterial agents by agar dilution». European Committee for antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) of the European society of clinical microbiology and infection diseases (ESCMID).

## F

13. **Filippo Fratini, Giovanni Cilia<sup>1</sup>, Barbara Turchi<sup>1</sup>, Antonio Felicioli.** (2016). Review, Beeswax : A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine.

## G

14. **Gonnet M.** (1986). L'analyse des miels. Description de quelques méthodes de contrôle de la qualité. Bulletin technique apicole, 54-13, (1).p (7-36)p.

## H

15. **Hafsa Yaiche Achour, Mustapha Khali.** (2014). Composition physicochimique des miels algériens. Détermination des éléments traces et des éléments potentiellement toxiques.

## K

16. **Kempf M, Eveillard M, KOWALCZYK F.** (2011). Antibacterial activity against 224 clinical bacterial strains of JCA 250 and JCA 251 compounds containing essential oil provided from aroma technologies research. Pathol Biol. 59 : (39-43)p.
17. **Kwakman Paulus HS, Zaat Sebastian AJ.** (2012). Composants antibactériens du miel.

## M

18. **Melissa A, Mundo M, Padilla-Zakour O.I, Worobo R.W.** (2004). Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honey. International journal of food Microbial. Vol 97, n°1, (1-8)p.
19. **Merah M, Bensaci Bachagha M, Boudershem A.** (2010). Étude de l'effet antimicrobien de trois échantillons du miel naturel récoltés du territoire algérien. Ann. Sci. Technol. 2 : (115-125)p.
20. **Molan P.C.** 1992. The antibacterial activity of honey : 1. The nature of the antibacterial activity. Bee World. Vol 73(1) : (5-28)p.
21. **Moulai mostefa Nafissa, Chikhaoui Ahlam, Melikaoui Samiha.** (2022). Mémoire de fin d'étude de Master 'Etude de l'activité antibactérienne de quelques produits de la ruche'.

## N

22. **Nair S.** 2014. Identification des plantes mellifères et analyses physicochimiques des miels Algériens. Thèse de Doctorat en Biologie. Université d'Oran : 192p.

23. **Naman M, Faid M, El Adlouni C.** (2005). Microbiological and physico-chemical properties of Moroccan honey. *International Journal Of Agriculture & Biology*, 7: (773– 776)p.

## O

24. **O. Belhaj, J. Oumato, S. Zrira.** 2015. Étude physico-chimique de quelques types de miels marocains.

## P

25. **Perez C, Paul M, Bazerque P.** 1990. ‘An Antibiotic assay by the agar well diffusion method’. *Acta. Bio. Med.* (113-115)p.

## S

26. **Sanglard, D., and J. Bille.** 2002. Current understanding of the modes of action of and resistance mechanisms to conventional and emerging antifungal agents for treatment of *Candida* infections ; (349–383)p. In R. A. Calderone (ed.), *Candida and candidiasis*. ASM Press, Washington D.C.
27. **Segretain G, Drouhet E, Mariat F.** (1987). *Diagnostic de laboratoire en mycologie médicale*.
28. **Sib A.** 2007. ‘Contrôle de la qualité physicochimique et microbiologique et évaluation de l’activité antimicrobienne du miel d’origine locale et importé’. Mémoire d’obtention de diplôme en microbiologie alimentaire et sécurité sanitaire des aliments. Université de Tlemcen, Algérie.

# **Annexes**

## Annexe N°1

Tableau N°1 : Tableau de Chataway

Indice de réfraction à 20 °C	Teneur en eau g/100 g	Indice de réfraction à 20 °C	Teneur en eau g/100 g
1.5044	13.0	1.4880	19.4
1.5038	13.2	1.4875	19.6
1.5033	13.4	1.4870	19.8
1.5028	13.6	1.4865	20.0
1.5023	13.8	1.4860	20.2
1.5018	14.0	1.4855	20.4
1.5012	14.2	1.4850	20.6
1.5007	14.4	1.4845	20.8
1.5002	14.6	1.4840	21.0
1.4997	14.8	1.4835	21.2
1.4992	15.0	1.4830	21.4
1.4987	15.2	1.4825	21.6
1.4982	15.4	1.4820	21.8
1.4976	15.6	1.4815	22.0
1.4971	15.8	1.4810	22.2
1.4966	16.0	1.4805	22.4
1.4961	16.2	1.4800	22.6
1.4956	16.4	1.4795	22.8
1.4951	16.6	1.4790	23.0
1.4946	16.8	1.4785	23.2
1.4940	17.0	1.4780	23.4
1.4935	17.2	1.4775	23.6
1.4930	17.4	1.4770	23.8
1.4925	17.6	1.4765	24.0
1.4920	17.8	1.4760	24.2
1.4915	18.0	1.4755	24.4
1.4910	18.2	1.4750	24.6
1.4905	18.4	1.4745	24.8
1.4900	18.6	1.4740	25.0
1.4895	18.8		
1.4890	19.0		
1.4885	19.2		

## Annexe N°2



Figure N°1 : Miel de roquette



Figure N°2 : Miel de jujubier



Figure N°3 : Miel d'euphorbe



Figure N°4 : Cire d'abeille



Figure N°5 : Antifongique



Annexe N°3



Figure N°1 : pH-mètre (Mettler Toledo)



Figure N°2 : Conductimètre (Hanna EC 214)



Figure N°3 : Refractomètre (Abbe)



Figure N°4 : four à moufle (Heraeus)



Figure N°5 : Micro-onde (Wairpool)



**Figure N°6 : Etuve (Heraeus)**



**Figure N°7 : Balance analytique (Ohaus)**



**Figure N°8 : Spectrophotomètre (Pharmacia Biotech Nova spec)**



**Figure N°9 : Bain marie (Heidolph)**



