

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Institut des Sciences Vétérinaires

THESE DE DOCTORAT

en Sciences Vétérinaires

Spécialité : Épidémiologie Animale

ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE ET SUIVIE CLINIQUE ET
MICROBIOLOGIQUES A BASE DES PRODUITS ALTERNATIFS SUR DES
PLAIES CHEZ DES ANIMAUX MODELES

Par

Asma AIZA

Devant le jury composé de :

D. ADEL	MCA., ISV, Blida 1	Président
N. DJELLATA	MCA., ISV, Blida 1	Examinatrice
K. AIT-LOUDHIA	Professeur, ENSV, Alger	Examinatrice
K. BENFODIL	MCA., SNVST, Bouira	Examinatrice
B. KHIATI	Professeur, ISV, Tiaret	Directeur
S. KEBBAL	MCA., ISV, Blida 1	Co-directeur
R. KAIDI	Professeur, ISV, Blida 1	Invité d'honneur

Blida, 21 Janvier 2025

RESUME

Les plaies infectées représentent un problème majeur pour la santé publique dont diverses espèces bactériennes sont incriminés dans ce type d'infections. De plus, l'émergence de l'antibiorésistance complique leur traitement, affectant ainsi la qualité et la durée de cicatrisation d'où la nécessité d'explorer des solutions alternatives telles que l'utilisation du miel. La présente thèse comporte deux parties expérimentales.

Dans la première partie, nous avons réalisé une enquête transversale dans la wilaya de Ain Defla (nord-centre de l'Algérie) visant à identifier les germes isolés sur des plaies infectées et de caractériser leur résistance aux antibiotiques. L'étude a été menée auprès de 620 patients présentant des plaies cutanées purulentes. Au total, 428 souches bactériennes ont été isolées dont 283 étaient des Gram positif ($66,12 \pm 4,48\%$) ($P < 0,001$). Un total de 77 isolats de *Staphylococcus aureus* ont été obtenus, parmi lesquels $31,2 \pm 9,3\%$ (24/77) étaient résistants à la méticilline. Les bactéries Gram négatif les plus fréquentes étaient *Escherichia coli* ($30,34 \pm 7,4\%$), suivies de *Klebsiella pneumoniae* ($25,52 \pm 7,10\%$) et de *Pseudomonas aeruginosa* ($23,45 \pm 6,70\%$). Tous les isolats de *Staphylococcus aureus* (77/77) ont montré une sensibilité à la clindamycine. Les isolats d'*Escherichia coli* ont présenté une résistance à plusieurs antibiotiques, avec des taux élevés de résistance à l'amoxicilline (38/44 ; $86,4 \pm 10,1\%$) et à l'amoxicilline-clavulanique (30/44 ; $68,2 \pm 13,8\%$) ($P < 0,001$). Toutes les bactéries Gram négatif étaient sensibles à l'amikacine (145/145), et seul un isolat Gram positif présentait une résistance à la vancomycine. La multirésistance a été observée chez 31,54% des isolats ; elle était significativement plus élevée chez les bactéries Gram négatif que chez les bactéries Gram positif (62/145 ; $42,76 \pm 8\%$ et 73/283 ; $25,79 \pm 5,10\%$, respectivement) ($P < 0,001$) et significativement corrélée à l'âge des patients ($P < 0,001$).

Dans la deuxième partie de l'étude expérimentale, nous présentons les résultats d'une étude expérimentale dont l'objectif est d'étudier les effets antibactérien et antioxydant de miel *in vitro* et l'effet anticicatrisant *in vivo*.

L'activité antibactérienne a été testée sur des souches de référence en utilisant la méthode de diffusion en puits. Les résultats ont montré une activité inhibitrice, du gel à base de miel, de $27,33 \pm 0,58$ pour *S. aureus*, $22,33 \pm 1,53$ pour *E. faecalis*, $20,00 \pm 1,73$ pour *E. coli* et $18,67 \pm 1,53$ pour *P. aeruginosa*. Ces résultats sont nettement supérieurs à ceux obtenus avec la sulfadiazine argentique ($P < 0,01$). Pour l'effet antioxydant, la technique de réduction de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) a été utilisée. L'IC₅₀ de notre gel à base de miel était déduite à 43,18 mg/mL, ce qui révèle une bonne activité antioxydante.

Pour l'expérience *in vivo*, 18 rats mâles de race Wistar ont été utilisés, avec six rats dans chaque groupe. Les traitements appliqués localement sur des plaies excisionnelles comprenaient du miel, de la sulfadiazine argentique à 1% et de l'eau distillée en tant que témoin, administrés une fois par jour pendant 21 jours. Une évaluation planimétrique et histopathologique a été effectuée tout au long de l'expérience. Les analyses statistiques n'ont révélé aucune différence significative entre le taux de contraction des plaies traités par la préparation de miel et la sulfadiazine argentique. Bien que l'examen histopathologique ait montré une différence significative entre les scores totaux des trois groupes ($P < 0,05$), aucune différence significative n'a été observée entre les différents paramètres histopathologiques des sujets traités avec le gel de miel et ceux traités avec la sulfadiazine argentique ($P > 0,05$).

Mots clés : Plaies infectées, Antibiorésistance, Miel, Sulfadiazine argentique, Effet antibactérien, Effet antioxydant, Effet cicatrisant.

SUMMURY

Infected wounds represent a major public health issue, with various bacterial species implicated in such infections. Additionally, the emergence of antibiotic resistance complicates their treatment, thus affecting the quality and duration of healing. This underscores the need to explore alternative solutions such as the use of honey. This thesis comprises two experimental parts.

In the first part, we conducted a cross-sectional survey in the Wilaya of Ain Defla (north-central Algeria) aimed at identifying the germs isolated from infected wounds and characterizing their antibiotic resistance. The study involved 620 patients with purulent skin wounds. A total of 428 bacterial strains were isolated, of which 283 were Gram-positive ($66.12 \pm 4.48\%$) ($P < 0.001$). A total of 77 isolates of *Staphylococcus aureus* were obtained, among which $31.2 \pm 9.3\%$ (24/77) were methicillin-resistant. The most frequent Gram-negative bacteria were *Escherichia coli* ($30.34 \pm 7.4\%$), followed by *Klebsiella pneumoniae* ($25.52 \pm 7.10\%$) and *Pseudomonas aeruginosa* ($23.45 \pm 6.70\%$). All *Staphylococcus aureus* isolates (77/77) showed sensitivity to clindamycin. *Escherichia coli* isolates showed resistance to multiple antibiotics, with high resistance rates to amoxicillin (38/44; $86.4 \pm 10.1\%$) and amoxicillin-clavulanate (30/44; $68.2 \pm 13.8\%$) ($P < 0.001$). All Gram-negative bacteria were sensitive to amikacin (145/145), and only one Gram-positive isolate was resistant to vancomycin. Multidrug resistance was observed in 31.54% of the isolates; it was significantly higher in Gram-negative bacteria than in Gram-positive bacteria (62/145; $42.76 \pm 8\%$ and 73/283; $25.79 \pm 5.10\%$,

respectively) ($P < 0.001$) and significantly correlated with the patients' age ($P < 0.001$).

In the second part of the experimental study, we present the results of an experimental study aimed at investigating the antibacterial and antioxidant effects of honey *in vitro* and its wound healing effect *in vivo*.

The antibacterial activity was tested on reference strains using the well diffusion method. The results showed an inhibitory activity of honey-based gel of 27.33 ± 0.58 for *S. aureus*, 22.33 ± 1.53 for *E. faecalis*, 20.00 ± 1.73 for *E. coli*, and 18.67 ± 1.53 for *P. aeruginosa*. These results are significantly higher than those obtained with silver sulfadiazine ($P < 0.01$). For the antioxidant effect, the DPPH reduction technique was used. The IC_{50} of our honey-based gel was deduced to be 43.18 mg/mL, indicating good antioxidant activity.

For the *in vivo* experiment, 18 male Wistar rats were used, with six rats in each group. The treatments applied locally on excisional wounds included honey, 1% silver sulfadiazine, and distilled water as a control, administered once daily for 21 days. Planimetric and histopathological evaluations were performed throughout the experiment. Statistical analyses revealed no significant difference between the wound contraction rates of those treated with the honey preparation and those treated with silver sulfadiazine. Although histopathological examination showed a significant difference between the total scores of the three groups ($P < 0.05$), no significant difference was observed between the different histopathological parameters of the subjects treated with the honey gel and those treated with silver sulfadiazine ($P > 0.05$).

Keywords: Infected wounds, Antibiotic resistance, Honey, Silver sulfadiazine, Antibacterial effect, Antioxidant effect, Wound healing effect.

ملخص

تمثل الجروح الملتهبة مشكلة كبيرة للصحة العامة، حيث يوجد أنواع بكتيرية مختلفة متناسبة في هذا النوع من العدوى. بالإضافة إلى ذلك، فإن ظهور مقاومة للمضادات الحيوية يزيد من تعقيد علاجها، مما يؤثر على جودة ومدى الشفاء، الأمر الذي يتطلب إيجاد حلول بديلة مثل استخدام العسل. تحتوي هذه الرسالة على جزئين تجريبيين.

في الجزء الأول، أجرينا دراسة مقطعية في ولاية عين الدفلى (شمال الوسط الجزائري) بهدف تحديد أصناف الجراثيم المعزولة من الجروح الملتهبة وتحديد مدى مقاومتها للمضادات الحيوية. أجريت الدراسة على 620 مريض يعانون من جروح جلدية متقيحة. تم عزل 428 سلالة بكتيرية، منها 283 موجبة لصبغة الجرام (66.12 ± 4.48%) (P < 0.001). تم الحصول على 77 عزلة من *Staphylococcus aureus*، منها 77/24 (9.3 ± 31.2%) مقاومة للميثيسيلين. من بين البكتيريا السالبة لصبغة الجرام الأكثر شيوعاً، وجدنا *Escherichia coli* (7.4 ± 30.34%)، تليها *Pseudomonas aeruginosa* (7.10 ± 25.52%) و *Klebsiella pneumoniae* (6.70 ± 23.45%). أظهرت جميع عزلات *Staphylococcus aureus* (77/77) حساسية للكينيداميسين. بينما أظهرت عزلات *Escherichia coli* مقاومة لعدة مضادات حيوية، مع معدلات مقاومة عالية للأموكسيسيلين (44/38؛ 86.4 ± 10.1%) والأموكسيسيلين+كلافولانيك (44/30؛ 68.2 ± 13.8%) (P < 0.001). كانت جميع البكتيريا السالبة لصبغة الجرام حساسة للأميكاسين (145/145)، وكان هناك عزلة واحدة موجبة لصبغة الجرام مقاومة للفانكوميسين. لوحظت المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لدى 31.54% من العزلات؛ وكانت أعلى بكثير في البكتيريا السالبة لصبغة الجرام مقارنةً بالبكتيريا الموجبة (145/62؛ 42.76 ± 8% و 283/73؛ 25.79 ± 5.10%)، على التوالي (P < 0.001) وارتبطت ارتباطاً كبيراً بعمر المرضى (P < 0.001).

في الجزء الثاني من الدراسة، تم القيام بدراسة تجريبية تهدف إلى تقييم التأثيرات المضادة للبكتيريا والمضادة للأكسدة للعسل في المختبر وتأثيره على إلتئام الجروح في الجسم الحي.

تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا على سلالات مرجعية باستخدام طريقة الانتشار، حيث أظهرت النتائج نشاطاً مثبتاً للمستحضر المحتوي على العسل بلغ: 0.58 ± 27.33 مم لـ *S. aureus*، و 1.53 ± 22.33 مم لـ *E. faecalis*، و 1.73 ± 20.00 مم لـ *E. coli*، و 1.53 ± 18.67 مم لـ *S. aureus*.

مم لـ *P. aeruginosa*. هذه النتائج أعلى بكثير من تلك التي تم الحصول عليها مع الصلفاديازين الفضي ($P < 0.01$). بالنسبة للتأثير المضاد للأوكسدة، تم استخدام تقنية DPPH. تم استنتاج IC_{50} لمستحضرنا المحتوي على العسل عند 43.18 ميكرو لتر/مل، مما يكشف عن نشاط جيد كمضاد للأوكسدة.

بالنسبة للتجربة في الجسم الحي، تم استخدام 18 من ذكور الجرذان البيضاء، ستة جرذان في كل مجموعة. تضمنت العلاجات المطبقة موضعياً على الجروح : العسل، والصلفاديازين الفضي بنسبة 1% والماء المقطر كشاهد، تم تطبيقها مرة واحدة يومياً لمدة 21 يوماً. تم إجراء تقييم مسطح ونسيجي مرضي طوال التجربة. لم تكشف التحليلات الإحصائية عن أي فرق كبير بين معدل تقلص الجروح المعالجة بمستحضر العسل والصلفاديازين الفضي. على الرغم من أن الفحص النسيجي المرضي أظهر فرقاً كبيراً بين الدرجات الإجمالية للمجموعات الثلاث ($P < 0.05$)، إلا أنه لم يُلاحظ أي فرق بين المعايير النسيجية المختلفة للكائنات المعالجة بهلام العسل وتلك المعالجة بالصلفاديازين الفضي ($P > 0.05$).

الكلمات المفتاحية: جروح ملتهبة، مقاومة المضادات الحيوية، عسل، صلفاديازين فضي، تأثير مضاد للبكتيريا، تأثير مضاد للأوكسدة، تأثير إنتام للجروح.

REMERCIEMENTS

Au nom de Dieu clément et miséricordieux qui par sa grâce j'ai pu achever ce travail. Je remercie Dieu, premièrement et éternellement, de m'avoir accordé la détermination et le courage tout au long de ce parcours de recherche et d'expérimentation pour mener à bien ce travail.

Je tiens à remercier :

Mon encadreur, **Professeur KHIATI Baghdad**, de l'Institut des Sciences Vétérinaires de l'université de Tiaret, pour sa disponibilité, sa gentillesse, ses conseils avisés, sa patience, son soutien indéfectible tout au long de la réalisation de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Mon co-encadreur, **Docteur KEBBAL Seddik**, de l'Institut des Sciences Vétérinaires, Université de Blida 1, pour son aide précieuse, sa compréhension et son soutien, particulièrement durant les moments cruciaux de la dernière phase.

Mon enseignant et notre invité d'honneur, **Professeur KAIDI Rachid**, de l'Institut des Sciences Vétérinaires, Université de Blida 1, pour son affabilité, ses recommandations éclairées pendant toute la durée de cette étude, je lui témoigne ici toute ma gratitude.

Docteur ADEL Djallel, de l'Institut des Sciences Vétérinaires, Université de Blida 1, qui nous a fait l'insigne honneur de présider notre jury.

Professeur Khatima AIT-LOUDHIA, de l'Ecole National des Sciences Vétérinaires, Alger, qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury.

Docteur Nadia Djellata, de l'Institut des Sciences Vétérinaires, Université de Blida 1, qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury.

Docteur Karima BENFODIL, de la Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université de Bouira, qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury.

Je remercie tous les membres de l'équipe du laboratoire des analyses médicales de Dr ZIBOUCHE A., pour leur accueil chaleureux et leur bonne humeur qui m'ont permis d'effectuer mon stage dans les meilleures conditions possibles.

J'exprime également ma gratitude envers le personnel médical de l'Établissement Public Hospitalier Makour Hamou de la wilaya de Ain Defla, en particulier le **Dr Khelidj, Mr Taiba A. et Mme Amina**, pour leur précieuse contribution.

Je remercie aussi chaleureusement :

Dr Foughali Asma Amina, pour sa disponibilité, son soutien, ses précieux conseils, son encouragement et surtout sa présence bienveillante. Que ces mots lui transmettent toute ma reconnaissance profonde et ma gratitude éternelle.

Dr Halfaoui Zohor, pour sa gentillesse, son aide et surtout son soutien moral qui ne cesse jamais de m'encourager à progresser. Merci d'être présente.

Mes chers (es) collègues qui ont apporté leur aide et leur contribution à la réalisation de ce travail : **Dr Moussa Ahmed ; Dr Achek Rachid ; Dr Hamidi Djamel ; Dr Ansel Samir ; Dr Tazeraret Fatah ; Dr Ait Abdelkader Sabrina ; Dr Kouache Benmoussa ; Dr Hamdi Mohamed ; Dr HEMIDA Houari ; Dr Brahimi Samiha ; Dr Mekheldi Khira ; Dr Manseur Hamza.**

DÉDICACES

À mes chers parents, piliers inébranlables qui demeurent constamment présents pour veiller à mon bonheur. Je vous exprime ma profonde gratitude pour les innombrables sacrifices consentis afin de permettre mon épanouissement et ma prospérité. Grâce à vous, j'ai développé le goût de l'effort, vertu essentielle qui m'a menée jusqu'ici. Que ces quelques mots soient le témoignage de ma reconnaissance infinie et de mon affection sincère envers vous. Enfin, merci d'être tout simplement ma mère et mon père bien-aimés.

À mon cher époux, véritable pilier dans ma vie, toi qui as été mon plus ferme soutien lors des derniers instants décisifs de mon parcours doctoral. Ta présence rassurante et ton appui indéfectible ont constitué un phare guidant mes pas à travers les défis de la finalisation de cette thèse. Tes encouragements constants m'ont permis de persévérer et de surmonter chaque obstacle avec une détermination renouvelée. Merci d'avoir été mon ancre. Merci d'être ma vie.

À mon cher fils Fadi, mon précieux trésor et la lumière de ma vie, tu es la source de ma joie et de mon bonheur infini. Chaque sourire de toi illumine mon monde, et chaque instant avec toi est un cadeau inestimable. Je t'aime plus que les mots ne peuvent l'exprimer.

A ma très chère sœur et sa merveilleuse petite famille, ma confidente, mon amie depuis toujours, qui m'as soutenue avec un amour inconditionnel. Ton écoute attentive et tes précieux conseils ont été d'un réconfort inestimable. Ta présence est un cadeau précieux pour toujours.

A mon frère bien-aimé, toi qui es mon unique et précieux frère, je te dédie ces efforts avec une immense reconnaissance pour l'amour fraternel inconditionnel que tu m'as prodigué. Puisse notre lien demeurer à jamais une source intarissable de force et d'inspiration mutuelle.

À mes chers beaux-parents, vous qui m'avez accueillie chaleureusement au sein de votre famille dès les premiers jours.

A mes chères belles-sœurs, je vous dédie ces efforts avec toute mon affection et ma reconnaissance éternelle pour votre présence bienveillante à mes côtés. Pussions-nous poursuivre sur cette voie, unies par ces liens si chers.

A mon beau-frère, je te dédie ce travail avec tout mon respect et ma reconnaissance.

A ma grande et chère famille, je vous remercie pour tous ce que vous m'avez apporté.

A mes chères amies, Asma, Zohor, Nabila, Fatima, Hafidha, Soulef, Amina, Thinhinane, Dihia, Houda, Ibtissam, Khira, Sarra, Samiha, votre amitié a illuminé les jours sombres et enrichi les moments joyeux. Merci pour vos encouragements, votre soutien et votre amour inconditionnel qui ont rendu chaque étape de ma vie plus belle. Je suis reconnaissante d'avoir des amies comme vous.

A tous mes enseignants tout au long de mes études, je dédie ce travail en témoignage de ma profonde gratitude pour votre dévouement et votre legs inestimable. Vous êtes les artisans de cette réussite.

A tous ceux qui m'aiment et m'apprécient.

Asma AIZA

TABLE DES MATIERES

RESUME	2
REMERCIEMENTS	8
TABLE DES MATIERES	12
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	17
INTRODUCTION	21
1. ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA PEAU	24
1.1. Structure de la peau	24
1.1.1. Epiderme	24
1.1.1.1. Couche cornée (<i>stratum corneum</i>)	25
1.1.1.2. Couche claire (<i>stratum lucidum</i>)	26
1.1.1.3. Couche granuleuse (<i>stratum granulosum</i>)	26
1.1.1.4. Couche épineuse (<i>stratum spinosum</i>)	26
1.1.1.5. Couche basale (<i>stratum germinatum</i>)	26
1.1.2. Jonction dermo-épidermique	27
1.1.3. Derme	27
1.1.3.1. Derme papillaire	28
1.1.3.2. Derme réticulaire	28
1.1.4. Hypoderme	28
1.1.5. Glandes de la peau	30
1.1.5.1. Glandes sébacées	30
1.1.5.2. Glandes sudoripares	30
1.1.6. Poils	31
1.1.7. Follicules pileux	31
1.1.8. Griffes	32
1.1.9. Vascularisation cutanée	32
1.1.9.1. Vaisseaux cutanés	32
1.1.9.2. Réseau lymphatique cutané	33

1.1.10. Innervation cutanée	34
1.1.10.1. Voies afférentes du système nerveux cutané	35
1.1.10.2. Voies efférentes du système nerveux cutané	35
1.2. Physiologie de la peau	35
1.2.1. Barrière physique	36
1.2.2. Hydratation	36
1.2.3. Régulation thermique	36
1.2.4. Organe sensoriel	37
1.2.5. Sécrétion et excrétion	37
1.2.6. Métabolisme	38
1.2.7. Immunité	38
	39
2. CLASSIFICATION DES PLAIES ET PROCESSUS DE CICATRISATION	
2.1. Classification des plaies	39
2.1.1. Selon la profondeur de la plaie	40
2.1.1.1. Premier degré	40
2.1.1.2. Deuxième degré	40
2.1.1.3. Troisième degré	40
2.1.2. Selon l'étendue de la plaie	41
2.1.3. Selon la nature de la plaie	41
2.1.4. Selon l'évolution dans le temps	42
2.1.4.1. Plaies aiguës	42
2.1.4.2. Plaies chroniques	42
2.2. Processus de la cicatrisation	42
2.2.1. Hémostase	43
2.2.2. Réponse inflammatoire	44
2.2.3. Prolifération et granulation	46
2.2.4. Remodelage et maturation	47
2.3. Facteurs affectant la cicatrisation	49
2.3.1. Facteurs locaux	49
2.3.1.1. Oxygénation	49
2.3.1.2. Infections	50
2.3.2. Facteurs systémiques	52

2.3.2.1. Age	52
2.3.2.2. Stress	53
2.3.2.3. Diabète	53
2.3.2.4. Thérapie médicale	53
2.3.2.5. Obésité	54
2.3.2.6. Alcool et tabagisme	54
2.3.2.7. Alimentation	54
	55

3. GENERALITES SUR LE MIEL ET SES PROPRIETES THERAPEUTIQUES

3.1. Miel	55
3.1.1. Définition	55
3.1.2. Fabrication du miel	55
3.1.3. Types de miel	56
3.1.3.1. Miels mono-floraux	56
3.1.3.2. Miels multi-floraux	57
3.1.4. Composition du miel	57
3.1.4.1. Eau	57
3.1.4.2. Saccharides	57
3.1.4.3. Acides organiques	58
3.1.4.4. Acides aminés et protéines	58
3.1.4.5. Lipides	58
3.1.4.6. Sels minéraux	59
3.1.4.7. Enzymes	59
3.1.4.8. Vitamines	60
3.1.4.9. Pigments	60
3.1.4.10. Micro-organismes	60
3.1.4.11. Facteurs antibactériens	61
3.1.4.12. Substances aromatiques	61
3.1.4.13. Grains de pollen	61
3.1.4.14. Hydroxyméthylfurfural	61
3.1.4.15. Polyphénols	62
3.1.5. Paramètres physico-chimiques du miel	62

3.1.5.1. Densité	62
3.1.5.2. Viscosité	62
3.1.5.3. Teneur en eau	63
3.1.5.4. Indice de réfraction	63
3.1.5.5. pH	63
3.1.5.6. Pouvoir rotatoire	63
3.1.5.7. Couleur	63
3.1.5.8. Cristallisation	64
3.1.5.9. Conductivité électrique	64
3.2. Utilisation thérapeutique de miel	64
3.2.1. Historique de l'emploi du miel en thérapie	64
3.2.2. Propriétés thérapeutiques du miel	66
3.2.2.1. Propriétés antibactériennes du miel	66
3.2.2.2. Propriétés cicatrisantes du miel	70
3.2.2.3. Autres propriétés spécifiques	71
3.3. Caractéristiques de miel à usage pharmaceutique	73
3.3.1. Contrôle des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques	73
3.3.2. Parfaite sécurité	74
3.3.3. Stabilité optimale des ingrédients actifs	75
3.3.4. Normes pharmaceutiques de miel	75
	77
4. IDENTIFICATION ET ANTIBIORESISTANCE DES BACTERIES ISOLEES DU PUS PRELEVE SUR DES PLAIES INFECTEES	
4.1. Problématique et objectifs	77
4.2. Matériel et méthodes	78
4.2.1. Zone d'étude	78
4.2.2. Site et période d'étude	79
4.2.3. Collecte des prélèvements	79
4.2.4. Laboratoires d'analyse	80
4.2.5. Identification phénotypique des bactéries	81
4.2.6. Identification bactériologique par MALDI-TOF-MS	82
4.2.7. Test de la résistance aux antibiotiques	86
4.2.8. Conservation des souches isolées	89

4.2.9. Analyses statistiques	89
4.3. Résultats	89
4.3.1. Description de la population d'étude	89
4.3.2. Espèces bactériennes identifiées phénotypiquement	91
4.3.3. Identification bactériologique par MALDI-TOF MS	92
4.3.4. Profils de résistance aux antibiotiques	93
4.3.5. Profil de multirésistance	94
4.4. Discussion	99
4.5. Conclusion	103
5. EVALUATION DES EFFETS <i>IN VIVO</i> ET <i>IN VITRO</i> D'UNE FORMULATION CONTENANT DU MIEL	104
5.1. Problématique et objectifs	104
5.2. Matériel et méthodes	105
5.2.1. Lieu de déroulement de l'étude	105
5.2.2. Méthode de préparation du gel à base de miel	105
5.2.3. Partie <i>in vitro</i>	106
5.2.4. Partie <i>in vivo</i>	110
5.2.5. Analyses statistiques	122
5.3. Résultats	122
5.3.1. Partie <i>in vitro</i>	122
5.3.2. Partie <i>in vivo</i>	126
5.4. Discussion	136
5.5. Conclusion	141
CONCLUSION GENERALE	142
RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES	144
APPENDICES	146
REFERENCES	165

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

A. Liste des figures

Figure 1.1 :	(a) Schéma des couches cellulaires de l'épiderme, (b) Coupe histologique de l'épiderme	25
Figure 2.1 :	Classification des plaies cutanées en fonction de leur profondeur	41
Figure 2.2 :	Illustration des phases du processus de cicatrisation des plaies	43
Figure 2.3 :	Phase inflammatoire après une plaie cutanée ; hémostase et invasion de cellules inflammatoires	46
Figure 2.4 :	Phase proliférative de processus de cicatrisation	47
Figure 2.5 :	Phase de remodelage de processus de cicatrisation	49
Figure 2.6 :	Spectre clinique de la colonisation et de l'infection des plaies	50
Figure 4.1 :	Situation géographique de la zone d'étude : Wilaya de Ain Defla, Algérie.	78
Figure 4.2 :	EPH. Makour Hamou de la wilaya de Ain Defla.	79
Figure 4.3 :	Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico- Chimiques.	80
Figure 4.4 :	Colonies bactériennes étalées sur la plaque cible de MALDI-TOF MS.	83
Figure 4.5 :	Matrice (α -cyano-4-hydroxycinnamique) utilisée pour couvrir les spots.	84
Figure 4.6 :	Mise en place de la plaque cible dans l'appareillage (Burker, MALDI-TOF Biotyper®)	84
Figure 4.7 :	Logiciel Biotyper d'Automation Control	85
Figure 4.8 :	Spectromètre générée par MALDI-TOF MS	86
Figure 4.9 :	Nombre d'échantillons de pus prélevés dans la présente étude selon la catégorie d'âge	90

Figure 4.10 :	Fréquence des bactéries isolées dans la présente étude à partir d'échantillons de pus/plaies.	91
Figure 4.11 :	Répartition des souches bactériennes selon les scores obtenus lors de l'identification par MALDI-TOF MS.	92
Figure 4.12 :	Heatmap de profil de résistance aux antibiotiques testés dans l'étude.	98
Figure 5.1 :	Etapes de préparation de gel à base de miel	106
Figure 5.2 :	Animaux utilisés dans notre étude	111
Figure 5.3 :	Préparation chirurgicale du site opératoire	113
Figure 5.4 :	Etapes de réalisation des plaies	114
Figure 5.5 :	Application des différents traitements sur les plaies	115
Figure 5.6 :	Application de pansement	116
Figure 5.7 :	Etapes de préparation des lames histologiques.	119
Figure 5.8 :	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	123
Figure 5.9 :	Courbe d'étalonnage de la quercétine	124
Figure 5.10 :	Pourcentage de piégeage des radicaux DPPH par les antioxydants standards (acide ascorbique et BHT) et l'hydrogel de miel	125
Figure 5.11 :	Moyennes et écart type des expansions des plaies au J1	127
Figure 5.12 :	Aspect macroscopique des plaies au J7	128
Figure 5.13 :	Pourcentage de contraction des plaies au J7	129
Figure 5.14 :	Aspect macroscopique des plaies au J14	130
Figure 5.15 :	Pourcentage de contraction des plaies au J14	131
Figure 5.16 :	Aspect macroscopique des plaies au J21	132
Figure 5.17 :	Pourcentage de contraction des plaies à J21	133
Figure 5.18 :	Coupes histologiques des plaies au J21	135

B. Liste des tableaux

Tableau 3.1 :	Constituants minéraux du miel	59
Tableau 3.2 :	Normes et techniques d'analyse pour le miel	76
Tableau 4.1 :	Interprétation des valeurs obtenus par MALDI-TOF MS.	85
Tableau 4.2 :	Antibiotiques testés pour la sensibilité des souches isolées (les antibiotiques sont classés par ordre alphabétique).	87
Tableau 4.3 :	Caractéristiques de la population d'étude.	90
Tableau 4.4 :	Espèces bactériennes identifiées par MALDI-TOF MS.	93
Tableau 4.5 :	Profil de résistance aux antibiotiques des souches bactériennes isolées dans la présente étude.	96
Tableau 5.1 :	Critères et score de l'analyse histopathologique	121
Tableau 5.2 :	Diamètres des zones d'inhibition contre les différentes souches bactériennes	122
Tableau 5.3 :	Pourcentages d'inhibition des radicaux libres (%)	124
Tableau 5.4 :	Moyennes des scores des paramètres d'évaluation histopathologiques des plaies	133

INTRODUCTION

Les plaies chroniques ou non cicatrisantes constituent un problème de santé majeur à l'échelle mondiale. Elles représentent une cause importante de morbidité et de mortalité [1]. Au-delà de l'impact sanitaire indéniable, ces plaies ont également des répercussions économiques significatives sur les systèmes de santé [2]. Les facteurs à l'origine du retard ou de l'absence de cicatrisation sont multiples et variés. Parmi les principaux facteurs, les infections des plaies occupent une place prépondérante [3].

À l'échelle mondiale, de nombreuses recherches ont été menées dans le but d'estimer la fréquence et la répartition de ces infections pyogènes liées aux plaies. Dans certains pays développés comme la France, les taux d'infection des plaies semblent relativement faibles, avec une prévalence estimée à environ 2,2% [4]. Cependant, dans les pays en développement, les chiffres sont nettement plus élevés. Au Soudan, par exemple, des recherches ont rapporté un taux alarmant de 25,23% d'infections des plaies [5], ce qui souligne l'ampleur du défi à relever dans ces contextes particuliers.

Les infections des plaies sont causées par une diversité d'espèces bactériennes. Parmi les principaux pathogènes impliqués figurent les staphylocoques, les entérobactéries et les *Pseudomonas*.

La survenue des infections bactériennes implique un recours systématique aux antibiotiques augmentant la pression de sélection et l'apparition de résistances. Cette résistance aux antibiotiques rend la prise en charge des plaies infectées extrêmement difficile, entravant le processus de cicatrisation et favorisant l'installation de plaies chroniques complexes à traiter [6].

Au cours des dernières années, une émergence alarmante de la résistance aux antibiotiques est observée, et de surcroît envers des molécules de dernière génération. Les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline, communément appelées SARM, constituent un important problème de santé

publique en raison de leur multirésistance aux antibiotiques. En Algérie, une étude menée entre 2008 et 2010 a révélé que l'incidence des souches de SARM isolées dans les infections du site chirurgical était estimée à 4,2% [7]. Dans une autre étude menée au nord-ouest de l'Algérie, par Bouharkat et *al.* (2020) sur un total de 60 isolats de *S. aureus* prélevés, 18,3% étaient des souches SARM [8].

Cette crise de l'antibiorésistance souligne l'urgente nécessité de rechercher des solutions alternatives efficaces et durables pour lutter contre les infections bactériennes des plaies. C'est dans ce contexte que les approches naturelles, telles que l'apithérapie, suscitent un intérêt grandissant.

Parmi les produits de la ruche, le miel était déjà employé par nos ancêtres pour soigner les blessures et les plaies. Son utilisation remonte à l'Antiquité, où il était considéré comme un véritable trésor par les Égyptiens, les Grecs et les Romains, qui l'utilisaient largement dans leurs pratiques de soin [9].

Cependant, avec l'avènement des antibiotiques et des traitements pharmaceutiques modernes, l'utilisation du miel dans le domaine médical a connu un certain déclin. Ce n'est que récemment que la profession médicale a "redécouvert" ce remède ancestral et son potentiel unique pour la gestion des plaies [10].

Plusieurs études ont mis en évidence les bienfaits de l'utilisation de miel pour les différents processus de cicatrisation des plaies *in vitro* et/ou *in vivo* [11], [12], [13]. Cependant, il est important de souligner que les résultats obtenus peuvent varier considérablement en fonction de plusieurs facteurs.

Tout d'abord, certaines recherches ont évalué les effets du miel utilisé seul, tandis que d'autres l'ont combiné avec d'autres substances [14], [15], [16], [17]. Ces associations peuvent potentiellement créer des synergies bénéfiques à la cicatrisation. En outre, la nature des plaies étudiées joue un rôle crucial dans les résultats observés (des plaies excisionnelles, des plaies incisionnelles, des brûlures, des plaies chroniques, ...). Un autre facteur déterminant est l'origine botanique du miel utilisé d'où sa composition qui peut moduler leurs propriétés thérapeutiques [18].

C'est à travers ces données que nous avons choisi ce sujet de recherche qui comporte en premier, une synthèse bibliographique où nous donnons quelques notions sur l'anatomie de la peau, la cicatrisation et les facteurs affectant son déroulement. Ainsi que des généralités sur le miel et ses effets thérapeutiques.

Par la suite, une partie expérimentale qui comporte deux enquêtes, une première dont l'objectif est d'estimer la fréquence des plaies infectées ainsi que la nature des germes incriminés et leur sensibilité aux divers antibiotiques, et une deuxième sur les bienfaits de miel *in vitro* pour l'effet antibactérien et antioxydant et *in vivo* pour l'effet cicatrisant chez des animaux modèles.

CHAPITRE 1 : ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA PEAU

1.1. Structure de la peau

La peau est l'un des plus grands organes de tout organisme vivant. C'est un élément important qui sépare le corps de l'environnement externe. Sa structure est complexe et dépasse largement la simple définition d'une enveloppe corporelle ; elle est plutôt considérée comme un véritable organe. Elle recouvre toute la surface corporelle ; En fait, elle s'agit du plus lourd des organes du corps [19].

La structure principale de la peau de tous les mammifères est similaire et présente une structure en couches. L'épiderme, qui est la couche externe de la peau, est d'origine ectodermique. Les autres couches : le derme et l'hypoderme sont d'origine mésodermique [20].

1.1.1. Epiderme

L'épiderme, un tissu pluristratifié, kératinisé et dépourvu de vaisseaux sanguins, présente une épaisseur variant de 0,05 mm à 1,5 mm selon sa localisation dans les régions de peau fine ou épaisse. Chez le rat, cette épaisseur varie en fonction de la race, l'âge et la surface corporelle [21].

Connu sous le terme d'épithélium de revêtement, il est constitué principalement de kératinocytes, il se renouvelle constamment à partir d'une couche basale germinative. Ces cellules subissent un processus de différenciation jusqu'à former une barrière composée de cellules mortes et aplaties, dépourvues de noyau, et ce, en espace de 14 jours. Leur évolution et leur élimination ultérieure nécessitent 14 jours supplémentaires. La durée nécessaire pour le renouvellement total de l'épiderme, estimée entre 52 et 75 jours, selon Williams et *al*, (2005) [22].

Au cours de ce processus, leur morphologie évolue et se distingue en quatre ou cinq sous-couches cellulaires distinctes : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse, la couche claire et la couche cornée (épaisse ou fine) (Figure 1.1) [23].

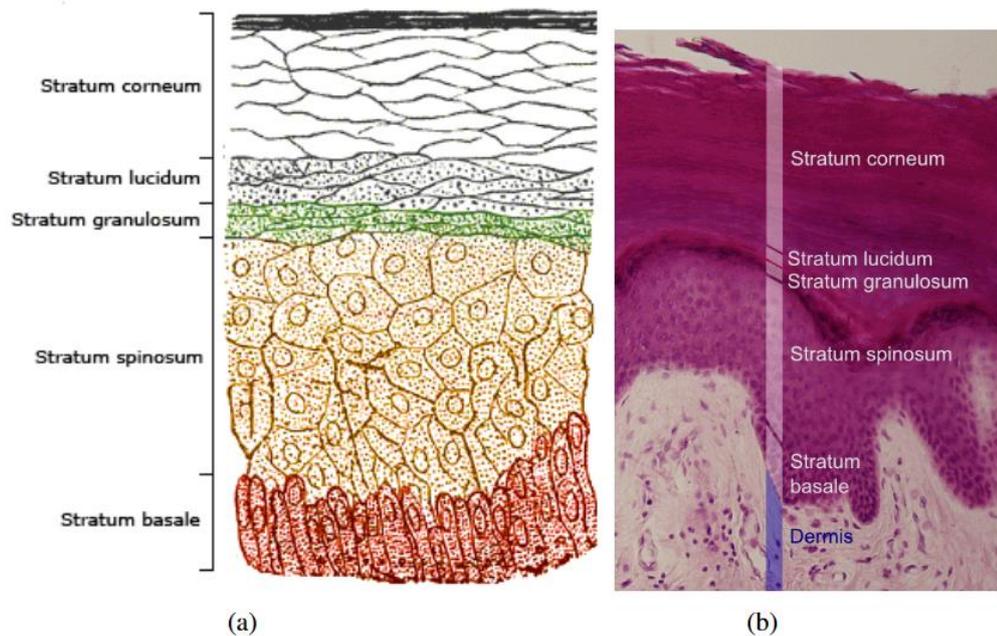


Figure 1.1 : (a) Schéma des couches cellulaires de l'épiderme, (b) Coupe histologique de l'épiderme [24].

1.1.1.1. Couche cornée (*stratum corneum*)

La couche cornée, la plus externe de l'épiderme, est composée d'environ 20 à 30 couches cellulaires. Elle est principalement constituée de cellules aplaties et dépourvues de noyaux, appelées cornéocytes ou kératinocytes cornés. L'équilibre entre la desquamation et la prolifération cellulaire de la couche basale garantit une épaisseur constante de l'épiderme à un endroit donné, ainsi qu'un renouvellement continu des cellules. En cas de perte soudaine de cellules épidermiques lors de blessures cutanées, une augmentation du taux de multiplication des cellules épidermiques devrait compenser cette perte [25].

La couche cornée assure une fonction barrière cruciale pour l'épiderme. Elle empêche la perte de liquides du milieu intérieur du corps. Elle protège également des agressions extérieures, qu'elles soient mécaniques, thermiques, liées aux radiations électromagnétiques, aux agents chimiques ou infectieux [26].

La couche cornée est composée de deux sous-couches :

- ❖ Couche compacte (*stratum compactum*) : C'est la sous-couche qui suit directement la couche granuleuse, maintient une certaine cohésion intercellulaire.

- ❖ Couche desquamante de Ranvier (*stratum disjunctum*) : C'est la sous-couche la plus superficielle, responsable de la desquamation.

Chez le rat, Le *stratum corneum* est plus épais sur ses pattes. L'épaisseur du *stratum corneum* des rats adultes est de 165 µm [27] et l'épaisseur totale de l'épiderme est comprise entre 350 et 450 µm [21].

1.1.1.2. Couche claire (*stratum lucidum*)

La couche claire n'est pas une composante de tous les types d'épiderme cutané. On la retrouve seulement dans les zones de peau plus épaisses, comme les paumes des mains et les plantes des pieds [28]. Elle est constituée de multiples assises de cellules aplaties, qui présentent un aspect clair et homogène. Ces cellules représentent une « transition » entre les cellules granuleuses et cornées, elles sont appelées communément cellules "T".

1.1.1.3. Couche granuleuse (*stratum granulosum*)

La couche granuleuse comprend entre une et trois assises de kératinocytes aplatis dotés d'un noyau ovale. On y trouve deux types de granulations : les kératohyalines et les kératinosomes. Les granulations kératohyalines, dépourvues d'enveloppe membranaire, sont volumineuses et renferment de la profilaggrine. Quant aux kératinosomes, aussi appelés corps lamellaires d'Odland, ce sont de plus petites granulations riches en lipides [29].

1.1.1.4. Couche épineuse (*stratum spinosum*)

La couche épineuse, ou *stratum spinosum*, est constituée de 5 à 6 couches cellulaires. Elle tire son nom de l'aspect "épineux" des kératinocytes, dû à la présence de nombreux desmosomes qui les relient par des tonofilaments. Ces cellules, ayant une forme cubique et aplatie, appelées acanthocytes issues de la division des kératinocytes de la couche basale [30].

1.1.1.5. Couche basale (*stratum germinatum*)

La couche basale est constituée d'une seule couche de kératinocytes. Ces cellules ont la capacité de se diviser par mitose afin d'assurer le renouvellement constant des cellules de l'épiderme. Les cellules filles issues de ces divisions se

différencient pour former les couches supérieures de l'épiderme. Elles reposent sur la membrane basale, qui sépare l'épiderme du derme [30].

La couche basale comprend aussi des mélanocytes qui représentent environ 5% de la population cellulaire de l'épiderme. Leur fonction principale est la synthèse de mélanine, un pigment naturel de la peau et des poils, processus appelé mélanogénèse. La mélanine joue un rôle crucial dans la protection du matériel génétique des noyaux des kératinocytes contre les rayonnements ultraviolets [31].

1.1.2. Jonction dermo-épidermique

Le derme et l'épiderme sont reliés par une zone d'adhérence nommée la jonction dermo-épidermique. Celle-ci est centrée autour de la membrane basale épidermique, également appelée lame basale épidermique. Sur une coupe, cette zone apparaît ondulée car elle repose sur les papilles dermiques qui s'insèrent dans l'épiderme. La jonction dermo-épidermique fait office de matrice d'ancrage fixant l'épiderme au derme. Elle joue également un rôle de barrière physique sélective entre ces deux couches cutanées. Son rôle est de réguler l'invasion cellulaire tout en permettant une diffusion contrôlée des cellules immunitaires, des nutriments et des éléments métaboliques du derme vers l'épiderme [25].

D'un point de vue structurel, la jonction dermo-épidermique est une région dépourvue de cellules, d'une épaisseur comprise entre 50 et 80 nanomètres. Elle est élaborée conjointement par les kératinocytes basaux de l'épiderme et les fibroblastes du derme. Cette jonction est constituée de trois couches successives de matrice extracellulaire spécialisée, de la surface vers la profondeur : la *lamina lucida*, la *lamina densa* et la *sub-lamina* [32].

1.1.3. Derme

Le derme est le tissu intermédiaire prédominant de la peau, constitue la majeure partie de son épaisseur.

Ce tissu est un ensemble de fibres conjonctives composées de cellules fixes et migratrices, entourées d'une matrice extracellulaire. Elle est principalement composée de fibres de collagène et d'élastine. Les fibroblastes sont les cellules prédominantes du derme, responsables de la production, de la maintenance et de la dégradation de cette matrice en sécrétant des enzymes telles que les

collagénases et les protéases. Les cellules du système immunitaire, telles que les leucocytes, les cellules dendritiques, les mastocytes et les macrophages, sont des cellules migratrices dans le derme [33].

Également, le derme abrite la grande majorité du système vasculaire cutané, ainsi que des fibres nerveuses, et sert de support pour les annexes cutanées, notamment les follicules pileux, les glandes sébacées et les muscles érecteurs [25]. Il joue aussi un rôle crucial dans la texture, l'élasticité, la résistance et la cicatrisation de la peau. Il est particulièrement important lors du processus de cicatrisation par seconde intention, où sa capacité de contraction est essentielle grâce à ses propriétés élastiques.

1.1.3.1. Derme papillaire

Le derme papillaire se situe juste sous l'épiderme. Cette couche est principalement constituée de collagène de types I et III, ainsi que de fines fibres d'oxytalan et de fibrillines 1 et 2, disposées perpendiculairement à l'épiderme. Elle est riche en fibroblastes et en cellules immunitaires, cette région sert de support aux fibres nerveuses, aux vaisseaux sanguins capillaires et aux vaisseaux lymphatiques. Elle fournit ainsi un réseau nourricier permettant d'alimenter l'épiderme [34].

1.1.3.2. Derme réticulaire

La couche inférieure du derme, appelée derme réticulaire, est plus épaisse et composée d'un réseau dense de collagène de type I ainsi que de fibres élastiques pleinement. Cette couche abrite les annexes cutanées et joue un rôle dans l'amortissement des chocs [34].

Pour le rat, nous ne distinguons pas une division aussi nette du derme et sa structure est plus homogène [35].

1.1.4. Hypoderme

L'hypoderme est un tissu conjonctif lâche et très vascularisé et innervé. Il s'agit de la couche cutanée la plus profonde, dont l'épaisseur varie selon les régions du corps. L'hypoderme est principalement composé d'adipocytes regroupés en lobules et maintenus par du tissu conjonctif. Son rôle essentiel consiste à stocker

les graisses sous forme de triglycérides et d'acides gras, constituant ainsi d'importantes réserves énergétiques pour l'organisme [36].

Entre les lobules graisseux de l'hypoderme, il existe de nombreux capillaires sanguins et fibres nerveuses, dont la densité varie selon la localisation anatomique. De plus, ces lobules adipeux sont séparés par des cloisons de fibres de collagène provenant du derme. Ces cloisons se connectent aux aponévroses des muscles ou au périoste des os, limitant ainsi la mobilité de la peau [37].

La délimitation entre le derme profond et l'hypoderme pourrait sembler floue, notamment dans les régions où ces deux plans sont riches en tissu adipeux. Ainsi, une couche de fibres musculaires striées discontinues, appelée muscle panniculaire ou *Panniculus carnosus*, se trouve entre le derme profond et l'hypoderme, avec un développement notable dans certaines zones comme le dos [25].

Autres couches

Toutefois, des particularités méritent d'être signalées. Ainsi, la peau du rat présente une couche supplémentaire appelée panniculus. C'est une couche de muscle différenciée tant sur l'aspect quantitatif que sur l'aspect épaisseur des fibres musculaires. Chez les femelles, le panniculus apparaît comme une couche de cellules en division dans la zone où le tissu se transforme en glandes mammaires. Le muscle est interrompu par l'apparition de foyers de tissu adipeux contenant des faisceaux de tissu conjonctif, dans lesquels sont présents des vaisseaux et des nerfs [38].

Également, la couche fibreuse (*stratum fibrosum*), également absente dans la peau humaine, forme la limite inférieure du tissu sous-cutané. Elle est constituée de petits faisceaux de collagène suspendus dans du tissu conjonctif ayant la consistance du mucus. Les vaisseaux (principalement des micro-vaisseaux) et les nerfs sont facilement identifiables.

Les fibres de collagène peuvent être densément regroupées en faisceaux simples dans le *stratum fibrosum* ou peuvent être séparées par du tissu adipeux [39], [38].

1.1.5. Glandes de la peau

1.1.5.1. Glandes sébacées

Les glandes sébacées sont généralement associées aux follicules pileux. Elles sont constituées de cellules sécrétrices appelées sébocytes. Ces dernières subissent une différenciation de la périphérie vers le centre de la glande, s'enrichissant progressivement en lipides et augmentant de volume. Le noyau des sébocytes se condense (devient pycnotique) et la cellule entière, avec son contenu sécrétoire, est éliminée. Le sébum ainsi sécrété, riche en lipides comme le cholestérol, les triglycérides et les acides gras, est alors acheminé vers la surface de l'épiderme pour former un film protecteur contre la déshydratation cutanée et les infections bactériennes. La sécrétion de sébum est régulée par les hormones sexuelles [40]. De plus, il renferme des phéromones [30].

1.1.5.2. Glandes sudoripares

Les glandes sudoripares (glandes sudoriques) se trouvent sur toute la surface du corps, à l'exception des mamelons et de certaines zones des organes génitaux externes. On distingue deux catégories de glandes sudoripares dans la peau : les glandes sudoripares apocrines et les glandes sudoripares eccrines.

➤ Glandes sudoripares apocrines

Les glandes sudoripares de type apocrine sont reliées à la gaine des follicules pileux. On les retrouve principalement au niveau des régions axillaires et pubiennes. Elles sécrètent un liquide contenant une grande quantité de protéines et jouent un rôle dans la régulation de la température corporelle [41].

➤ Glandes sudoripares eccrines

Les glandes sudoripares eccrines (appelées aussi mérocrines), présentes sur toute l'étendue de la peau, jouent un rôle vital dans la régulation thermique du corps [42]. Elles sont composées de cellules glandulaires cylindriques, ces glandes forment un conduit permettant l'excrétion principalement d'eau, de minéraux, de lactate et d'urée.

La partie sécrétrice de ces glandes se trouve dans la partie profonde du derme, tandis que la partie excrétrice parcourt le derme puis l'épiderme perpendiculairement à la surface cutanée, se terminant par un pore [43].

1.1.6. Poils

Les poils sont des structures minces et souples qui émergent à la surface de la peau des mammifères. Ils sont formés de cellules kératinisées et sont le produit de replis de l'épiderme appelés follicules pileux. La présence de poils est une caractéristique commune à tous les mammifères [44].

Chaque poil prend naissance au sein d'une invagination tubulaire de l'épiderme s'enfonçant profondément dans le derme. Cette invagination forme initialement la paroi de l'infundibulum, qui deviendra ensuite la gaine épithéliale externe du poil. En s'éloignant de la surface cutanée, dans la région sus-isthmique, la paroi de l'infundibulum s'amincit progressivement par perte des couches cornée puis granuleuse. Cette paroi se poursuit dans la région sous-isthmique par la gaine épithéliale externe qui s'amincit aussi graduellement. La couche spinuleuse finit par disparaître, ne laissant que la gaine externe réduite à une seule assise cellulaire. Ces cellules sont volumineuses et riches en glycogène, leur conférant un aspect vacuolaire [45].

1.1.7. Follicules pileux

Le follicule pileux est constitué du poil lui-même, de sa gaine épithéliale et du muscle arrecteur. A la base se trouve une cavité, le bulbe pileux, contenant un tissu conjonctif très vascularisé appelé papille folliculaire. Cette papille est formée de cellules matricielles qui se divisent et migrent vers la surface pour former les kératinocytes de la tige du poil et la gaine épithéliale interne. La gaine externe, ou infundibulum, dérive d'une invagination tubulaire de l'épiderme s'enfonçant profondément dans le derme [46].

Le muscle arrecteur du poil, un muscle lisse oblique, s'insère sur la base du follicule et la jonction dermo-épidermique. Sa contraction permet le redressement du poil, phénomène appelé horripilation. Sous ce muscle se situe le bulge, où résident les cellules souches du poil. La gaine du follicule est connectée aux glandes sébacées et sudoripares apocrines [47].

Dans la peau des rats, le pigment est produit près du bulbe pileux anagène [21] et non dans la couche basale de l'épiderme, ce qui est typique de la peau humaine [48]. Dans les parties épaisses de l'épiderme du rat, on trouve des cellules de Merkel contenant des structures regroupées autour de follicules pileux plus grands et agissant comme des corps tactiles [21].

1.1.8. Griffes

Les griffes sont des structures spécialisées, kératinisées et très rigides, en continuité directe avec le derme et l'épiderme.

Leur partie exposée, comprenant le corps et l'apex, mesure entre 16 et 18 mm dans les pattes antérieures et entre 20 et 30 mm dans les pattes postérieures. Elles ne sont pas rétractiles et sont alignées dans le prolongement des doigts. Les coussinets digitaux sont peu développés, étroits et minces. Ils ne sont pas recouverts de corne ni d'un épiderme épais, qui mesure qu'entre 50 à 60 μm d'épaisseur. De plus, leur peau est velue partout, sans être glabre. Il n'y a pas de torus métacarpien ou métatarsien. Les faces palmaires de la main et plantaire du pied, y compris les doigts, sont recouvertes d'une fourrure dense et courte, ce qui leur permet de prendre contact avec le sol sur toute leur longueur lorsqu'ils sont au repos [44].

1.1.9. Vascularisation cutanée

1.1.9.1. Vaisseaux cutanés

Le réseau vasculaire cutané est essentiellement alimenté par les artères sous-cutanées, qui se déploient sous l'hypoderme, suivant un trajet parallèle à la surface de la peau. Ces artères émettent des branches collatérales qui pénètrent entre les lobules graisseux, formant ainsi un réseau anastomotique appelé plexus profond. Cette structure se situe à la jonction entre le derme et l'hypoderme, s'alignant avec la surface cutanée.

Des artérioles ascendantes relient ce plexus profond à un second réseau artériel anastomotique, nommé le plexus artériel superficiel ou sous-papillaire, localisé dans la partie supérieure du derme [37].

À partir du plexus artériel superficiel, des artérioles émergent pour irriguer un réseau capillaire au niveau des papilles dermiques. Parallèlement, le système

veineux suit un schéma similaire au système artériel. Les capillaires convergent en veinules, qui sortent des papilles dermiques pour se connecter au plexus veineux superficiel ou sous-papillaire, associé au plexus artériel. Ce réseau veineux est interconnecté avec celui des artères. Le sang est ensuite drainé vers le plexus veineux profond du derme, qui coïncide avec le plexus profond des artères. Quant aux veines sous-cutanées, situées parallèlement aux artères sous-cutanées, ramènent le sang vers le cœur, assurant ainsi la circulation sanguine dans la peau.

Il existe une transition progressive entre les différents types de vaisseaux sanguins. Les artérioles ont un diamètre interne d'environ 20 μm et une paroi épaisse d'environ 15 μm , constituée de trois tuniques cellulaires concentriques séparées par des fibres élastiques. De l'intérieur vers l'extérieur, on trouve l'intima formée principalement d'un endothélium et d'un sous-endothélium, la média composée de plusieurs assises de cellules musculaires lisses, et enfin l'adventice constituée de fibres de collagène. En revanche, dans les capillaires, la média et l'adventice disparaissent, laissant une paroi d'environ 1 μm d'épaisseur, formée uniquement d'une couche endothéliale perméable et d'une assise externe discontinue de péricytes, le tout entouré d'une membrane basale [49].

Les veinules post-capillaires, qui drainent le sang de 4 à 5 capillaires, présentent une structure semblable à celle des capillaires mais avec une lumière plus large. Elles sont constituées de tubes formés par des cellules endothéliales, soutenus par une lame basale et une tunique externe appelée adventice, composée de fibres de collagène et de fibroblastes. Les veinules musculaires, formées par la convergence des veinules post-capillaires, présentent une paroi enrichie en cellules musculaires lisses et en fibres conjonctives et élastiques, leur conférant une grande distensibilité [50].

Les veinules jouent un rôle de réservoir à capacité variable, participant ainsi à la régulation du volume sanguin microcirculatoire. Elles ont une lumière d'environ 20 μm et une paroi d'une épaisseur d'environ 2 μm [49].

1.1.9.2. Réseau lymphatique cutané

Le système vasculaire lymphatique joue un rôle essentiel en drainant l'excès de liquide extracellulaire vers la circulation sanguine, après une filtration au niveau des ganglions lymphatiques. Il est constitué de vaisseaux lymphatiques qui suivent

généralement un trajet parallèle aux veines. Les capillaires lymphatiques, responsables de la récolte du liquide extracellulaire, le transforment en lymphne dès son entrée dans ces vaisseaux. Ainsi, la lymphne a la même composition que le liquide interstitiel, contenant eau, électrolytes, protéines et divers lymphocytes. Les capillaires lymphatiques représentent le point de départ du drainage lymphatique, également appelés lymphatiques initiaux. Il existe également un chemin pré-lymphatique au sein de l'espace extracellulaire, où les fibres de tissu conjonctif semblent guider le fluide et les macromolécules vers les capillaires lymphatiques [51].

Dans le tissu cutané, les capillaires lymphatiques apparaissent comme des conduits dilatés situés à proximité des capillaires sanguins. Leur paroi est formée d'une seule assise de cellules endothéliales reposant sur une mince membrane basale. Des faisceaux de filaments composés de fibrilles de fibrilline ancrent l'endothélium aux fibres élastiques du tissu conjonctif environnant [51].

Les jonctions cellulaires des capillaires lymphatiques sont plus lâches que celles des capillaires sanguins. Les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques se chevauchent légèrement, formant des sortes de valves unidirectionnelles dont les bords ne sont pas fixés aux tissus environnants.

Lorsque la pression du liquide interstitiel augmente dans les tissus, cela étire les prolongements fibreux des cellules endothéliales, dilatant ainsi les capillaires lymphatiques. Cette augmentation de pression pousse également les valves inter-endothéliales vers l'intérieur du vaisseau, permettant l'entrée du liquide interstitiel. La pression à l'intérieur s'accroît alors progressivement, ce qui referme les valves entre les cellules endothéliales, empêchant la fuite de la lymphne. Les capillaires lymphatiques ont un diamètre supérieur (10 à 70 μm selon les conditions locales) et une lumière plus irrégulière que les capillaires sanguins [52].

1.1.10. Innervation cutanée

Le système nerveux cutané constitue un réseau dense et complexe de nerfs innervant l'intégralité de la peau, à l'exception de sa couche cornée. En termes de flux d'information, on distingue des voies dites afférentes ou sensibles acheminant les informations depuis la périphérie vers le système nerveux central (SNC). Ces voies renseignent le SNC sur l'environnement extérieur et l'état interne de

l'organisme. Il existe également des voies efférentes ou motrices qui véhiculent les instructions dans le sens inverse, du SNC vers la périphérie, transmettant ainsi les directives du SNC aux organes effecteurs [53].

1.1.10.1. Voies afférentes du système nerveux cutané

Les voies afférentes du système nerveux cutané, qui font partie du système nerveux somatique, jouent un rôle crucial dans la perception sensorielle de la peau. En tant qu'organe sensoriel majeur, la peau est constamment exposée à une multitude d'informations provenant du monde extérieur auquel elle est directement en contact.

Ces informations sont détectées par des récepteurs ou des terminaisons nerveuses libres répartis à travers la peau, puis transmises par différents types de fibres nerveuses sensibles.

Ces fibres, organisées en réseau dans le derme, sont les prolongements des neurones chargés de transporter les informations sensorielles vers le SNC. En conséquence, les stimuli sensitifs cutanés sont perçus par l'individu, qui en est conscient [54].

1.1.10.2. Voies efférentes du système nerveux cutané

Les voies efférentes du système nerveux cutané, appartenant au système nerveux autonome qui contrôle les réponses motrices involontaires, se trouvent exclusivement dans la peau. Bien qu'elles soient moins nombreuses que les fibres sensibles, elles sont présentes dans le derme où elles s'entremêlent étroitement avec les fibres sensibles du plexus dermique. Les fibres motrices cutanées se divisent en types B et C. Leur rôle consiste à innover et réguler les muscles horripilateurs, les glandes sudoripares, les vaisseaux sanguins, ainsi que d'autres structures comme les vaisseaux lymphatiques, les glandes eccrines et sébacées, les anastomoses artério-veineuses et les follicules pileux [54].

1.2. Physiologie de la peau

La structure anatomique de la peau montre son rôle fondamental en tant que barrière multifonctionnelle. Cette barrière agit à plusieurs niveaux : elle assure une protection physique, mécanique, chimique et immunologique. De plus, la peau contribue activement au maintien de l'équilibre interne du corps en régulant son

hydratation et sa température. Elle joue également un rôle crucial dans la perception sensorielle, permettant une interaction sensible avec l'environnement.

1.2.1. Barrière physique

La fonction principale de la peau est de servir de barrière physique, un élément crucial qui garantit la préservation de l'environnement interne du corps.

L'épiderme, en particulier sa couche cornée, joue un rôle crucial en tant que barrière protectrice contre les agressions extérieures, préservant ainsi les organes internes des dommages potentiels.

La structure de cette barrière, composée de cornéocytes liés par une enveloppe cornée et un ciment lipidique, forme une défense efficace contre divers éléments extérieurs tels que la pollution, les produits chimiques, les allergènes, les agents pathogènes et les rayonnements solaires [55].

1.2.2. Hydratation

Le derme joue un rôle crucial dans le maintien de l'hydratation cutanée en stockant l'eau. Cette réserve hydrique provient du système vasculaire et se lie à des macromolécules telles que les protéoglycanes et l'acide hyaluronique, constituant la substance fondamentale du derme. Cette capacité du derme à retenir l'eau agit comme une éponge [56].

Les lipides présents dans l'espace entre les cellules cornéocytaires forment un film hydrophobe qui agit comme une barrière protectrice contre la déshydratation cutanée. Cependant, malgré cette barrière, la couche cornée permettrait une perte d'eau trans-épidermique/minimale, qui peut être exacerbée dans certaines conditions pathologiques telles que le psoriasis, la xérose et la dermatite atopique [57].

1.2.3. Régulation thermique

La peau est le principal acteur dans la régulation thermique, produisant ou dissipant de la chaleur selon les besoins. Les échanges thermiques entre le corps et l'environnement se réalisent à travers quatre mécanismes : le rayonnement infrarouge, la conduction thermique, la convection par le brassage d'air sur la peau

et l'évaporation de l'eau. Ainsi, des processus biologiques intracellulaires sont déclenchés pour répondre aux variations thermiques extérieures.

La régulation de la température corporelle implique le système vasculaire du derme et ses annexes cutanées. Par exemple, en cas d'exposition à une chaleur excessive, les glandes sudoripares eccrines sont stimulées par le système nerveux sympathique sous le contrôle de l'hypothalamus, ce qui entraîne la sécrétion de sueur [58]. L'hypoderme contribue également au maintien de la température corporelle en agissant comme un isolant thermique [59].

1.2.4. Organe sensoriel

La peau est un organe richement ultra-innervé qui assure une fonction tactile cruciale. Elle détecte une multitude d'événements et de stimuli pour les transmettre au cerveau, permettant ainsi à l'individu d'adopter des réponses appropriées à son environnement.

Ce rôle sensoriel de la peau se manifeste à travers plusieurs mécanismes [58] :

- La sensibilité tactile, également connue sous le terme de mécanoreception, est attribuée au système mécanorécepteur, qui permet la perception du toucher en détectant les vibrations et les pressions.
- La sensibilité aux variations physico-chimiques telles que la chaleur et le froid est assurée par les thermorécepteurs, qui contribuent à la régulation de la température corporelle en influençant la vascularisation du corps par le biais du thalamus.
- La sensibilité nociceptive repose sur les nocicepteurs, des récepteurs sensibles à la douleur qui réagissent aux stimuli tels que les pincements, les piqûres, les températures extrêmes ($> 45^{\circ}\text{C}$ ou $< -20^{\circ}\text{C}$) et aux substances provoquant la douleur.

1.2.5. Sécrétion et excrétion

La peau joue un rôle central dans la production de structures kératinisées telles que les poils, les griffes et la couche cornée de l'épiderme. De plus, elle abrite des glandes qui sécrètent du sébum ainsi qu'une quantité moindre de sueur.

1.2.6. Métabolisme

La peau est un milieu de production de mélanine par les mélanocytes, localisés dans la couche basale de l'épiderme, les follicules pileux et les canaux des glandes sudoripares et sébacées [60]. La mélanine est responsable de la pigmentation de la peau et du pelage, et elle agit comme un mécanisme de protection contre les dommages induits par l'exposition au soleil.

Également, la peau joue un rôle essentiel dans le métabolisme de la vitamine D3. Les rayons solaires stimulent la conversion du 7-déshydrocholestérol en vitamine D3 dans l'épiderme [60].

1.2.7. Immunité

La peau agit comme une barrière de défense active contre les agents pathogènes grâce à la présence de cellules immunitaires spécialisées. Lorsque des pathogènes pénètrent, la peau déclenche un système de défense immunitaire impliquant des cellules immunitaires résidentes dans les couches externe (épiderme) et interne (derme) de la peau.

Parmi ces cellules, les cellules présentatrices d'antigènes, comme les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques, jouent un rôle crucial. Elles détectent les agents pathogènes et interagissent avec les lymphocytes T du système lymphatique pour monter une réponse immunitaire spécifique visant à les éliminer [61].

CHAPITRE 2 : CLASSIFICATION DES PLAIES ET PROCESSUS DE CICATRISATION

Les plaies peuvent être définies comme des perturbations de la continuité cellulaire, anatomique et fonctionnelle des tissus vivants dues à des dommages physiques, chimiques, thermiques, microbiens ou immunologiques. Quelle que soit leur étiologie, ces lésions entraînent la destruction partielle ou totale de l'épiderme et/ou du derme.

La prise en charge des plaies cutanées représente un enjeu de santé. Dans ce contexte, la classification des plaies permet, selon des critères étiologiques, anatomiques et évolutifs d'adapter la stratégie de traitement en fonction du type lésionnel.

Par ailleurs, une connaissance approfondie des phases et des facteurs régulant le processus de cicatrisation permet de développer des interventions thérapeutiques ciblées visant à accélérer la guérison, à minimiser les complications et à favoriser enfin la restauration fonctionnelle des tissus.

2.1. Classification des plaies

Les plaies cutanées suite à une blessure sont classées selon plusieurs facteurs :

- La profondeur, évaluée selon trois degrés et ce, pour caractériser la sévérité de la plaie, notamment dans le cas des brûlures (premier, deuxième et troisième degré) ;
- L'étendue, représentée par la surface affectée ;
- La nature de l'agression, comprenant les traumatismes, la chaleur, le froid et les agents chimiques ;
- L'évolution, classée soit comme des plaies à évolution chronique ou à évolution aiguë.

2.1.1. Selon la profondeur de la plaie

2.1.1.1. Premier degré

Les plaies du premier degré, également appelées les plaies partielles, se limitent à l'épiderme. Elles sont généralement causées par une légère brûlure, à une exposition prolongée au soleil ou à une abrasion mineure, et restent douloureuses pendant quelques jours. Les kératinocytes de l'épiderme morts se desquament et sont remplacés par la prolifération des cellules basales, sans qu'aucune cicatrice ne se forme [62], [63].

2.1.1.2. Deuxième degré

Les lésions du deuxième degré sont plus profondes et causent une douleur intense car elles affectent les terminaisons nerveuses du derme. Ces blessures résultent généralement de brûlures plus importantes, d'abrasions cutanées ou de coupures. Elles entraînent la destruction de l'épiderme, de la membrane basale et d'une partie du derme. Elles peuvent atteindre le derme papillaire (blessures peu profondes), comme elles peuvent aller plus profondément en altérant le derme réticulaire. Toutefois, une portion saine du derme ainsi que des annexes cutanées demeurerait intactes, et favoriseraient ainsi la ré-épithélialisation.

La cicatrisation de ces lésions est souvent laborieuse et peut laisser une cicatrice permanente, notamment dans le cas de plaies profondes[62],[63]. Les lacérations nécessiteront éventuellement des sutures pour refermer les plaies du deuxième degré, tandis que des greffes cutanées pourraient être envisagées en cas d'étendue importante ou de blessures de deuxième degré profondes, telles que les brûlures [48].

2.1.1.3. Troisième degré

Les lésions de troisième degré se distinguent par l'altération totale de l'épiderme et du derme. Une brûlure sévère, une coupure profonde ou une abrasion importante entraîneraient la perte des terminaisons nerveuses, rendant ainsi ces blessures insensibles. Dans ce cas, la cicatrisation doit commencer à partir des bords de la plaie. Après une lacération, des sutures, des broches ou des pansements seraient nécessaires si la taille ou l'emplacement de la plaie augmenteraient le risque de déhiscence.

Pour les abrasions ou les brûlures étendues de troisième degré, une greffe serait indispensable pour permettre la guérison. En l'absence de greffe, la régénération tissulaire serait laborieuse, prolongée et esthétiquement peu satisfaisante [62], [63].

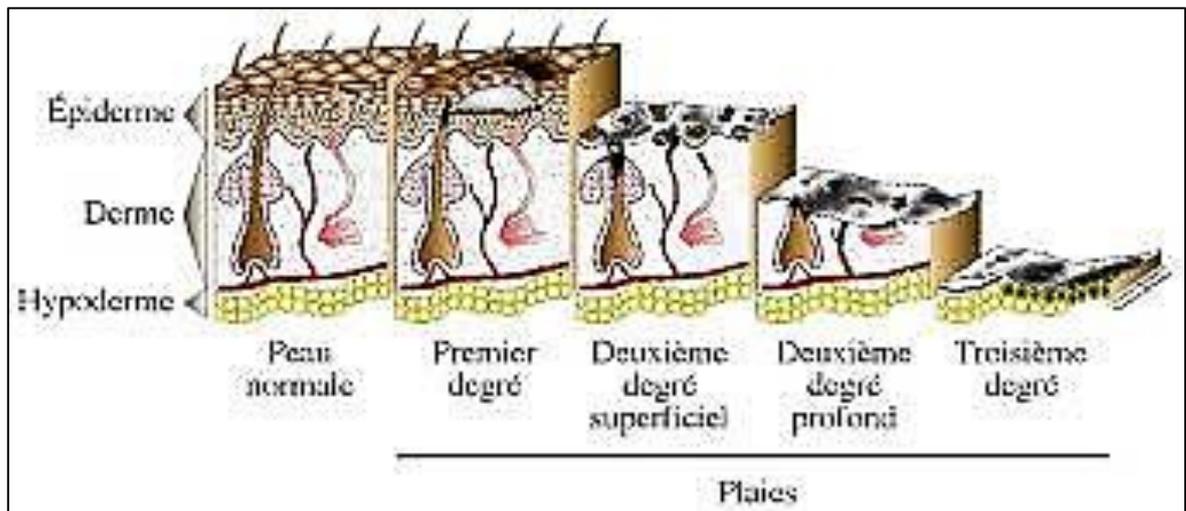


Figure 2.1 : Classification des plaies cutanées en fonction de leur profondeur.

2.1.2. Selon l'étendue de la plaie

L'étendue d'une blessure revêt une importance primordiale dans la prise en charge d'une plaie. Ainsi, les interventions thérapeutiques et les mesures de prévention vis-à-vis des infections varieront en fonction d'une lésion localisée ou d'une blessure affectant une proportion significative de la surface corporelle.

La prise en charge thérapeutique peut aller de l'application d'un simple pansement pour des plaies superficielles et circonscrites à l'utilisation de greffes de peau autologue ou d'autres substituts dermiques pour les pertes de substance majeures et étendues. On peut également avoir recours au débridement chirurgical, une procédure visant à éliminer les tissus nécrosés et à réparer le site de la plaie [64].

2.1.3. Selon la nature de la plaie

La nature de la blessure influe sur les caractéristiques de la plaie, ce qui a un impact sur sa présentation ainsi que sur son processus de guérison, naturelle ou thérapeutique.

Ainsi, des plaies causées par une action thermique subiraient une perturbation importante de la matrice extracellulaire par rapport à celles ayant été causées par une incision, impactant ainsi leur profil inflammatoire et leur réparation tissulaire, éventuellement [65].

2.1.4. Selon l'évolution dans le temps

2.1.4.1. Plaies aiguës

Il s'agit d'une lésion tissulaire qui évolue selon un processus de réparation ordonnée et qui aboutit à une restauration durable de l'intégrité anatomique et fonctionnelle. Elles sont généralement causées par des coupures ou des incisions chirurgicales et le processus de cicatrisation s'achèverait dans les délais prévus [66].

2.1.4.2. Plaies chroniques

Ces plaies sont dues à des infections locales, à l'hypoxie, à des traumatismes, à des corps étrangers et à des problèmes systémiques comme le diabète sucré, la malnutrition, l'immunodéficience ou les médicaments.

Elles sont considérées comme chroniques lorsque le temps de cicatrisation ne suit pas l'évolution prévue ou ne se situe pas dans la fourchette de ce qui est considéré comme une trajectoire de cicatrisation normale. L'ensemble du processus est prolongé. Les plaies considérées comme chroniques résistent souvent aux tentatives de traitement. En outre, la qualité des tissus pourrait être de mauvaise qualité, entraînant ainsi une mauvaise fermeture fonctionnelle, et par voie de conséquences les plaies pourraient de nouveau surgir [67].

2.2. Processus de la cicatrisation

Le mécanisme de cicatrisation des plaies passe par plusieurs phases notamment : l'hémostase, la réponse inflammatoire, la prolifération et la formation de tissu de granulation et enfin le remodelage et la maturation tissulaire (Figure 2.2).

Dans les conditions normales, le processus suit une séquence temporelle très spécifique, mais les phases pourraient se chevaucher dans le temps [3].

Des interruptions, des anomalies ou une prolongation du processus peuvent engendrer un retard de la cicatrisation des plaies ou une plaie chronique non cicatrisable.

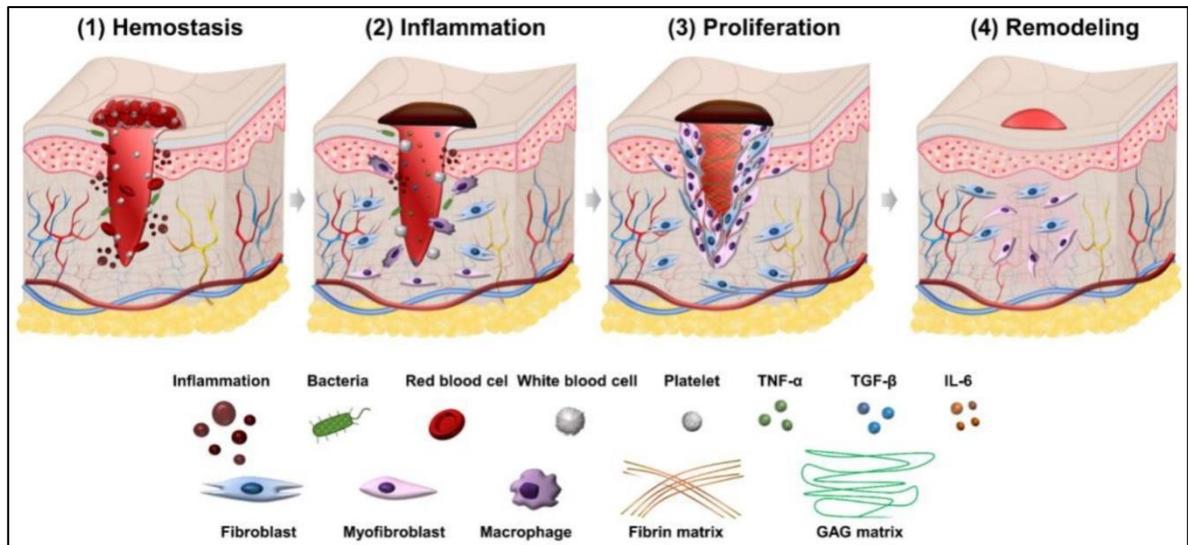


Figure 2.2 : Illustration des phases du processus de cicatrisation des plaies [68].

2.2.1. Hémostase

L'hémostase commence dès que la lésion du tissu survient et peut s'étendre de 1 à 3 jours [69]. Elle comprend plusieurs étapes successives. Initialement, une contraction des vaisseaux sanguins se déroule autour de la plaie, qui peut durer généralement de 15 à 60 secondes.

Cette vasoconstriction vise à réduire le flux sanguin afin de faciliter la mise en place de l'hémostase primaire et de limiter le saignement. Pendant cette phase, une agrégation d'un amas de plaquettes se produit pour stopper ce saignement, en formant par la suite un bouchon hémostatique pour arrêter ce saignement [70].

Après, les brins de fibrine forment un réseau entre les plaquettes agrégées, piégeant les globules rouges et forment un caillot de fibrine imperméable. Ce dernier scelle le site de la blessure et empêche toutes éventuelles hémorragies et infections.

Le caillot sanguin formé et les tissus autour de la plaie libèrent des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance. Parmi ces derniers, on retrouve le facteur de croissance transformant bêta (TGF-β), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et le facteur

de croissance épidermique (EGF). Le PDGF en particulier exerce un effet chimiotactique sur les fibroblastes et les cellules musculaires lisses, comme démontré dans des études *in vitro* [71].

Le TGF- β , quant à lui active la transformation des fibroblastes en myofibroblastes [72].

L'EGF va soutenir par la suite la ré-épithélialisation. Notons que, que le caillot sanguin contient des molécules de fibrine, de la fibronectine, de la vitronectine et des thrombospondines, formant la matrice provisoire comme une structure d'échafaudage pour la migration des leucocytes, des kératinocytes, des fibroblastes et des cellules endothéliales et comme un réservoir de facteurs de croissance.

Cette phase, appelée hémostase secondaire, dure généralement entre 3 et 5 minutes, favorisant ainsi le processus de coagulation. Par la suite, la mise en place de ce réseau de fibrine stimule la croissance des fibroblastes et des cellules musculaires lisses dans la paroi des vaisseaux, amorçant ainsi le processus de réparation qui finira par dissoudre le caillot grâce à la fibrinolyse.

Après l'arrêt du saignement, la phase inflammatoire de la cicatrisation débute. Durant cette phase, différents types de cellules immunitaires sont attirées vers le site de la plaie par un processus appelé chimiotaxie. D'abord une infiltration de neutrophiles est observée, suivie séquentiellement par l'infiltration de macrophages et de lymphocytes. La présence de ces cellules inflammatoires à la plaie favorise, étape cruciale du processus de guérison.

2.2.2. Réponse inflammatoire

La deuxième étape du processus de cicatrisation consiste à l'élimination des corps étrangers et des tissus nécrosés du site de la blessure. Elle démarre après la libération des cytokines et des facteurs de croissance par les fibroblastes situés dans la région affectée [73].

Parmi ces substances, il y a les interleukines telles que l'interleukine-1 β et le facteur de nécrose tumorale (TNF α).

Ces éléments déclenchent une réponse inflammatoire, notamment en attirant les neutrophiles vers la zone affectée, ayant un rôle important dans

l'élimination des microbes envahissants et des débris cellulaires dans la zone de la plaie [74].

Par la suite, les monocytes sont recrutés et se transforment en macrophages, et contribuent à des processus tels que la phagocytose, l'angiogenèse et le recrutement cellulaire. En parallèle, ces cellules inflammatoires favorisent l'intervention de molécules spécifiques, notamment des enzymes lysosomales (des lipases ou des protéases, ainsi que des espèces oxygénées), qui contribuent au nettoyage de la plaie. Ainsi, les macrophages libèrent des cytokines qui favorisent la réponse inflammatoire en recrutant et en activant des leucocytes supplémentaires [75].

Du point de vue macroscopique, cette phase se manifeste par l'apparition de signes caractéristiques de l'inflammation, représentés par la formation d'un œdème et d'un érythème autour de la plaie, la sensation de chaleur, ainsi qu'une douleur pulsatile [76].

Mise à part une contamination éventuelle étendue de la plaie ne se soit produite, l'infiltration de neutrophiles dans la plaie cesse en quelques jours. La plupart des neutrophiles sont piégés dans le caillot de la plaie et les tissus desséchés, puis sont soit expulsés avec l'escarre, soit détruits par la phagocytose des macrophages. En éliminant ces cellules apoptotiques, les macrophages subissent une transition phénotypique vers un état réparateur qui stimule les kératinocytes, les fibroblastes et l'angiogenèse pour favoriser la régénération tissulaire. De cette manière, les macrophages favorisent la transition vers la phase proliférative de la cicatrisation [77].

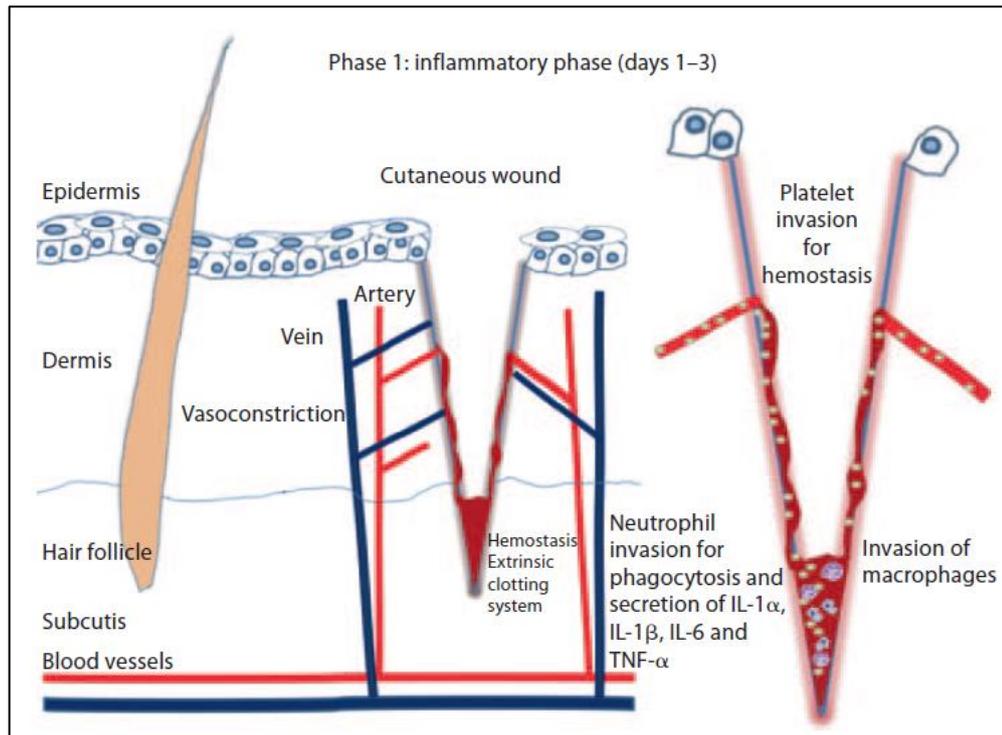


Figure 2.3 : Phase inflammatoire après une plaie cutanée ; hémostase et invasion de cellules inflammatoires [78].

2.2.3. Prolifération et granulation

La troisième phase du processus de cicatrisation se déclenche de 2 à 10 jours, après l'apparition de la blessure, ayant pour rôle la restauration d'une barrière épithéliale stable en vue de la formation d'un tissu cicatriciel. La phase proliférative suit généralement et se chevauche avec la phase inflammatoire, et se caractérise par la prolifération et la migration épithéliales sur la matrice provisoire à l'intérieur de la plaie (ré-épithélialisation).

Au cours de la phase inflammatoire, les macrophages et les neutrophiles libèrent des cytokines et des chimiokines pour initier le recrutement cellulaire au site de la lésion [69].

Pendant cette phase de prolifération cellulaire, le phénomène de granulation se déclenche et favorise la création d'un nouveau tissu conjonctif hautement vascularisé. Sous l'effet de facteurs de croissance, les fibroblastes produisent du collagène ainsi que des glycosaminoglycanes et des protéoglycanes, qui sont des composants majeurs de la matrice extracellulaire.

Ces derniers contribuent à la fermeture de la plaie. Parallèlement, les angioblastes établissent un nouveau réseau capillaire, tandis que les kératinocytes se regroupent sur les bords de la plaie pour permettre la ré-épithélialisation du tissu [79].

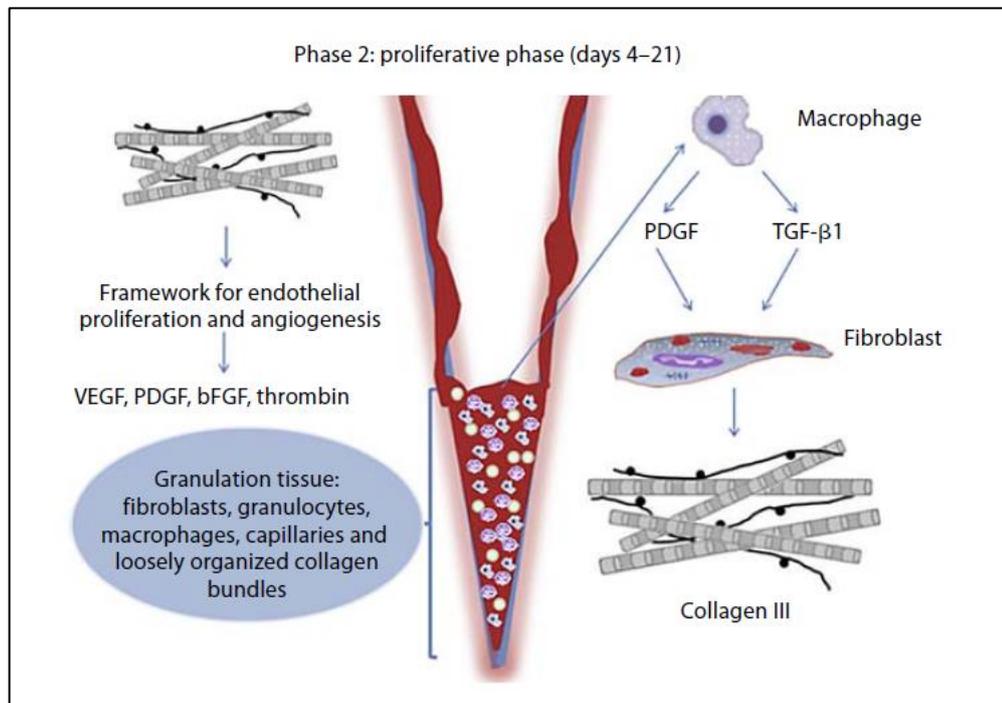


Figure 2.4 : Phase proliférative de processus de cicatrisation [78].

2.2.4. Remodelage et maturation

Après une prolifération robuste et une synthèse de la matrice extra-cellulaire, la cicatrisation des plaies entre dans la phase de remodelage finale. Le remodelage ou la maturation constitue la phase la plus longue du processus de cicatrisation. Elle survient environ deux à trois semaines après la blessure et peut durer plusieurs années.

Pendant cette période, l'activité immunitaire diminue progressivement, tandis qu'une réorganisation de la matrice extracellulaire et du tissu granulaire se produit afin de produire un tissu cicatriciel qui se rapproche le plus possible du tissu d'origine. Cela implique notamment une régression de nombreuses capillaires nouvellement formées, de sorte que la densité vasculaire de la plaie revienne à la normale et une augmentation de la quantité de collagène [80].

Le collagène III, produit lors de la phase proliférative, est remplacé par un collagène I plus fort qui est orienté en petits faisceaux parallèles. Plus tard, les myofibroblastes provoquent des contractions de la plaie par leur fixation multiple au collagène et aident à réduire la surface de la cicatrice en développement [81].

La plaie subit une contraction physique tout au long du processus de cicatrisation, qui est censée être médiée par des fibroblastes contractiles (myofibroblastes) qui apparaissent dans la plaie [74].

Il est à noter que certains composants cutanés ne se rétabliront jamais complètement après la fermeture de la plaie. Les annexes sous-épidermiques telles que les follicules pileux ou les glandes sudoripares n'ont aucun potentiel de guérison ou de repousse après une blessure grave. L'épiderme de la cicatrice résultante diffère de la peau non affectée après la cicatrisation de la plaie en raison de l'absence de papilles réticulaires qui sont normalement ancrées dans la matrice tissulaire sous-jacente et sont responsables de la connexion étroite de l'épiderme au derme [82].

Toutefois, certains types de plaies ne suivent pas le processus classique de cicatrisation et restent dans une phase inflammatoire prolongée, ce qui les qualifie de plaies chroniques.

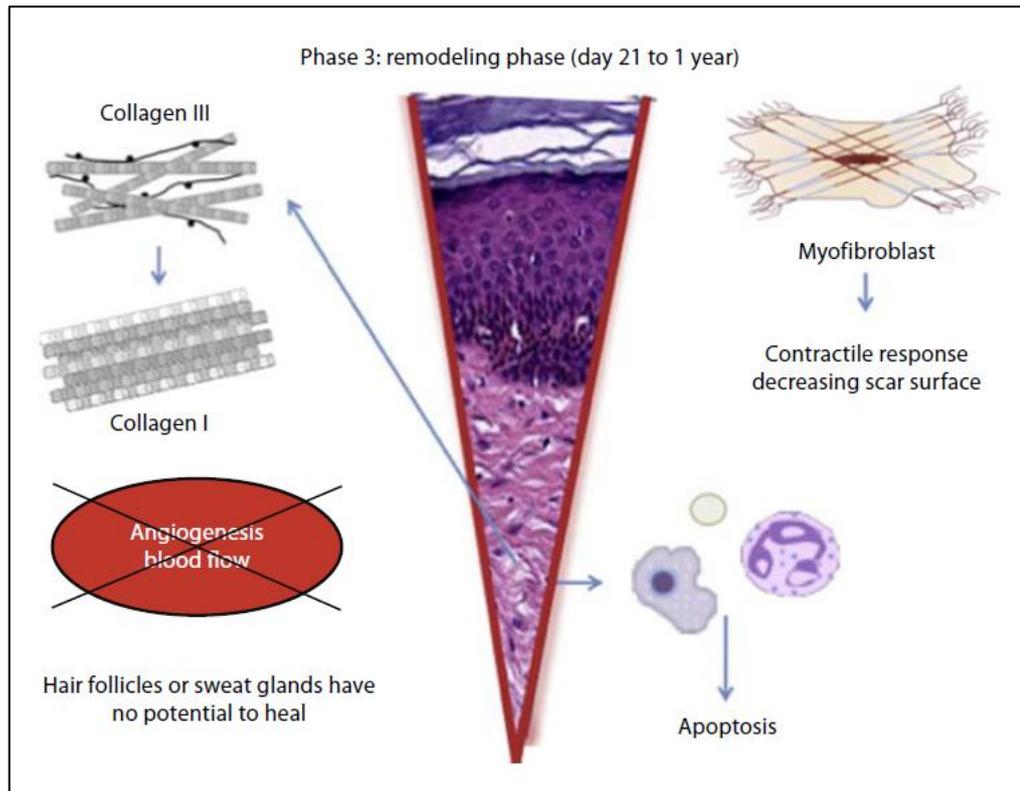


Figure 2.5 : Phase de remodelage de processus de cicatrisation [78].

2.3. Facteurs affectant la cicatrisation

Les facteurs qui influencent le processus de réparation tissulaire suite à une blessure peuvent être classés en deux catégories principales : les facteurs locaux et les facteurs systémiques. D'une part, les facteurs locaux sont ceux qui affectent directement les caractéristiques de la plaie elle-même. D'autre part, les facteurs systémiques représentent l'état général de santé de la personne blessée et sa capacité globale à accepter et accélérer le processus de cicatrisation [3].

2.3.1. Facteurs locaux

2.3.1.1. Oxygénation

Un apport adéquat en oxygène est essentiel pour permettre aux cellules de fonctionner correctement, notamment pour générer l'énergie nécessaire à leurs activités métaboliques. Il est essentiel pour presque tous les processus de cicatrisation. Il prévient l'infection des plaies, induit l'angiogenèse, augmente la différenciation, la migration et la ré-épithélialisation des kératinocytes. Il favorise aussi la prolifération des fibroblastes et la synthèse du collagène, et encourage la contraction des plaies [83].

La rupture des vaisseaux sanguins et la forte demande en oxygène des cellules impliquées dans la réparation créent un microenvironnement très pauvre en oxygène, donc hypoxique, au niveau de la plaie dans ses premiers stades. Si l'apport en oxygène n'est pas rétabli, le processus de cicatrisation se trouve entravé. En effet, bien qu'une hypoxie temporaire juste après la blessure déclenche la cicatrisation, une hypoxie prolongée ou chronique au site de la plaie finit par retarder et compromettre la guérison. Un apport suffisant en oxygène est donc crucial pour permettre une cicatrisation optimale [84].

2.3.1.2. Infections

En cas de lésion cutanée, les microorganismes normalement présents à la surface de la peau peuvent pénétrer et atteindre les tissus sous-jacents. L'état de l'infection et le statut de réplication des micro-organismes déterminent si la plaie est classée comme ayant une contamination, une colonisation, une infection locale, une colonisation sévère et/ou une infection invasive qui se propage (Figure 2.6).

La contamination fait simplement référence à la présence d'organismes non répliatifs sur la plaie. La colonisation, elle, implique la présence de micro-organismes capables de se répliquer sur la plaie, mais sans causer de dommages tissulaires. Un stade intermédiaire est celui de l'infection locale ou de la colonisation sévère, où les micro-organismes se multiplient activement et déclenchent des réactions au niveau des tissus de la plaie. Enfin, l'infection invasive survient lorsque les organismes prolifèrent à l'intérieur même de la plaie, causant des lésions supplémentaires chez l'hôte [85].

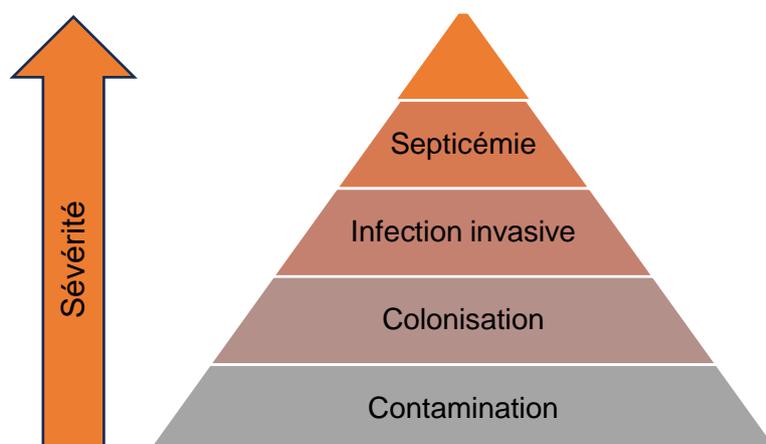


Figure 2.6 : Spectre clinique de la colonisation et de l'infection des plaies.

Initialement, les plaies sont colonisées par des commensaux cutanés, mais le schéma de colonisation évolue avec le temps si la plaie n'est pas bien prise en charge.

Au début, les plaies sont principalement peuplées d'organismes Gram-positifs [86]. Les bacilles à Gram négatif aérobies tels que les *Pseudomonas* spp. sont un autre groupe d'organismes détectés ultérieurement dans la colonisation de la plaie ; ces organismes pourraient ne pas envahir les tissus plus profonds, mais auraient tendance à entraîner une détérioration significative de la plaie en raison de la production d'enzymes destructrices des tissus, de mécanismes antiphagocytaires et d'adhérence, ainsi que d'exotoxines et d'endotoxines [87].

Les agents pathogènes aérobies ou facultatifs tels que *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et les streptocoques b-hémolytiques sont couramment isolés des plaies infectées et cliniquement non infectées. Ces organismes sont relativement faciles à mettre en culture, ce qui peut contribuer à leur détection fréquente. Les organismes anaérobies constituent une proportion significative de la population microbienne des plaies chroniques [88]; en particulier, les plaies situées à proximité de la cavité buccale et de l'intestin hébergent une flore microbienne cohérente avec la flore résidente de ces sites [89].

L'inflammation est un élément normal du processus de cicatrisation et joue un rôle important dans l'élimination des micro-organismes contaminants. Toutefois, en l'absence d'une élimination efficace des agents pathogènes, l'inflammation peut être prolongée. Les bactéries et les endotoxines peuvent entraîner une augmentation des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 (IL-1) et le TNF- α qui prolongent la phase inflammatoire. Si cette inflammation persiste, la plaie peut devenir chronique et ne pas se cicatriser.

Cette inflammation prolongée entraîne également une augmentation du taux de métalloprotéases matricielles, une famille de protéases capables de dégrader la matrice extra-cellulaire.

Parallèlement à l'augmentation de la teneur en protéases, il se produit une diminution du niveau des inhibiteurs de protéases d'origine naturelle. Ce changement dans l'équilibre des protéases peut entraîner une dégradation rapide des facteurs de croissance qui apparaissent dans les plaies chroniques [90].

Comme dans d'autres processus infectieux, les bactéries des plaies infectées se présentent sous la forme de biofilms, qui sont des communautés complexes de bactéries agrégées intégrées dans une matrice polysaccharidique extracellulaire autosécétrée [85].

Les biofilms matures développent des microenvironnements protégés et sont plus résistants aux traitements d'antibiotiques conventionnels. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) et les streptocoques β -hémolytiques sont des bactéries courantes dans les plaies infectées et cliniquement non infectées [91].

P. aeruginosa et *Staphylococcus* spp. semblent être des acteurs majeurs dans les infections bactériennes des plaies. De nombreux ulcères chroniques peinent à guérir probablement en raison de la présence de biofilms contenant *P. aeruginosa*. Ces biofilms forment une sorte de barrière protectrice empêchant les neutrophiles, les globules blancs phagocytaires, d'atteindre et d'éliminer les bactéries. Ce mécanisme de défense des biofilms pourrait expliquer pourquoi les traitements antibiotiques échouent parfois à éradiquer les infections bactériennes dans les plaies chroniques [92].

2.3.2. Facteurs systémiques

2.3.2.1. Age

L'âge constitue un facteur de risque majeur pour des perturbations du processus normal de cicatrisation des plaies. De nombreuses études cliniques et expérimentales chez l'animal, à l'échelle cellulaire et moléculaire, se sont penchées sur les changements et les retards de cicatrisation observés avec l'avancée en âge [93].

Ce retard de cicatrisation lié à l'âge s'explique en partie par des dysfonctionnements de la réponse inflammatoire. On observe notamment un ralentissement du recrutement des lymphocytes T vers le site de la plaie, des perturbations dans la production des chimiokines qui guident les cellules immunitaires, ainsi qu'une diminution de la capacité des macrophages à phagocyter et éliminer les débris cellulaires et agents pathogènes [94].

Un retard dans la ré-épithélialisation, la synthèse de collagène et l'angiogenèse a également été observé chez les souris âgées par rapport aux jeunes souris [95].

2.3.2.2. Stress

Des études chez l'homme et chez l'animal ont démontré que le stress psychologique entraîne un retard important dans la cicatrisation des plaies. Le stress augmente les glucocorticoïdes et réduit les niveaux de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α sur le site de la plaie. Le stress réduit également l'expression de l'IL-1 α et de l'IL-8 sur le site de la plaie, deux chimio-attractants nécessaires à la phase inflammatoire initiale de la cicatrisation. Ainsi, le stress altère l'immunité normale à médiation cellulaire au niveau de la plaie, entraînant un retard important dans le processus de cicatrisation [96].

2.3.2.3. Diabète

Les personnes diabétiques présentent une altération avérée de la cicatrisation des plaies aiguës. En outre, cette population est susceptible de développer des ulcères du pied diabétique chroniques ne cicatrisant pas, et dont la fréquence est estimée à 15% de l'ensemble des personnes atteintes de diabète [97].

L'altération de la cicatrisation qui se produit chez les personnes atteintes de diabète implique l'hypoxie, le dysfonctionnement des fibroblastes et des cellules épidermiques, l'altération de l'angiogenèse et de la néovascularisation, des niveaux élevés de métalloprotéases, une diminution de la résistance immunitaire de l'hôte et une neuropathie.

2.3.2.4. Thérapie médicale

De nombreux médicaments sont susceptibles d'interférer avec le processus de cicatrisation des plaies, que ce soit en perturbant la formation des caillots sanguins, le fonctionnement des plaquettes, la réponse inflammatoire ou encore la prolifération cellulaire. Parmi les catégories de médicaments couramment utilisés qui ont un impact significatif sur la cicatrisation, il y a les stéroïdes glucocorticoïdes, les anti-inflammatoires non stéroïdiens ainsi que les agents chimio-thérapeutiques.

2.3.2.5. Obésité

Les personnes obèses sont souvent confrontées à des complications liées aux plaies, notamment l'infection des plaies cutanées, la déhiscence, la formation d'hématomes, les ulcères de pression et les ulcères veineux. En particulier, le taux d'infection du site opératoire est plus élevé chez les patients obèses. Ces complications peuvent résulter d'une hypoperfusion et d'une ischémie relative qui se produisent dans le tissu adipeux sous-cutané. Dans le cas des plaies chirurgicales, la tension accrue sur les bords de la plaie, fréquemment observée chez les patients obèses, contribue également à la déhiscence de la plaie [98].

2.3.2.6. Alcool et tabagisme

Des données cliniques et des expérimentations sur des animaux ont montré que l'exposition à l'alcool entrave la cicatrisation des plaies et augmente l'incidence des infections [99]. La consommation de l'alcool diminuerait la résistance de l'organisme et l'intoxication à l'éthanol au moment de la blessure est un facteur de risque d'augmentation de la sensibilité à l'infection de la plaie.

Quant au le tabagisme, plusieurs études ont révélé qu'un retard de cicatrisation est observé chez les patients fumeurs, ainsi qu'une augmentation du risque de diverses complications telles que l'infection, la rupture de la plaie, la nécrose de la plaie et du lambeau, l'épidermolyse et une diminution de la résistance à la tension des tissus cicatriciels [100].

2.3.2.7. Alimentation

La malnutrition ou les carences en nutriments spécifiques peuvent avoir un impact profond sur la cicatrisation des plaies après un traumatisme ou une intervention chirurgicale. Les patients souffrant de plaies chroniques ou ne cicatrisant pas et présentant une carence nutritionnelle ont souvent besoin de nutriments spécifiques. Le métabolisme énergétique, glucidique, protéique, lipidique, vitaminique et minéral peut affecter le processus de cicatrisation [101].

CHAPITRE 3 : GENERALITES SUR LE MIEL ET SES PROPRIETES THERAPEUTIQUES

3.1. Miel

3.1.1. Définition

Le miel est une substance sucrée naturelle produite par les abeilles de l'espèce *Apis mellifera*. Sa fabrication débute par la récolte par les abeilles de différentes matières premières sucrées comme le nectar des fleurs, les sécrétions végétales ou les exsudats sucrés laissés par certains insectes sur les plantes. Les abeilles combinent alors ces éléments avec leurs propres sécrétions, puis déposent ce mélange dans les rayons de la ruche. Là, elles provoquent sa déshydratation progressive et le laissent mûrir jusqu'à obtenir la texture et la composition caractéristiques du miel. Cette définition vise à exclure toute forme de fabrication à partir de substances artificielles, telles que l'ajout de sucre pour nourrir les abeilles [102].

3.1.2. Fabrication du miel

Les abeilles butineuses collectent le nectar des fleurs ou le miellat, une sécrétion sucrée produite par des insectes suceurs tels que les pucerons ou les cochenilles, qu'elles stockent dans leurs jabots. En route vers la ruche, une enzyme appelée l'invertase est sécrétée dans le jabot de l'abeille, hydrolysant le saccharose en glucose et en fructose [103].

Arrivées à la ruche, les abeilles butineuses régurgitent le nectar aux abeilles receveuses. Ces dernières, à leur tour, continuent ce processus de régurgitation et de ré-ingestion en mélangeant le nectar avec de la salive et les sucs digestifs, complétant ainsi la digestion des sucres par trophallaxie. Tout au long de ce processus, la teneur en eau diminue tandis que le liquide se mélange à des

sécrétions salivaires riches en enzymes. Parallèlement, de nouveaux sucres sont synthétisés [104], [103].

Le miel est ensuite stocké dans des alvéoles où il est déshumidifié par agitation grâce aux pièces buccales des abeilles et par ventilation assurée par les ailes des ouvrières ventileuses. Cela crée un courant d'air qui favorise l'évaporation de l'eau.

L'étalement du liquide en couches minces dans les cellules de cire contribue à accélérer ce processus. Cette évaporation est renforcée par la chaleur à l'intérieur de la ruche (36°C à 37°C) et par le mouvement rapide des ailes des abeilles ventileuses, générant un puissant courant d'air ascendant. Lorsque la teneur en eau du miel atteint un niveau inférieur à 18%, il est stocké dans d'autres alvéoles, qui sont ensuite scellées une fois remplies. Le miel est ainsi préservé en tant que réserve de nourriture [103].

Ce processus assure à la colonie une réserve alimentaire hautement énergétique, stable, durable et peu sensible à la fermentation.

3.1.3. Types de miel

La composition du miel varie en fonction des sources florales dont il est issu. Pour déterminer son origine géographique, il faut procéder à une analyse pollinique du miel. On distingue deux grandes catégories de miels : les miels mono-floraux et les miels multi-floraux.

3.1.3.1. Miels mono-floraux

Les miels mono-floraux sont produits à partir du nectar et/ou du miellat provenant d'une seule espèce végétale. Pour obtenir ce type de miel, les ruches doivent être installées à proximité de la plante visée. Les miels mono-floraux se distinguent par des caractéristiques palynologiques, physico-chimiques et organoleptiques qui leur sont propres et spécifiques à l'espèce végétale dont ils sont issus [105].

3.1.3.2. Miels multi-floraux

Les miels multi-floraux, également appelés "miels toutes fleurs", proviennent de diverses espèces végétales. Ils ne sont pas associés à une fleur ou une plante dominante. Ces miels sont généralement identifiés soit par leur origine géographique, comme le "Miel de haute montagne", soit par le type de paysage floral comme le "Miel de forêt". Dans ce type de miels, aucune fleur, espèce végétale n'a dominance sur les autres. La couleur de ces miels peut varier du jaune pâle au brun foncé [106].

3.1.4. Composition du miel

Le miel est un produit extrêmement complexe. Il se compose d'hydrates de carbone, principalement sous forme de divers sucres ou polysaccharides, représentant environ 80% de sa composition, tandis que l'eau constitue environ 17%. De plus, divers éléments tels que des acides organiques, des acides aminés, des protéines, des lipides, des sels minéraux, des enzymes, des pigments et des vitamines sont également présents dans le miel [107].

3.1.4.1. Eau

La teneur en eau du miel est une caractéristique essentielle qui joue un rôle déterminant dans sa qualité et sa durabilité. Un taux d'humidité trop élevé, dépassant les 20%, risque de provoquer sa fermentation, tandis qu'un taux trop bas, inférieur à 14%, rendrait le miel trop visqueux, compliquant ainsi son extraction et son conditionnement. Cette proportion en eau varie généralement entre 14 et 20%, dépendant de facteurs tels que l'espèce florale et la saison. Le pourcentage idéal se situe généralement entre 17 et 18% [108].

3.1.4.2. Saccharides

Les sucres les plus abondants sont les monosaccharides, représentés par le fructose et le glucose, avec près de 70% du contenu total en sucre dans le miel. L'enzyme invertase présente dans le miel participe à l'hydrolyse des sucres provenant du nectar, ce qui entraîne la production de fructose et de glucose en monosaccharides [109].

Le reste des sucres représente 10 à 15% du contenu total en sucre du miel, y compris les disaccharides et les tri-saccharides. En plus du fructose et du glucose, le miel contient également des oligosaccharides, du maltose, de l'isomaltose, du maltulose, du gentiobiose, du laminaribiose, du nigerose et du kojibiose. Également, le miel contient 4 à 5% de fructo-oligosaccharides, qui représentent une bonne source de prébiotiques contribuant au soutien du système digestif, car ils sont indigestes. Ils soutiennent également la microflore intestinale [110].

3.1.4.3. Acides organiques

L'acide gluconique, issu du glucose, est l'acide prédominant dans le miel (en moyenne, représentant environ 0,43% de la matière sèche) [111]. Cependant, une variété d'une vingtaine d'acides organiques tels que les acides acétique, benzoïque, citrique, lactique, malique, oxalique, butyrique, pyroglutamique et succinique sont également présents.

En plus de ces acides, d'autres composés permanents, tels que les lactones, contribuent également à sa nature acide. Des dérivés naturels de l'acide benzoïque sont également présents en partie par million (ppm) [112].

3.1.4.4. Acides aminés et protéines

Les acides aminés et les protéines sont présents en quantités modestes dans le miel (0,26%), tandis que la teneur en azote est négligeable, avoisinant les 0,041% [112]. Ces composés comprennent principalement des peptones, des albumines, des globulines et des nucléoprotéines, issus soit de la plante, soit des sécrétions de l'abeille. D'autres d'acides aminés libres tels que la proline, la trypsine, l'histidine, l'alanine, la glycine ou la méthionine sont également présentes. La proline est identifiée comme l'acide aminé principal, représentant 80 à 90% de l'ensemble des acides aminés présents dans le miel. Sa concentration nous renseigne sur la maturité du miel. De plus, elle peut être utilisée pour détecter d'éventuelles fraudes [113].

3.1.4.5. Lipides

La quantité de lipides est en général infime dans le miel. Les stérols constituent la majeure partie des lipides présents dans le miel, se présentant sous

forme de cholestérol libre et d'esters de cholestérol. Ces esters peuvent être convertis en précurseurs d'hormones stéroïdiennes après leur ingestion. Les autres lipides présents comprennent les triglycérides et les acides gras tels que l'acide palmitique, l'acide oléique et l'acide linoléique [114].

3.1.4.6. Sels minéraux

Les matières minérales sont présentes à un taux d'environ 0,1% dans les miels en général, toutefois, dans les miels foncés, on les trouve en abondance. On y trouve du potassium, du calcium, du sodium, du magnésium, du cuivre, du manganèse, du chlore, du soufre, du silicium, du fer et d'autres oligo-éléments (Tableau 3.1).

Le potassium représente à lui seul environ la moitié de ces minéraux. Leurs concentrations dépendent des plantes butinées par les abeilles ainsi que du type de sol sur lequel ces végétaux poussent. De manière générale, les miels de miellat renferment deux fois plus de minéraux que les miels de nectar [106].

Tableau 3.1 : Constituants minéraux du miel [115].

Les constituants minéraux	Quantité (mg/kg)	Les constituants minéraux	Quantité (mg/kg)
Potassium	200-1500	Cuivre	0,2-6,0
Sodium	16-170	Zinc	0,5-20
Calcium	40-300	Plomb	0,02-0,8
Magnésium	7-130	Manganèse	0,2-10
Fer	0,3-40	Nickel	0,3-1,3
Chrome	0,1-0,3	Aluminium	3-60
Cobalt	0,01-0,5	Cadmium	0,005-0,15

3.1.4.7. Enzymes

Le miel contient des enzymes provenant à la fois du nectar des plantes et des sécrétions salivaires des abeilles. Parmi les enzymes les plus importantes, il y a la gluco-invertase qui hydrolyse les disaccharides, ainsi que les amylases alpha et bêta qui facilitent la dégradation de l'amidon. Le miel renferme également une catalase, une phosphatase, des enzymes acidifiantes et une glucose-oxydase qui convertit le glucose en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène. Cependant, ces enzymes sont sensibles à la chaleur et peuvent être détruites lors du chauffage du miel. Ainsi, la présence ou l'absence de ces enzymes peut indiquer si le miel a

été exposé à une surchauffe lors d'un traitement thermique destiné à faciliter sa manipulation [116].

3.1.4.8. Vitamines

Le miel renferme de petites quantités de vitamines, principalement des vitamines du groupe B provenant des grains de pollen en suspension dans le miel. On y trouve notamment de la thiamine (B1), de la riboflavine (B2), de la pyridoxine (B6), de l'acide pantothénique (B5), de l'acide nicotinique (B3), de la biotine (B8) et de l'acide folique (B9). La vitamine C est également présente dans le miel. La conservation de ces vitamines est favorisée lorsque le pH du miel est bas (acide) [117].

3.1.4.9. Pigments

Les caroténoïdes et les flavonoïdes jouent un rôle prédominant dans la couleur du miel. Les flavonoïdes, faisant partie des polyphénols, détiennent des propriétés antioxydantes significatives en contribuant à neutraliser les radicaux libres. La quantité et la composition des flavonoïdes varient selon la fleur butinée. En général, les miels plus foncés (comme ceux provenant du tournesol, du sarrasin et du miellat) sont plus riches en flavonoïdes.

Parmi les flavonoïdes présents dans le miel, on y trouve : la pinocembrine, la pinobankine, la chrysin, la galangine, la quercétine, la lutéoline et le kaempférol [116].

3.1.4.10. Micro-organismes

Les micro-organismes peuvent potentiellement contaminer le miel, bien que la plupart du temps ces contaminations soient inoffensives. Parmi eux, il y a les levures responsables de la fermentation, les moisissures telles que *Aspergillus* et *Penicillium*, les algues, les bactéries et les spores de champignons, qui font partie de la flore mésophile naturelle. Dans des cas exceptionnels, des spores de *Clostridium botulinum* peuvent être présentes [118].

Pour les miels destinés à un usage médical, une stérilisation peut être réalisée par irradiation aux rayons gamma. Cette méthode éliminerait tous les agents pathogènes du miel tout en préservant son activité antibactérienne [119].

3.1.4.11. Facteurs antibactériens

Les propriétés antibactériennes du miel reposent principalement sur des substances appelées "inhibines", parmi lesquelles le peroxyde d'hydrogène produit par le glucose oxydase est la plus connue. En plus des inhibines dites "non peroxydes" qui inhibent également la croissance bactérienne, d'autres facteurs antibiotiques significatifs comprennent la défensine-1, qui joue un rôle dans le système immunitaire, ainsi que le méthylglyoxal qui sont présentes dans certains types de miel [120].

3.1.4.12. Substances aromatiques

Ces substances odorantes sont responsables de l'arôme et du parfum caractéristiques du miel. Leur composition peut évoluer avec le temps, étant des combinaisons d'alcools, de cétones, d'aldéhydes, de quinones et d'acides [112].

3.1.4.13. Grains de pollen

La méliissopalynologie, qui consiste en l'étude du pollen présent dans le miel, offre des informations précieuses sur son origine botanique et géographique. Cependant, il est rare qu'un miel soit totalement monofloral à 100%, car il est difficile de s'assurer que les abeilles ne collectent le nectar qu'à partir d'une seule espèce de fleurs. Par conséquent, le nom donné au miel est généralement basé sur le type de pollen prédominant [117].

3.1.4.14. Hydroxyméthylfurfural

L'hydroxyméthylfurfural, communément désigné sous l'acronyme « HMF », est un composé produit par la transformation du fructose en milieu acide. Sa formation est progressive avec le vieillissement du miel, ce qui en fait un indicateur de son âge. Une concentration anormalement élevée en HMF peut révéler un stockage prolongé ou un chauffage excessif, les deux étant des signes de

dégradation. La quantité d'HMF recommandée est généralement inférieure à 40 mg/kg [121].

3.1.4.15. Polyphénols

Plusieurs polyphénols ont été trouvés dans le miel (de 56 à 500 mg/kg de polyphénols). Le principal flavonoïde présent dans le miel est la chrysin, le pinobanksin et le pinocembrin, tandis que les flavonoïdes secondaires comprennent la kaempférol, la galangine, la quercétine et l'isorhamnétine [122].

Une quantité moyenne d'acide phénylacétique, de léptosine, de méthylsyringate et d'acide méthoxyphénylacétique a été trouvée [123].

3.1.5. Paramètres physico-chimiques du miel

Le miel présente des caractéristiques physico-chimiques particulières qui varient en fonction de l'origine de la plante et sa composition de ses sucres.

3.1.5.1. Densité

La densité du miel est influencée par sa teneur en eau. Un miel récolté prématurément dans un environnement humide ou laissé pendant une période prolongée dans un récipient de maturation peut contenir une quantité importante d'eau, ce qui constitue un défaut détectable à l'aide d'un densimètre ou d'un réfractomètre. Cette densité varie généralement entre 1,39 et 1,44 à 20°C et dépend principalement de la teneur en eau du miel, ainsi que dans une moindre mesure de sa composition chimique [124].

3.1.5.2. Viscosité

La viscosité du miel est principalement déterminée par sa teneur en eau, sa composition chimique et la température de stockage. De plus, les sucres présents dans le miel peuvent partiellement cristalliser sous l'effet de divers facteurs tels que la température, l'agitation et la composition chimique, ce qui peut entraîner un changement significatif dans son apparence sans altérer sa composition fondamentale [125].

3.1.5.3. Teneur en eau

La concentration en eau revêt une importance primordiale, car elle offre des indications sur le degré de maturation du miel et peut également prédire sa stabilité face à la fermentation et à la cristallisation pendant le stockage, ce qui influe directement sur la conservation du produit [126].

La possibilité de fermentation est moins importante pour les miels contenant moins de 18% d'eau [124].

3.1.5.4. Indice de réfraction

La relation entre l'indice de réfraction du miel et sa teneur en eau est inversement proportionnelle. À une température de 20°C, l'indice de réfraction varie entre 1,5041 et 1,4915 pour une teneur en eau comprise entre 13% et 18%, ce qui est observé dans la plupart des types de miel [127].

3.1.5.5. pH

Le pH joue un rôle crucial dans la stabilité du miel et ses conditions de stockage [128]. Tous les types de miel sont acides, avec un pH variant généralement entre 3,2 et 5,5. Les miels issus du nectar présentent un pH plus bas, oscillant entre 3,3 et 4,0, tandis que les miels de miellat affichent des valeurs légèrement plus élevées, allant de 4,5 à 5,5. Cette acidité est principalement attribuée à la présence d'acide gluconique dans le miel [129].

3.1.5.6. Pouvoir rotatoire

Le miel est capable de polariser la lumière, une caractéristique connue sous le nom de pouvoir rotatoire. Ce dernier est influencé par les types et les quantités de sucres présents dans le miel. Cette particularité est largement exploitée dans la détermination de l'origine botanique du miel [130].

3.1.5.7. Couleur

La coloration constitue une caractéristique physique distinctive des différents types de miel, étroitement liée à leur source florale et à leur composition.

La couleur du miel peut varier d'un aspect pratiquement incolore ou blanc à une couleur brun foncé. Généralement, une couleur plus claire indique une teneur moindre en minéraux, tandis qu'une couleur plus foncée suggère une concentration plus élevée en ces éléments [131]. Des facteurs tels que le chauffage, le vieillissement et l'exposition à la lumière peuvent intensifier la coloration du miel.

3.1.5.8. Cristallisation

La cristallisation du miel est un phénomène naturel et physique, et n'explique pas éventuellement une altération du produit. Cependant, bien que le miel reste liquide à l'intérieur de la ruche à une température de 36°C, il peut cristalliser une fois récolter. La vitesse à laquelle cette cristallisation se produit dépend de la température de stockage et de la composition des sucres ainsi que de leur solubilité dans l'eau. Les miels ayant une teneur élevée en glucose ont tendance à cristalliser plus rapidement que ceux à dominance en fructose [132].

3.1.5.9. Conductivité électrique

La conductivité électrique du miel se révèle être un paramètre crucial pour différencier le miel de miellat du miel de nectar. En effet, la conductivité électrique du miel de miellat dépasse généralement 0,8 ms/cm, tandis que celle du miel de nectar reste en dessous de ce seuil. De plus, elle est proportionnelle à la teneur en substances minérales du miel, ce qui explique pourquoi elle est plus élevée lorsque la concentration en minéraux est plus importante [106].

3.2. Utilisation thérapeutique de miel

3.2.1. Historique de l'emploi du miel en thérapie

La relation entre l'Homme et l'Abeille trouve ses racines dès la période néolithique. Sur les parois d'une grotte dans la région de Valence en Espagne, datant de 5 à 10000 ans avant J-C, une peinture rupestre dépeint un humain récoltant du miel avec un panier [103].

La première trace référencée sur le miel remonte à une tablette sumérienne datant de 2100-2000 av. J-C, le mentionnant comme un remède [133], [113].

En Égypte, dès 2400 av. J-C, les abeilles étaient exploitées. Le papyrus d'Ebers du XVI^e siècle av. J-C dévoile de nombreuses préparations à base de miel pour traiter diverses affections, telles que des blessures et des troubles digestifs, rénaux et oculaires [104].

A son tour, Hippocrate a contribué à promouvoir l'utilisation du miel en alimentation et en médecine, préconisant son utilisation pour divers problèmes de santé, notamment la cicatrisation des plaies, les ulcères et les hémorroïdes. Les Romains et les médecins de l'époque, comme Dioscoride et Galien ont également vanté les vertus médicinales du miel [134].

Avec l'arrivée de l'Islam, le Coran a clairement indiqué l'activité de valeur thérapeutique du miel. En effet, au niveau des Versets 68 et 69 de la sourate n°16 d'Ennahal et dans lesquels Dieu dit : ***“Prends demeure dans les montagnes et dans les arbres et dans ce que (les hommes) construisent (pour toi), manges de tout fruit et suis humblement les chemins de ton seigneur. Il sort de l'intérieur de son corps une liqueur de couleurs différentes où se trouve un remède pour les hommes”***.

Au XIX^e siècle, des préparations telles que les électuaires, les mellites et les oxymels étaient courantes, utilisées à des fins thérapeutiques, avec des indications similaires à celles des siècles précédents [104], [103].

Au XX^e siècle, les Russes et les Allemands ont continué à exploiter les propriétés curatives du miel, notamment pendant la première guerre mondiale, mais son utilisation a décliné après la seconde guerre mondiale avec l'avènement de produits pharmaceutiques plus innovants [133].

Actuellement, bien que la production mondiale de miel soit estimée à 1,2 million de tonnes, représentant moins de 1% de la production totale de sucres rapides, son utilisation à des fins thérapeutiques a progressivement diminué en faveur de produits pharmaceutiques modernes [17].

3.2.2. Propriétés thérapeutiques du miel

Le miel est un ingrédient naturel qui offre une gamme étendue d'activités biologiques bénéfiques sur le plan thérapeutique. Parmi ces activités, on compte notamment son pouvoir antioxydant, anti-inflammatoire, antibactérien et même anticancéreux. Cependant, lorsqu'il s'agit de favoriser la guérison des plaies, ce sont principalement ses effets antibactériens et cicatrisants qui jouent un rôle prépondérant. Ces propriétés ont été largement étudiées et sont souvent exploitées dans le traitement de diverses affections cutanées et dans les soins de plaies.

3.2.2.1. Propriétés antibactériennes du miel

Les résultats de plusieurs recherches démontrent l'ampleur du spectre d'action du miel. Il a été observé qu'il est efficace contre au moins 80 espèces de micro-organismes, comprenant des bactéries aérobies et anaérobies, tant Gram positives que Gram négatives, ainsi que certaines bactéries résistantes aux antibiotiques. De plus, une activité antifongique a été constatée contre certaines levures, ainsi que contre certaines espèces d'*Aspergillus*, de *Penicillium* et de antimicrobiens conventionnels [135].

3.2.2.1.1. Mécanismes de l'action antibactérienne du miel

Les mécanismes d'action antibactérienne (action bactéricide et bactériostatique) du miel ont été étudiés par les scientifiques, mettant en évidence quatre facteurs principaux : l'effet osmotique, la présence de peroxyde d'hydrogène, les facteurs non-péroxydes et l'acidité [136].

A. Effet osmotique

Le miel est souvent décrit comme une solution de sucres hyper-saturée, composée principalement d'un mélange de fructose et de glucose, avec une teneur en eau relativement basse, d'environ 18%. Ces sucres présentent une propriété antibactérienne en raison de leur capacité à réduire l'activité de l'eau. En effet, les molécules de sucre du miel interagissent fortement avec l'eau, limitant ainsi la disponibilité d'eau pour le développement des micro-organismes, ce qui est connu sous le nom de phénomène de déshydratation osmotique [137].

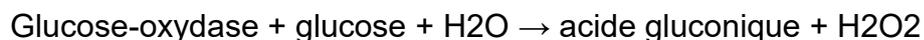
L'application de miel sur une plaie permet aux sucres de se dissoudre dans les tissus, créant ainsi un environnement à faible teneur en eau, ce qui inhibe la croissance bactérienne et favorise le processus de cicatrisation.

Même lorsqu'il est dilué, le miel conserve son activité contre les bactéries ; seules quelques levures peuvent se développer dans de telles conditions [138].

B. Peroxyde d'hydrogène

En plus de son effet osmotique, le miel présente également une activité bactéricide démontrée à la fois *in vivo* et *in vitro*. Cette activité est attribuée à un composé appelé inhibine, identifié comme étant du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est considéré comme la principale inhibine présente dans le miel [137].

Il est produit grâce à l'action d'une enzyme appelée glucose-oxydase, sécrétée par les glandes hypopharyngées des abeilles lors de la transformation du nectar en miel, selon la réaction d'oxydation suivante :



Les catalases, qui sont des enzymes antagonistes de la glucose-oxydase, sont responsables de l'élimination du peroxyde d'hydrogène.

Ces enzymes sont naturellement présentes au niveau de la peau humaine, ce qui peut limiter l'utilisation topique du miel dans le traitement des plaies.

La glucose-oxydase est une enzyme active dans un environnement plus ou moins basique, avec un pH optimal situé autour de 6,1. Elle est également sensible aux variations de température et à la lumière, ce qui souligne l'importance des conditions de conservation du miel [139].

De plus, L'activité enzymatique de la glucose-oxydase varie en fonction de la dilution du miel. En effet, une autre recherche a révélé qu'avec la dilution du miel, l'activité de ce dernier peut augmenter de 2500 à 50 000 fois [136].

C. Systèmes non-peroxydes

D'autres facteurs phytochimiques, connus sous le nom de "non-peroxydes", contribuent également à l'activité antibactérienne du miel.

➤ Méthylglyoxal

Une autre substance ayant des propriétés bactéricides est le méthylglyoxal [18]. La concentration en méthylglyoxal varie en fonction de l'origine géographique et botanique du miel. Par exemple, le miel de manuka (*Leptospermum scoparium*) est connu pour contenir la plus grande quantité de méthylglyoxal [140].

Cette substance peut atteindre dans ce type de miel jusqu'à 850 µg/g, ce qui lui confère une efficacité notable contre les bactéries multi résistantes aux antibiotiques, notamment les entérocoques résistants à la vancomycine et les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline.

Des recherches ont également démontré la capacité du méthylglyoxal à éliminer les biofilms bactériens et son activité anti-inflammatoire puissante [141].

➤ β-défensine 1

La β-défensine 1 agit directement sur la membrane négativement chargée des bactéries et possède également des cibles intracellulaires, ce qui en fait un véritable antibiotique peptidique et confère au miel la plupart de ses propriétés antibactériennes.

La β-défensine 1 est produite par les glandes hypopharyngiennes et mandibulaires des abeilles, et se trouve donc dans tous les miels, bien qu'en quantités très faibles, généralement de l'ordre de 2 à 3 nanogrammes par gramme de miel. Elle est similaire à la β-défensine 1 d'origine humaine, qui joue un rôle dans l'immunité innée [120].

➤ Autres facteurs

L'activité antibactérienne non peroxydasique peut également être expliquée par la présence de divers composés tels que le lysozyme, les complexes phénoliques et les acides organiques, qui se trouvent naturellement dans les miels [136].

Le lysozyme, également appelé muramidase, est une enzyme bactériostatique produite par les abeilles. Elle possède la capacité d'hydrolyser les polysaccharides constitutifs de la paroi des bactéries après leur capture par les phagocytes [142].

La quantité et le type des complexes phénoliques varient en fonction de l'origine florale du miel. Par exemple, le miel de manuka est le plus riche en polyphénols comparé aux autres types de miel [143].

La pinocembrine, en raison de son effet antiseptique, demeure l'un des flavonoïdes les plus connus. Il est également suggéré qu'elle joue un rôle essentiel dans le maintien de l'hygiène à l'intérieur de la ruche [144].

D. Acidité

La plupart des miels présentent un pH généralement acide, situé entre 3,2 et 5,4. Ce pH semble suffisamment bas pour inhiber la croissance de nombreuses bactéries, comme le montrent les valeurs de pH minimales nécessaires à la croissance de diverses espèces pathogènes, telles que *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* et *Streptococcus pyogenes* (pH: 4,3/ 4,0 /4,4 / 4,5, respectivement) [136].

Cette acidité est principalement due à la présence d'acide gluconique, qui est produit lors de la réaction d'oxydation du glucose.

En combinant ces divers facteurs, les bactéries ne développent généralement pas de résistance au miel, contrairement aux antibiotiques.

3.2.2.2. Propriétés cicatrisantes du miel

Diverses études ont démontré l'efficacité du miel dans le traitement de différentes catégories de plaies. En effet, l'utilisation de pansements au miel non seulement accélère significativement le processus de cicatrisation et assure la stérilisation des blessures, mais limite également les complications esthétiques telles que les cicatrices hypertrophiques et les problèmes fonctionnels comme les contractures post-brûlures.

Plusieurs facteurs et composants du miel contribuent à accélérer la régénération tissulaire et à améliorer à la fois la rapidité et la qualité de ce processus.

3.2.2.2.1. Peroxyde d'hydrogène

En plus de ses qualités antibactériennes, le peroxyde d'hydrogène joue un rôle essentiel dans le processus de cicatrisation des plaies. Libéré progressivement par l'enzyme glucose oxydase, il contribue d'abord à une décontamination efficace des lésions. Cette étape est critique car, lors des phases vasculaires et inflammatoires, les tissus nécrotiques et les exsudats peuvent générer des radicaux libres et des protéases nocifs pour la réparation tissulaire.

De plus, en réagissant avec les fluides et les exsudats des tissus endommagés, le peroxyde d'hydrogène, décomposé par l'enzyme catalase en eau et en oxygène, génère une "micro-effervescence". Cela favorise un nettoyage mécanique au sein de la plaie, renforçant ainsi la décontamination [145].

En outre, le peroxyde d'hydrogène présent dans le miel agit comme un stimulant de la multiplication cellulaire. Il favorise la prolifération des fibroblastes, des cellules épithéliales et l'angiogenèse. Des études sur des modèles animaux suggèrent qu'il pourrait également stimuler la synthèse de collagène en activant le facteur de croissance transformant. Cette stimulation de la croissance tissulaire permet à la peau de retrouver rapidement ses propriétés biomécaniques, réduisant ainsi le temps de cicatrisation des plaies et les risques d'infection [144].

En agissant selon ces divers mécanismes, le peroxyde d'hydrogène renforce le processus de nettoyage mécanique et facilite la formation du tissu de granulation dans la zone de cicatrisation, tout en évitant les effets toxiques des radicaux libres à des concentrations élevées [146].

3.2.2.2.2. Pression osmotique

L'efficacité du miel dans la cicatrisation des plaies provient également de sa forte osmolarité. D'une part, elle provoque un afflux de liquides vers la plaie, créant un environnement humide riche en protéases favorable à l'autolyse et à la cicatrisation. D'autre part, les mouvements constants des fluides contribuent à détacher les débris tissulaires et les tissus nécrotiques, qui sont ensuite éliminés lors des changements de pansement. Ce processus dynamique facilite le nettoyage de la plaie et réduit la douleur associée aux soins [146].

3.2.2.2.3. pH acide

L'application de miel sur une plaie favorise sa guérison en accélérant le processus de cicatrisation. Cette accélération est due à deux facteurs principaux liés à l'acidité du miel. Premièrement, l'acidification induite par le miel permet une libération accrue d'oxygène par l'hémoglobine. Deuxièmement, le pH acide inhibe l'activité d'une protéase ayant un pH optimal de 7. Cette protéase est responsable de la dégradation des facteurs de croissance nécessaires à la prolifération des fibroblastes pendant la phase de granulation, étape clé de la cicatrisation [10].

3.2.2.3. Autres propriétés spécifiques

3.2.2.3.1. Propriété désodorisante

L'utilisation de miel s'est avérée être une solution particulièrement efficace pour atténuer voire éliminer complètement les odeurs désagréables émanant des plaies infectées. Les propriétés antimicrobiennes du miel jouent un rôle clé en inhibant la croissance de la flore anaérobie, responsable non seulement des mauvaises odeurs, mais aussi de la perturbation de la phagocytose des autres bactéries présentes dans la plaie. Ces bactéries, confrontées à l'absence d'oxygène, se tournent vers la fermentation lactique, acidifiant ainsi le milieu [147].

Par conséquent, l'application de miel sur des plaies infectées est tout à fait appropriée, car elle permet de neutraliser les odeurs tout en entravant la prolifération d'éventuels agents pathogènes [148].

3.2.2.3.2. Propriété antalgique

Le miel présente également des propriétés analgésiques. En premier lieu, durant le processus inflammatoire, il agit mécaniquement et chimiquement pour réduire la douleur. Il diminue le volume des exsudats, réduisant ainsi la pression tissulaire, et limite la libération de prostaglandines, deux facteurs qui excitent les terminaisons nerveuses.

En outre, grâce à sa forte osmolarité, le miel attire un afflux important de liquides vers la plaie. Cet apport de liquides présente deux avantages. Premièrement, il empêche l'adhérence des pansements à la plaie, ce qui facilite leur retrait sans douleur. Deuxièmement, il évite d'endommager les nouveaux tissus en formation sous la surface de la plaie lors du changement de pansement [146].

3.2.2.3.3. Propriété nutritive

Le miel contient une variété de nutriments directement assimilables par l'organisme, notamment des sucres, des vitamines, des acides aminés et des oligo-éléments. Ces divers composés jouent un rôle nutritionnel crucial dans le processus de cicatrisation en favorisant la réparation cellulaire. Par exemple, les sucres augmentent le métabolisme des cellules immunitaires comme les lymphocytes, les neutrophiles, les monocytes et les macrophages, améliorant ainsi la nutrition des cellules impliquées dans la réparation de la plaie. Les vitamines du groupe B favorisent principalement la régénération cellulaire et contribuent à l'hydratation de la peau. Quant à la vitamine C, au fer et au cuivre, ils stimulent la production de collagène, essentielle à la cicatrisation [147].

3.2.2.3.4. Propriété anti-inflammatoire

Outre ses propriétés antibactériennes, le miel possède la capacité de lutter contre les infections grâce à ses activités anti-inflammatoires et antioxydantes. Des chercheurs ont élucidé le mécanisme d'action du miel sur les cellules pro-

inflammatoires impliquées dans le processus de cicatrisation. Ils ont découvert qu'à une concentration de 0,1%, le miel stimule la prolifération des lymphocytes et favorise l'activation des cellules phagocytaires *in vitro* [149].

3.2.2.3.5. Propriété antioxydantes

Le miel peut renfermer une variété de polyphénols agissant comme des antioxydants. Parmi eux, on trouve divers acides phénoliques tels que l'acide caféique, ellagique, gallique, cinnamique et benzoïque, ainsi que des flavonoïdes tels que la quercétine, la pinocembrine, l'hespérétine, la myricétine, le kaempférol, l'apigénine et la galangine.

En plus de leurs propriétés anti-inflammatoires, ces flavonoïdes présentent une puissante activité antioxydante. Même à de faibles concentrations, ces molécules sont capables de neutraliser les radicaux libres, limitant ainsi les processus d'oxydation et leurs effets néfastes sur l'organisme [150].

3.3. Caractéristiques de miel à usage pharmaceutique

Le miel récolté n'est pas adapté pour un usage directement médical ou pharmaceutique, comme pour le traitement des plaies, brûlures ou escarres. Au cours de sa conservation, il peut subir divers processus qui altèrent ses qualités essentielles. De plus, selon son origine géographique, il peut être contaminé par diverses sources de pollution, telles que les pesticides terrestres ou aériens.

En outre, les étapes de récolte, d'extraction et de manipulation de miel peuvent entraîner des contaminations indésirables, voire dangereuses. Avant d'être utilisé à des fins médicales, le miel doit subir plusieurs opérations et précautions afin d'assurer une activité médicale sans risque, constante et reproductible.

3.3.1. Contrôle des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques

Il est nécessaire de contrôler les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques du miel destiné à un usage médical. Chaque lot doit être soumis à des tests pour garantir de manière reproductible des paramètres constants. Ce lot initial doit être caractérisé par une série d'analyses physico-chimiques et microbiologiques, qui seront ensuite recherchés sur chaque lot de production pour s'assurer de la constance de la matière médicale [136].

La quantité et la nature spécifique des composés recherchés dépendent principalement des objectifs médicaux visés, ce qui peut inclure la concentration en composés antibactériens comme le peroxyde d'hydrogène et les acides phénoliques pour des applications antimicrobiennes, ou encore la présence de flavonoïdes et d'enzymes pour des effets anti-inflammatoires et cicatrisants.

3.3.2. Parfaite sécurité

- Suppression des résidus de pesticides et de métaux lourds

Dans les régions où l'usage de pesticides est répandu pour les cultures intensives, il est essentiel de privilégier la récolte de miel provenant de zones protégées. Une recherche systématique de la présence de pesticides et de métaux lourds tels que le plomb, le mercure et le cadmium est impérative, tout en assurant un contrôle rigoureux du processus d'extraction.

- Prévention des contaminations (par des bactéries, levures et spores de botulisme)

Le miel est particulièrement vulnérable à la contamination, notamment par l'air, surtout dans des environnements pollués comme les établissements hospitaliers. En présence d'humidité, il peut favoriser la croissance de levures de fermentation et présenter un risque de botulisme en raison de la présence de spores de la bactérie « *Clostridium Botulinum* ».

Pour s'assurer que le miel contienne une charge bactérienne inférieure ou égale à 30 UFC par gramme, la stérilisation par rayons gamma serait nécessaire [151].

- Absence des grains de pollen

Malgré que les cas d'allergies provoquées par les grains de pollen présents dans le miel soient rares, ils peuvent cependant, représenter un risque pour certains patients. En outre, les grains de pollen peuvent également servir de vecteurs potentiels de pollution, notamment de plomb, de cadmium et de pesticides.

3.3.3. Stabilité optimale des ingrédients actifs

Il est primordial d'établir une date de péremption et de maintenir une activité bactéricide constante tout au long de cette période. La teneur en eau doit être maintenue au maximum 20% afin d'éviter toute fermentation qui pourrait survenir après trois mois en raison de l'effet hygroscopique, ce qui pourrait entraîner une diminution de l'activité peroxydasique.

Dans les régions à climat tempéré, le miel peut être conservé à température ambiante, mais il est crucial de ne pas dépasser les 25°C (avec une plage idéale entre 12°C et 25°C).

Une exposition aux rayons UV peut entraîner des altérations du miel, il est donc recommandé de le conserver à l'abri de ces rayons [152].

Pour une utilisation optimale du miel à des fins médicales, il est impératif de vérifier que le miel prescrit a été soumis aux mêmes procédures de préparation et de contrôle que celles des médicaments, et qu'il a prouvé son efficacité à travers des preuves cliniques.

3.3.4. Normes pharmaceutiques de miel

Le miel destiné à un usage médical, s'il est classifié comme un médicament, doit également obéir à des normes de qualité spécifiques en fonction de la forme pharmaceutique employée. Il existe diverses valeurs recommandées ainsi que des méthodes analytiques définies pour le miel, conformément à la monographie spécifique du miel établie dans la Pharmacopée Européenne (Tableau 3.2).

Tableau 3.2 : Normes et techniques d'analyse pour le miel [151].

Critères	Normes	Techniques d'analyse
Sucres	Sucres spécifiques	Chromatographie sur Couche Mince
Teneur en eau	Maximum 20%	Réfractométrie
Conductivité électrique	Maximum 800 μ S.cm-1	Conductimétrie
Angle de rotation optique	Maximum +0,6°	Polarimétrie
Hydroxyméthylfurfural	Maximum 80 mg/kg	Spectrophotométrie
Chlorures	Maximum 350 mg/kg	Essai Chlorure
Sulfates	Maximum 250 mg/kg	Essai Sulfate

CHAPITRE 4 : IDENTIFICATION ET ANTIBIORESISTANCE DES BACTERIES ISOLEES DU PUS PRELEVE SUR DES PLAIES INFECTEES

4.1. Problématique et objectifs

Les plaies infectées représentent une problématique majeure en santé humaine, surtout en post opératoire en milieu hospitalier. En fonction des bactéries responsables, ces infections sont soit purulentes, soit séro-sanguinolentes [153]. Ces infections pyogènes perturbent le processus de cicatrisation des plaies, entraînant une augmentation importante des coûts de traitement, de la morbidité et de la mortalité [154], [155]. Différentes espèces bactériennes tels que les Staphylocoques, les Entérobactéries et les Pseudomonas sont incriminées dans ces infections. Différentes stratégies thérapeutiques sont envisagées pour les traiter et les guérir, dont l'utilisation des molécules d'antibiotiques reste la thérapie la plus courante [156]. Néanmoins, la résistance aux antibiotiques limite le succès thérapeutique. Connaître l'épidémiologie et la résistance aux antibiotiques est nécessaire pour réduire les risques d'échec thérapeutique.

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur et critique de santé publique qui suscite de plus en plus de sérieuses préoccupations à échelle mondiale [157],[158],[159]. Plusieurs études épidémiologiques ont montré d'importantes fluctuations de la résistance aux antibiotiques en fonction de la nature des plaies, des germes responsables, des procédures chirurgicales et des localisations des plaies [160].

La présente étude visait à identifier les bactéries isolées du pus prélevé sur des plaies infectées pyogènes chez l'homme à l'établissement public hospitalier (EPH) Makour Hamou à Ain Defla ; ainsi que d'étudier leur profil de multirésistance aux divers antibiotiques.

4.2. Matériel et méthodes

4.2.1. Zone d'étude

L'étude a été menée dans la wilaya de Ain Defla (Figure 4.1). Cette wilaya occupe une localisation centrale en Algérie, située à environ 145 km au sud-ouest d'Alger. Elle se localise dans une région qui relie l'est et l'ouest du pays. Elle est bordée :

- Au nord, par la wilaya de Tipaza ;
- Au nord-est, par la wilaya de Blida ;
- À l'est, par la wilaya de Médéa ;
- Au sud, par la wilaya de Tissemsilt ;
- À l'ouest, par la wilaya de Chlef.

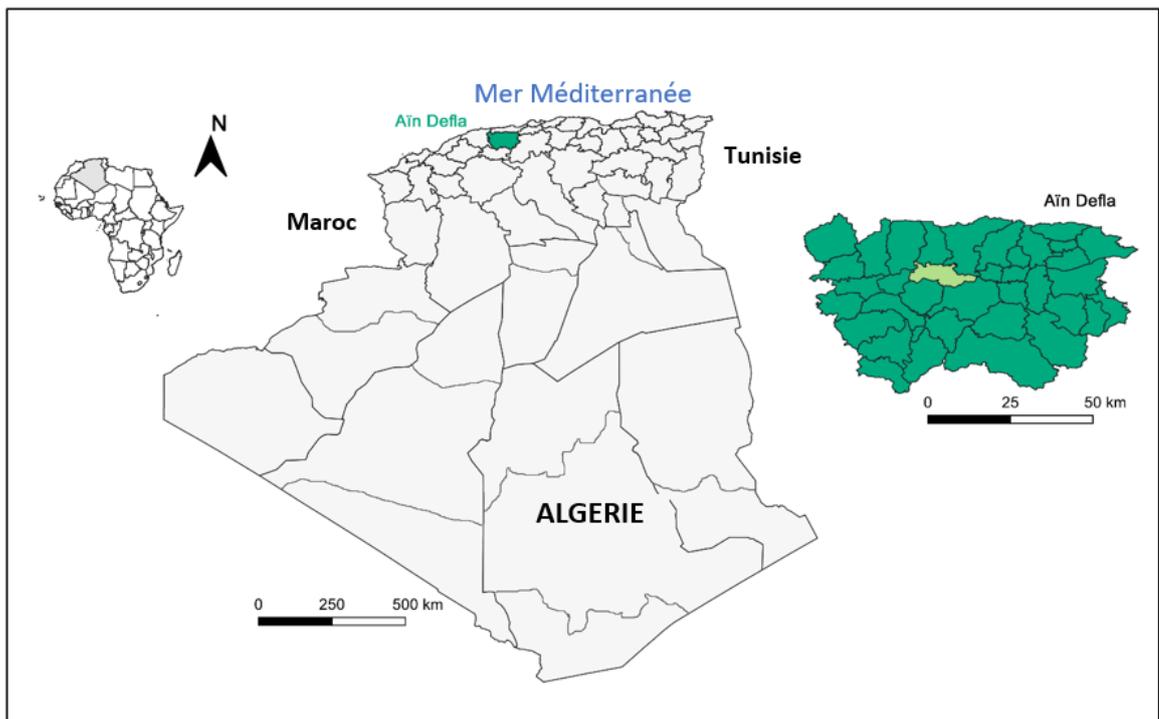


Figure 4.1 : Situation géographique de la zone d'étude : Wilaya de Ain Defla, Algérie [161].

4.2.2. Site et période d'étude

Les prélèvements ont été réalisés au niveau de l'EPH « Makour Hamou » (N 36°15'54.4212 ; E 1°57'49.9608) de la wilaya de Ain Defla qui possède une capacité de 314 lits répartis sur 14 services. L'étude a été déroulée sur une période de cinq ans allant de janvier 2016 à décembre 2020.



Figure 4.2 : EPH. Makour Hamou de la wilaya de Ain Defla.

4.2.3. Collecte des prélèvements

Dans cette étude, un total de 620 patients, dont 262 hommes et 358 femmes (sexe ratio M/F = 0,73), présentant des infections purulentes de plaies et au moins un des symptômes d'infection de plaies ont été inclus dans l'échantillonnage [162]. L'âge des patients allait d'un mois à 90 ans (âge moyen : $37,7 \pm 20,69$ ans).

Les échantillons de pus/plaie ont été prélevés de manière aseptique à l'aide d'écouvillons ou de seringues stériles jetables. Les échantillons ont été identifiés et immédiatement transportés au laboratoire d'analyses médicales accompagnés d'une fiche d'identification portant les informations nécessaires sur le sujet prélevé (numéro de l'échantillon, âge, sexe, date et nature de l'échantillon). Afin d'éviter des

redondances dans la réalisation des prélèvements, chaque patient n'a été inclus dans l'étude qu'une seule fois pendant toute la durée de son hospitalisation.

4.2.4. Laboratoires d'analyse

4.2.4.1. Laboratoire d'analyses médicales

L'isolement et l'identification bactérienne phénotypique ainsi que le test d'antibiorésistance des bactéries isolées, ont été réalisés au sein de service de microbiologie du laboratoire d'analyses médicales du Dr. A. Zibouche, situé dans chef-lieu de la wilaya de Aïn Defla, en face de l'EPH Makour Hamou.

4.2.4.2. Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques

L'identification bactérienne par spectrométrie de masse de type désorption-ionisation laser assistée par matrice de type MALDI-TOF MS a été effectuée au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques à Bousmail (Wilaya de Tipaza) (Figure 4.3).



Figure 4.3 : Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques [163].

4.2.5. Identification phénotypique des bactéries

Tous les échantillons ont d'abord été cultivés sur différents milieux de culture :

- Gélose au sang (Tmmedia Labs, Rajasthan, Inde) pour l'isolement des bactéries exigeantes.
- Gélose Chapman (Mannitol Salt Agar MSA), (Tmmedia Labs, Rajasthan, Inde) pour l'isolement des Staphylocoques.
- Gélose Hektoon (Tmmedia Labs, Rajasthan, Inde) pour l'isolement des Entérobactéries.

Après l'ensemencement, les boîtes de différents milieux ont été incubées à 37°C pendant 24 - 48 h avec plusieurs lectures au cours de l'incubation. Les boîtes de gélose au sang ont été incubées dans une atmosphère riche en CO₂.

Dans le cas d'une culture polymicrobienne, des colonies distinctes de chaque groupe bactérien avec critères morphologiques similaires ont été sélectionnées, repiquées et réensemencées sur des nouvelles boîtes jusqu'à l'obtention de cultures pures.

L'identification a été effectuée selon les procédures de bactériologie standard [164]:

- Examen macroscopique des colonies.
- Coloration de Gram (examen microscopique).
- Tests biochimiques.

4.2.5.1. Examen macroscopique des colonies

L'examen macroscopique se fait sur des cultures pures et des colonies bien isolées en se basant sur plusieurs caractères culturels : la forme, le relief, le contour, la taille, la couleur, l'opacité, la consistance, l'odeur, ...etc.

4.2.5.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram permet une identification bactériologique basée sur la perméabilité de la paroi à l'alcool en classant les bactéries en deux groupes :

- Bactéries à Gram positif sont colorées en violet.
- Bactéries à Gram négatif sont colorées en rose.

4.2.5.3. Tests biochimiques

Plusieurs tests biochimiques ont été utilisés selon l'orientation de l'identification macroscopique et microscopique (catalase, oxydase, coagulase, Clark et Lubs, urée-indole, mannitol fermentation, TSI). La galerie Api Staph a été utilisée pour confirmer les souches *S. aureus*.

4.2.6. Identification bactériologique par MALDI-TOF-MS

La technique MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry) est une méthode analytique puissante utilisée pour l'analyse des biomolécules, notamment les protéines, les peptides, les lipides et les polysaccharides. Elle est largement utilisée dans de nombreux domaines, notamment la recherche biomédicale, la microbiologie, la chimie des protéines, la pharmacologie et la médecine, pour l'identification, la caractérisation et la quantification précise des biomolécules. Elle permet une analyse rapide et sensible des échantillons biologiques avec une grande précision de masse [165].

La réalisation de cette technique consiste à suivre quatre étapes principales selon les recommandations du fabricant Burker [166], en adaptant au protocole du CRAPC :

➤ Nettoyage de la plaque (cible métallique)

- La plaque métallique a été rincée soigneusement avec de l'eau chaude tout en frottant délicatement avec un papier doux et sans peluches pour éliminer les débris grossiers sans rayer la surface.
- Elle est rincée à nouveau avec de l'éthanol à 70% en frottant doucement avec le papier de précision pour dissoudre et éliminer les contaminants organiques résiduels.
- La cible est placée dans un récipient contenant de l'éthanol à 70% pendant 15 minutes pour permettre une désorption maximale des contaminants persistants.
- Elle est frottée vigoureusement avec 500 µL d'acide trifluoroacétique (TFA) à 80% avec le papier pour décaper toute trace résiduelle.
- La plaque est rincée abondamment avec de l'eau ultra-pure de qualité HPLC (High-performance liquid chromatography) pour éliminer tout résidu de TFA.
- Il faut la laisser sécher complètement à l'air libre.

➤ Dépôts des échantillons sur la plaque

- Une colonie bien isolée a été prélevée à partir d'une culture bactérienne pure et fraîche de 24 heures.
- Elle est étalée sur les spots de la plaque métallique (elle contient 96 spots) sous forme d'un film mince (Figure 4.4).
- Chaque spot a été recouvert par 1.5 μ L de matrice (une solution d'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique dissous dans 500 mL d'acétonitrile et 25 mL d'acide tri-fluoroacétique) (Figure 4.5).
- La plaque est laissée sécher pendant 15 minutes pour permettre sa co-cristallisation avec l'échantillon bactérien.

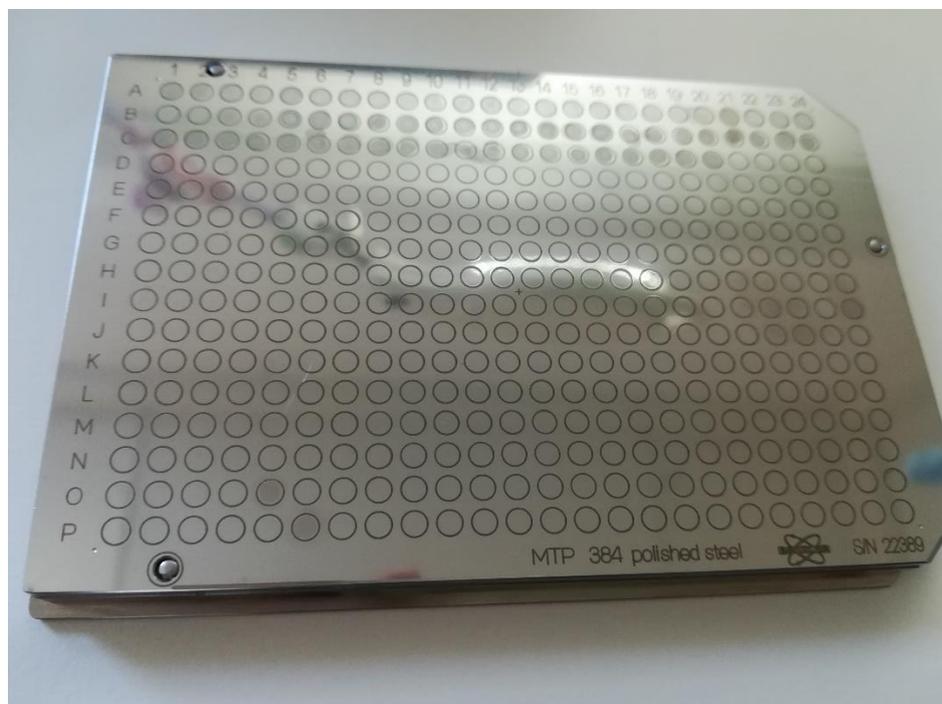


Figure 4.4 : Colonies bactériennes étalées sur la plaque cible de MALDI-TOF MS (photo personnelle).

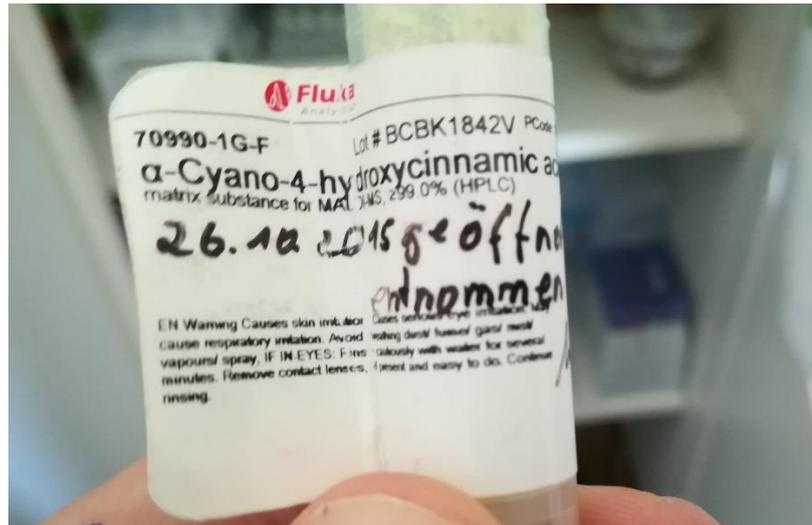


Figure 4.5 : Matrice (α -cyano-4-hydroxycinnamique) utilisée pour couvrir les spots (photo personnelle).

➤ Insertion de la cible et lancement du spectromètre de masse

- La plaque cible est insérée dans l'appareillage (Burker, MALDI-TOF Biotyper®) afin de l'exposer sous vide au tri du laser (337 nm, 20 Hz) (Figure 4.6).
- Les informations sont remplies et complétées dans le logiciel MALDI Biotyper d'Automation Control (Figure 4.7).
- Déclencher le spectromètre de masse.

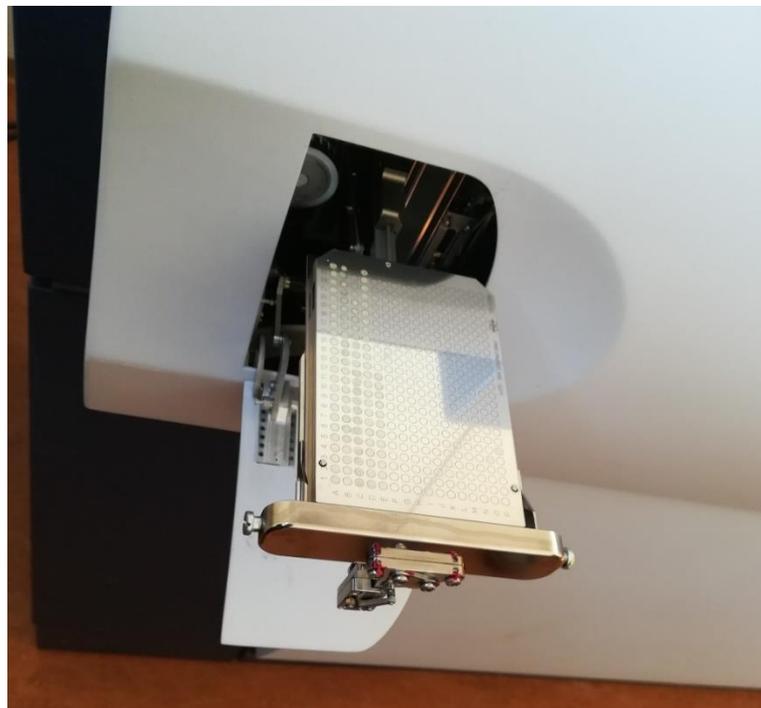


Figure 4.6 : Mise en place de la plaque cible dans l'appareillage (Burker, MALDI-TOF Biotyper®) (photo personnelle).

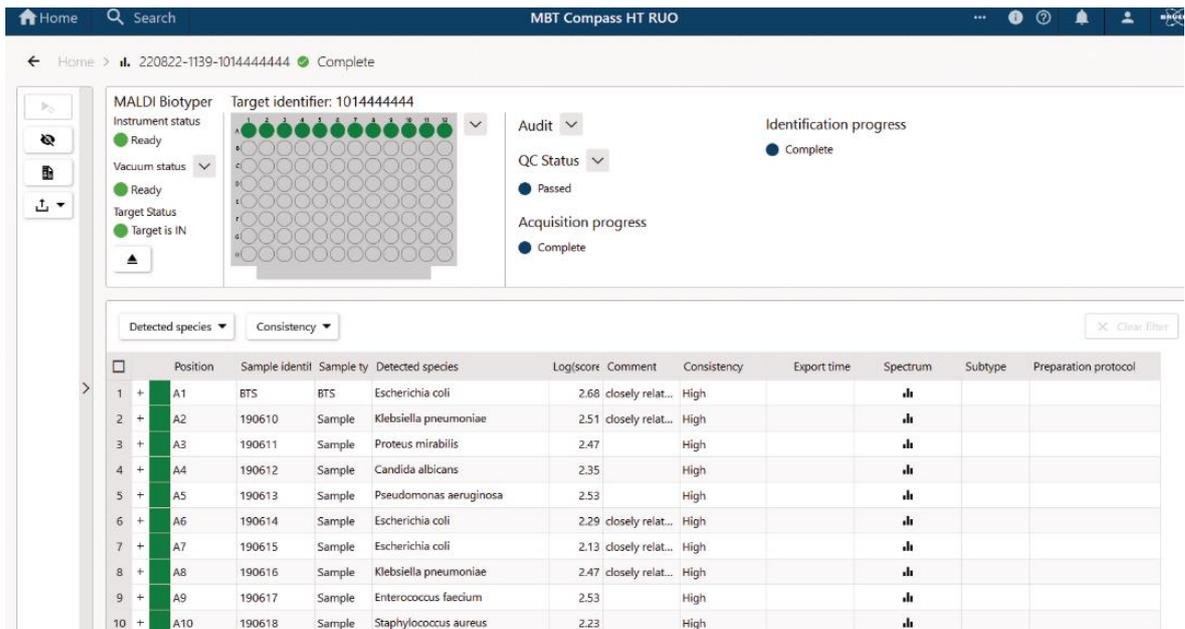


Figure 4.7 : Logiciel Biotyper d'Automation Control.

➤ Interprétation des résultats

Les spectres de masse générés par MALDI-TOF sont uniques et ils sont transférées par la suite dans le logiciel Biotyper afin de les comparer à une base de données contenant les spectres de référence des bactéries, et l'interprétation a été faite en fonction des scores Log pré-identifiées selon le tableau 4.1, d'une couleur appropriée. Lorsque l'intégralité de l'analyse des échantillons est terminée, un rapport est généré (Figure 4.8).

Tableau 4.1 : Interprétation des valeurs obtenues par MALDI-TOF MS.

Catégories	Description	Symboles
2.300 ... 3.000	Identification très probable des espèces	(+++)
2.000 ... 2.299	Identification sûre du genre, identification probable de l'espèce	(++)
1.700 ... 1.999	Identification probable du genre	(+)
0.000 ... 1.699	Identification non fiable	(-)

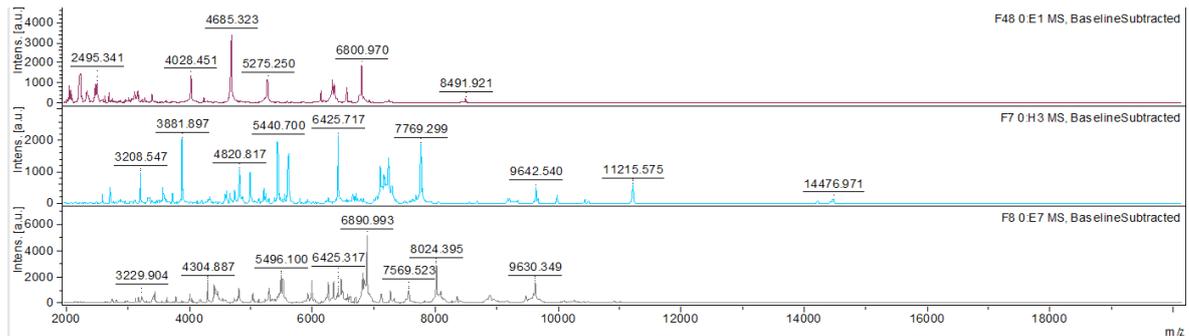


Figure 4.8 : Spectromètre générée par MALDI-TOF MS (photo personnelle).

4.2.7. Test de la résistance aux antibiotiques

4.2.7.1. Antibiogramme

L'antibiogramme a été effectué en utilisant la méthode de diffusion du disque sur gélose (Kirby-Bauer méthode) Mueller-Hinton (Tmmedia Labs, Rajasthan, Inde) pour les bactéries non exigeantes, et sur MH enrichie au sang pour les bactéries exigeantes selon les directives du Clinical and Laboratory Standards Institute [167].

Un total de 26 disques d'antibiotiques (Cypress Diagnostic, Langdrop, Belgique) a été utilisé pour tester la sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques (Tableau 4.2).

➤ Protocole

Le protocole d'antibiogramme a été réalisé en utilisant des cultures pures de 18 à 24 heures en suivant les étapes suivantes :

- Prélèvement de quelques colonies isolées et les transférées dans 2,5 mL d'eau physiologique stérile à 0,9% pour obtenir une suspension bactérienne homogène ajustée à 0,5 McFarland (10^6 UFC/mL). L'opacité est modulée en ajoutant soit de la culture à la suspension bactérienne, soit de l'eau physiologique stérile.
- Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension et essoré sur la paroi du tube, puis frotté sur la surface de la gélose sèche (épaisseur de la gélose 4 mm) en effectuant des stries serrées sur toute la surface. Il faut tourner la boîte de 60° à chaque série de stries et en pivotant l'écouvillon sur lui-même.
- Une fois la gélose séchée, les disques d'antibiotiques à tester sont déposés sur la surface à l'aide d'une pince stérile (maximum 6 disques par boîte de 90 mm).

- Les boîtes ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

La lecture se fait en mesurant les diamètres des zones d'inhibition autours des disques d'antibiotique en les comparant aux normes de CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) [167].

Tableau 4.2 : Antibiotiques testés pour la sensibilité des souches isolées (les antibiotiques sont classés par ordre alphabétique).

Antibiotiques (Contenu de disque)	Bactéries Gram négatif		Bactéries Gram positif	
	Espèces des <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp. et <i>Enterococcus</i> spp.
Amikacine (30 µg)	■	■	■	■
Amoxicilline (10 µg)	■			■
Amoxicilline-Clavulanate (20/10 µg)	■			
Aztréonam (30 µg)		■		
Céfazoline (30 µg)	■			
Céfotaxime (30 µg)	■			
Ceftazidime (30 µg)		■		
Ciprofloxacine (5 µg)	■			
Clindamycine (2 µg)			■	■
Doxycycline (2 µg)			■	
Erythromycine (15 µg)			■	■
Fosfomycine (200 µg)	■			
Gentamicine (10 µg)	■	■	■	
Imipenème (10 µg)	■	■		
Acide nalidixique (30 µg)	■			
Netilmicine (30 µg)		■		
Nitrofurantoïne (300 µg)	■			
Ofloxacine (5 µg)			■	
Pénicilline (10 UI)			■	■
Pipéracilline (100 µg)		■		
Rifampicine (30 µg)				■
Ticarcilline (75 µg)		■		
Ticarcilline-Clavulanate (75/10 µg)		■		
Tobramycine (10 µg)		■		
Triméthoprim-Sulfaméthoxazole (1,25/23,75 µg)	■		■	
Vancomycine (30 µg)			■	■

■ Testé

4.2.7.2. Détection des *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM)

Les souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) ont été identifiées par la technique de diffusion des disques contenant de l'oxacilline à 5 µg et de la céfoxitine à 30 µg sur milieu de culture Mueller-Hinton avec incubation à 37°C pendant respectivement 24 et 48 heures. Les géloses sont préalablement ensemencées par inondation avec un inoculum de 0,5 unité de McFarland.

La résistance à la méticilline est déterminée par des diamètres d'inhibition inférieurs à 27 mm pour la céfoxitine et inférieurs à 20 mm pour l'oxacilline [168].

La confirmation de la résistance à l'oxacilline a été réalisée par le screening test qui consiste à l'ensemencement d'une suspension bactérienne fraîche, standardisée à 0,5 McFarland, sur gélose Muller Hinton additionnée à 4 % de NaCl et de 6 µg/ml d'oxacilline incubé à 35°C pendant 24 heures. La culture d'au moins une colonie de la souche testée sur ce milieu indique une résistance à l'oxacilline [169].

4.2.7.3. Détection des bactéries productrice des β-lactamases à spectre élargi (BLSE)

Les bactéries productrice des β-lactamases à spectre élargi (BLSE) ont été identifiées par la technique de diffusion sur disque sur l'agar Muller-Hinton et confirmées par la méthode des doubles disques (Amoxicilline-Clavulanate (20/10 µg)/Cefotaxime (30 µg)) [167].

4.2.7.4. Détection des bactéries multirésistantes

La détection des bactéries multirésistantes (BMR) aux antibiotiques a été faite selon les normes internationales recommandées par Magiorakos et al [170]. L'ensemble des souches isolées ont été classées comme BMR si elles présentent une résistance simultanée a au moins trois antibiotiques provenant d'au moins trois familles d'antibiotiques distinctes [170].

Des souches de référence telles que *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923) et *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ont été utilisées comme contrôle interne lors d'étude de la sensibilité aux antibiotiques de différentes souches isolées.

4.2.8. Conservation des souches isolées

Afin de réaliser d'autres études ultérieures, les souches isolées à partir des cultures pures ont été conservées à la congélation à -20°C dans des cryotubes contenant une suspension bactérienne dense en BHIB additionnée de 50% de glycérol.

4.2.9. Analyses statistiques

Toutes les données ont été analysées dans un tableur Microsoft Excel® 2019. Les pourcentages ont été comparés à l'aide du test du Khi-Deux au seuil de 5% avec le logiciel Epi Info 2000.

4.3. Résultats

4.3.1. Description de la population d'étude

Entre 2016 et 2020, 620 échantillons de pus ont été prélevés sur différents types de plaies infectées, le plus grand nombre d'échantillons ayant été prélevé en 2017 (160/620 ; $25,81 \pm 3,44\%$), suivie par l'année 2018 (143/620 ; $23,06 \pm 3,32\%$). Cependant au cours de l'année 2016, uniquement 81/620 prélèvements ont été réalisés ($13,06 \pm 2,65\%$) (Tableau 4.3).

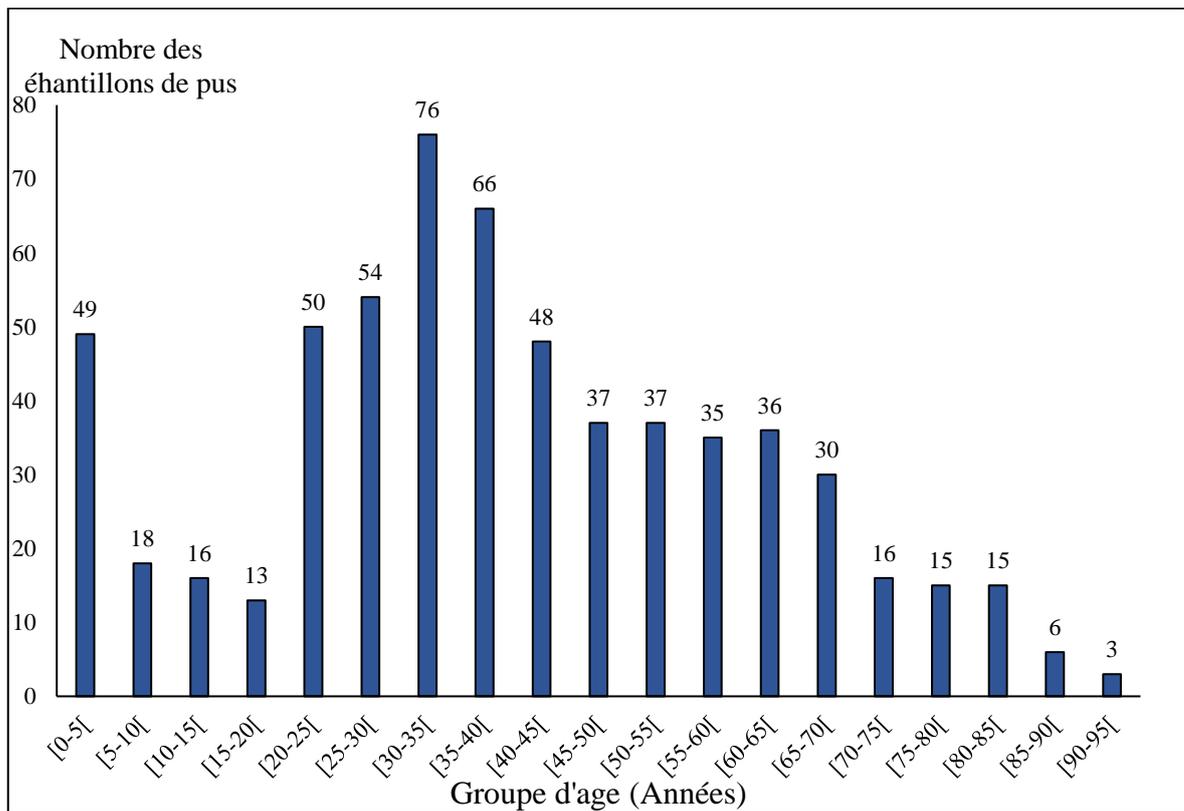
Dans cette étude le nombre des femmes (358/620 ; $57,74 \pm 3,89\%$) avec des cas de plaies infectées était plus important que les hommes.

Plus de la moitié (373/620 ; $60,16 \pm 3,85\%$) des plaies infectées ont été prélevées entre octobre et avril, correspondant aux mois froids ($P < 0,001$), comparant aux mois chauds (247/620 ; $39,84 \pm 3,85\%$).

Le plus grand nombre d'échantillons provenait de patients âgés de 30 à 35 ans (76/620 ; $12,26 \pm 2,58\%$), suivi du groupe de 35 à 40 ans (66/620 ; $10,65 \pm 2,43\%$) et enfin du groupe d'âge de 25 à 30 ans (54/620 ; $8,71 \pm 2,22\%$) (Figure 4.9).

Tableau 4.3 : Caractéristiques de la population d'étude.

Catégories	Nombre	(% ± ET)
Sexe		
Male	262	(42,26 ± 3,89)
Femelle	358	(57,74 ± 3,89)
Année		
2016	81	(13,06 ± 2,65)
2017	160	(25,81 ± 3,44)
2018	143	(23,06 ± 3,32)
2019	107	(17,26 ± 2,98)
2020	129	(20,81 ± 3,20)
Saison		
Froide	373	(60,16 ± 3,85)
Chaude	247	(39,84 ± 3,85)
Total	620	

**Figure 4.9** : Nombre d'échantillons de pus prélevés dans la présente étude selon la catégorie d'âge.

4.3.2. Espèces bactériennes identifiées phénotypiquement

Parmi les 620 échantillons d'écouvillons analysés, 407 étaient positifs ($65,65 \pm 3,74\%$) totalisant 428 isolats bactériens. Parmi les échantillons positifs, 21 présentaient des cultures mixtes ($5,16 \pm 4,86\%$).

Les bactéries à Gram positif (283 ; $66,12 \pm 4,48\%$) étaient significativement plus fréquentes que les bactéries à Gram négatif (145 ; $33,88 \pm 4,48\%$) ($P < 0,001$). La majorité des bacilles à Gram négatif étaient *Escherichia coli* (*E. coli*) (44/145 ; $30,34 \pm 7,48\%$) suivis de *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) (37/145 ; $25,52 \pm 7,10\%$) et *P. aeruginosa* (34/145 ; $23,45 \pm 6,70\%$) ($P < 0,001$).

Les Staphylocoques à coagulase négative (CoNS) étaient les plus fréquents (154/283 ; $54,42 \pm 5,80\%$) parmi les cocci à Gram positif, suivis de *S. aureus* (77/283 ; $27,21 \pm 11,21\%$) et *Streptococcus* spp. (49/283 ; $17,31 \pm 4,41\%$) ($P < 0,001$) (Figure 4.10).

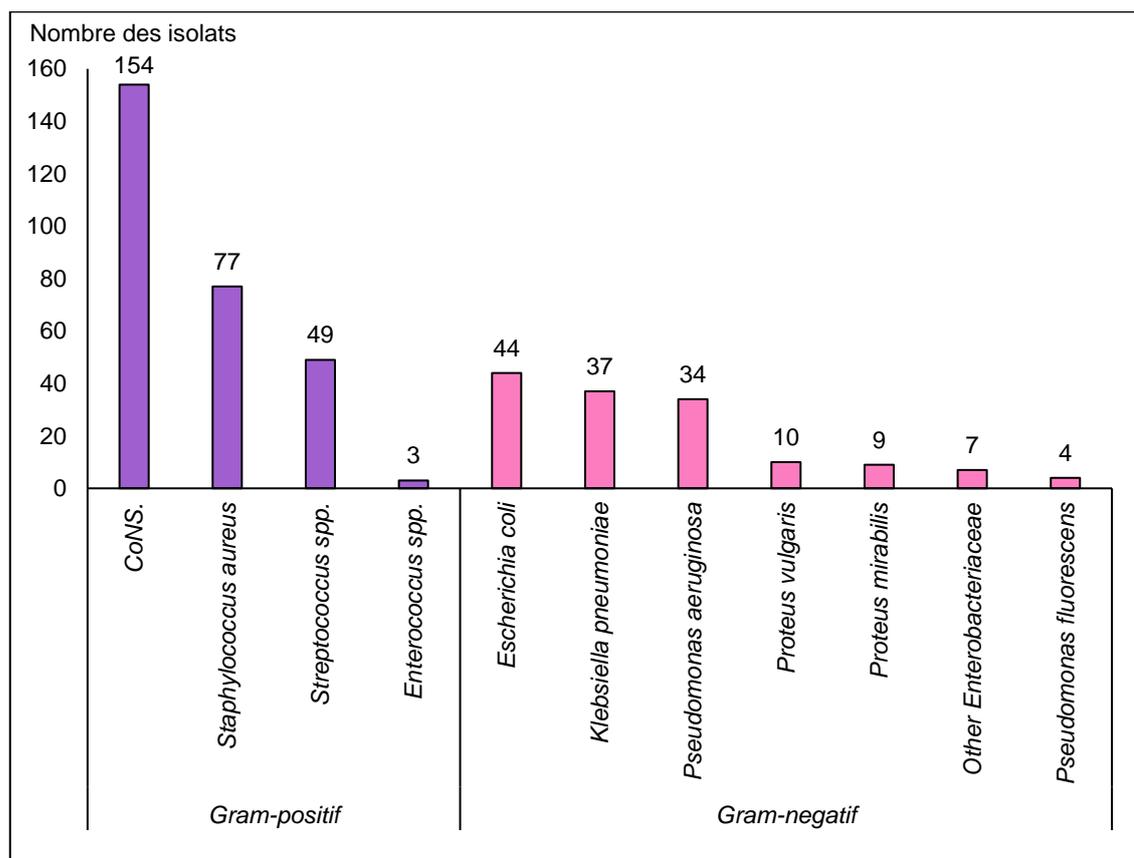


Figure 4.10 : Fréquence des bactéries isolées dans la présente étude à partir d'échantillons de pus/plaies.

4.3.3. Identification bactériologique par MALDI-TOF MS

Les résultats obtenus par le logiciel de MALDI-TOF MS (Biotyper) ont été interprétés selon les scores de la spectrométrie de masse obtenus. Ces scores nous ont permis d'obtenir 76/122 ($62,29 \pm 8,60\%$) souches dont l'identification de genre et de l'espèce est avec un degré de confiance élevé (couleur verte). 27/122 ($22,13 \pm 7,37\%$) souches dont l'identification de l'espèce est avec un degré de confiance faible (couleur jaune). Cependant, 19 isolats n'ont pas été identifiés ($15,57 \pm 6,43\%$) (couleur rouge) (Figure 4.11).

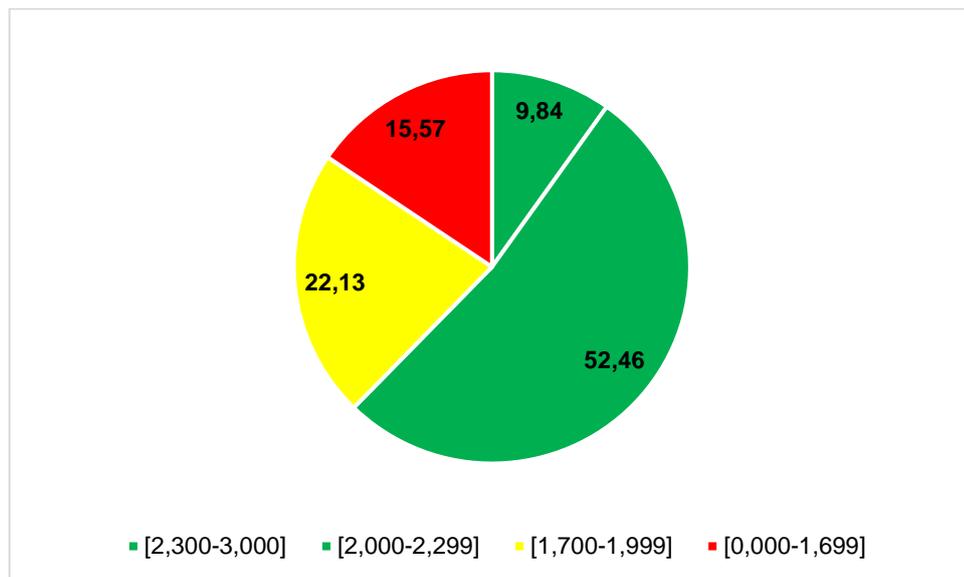


Figure 4.11 : Répartition des souches bactériennes selon les scores obtenus lors de l'identification par MALDI-TOF MS.

Les détails de l'identification des souches sont mentionnés dans le tableau 4.4. Les analyses MALDI-TOF nous ont permis de confirmer les résultats obtenus lors de l'identification bactériologique phénotypique et de déterminer les espèces bactériennes non identifiées par la première technique comme *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp.

Tableau 4.4 : Espèces bactériennes identifiées par MALDI-TOF MS.

Espèces bactériennes	Nombre de souches identifiées		
	Total	Avec degré de certitude élevé (Score ≥ 2)	Avec degré de certitude faible (Score < 2)
<i>Staphylococcus aureus</i>	22/122 ; 18,03 \pm 2,90%	20	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15/122 ; 12,30 \pm 2,04%	8	7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14/122 ; 11,48 \pm 1,92%	11	3
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	9/122 ; 7,38 \pm 1,26%	9	0
<i>Escherichia coli</i>	8/122 ; 6,56 \pm 1,13%	5	3
<i>Proteus mirabilis</i>	8/122 ; 6,56 \pm 1,13%	7	1
<i>Streptococcus anginosus</i>	6/122 ; 4,92 \pm 0,85%	3	3
<i>Streptococcus agalactiae</i>	5/122 ; 4,10 \pm 0,71%	5	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	4/122 ; 3,28 \pm 0,57%	4	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	4/122 ; 3,28 \pm 0,57%	1	3
<i>Staphylococcus simulans</i>	3/122 ; 2,46 \pm 0,43%	2	1
<i>Bacillus cereus</i>	2/122 ; 1,64 \pm 0,29%	1	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2/122 ; 1,64 \pm 0,29%	0	2
<i>Corynebacterium striatum</i>	1/122 ; 0,82 \pm 0,14%	0	1
Souches non identifiées	19/122 ; 15,57 \pm 2,54%	-	-

4.3.4. Profils de résistance aux antibiotiques

Parmi les 77 isolats de *S. aureus*, le taux de résistance le plus élevé a été enregistré pour la pénicilline (54/77 ; 70,1 \pm 10,2%), suivi de la doxycycline (21/77 ; 27,3 \pm 10%) et de la gentamicine (16/77 ; 20,8 \pm 9,1%) ($P < 0,001$). En revanche, des taux de sensibilité élevés de 91,7% et 100% ont été observés pour la clindamycine et la vancomycine, respectivement.

Parmi *S. aureus*, près d'un tiers (24/77 ; 31,2 \pm 9,3%) des isolats étaient résistants à la méticilline SARM. Les isolats de Staphylocoques à coagulase négative étaient le plus résistants à la pénicilline (135/154 ; 53,60 \pm 7,88%), à l'érythromycine (65/154 ; 32,47 \pm 7,40%) et à la doxycycline (62/154 ; 26,62 \pm 6,98%) ($P < 0,001$).

La ticarcilline (19/49 ; $38,8 \pm 13,6\%$), la clindamycine (15/49 ; $30,6 \pm 12,9\%$) et l'érythromycine (14/49 ; $28,6 \pm 12,6\%$) présentaient les taux de résistance les plus élevés chez les isolats de *Streptococcus* spp. ($P < 0,001$).

Les isolats d'*E. coli* étaient résistants à plusieurs antibiotiques, en particulier l'amoxicilline (38/44 ; $86,4 \pm 10,1\%$), l'amoxicilline-acide clavulanique (30/44 ; $68,2 \pm 13,8\%$), la céfazoline (21/44 ; $47,7 \pm 7,5\%$) et le triméthoprim-sulfaméthoxazole (16/44 ; $36,4 \pm 14,2\%$) ($P < 0,001$).

Les isolats de *K. pneumoniae* présentaient des taux de résistance élevés à l'amoxicilline (36/37 ; $97,3 \pm 5,2\%$), l'amoxicilline-acide clavulanique (31/37 ; $83,8 \pm 11,9\%$), la céfazoline (25/37 ; $67,6 \pm 15,1\%$) et la céfixime (18/37 ; $48,7 \pm 16,1\%$) ($P < 0,001$).

Les isolats de *P. aeruginosa* étaient les plus résistants à la pipéracilline (13/34 ; $38,2 \pm 16,3\%$), la ticarcilline (10/34 ; $29,4 \pm 15,3\%$), la ticarcilline-acide clavulanique (6/34 ; $17,7 \pm 12,8\%$) et la nétilmicine (5/34 ; $14,7 \pm 11,9\%$) ($P < 0,001$).

Les isolats de *Proteus vulgaris* et *Proteus mirabilis* montrent une plus grande résistance à l'amoxicilline, à la nitrofurantoïne et à l'association amoxicilline-acide clavulanique.

Quatre isolats étaient producteurs de BLSE, comprenant trois (3/37 ; $8,1\%$) *K. pneumoniae* et un isolat *E. coli* (1/44 ; $2,3\%$).

Toutes les bactéries à Gram négatif étaient sensibles à l'amikacine (145/145) suivie de l'imipénème ($98,62 \pm 1,9\%$; 143/145). La vancomycine est l'antibiotique le plus efficace contre les bactéries à Gram positif avec un taux de sensibilité de $99,65 \pm 0,69\%$ (282/283 souches) (Tableau 4.5).

Les antibiotiques de la classe des pénicillines avaient le taux de résistance le plus élevé, suivis des céphalosporines chez les bactéries à Gram négatif, comme l'indiquent la figure 4.12 par un pelage de nuance sombre. De plus, la résistance la plus faible était constatée avec les antibiotiques de la famille des aminoglycosides.

4.3.5. Profil de multirésistance

Près d'un tiers de tous les isolats bactériens ($31,54 \pm 4,40\%$; 135/428) étaient multirésistants (BMR). Le taux de multirésistance varie significativement en

fonction de l'âge des patients ($P < 0,001$). Le taux de multirésistance était plus élevé chez les bactéries à Gram négatif ($42,76 \pm 8\%$; 62/145) comparé aux bactéries à Gram positif ($25,79 \pm 5,10\%$; 73/283) ($P < 0,001$). De plus, le nombre d'isolats multirésistants était plus élevé pour les *Enterobacteriaceae* (BMR $> 44\%$) comparé aux *Pseudomonas* spp. (BMR $< 9\%$) ($P = 0,004$). Le taux de multirésistance ne variait pas avec les années d'échantillonnage ($P = 0,42$).

Tableau 4.5 : Profil de résistance aux antibiotiques des souches bactériennes isolées dans la présente étude.

Bactéries isolées (nombre)	CoNS (N=154)	<i>S. aureus</i> (N=77)	<i>Streptococcus</i> spp. (N=49)	<i>Enterococcus</i> spp. (N=3)	<i>E. coli</i> (N=44)	<i>K. pneumoniae</i> (N=37)	<i>P. aeruginosa</i> (N=34)	<i>P. fluorescens</i> (N=4)	<i>Proteus vulgaris</i> (N=10)	<i>Proteus mirabilis</i> (N=9)	Autres <i>Enterobacteriaceae</i> (N=7)
Antibiotiques testés (nombre des souches) (%±ET)											
PEN	81/154 (52,60 ± 7,89)	54/77 (70,13 ± 10,2)	3/49 (6,1 ± 6,7)	3/3	-	-	-	-	-	-	-
GEN	6/154 (3,90 ± 3,06)	16/77 (20,78 ± 9,06)	-	-	4/44 (9,1 ± 8,5)	5/37 (13,5 ± 11)	1/34 (2,9 ± 5,7)	0/4	0/10	0/9	2/7
AMK	5/154 (3,25 ± 2,80)	11/77 (14,29 ± 7,82)	-	-	0/44	0/37	0/34	0/4	0/10	0/9	0/7
ERY	50/154 (32,47 ± 7,4)	15/77 (19,48 ± 8,85)	14/49 (28,7 ± 12,7)	0/3	-	-	-	-	-	-	-
CLI	11/154 (7,14 ± 4,07)	5/77 (6,49 ± 5,50)	15/49 (30,6 ± 12,9)	1/3	-	-	-	-	-	-	-
VAN	0/154	0/77	0/49	1/3	-	-	-	-	-	-	-
OFX	12/154 (7,79 ± 4,23)	14/77 (18,18 ± 8,61)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SXT	36/154 (23,38 ± 6,68)	6/77 (7,79 ± 5,98)	-	-	16/44 (36,4 ± 14,2)	15/37 (40,5 ± 15,8)	-	-	6/10	2/9	5/7
DOX	41/154 (26,62 ± 6,98)	21/77 (27,27 ± 9,95)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RIF	-	-	1/49 (2,0 ± 4)	0/3	-	-	-	-	-	-	-
AMX	-	-	1/49 (2 ± 4)	3/3	38/44 (86,4 ± 10,1)	36/37 (97,3 ± 5,2)	-	-	10/10	7/9	6/7
AMC	-	-	-	-	30/44 (68,2 ± 13,8)	31/37 (83,8 ± 5,2)	-	-	5/10	4/9	5/7
CFZ	-	-	-	-	21/44 (47,7 ± 14,8)	25/37 (67,6 ± 15,1)	-	-	3/10	2/9	5/7

CTX	-	-	-	-	11/44 (25 ± 12,8)	14/37 (37,8 ± 15,6)	-	-	2/10	0/9	5/7
IPM	-	-	-	-	0/44	0/37	2/34 (5,9 ± 7,9)	0/4	0/10	0/9	0/7
FOF	-	-	-	-	0/44	2/37 (5,41 ± 7,3)	-	-	1/10	1/9	3/7
CIP	-	-	-	-	6/44 (13,6 ± 10,1)	4/37 (10,81 ± 10,01)	0/34	0/4	0/10	0/9	4/7
NAL	-	-	-	-	14/44 (31,8 ± 13,8)	6/37 (16,2 ± 11,9)	-	-	2/10	2/9	6/7
NIT	-	-	-	-	11/44 (25 ± 12,80)	16/37 (43,24 ± 15,96)	-	-	6/10	8/9	4/7
TIC	-	-	-	-	-	-	10/34 (29,4 ± 15,3)	2/4	-	-	-
TIM	-	-	-	-	-	-	6/34 (17,7 ± 12,8)	1/4	-	-	-
PIP	-	-	-	-	-	-	13/34 (38,2 ± 16,3)	1/4	-	-	-
CAZ	-	-	-	-	-	-	4/34 (11,8 ± 10,8)	0/4	-	-	-
NET	-	-	-	-	-	-	5/34 (14,7 ± 11,9)	0/4	-	-	-
TOB	-	-	-	-	-	-	3/34 (8,8 ± 9,5)	0/4	-	-	-
ATM	-	-	-	-	-	-	2/34 (5,9 ± 7,9)	0/4	-	-	-
BMR	34/154 (22,08 ± 6,55)	31/77 (40,26 ± 10,96)	8/49 (16,3 ± 10,3)	0/3	22/44 (50 ± 14,8)	20/37 (54,1 ± 16,1)	3/34 (8,8 ± 9,5)	0/4	7/10	4/9	6/7

Pénicilline (PEN); Gentamicine (GEN); Amikacine (AMK); Erythromycine (ERY); Clindamycine (CLI); Vancomycine (VAN); Ofloxacin (OFX); Trimethoprim+ Sulfaméthoxazole (SXT); Doxycycline (DOX); Rifampicine (RIF); Amoxicilline (AMX); Amoxicilline-Acide Clavulanique (AMC); Céfazoline (CFZ); Céfotaxime (CTX); Imipenème (IPM); Fosfomycine (FOF); Ciprofloxacine (CIP); Acide Nalidixique (NAL); Nitrofurantoïne (NIT); Ticarcilline (TIC); Ticarcilline-Clavulanique (TIM); Piperacilline (PIP); Ceftazidime (CAZ); Netilmicine (NET); Tobramycine (TOB); Aztreonam (ATM); BMR (Bactéries Multirésistantes).

(-): Non-testé

Antibiotics	Gram-negative							Gram-positive			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Other enterobacteriaceae	CoNS	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Enterococcus spp.</i>
Penicillin								35.1	70.1	6.12	75
Amoxicillin	86.36	97.30		77.78	100		85.71			2.04	75
Amoxicillin-Clavulanate	68.18	83.78		44.44	50		71.43				
Piperacillin			38.24			25					
Ticarcillin			17.65			50					
Ticarcillin-Clavulanate			29.41			25					
Imipenem	0	0	5.88	0	0	0	0				
Aztreonam			5.88			0					
Cefazolin	47.73	67.57		22.22	30		71.43				
Cefotaxime	25	37.84		0	20		71.43				
Ceftazidime			11.76			0					
Fosfomicin	0	5.41		11.11	10		42.86				
Vancomycin								0	0	0	25
Amikacin	0	0	0	0	0	0	0	2.16	14.29		
Gentamicin	9.09	13.51	2.94	0	0	0	28.57	2.597	20.78		
Netilmicin			14.71				0				
Tobramycin			8.82				0				
Erythromycin								21.65	19.48	28.57	0
Clindamycin								4.76	6.49	30.61	25
Doxycycline								17.75	27.27		
Ciprofloxacin	13.64	10.81	0	0	0	0	57.14				
Nalidixic Acid	31.82	16.22		22.22	20		85.71				
Ofloxacin								5.19	18.18		
Trimethoprim Sulfamethoxazole	36.36	40.54		22.22	60		71.43	15.58	7.79		
Rifampicin										2.04	0
Nitrofurantoin	25	43.24		88.89	60		57.14				

Figure 4.12 : Heatmap de profil de résistance aux antibiotiques testés dans l'étude.

4.4. Discussion

La résistance aux antibiotiques limite le choix des traitements des infections de plaies. La fréquence de ces infections varie selon le temps et la région. La présente enquête a été réalisée dans un hôpital Algérien situé dans la wilaya de Ain Defla ; elle a permis de collecter 620 échantillons de pus provenant de plaies infectées durant une période de cinq ans. La fréquence des plaies infectées était plus élevée pendant les mois froids (373/620 ; 60,16%) même si plusieurs études ont reporté que les risques d'infection augmentent pendant les mois chauds [171], [172], [173]. Aux États-Unis, il y avait 26,5% de cas d'infections en plus en août qu'en janvier [173]. Cette disparité pourrait être liée à la programmation des chirurgies (non urgente) en dehors de la saison estivale en Algérie, où la température dépasse les 45°C. Vickers et *al.* n'ont pas trouvé de relation statistiquement significative entre le climat et la fréquence des infections dans deux zones climatiques différentes (hôpitaux australiens tropicaux et subtropicaux) [174].

L'étude a révélé que plus de la moitié des échantillons de pus prélevés présentaient des cultures bactériennes positives (407/620 ; 65,65%). Les taux obtenus ici sont similaires à ceux rapportés par Rai et *al.* en 2017 qui ont mené une étude sur les plaies infectées chez des enfants au Népal (265/450 ; 59%) [175] et plus bas que ceux rapportés par Tchakal-Mesbahi et *al.* (en 2021) en Algérie (79,12% ; 1585 échantillons) [176], Shimekaw et *al.* en Éthiopie (en 2022) (72,6% ; 201 échantillons) [177], et Kassam et *al.* en 2017 en Tanzanie (91,4% ; 93 échantillons) [178] en utilisant des procédures de diagnostic bactériologique phénotypique standard. Malgré la présence de pus et de signes d'infections de plaies, le taux de cultures négatives était de 34,35% (213/620). Cela pourrait être dû à l'utilisation des antibiotiques préopératoires à titre prophylactique ou à une prescription précoce d'antibiotiques au début de l'infection. De plus, dans certains cas, l'identification bactériologique et les tests de sensibilité aux antibiotiques sont effectués après un échec thérapeutique.

La fréquence de bactéries Gram positif (66,12%) était supérieure à celle des bactéries Gram négatif (33,38%), ce qui est en accord avec les résultats de l'étude menée par Duwadi et *al.*, en 2022, chez des patients cancéreux dans un établissement de soins tertiaires au Népal. Dans cette étude, le pourcentage

d'isolats Gram positif (63,9%) surpassait celui des isolats Gram négatif (36,1%) [179]. Des résultats similaires ont également été observés au Népal par Upreti et *al.*, en 2018, qui ont constaté que parmi les 182 échantillons de pus provenant de patients présentant des signes cliniques d'infection des plaies, 71,6% étaient Gram positif [180]. Une étude menée en Algérie sur des patients souffrant d'infections de plaies par brûlure a révélé que 68,95% des souches isolées ont été des bactéries Gram négatif [176]. Cette faible proportion d'isolement des bactéries Gram négatif peut être expliquée par leur capacité limitée à survivre dans les conditions sèches de la peau normale, favorisant ainsi la prédominance des bactéries Gram positif [181].

Escherichia coli (30,34%), *K. pneumoniae* (25,52%) et *P. aeruginosa* (23,45%) étaient les principales bactéries identifiées parmi les isolats Gram négatif. La même tendance a été rapportée dans plusieurs régions du monde. En Inde, Rai et *al.* ont constaté que *P. aeruginosa* était l'isolat le plus dominant (45/102 ; 44%), suivi de *K. pneumoniae* (28/102 ; 27%) et *E. coli* (13/102 ; 13%) chez des enfants présentant des plaies infectées [175]. Dans une étude réalisée en Tanzanie par Manyahi et *al.*, *P. aeruginosa* était la bactérie Gram négatif la plus fréquente (24/147 ; 16,3%) [182]. Les espèces bactériennes causales varient selon la zone géographique et la nature des plaies. En Algérie, Tchakal-Mesbahi et *al.* ont rapporté que *P. aeruginosa* était l'espèce la plus fréquente (33,91%), suivie de *K. pneumoniae* (25,14%) et d'*Acinetobacter baumannii* (16,37%) [176].

Staphylococcus aureus représentait la deuxième bactérie Gram positif isolée (27,21%) après les souches de Staphylocoques à coagulase négative des résultats similaires ont été rapportés chez 8 569 patients en France (fréquence d'isolement était de 35% et 23% pour les Staphylocoques à coagulase négative et *S. aureus*, respectivement) [4]. Les Staphylocoques sont les bactéries colonisatrices les plus courantes de la peau et les principales causes d'infections nosocomiales et d'infections cutanées dans la communauté [183].

Nos résultats ont montré que 31,17% (24/77) des *S. aureus* étaient des SARM. Dans une étude menée par Zerouki et *al.*, au sein de service de chirurgie orthopédique et de traumatologie de l'hôpital militaire universitaire de Constantine, les *S. aureus* ont été isolés dans 39,5% (30/76) dont 63,3% étaient des SARM [7].

De plus, en Algérie, Bouharkat et *al.* ont révélé que *S. aureus* est l'espèce la plus isolée (25,97%) chez les patients diabétiques souffrant d'infections du pied dont les SARM représentaient 18,3% [8]. Au Maroc, le taux de *S. aureus* dans les infections de plaies de brûlures était de 33,85% (44/86), dont 86,36% étaient des SARM [184]. Ces divergences entre les études peuvent s'expliquer principalement par l'écologie microbienne des hôpitaux [7]. De plus, la fréquence élevée de *S. aureus* n'est pas surprenante, car cette bactérie fait partie de la flore microbienne naturellement présente sur la peau [185].

Dans cette étude, le taux de résistance à la pénicilline était de 70,13% pour *S. aureus*. Au Maroc, El Hamzaoui et *al.* ont trouvé une résistance de 86,36% parmi les *S. aureus* isolées [184]. Selon Que et *al.*, la production de pénicillinase est la principale cause responsable de l'émergence de la résistance à la pénicilline, avec une prévalence proche de 80% [186].

Un taux élevé de résistance à l'amoxicilline a été enregistré chez *E. coli* (86,36%), *K. pneumoniae* (97,30%) et d'autres espèces d'Entérobactéries. De plus, l'association d'amoxicilline-acide clavulanique présente également une résistance très importante (68,18% et 83,78% pour *E. coli* et *K. pneumoniae*, respectivement). De même, El Hamzaoui et *al.* ont rapporté que plus de 80 % des différentes souches isolées étaient résistantes à cette association d'antibiotiques [184]. La raison la plus courante de la résistance aux antibiotiques de la famille des bêta-lactamines parmi les Entérobactéries est liée à l'expression d'enzymes bêta-lactamases qui hydrolysent le cycle bêta-lactame, entraînant l'inactivation de ces antibiotiques [187], [188].

Dans cette étude, les résultats ont montré l'efficacité de la vancomycine pour combattre les bactéries à Gram positif. Dans une étude menée en Éthiopie par Mama et *al.*, il a été constaté que les 145 souches isolées étaient toutes sensibles à la vancomycine [189]. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la vancomycine est un glycopeptide réservé en dernier recours pour traiter les infections causées par des bactéries résistantes. Plusieurs générations de vancomycine ont été développées pour prévenir l'émergence de résistances [190], et elles ne sont utilisées qu'en milieu hospitalier, administrées par la voie intraveineuse [191].

Les résultats ont montré que l'amikacine et l'imipenème ont une très bonne efficacité contre les bactéries Gram négatif. Les deux antibiotiques sont utilisés exclusivement en clinique et impliquent des coûts élevés. En outre, l'amikacine se caractérise par sa forte résistance aux modifications enzymatiques bactériennes, ce qui rend plusieurs espèces de bactéries Gram négatif sensibles à cet antibiotique [192].

Le taux élevé de la résistance à la pénicilline est attribuable à une utilisation irrationnelle de ces médicaments. De même, le niveau important de résistance aux antibiotiques de type céphalosporine pourrait être lié à leur utilisation fréquente en post-chirurgie [193]. En revanche, les aminoglycosides étaient la classe d'antibiotiques à laquelle présentait le moins de résistance. Afin d'éviter l'émergence et la propagation de la résistance à cette classe d'antibiotique, il est impératif de contrôler rigoureusement leur utilisation dans les milieux hospitaliers. Ainsi, la surveillance continue des gènes de résistance chez les humains et les animaux est essentielle pour retarder la dissémination de la résistance aux aminoglycosides [194].

Dans notre étude, 31,54% des souches isolées ont montré une multirésistance aux antibiotiques. Cela pourrait retarder le processus de cicatrisation des plaies et même altérer l'état général du patient, entraînant par exemple une septicémie. De plus, cette résistance réduit les choix thérapeutiques et prolonge la durée d'hospitalisation. Dans des études éthiopiennes, des proportions plus élevées de multirésistance ont été enregistrées pour différents types de plaies, estimées entre 80,8% et 85% [189], [194].

Dans cette étude, la multirésistance dans les isolats de bactéries Gram négatif représentait 42,76%, tandis que 25,79% des bactéries Gram positif étaient multirésistantes. Ces taux de résistance étaient inférieurs aux résultats rapportés par Duwadi et *al.* (60% et 40% pour les bactéries Gram positif et Gram négatif, respectivement) [179]. De plus, cette multirésistance variait significativement selon l'espèce bactérienne [194], [176]. De plus, il existait une corrélation significative entre l'âge et le taux de la multirésistance. Cela pourrait s'expliquer par l'utilisation irrationnelle des antibiotiques, en particulier l'automédication qui se cumule avec l'âge.

4.5. Conclusion

Dans cette étude, les CoNS et *S. aureus* sont les bactéries prédominantes isolées à partir des prélèvements de pus provenant des plaies infectées chez les patients du district d'Ain Defla, au nord-centre de l'Algérie. Un taux de résistance très élevé a été enregistré pour les antibiotiques couramment utilisés comme l'amoxicilline (plus de 80% pour les différentes espèces bactériennes). L'amikacine et la vancomycine sont respectivement les plus efficaces contre les bactéries Gram positif. Près d'un tiers des isolats étaient multirésistants (BMR). Cette résistance était plus élevée chez les bactéries à Gram positif et elle dépend significativement de l'âge des patients.

CHAPITRE 5 : EVALUATION DES EFFETS *IN VIVO* ET *IN VITRO* D'UNE FORMULATION CONTENANT DU MIEL

5.1. Problématique et objectifs

Les plaies sont des blessures physiques ou chimiques qui résultent d'une ouverture ou d'une rupture de la peau. Cette blessure est suivie d'un phénomène physiologique interdépendant « la cicatrisation » impliquant plusieurs étapes qui se chevauchent, pouvant comprendre l'inflammation, la ré-épithélialisation, l'angiogenèse et le remodelage de la matrice extracellulaire [195].

Une bonne cicatrisation des plaies est importante pour la restauration de l'intégrité anatomique et fonctionnelle altérée de la peau. Sachant qu'il existe plusieurs facteurs qui interviennent dans le déroulement de cette dernière.

La cicatrisation des plaies représente une préoccupation majeure pour le personnel médical et un enjeu majeur de santé publique avec des coûts élevés des soins et des traitements médicaux dont l'objectif principal est de refermer rapidement les lésions cutanées avec des résultats fonctionnels et esthétiques optimaux.

De nos jours, il existe un intérêt scientifique considérable pour la recherche des solutions alternatives vu l'augmentation des échecs thérapeutiques liés aux plusieurs paramètres comme la nature de plaies, les infections cutanées, l'antibiorésistance, ...etc.

Parmi les domaines de recherche il y a l'évaluation pharmacologique des propriétés biologiques des produits api-phyto-thérapeutiques. En outre, des études récentes ont démontré que les api-produits sont également capables d'influencer le phénotype des cellules de la peau, telles que les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales, impliquées dans la cicatrisation correcte des plaies [196].

Les propriétés médicinales du miel et les autres api-produits dépendent surtout de la source florale butinée par les abeilles.

Toutefois, des études expérimentales supplémentaires sont nécessaires pour démontrer et corroborer ses activités biologiques. La présente étude a donc été entreprise pour démontrer l'activité antibactérienne et antioxydante *in vitro*, ainsi que l'activité cicatrisante d'une formulation de gel à base de miel sur un animal modèle et de comparer cette dernière à un traitement conventionnel (sulfadiazine argentique).

5.2. Matériel et méthodes

5.2.1. Lieu de déroulement de l'étude

L'expérimentation *in vivo* a eu lieu pendant deux mois au sein de service de chirurgie et d'imagerie médicale de l'institut des Sciences Vétérinaires de Tiaret, Université Ibn Khaldoun. Pour ce qui est de l'étude *in vitro*, elle a été menée au sein du laboratoire d'analyses médicales de Dr Zibouche, ainsi que le laboratoire d'analyse de département des Sciences Technologiques de l'Université Djilali Bounaama, Khemis Miliana.

5.2.2. Méthode de préparation du gel à base de miel

Afin de préparer notre gel, nous avons utilisé le miel d'euphorbe comme composition principale mélangé avec l'amidon comme agent épaississant et un gélifiant. Les proportions de chaque composant sont : 1 :4 (p/v) (Figure 5.1) :

- Quatre grammes de miel liquéfié ont été mélangés avec 1 g d'amidon (provenant du tubercule de pomme de terre).
- Le mélange a été placé dans un bain-marie à 40°C pour permettre l'homogénéisation des composants.
- La préparation a ensuite été stérilisée dans un stérilisateur à rayons ultraviolet.

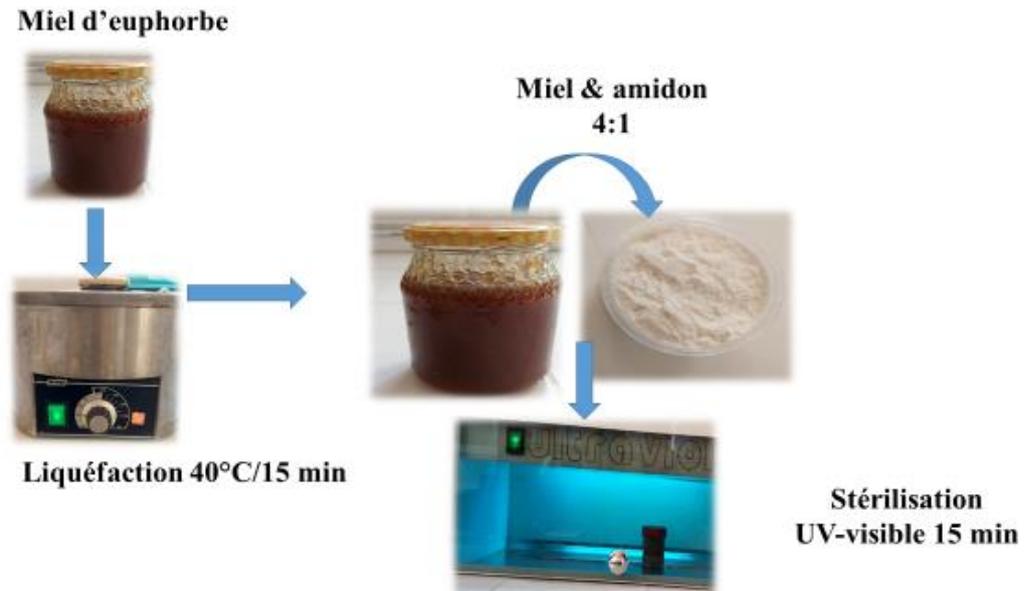


Figure 5.1 : Etapes de préparation de gel à base de miel (photo personnelle).

5.2.3. Partie *in vitro*

5.2.3.1. Effet antibactérien

5.2.3.1.1. Souches bactériennes

Quatre souches bactériennes de référence internationale ATCC (référentielles de l'American Type Culture Collection), *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ATCC 29212, ont été testées pour évaluer l'effet antibactérien de la préparation.

Pour cette évaluation, la méthode de diffusion en puits a été mise en œuvre comme suit :

5.2.3.1.2. Préparation de l'inoculum bactérien

L'inoculum a été préparé à partir d'une culture jeune et fraîche de 18 à 24 heures, cultivée sur milieu gélosé adapté pour chaque espèce bactérienne et incubée à 37°C. Quelques colonies bactériennes ont été mises en suspension dans l'eau physiologique stérile à 0,9% afin d'obtenir un inoculum d'une densité correspondant à un standard McFarland de 0,5 (10^6 UFC/mL).

L'inoculum peut être modulé en ajoutant soit avec de la culture si sa concentration est trop faible, soit avec de l'eau physiologique stérile si elle est trop élevée. Il est impératif de procéder à l'ensemencement dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

5.2.3.1.3. Ensemencement

Pour l'ensemencement bactérien, un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne. L'écouvillon est ensuite pressé fermement contre la paroi interne du tube en le tournant pour l'essorer au maximum. Il est frotté sur la totalité de la surface de la gélose Mueller-Hinton sèche, en stries serrées de haut en bas.

Cette opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° et en pivotant l'écouvillon. Pour terminer l'ensemencement, l'écouvillon est passé sur le pourtour de la gélose. Enfin, les boîtes sont laissées sécher pendant cinq minutes.

5.2.3.1.4. Technique de diffusion sur gélose (Méthode de puits)

L'évaluation de l'activité antibactérienne du miel a été déterminée par la technique de diffusion sur gélose décrite par Hamdi et *al.* en 2020 avec quelques modifications[197].

Des puits de 6 mm de diamètre ont été créés dans les boîtes de Pétri déjà ensemencées dont le fond a été rempli par une goutte de gélose Mueller Hinton pour restreindre la dispersion des produits utilisés (gel de miel, sulfadiazine argentique à 1% et eau distillée). Ensuite, chaque puits a été rempli par les différents produits testés. Les boîtes ont été incubées par la suite à 37°C pendant 24 heures.

L'efficacité de traitement se traduit par la formation d'une zone d'inhibition autour des puits. L'évaluation de l'activité antibactérienne a été effectuée en mesurant, à l'aide d'une règle transparente, le diamètre de ces zones d'inhibition. Les résultats sont catégorisés en trois niveaux d'activité : résistant ($D < 5$ mm), intermédiaire ($11 \text{ mm} > D > 6 \text{ mm}$) et sensible ($D > 12 \text{ mm}$)[198]. Les témoins négatifs sont préparés en remplissant les puits avec 0,5 mL d'eau distillée stérile. Le test a été réalisé en trois répétitions.

5.2.3.2. Effet antioxydant

5.2.3.2.1. Dosage des antioxydants

➤ Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des composés phénoliques présents dans notre gel à base de miel a été réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Singleton et *al.*, avec quelques modifications [199].

Dans des tubes à essais en verre, un volume de 100 μL de solution de miel (1mg/mL) sont mélangés avec 1000 μL de réactif de Folin (dilué 10 fois) et 800 μL de bicarbonate de sodium à 7,5% (Na_2CO_3). Les tubes ont été incubés par la suite pendant 40 minutes après une agitation. L'absorbance a été mesurée à 765 nm. Chaque dosage a été répété trois fois.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant l'acide gallique à des concentrations différentes (de 50 à 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La quantification des composés phénoliques a été réalisée par rapport à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique [200]. La teneur totale en composés phénoliques a été exprimée en équivalents d'acide gallique (EAG) (mg EAG/100 g de miel).

➤ Dosage des flavonoïdes

La teneur globale en flavonoïdes a été quantifiée par une méthode colorimétrique faisant intervenir le chlorure d'aluminium [201]. Un volume de 1 mL de chlorure d'aluminium à 2% (AlCl_3) est ajouté à 100 μL de solution de miel. Après une incubation de mélange pendant 40 minutes, la lecture d'absorbance a été faite à 430 nm. Trois répétitions ont été réalisées. La quantification des flavonoïdes totaux a été réalisée par rapport à une courbe d'étalonnage établie avec la quercétine. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalents de quercétine (EQ) par 100 grammes de miel [202].

5.2.3.2.2. Activité anti-radicalaire (DPPH)

Cette approche repose sur l'évaluation de l'aptitude des antioxydants à neutraliser le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). En effet, le DPPH se distingue par sa faculté à générer des radicaux libres stables. Cette stabilité provient de la délocalisation des électrons non appariés au sein de la molécule. La présence

de ces radicaux DPPH confère une coloration violette intense, qu'elle sera absorbée autour de 517nm. L'interaction des radicaux DPPH avec un composé antioxydant entraîne un virement de la coloration de violet vers le jaune [203].

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire est réalisée selon la technique décrite par Gül et Pehlivanen 2018 [204], avec quelques modifications. Les étapes de la technique sont les suivantes :

- Un gramme de la préparation de miel est mélangé avec 1 mL d'éthanol à 96°, pour former la solution mère.
- À partir de la solution mère, des doses croissantes sont préparées en ajoutant 1 mL d'éthanol à 96° pour chaque volume de solution mère prélevé (20, 40, 60, 80, 100, 200, 250 µL).
- Une quantité de 1 mL de DPPH est ajoutée à chacune des concentrations de solution.
- Les tubes contenant les solutions sont légèrement agités, suivis d'une incubation de 30 minutes à l'obscurité à température ambiante.
- La lecture est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 517 nm.
- Le pourcentage de réduction du DPPH est alors calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ de DPPH réduit} = \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs control}} * 100$$

L'évaluation du pouvoir antioxydant de notre préparation à base de miel a été réalisée en les comparants à un antioxydant naturel de référence, l'acide ascorbique, et un antioxydant de synthèse, BHT (Butylated Hydroxytoluen).

La concentration de la préparation qui peut inhiber 50% des radicaux de DPPH (IC₅₀) a été déterminée à partir de la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration en utilisant l'équation de régression linéaire :

$$(y = bx + a).$$

Les valeurs de IC₅₀ est qualifiée de puissante si la valeur IC₅₀ est inférieure à 10 mg/mL, de forte si la valeur IC₅₀ est comprise entre 10 et 50 mg/mL, de modérée si la valeur IC₅₀ est comprise entre 50 et 100 mg/mL, de faible si la valeur

IC₅₀ est comprise entre 100 et 250 mg/mL et d'inactive si la valeur IC₅₀ est supérieure à 250 mg/mL [203].

5.2.4. Partie *in vivo*

5.2.4.1. Modèle expérimental animal

Dans le cadre de notre étude, les rats ont été sélectionnés comme animaux modèles pour créer les plaies et évaluer la cicatrisation. Afin d'éviter les différences entre les sexes, tous les rats utilisés sont des mâles de race Wistar (*Rattus norvegicus*). L'approvisionnement des rats a été fait par l'Institut Pasteur D'Alger (Kouba) avec une attestation d'acquisition prouvant qu'ils ne présentaient aucun signe clinique de pathologie au moment de leur mise à disposition (Annexe C).

Les rats ont été récupérés après sevrage avec un poids moyen variant entre 140 et 160 g avec un temps d'adaptation de 15 jours (Figure 5.2). Dès l'arrivée des rats, chacun a été séparé dans des cages individuelles avec accès libre à l'eau et à une nourriture spécifique aux rongeurs. Cet aliment est composé de : Orge, Maïs, Son, Remoulage, Soja et CMV (Complexe Multi-vitaminique).

Les rats ont été maintenus dans des conditions de stabulation contrôlées avec un cycle jour/nuit de 14/10 heures, une température varie de 24 à 27°C et un taux d'humidité relative de 25-35%.



Figure 5.2 : Animaux utilisés dans notre étude (photos personnelles).

5.2.4.2. Test de la toxicité cutanée

Après la préparation de la formulation, le test de la toxicité cutanée a été réalisé pendant 7 jours sur des rats sains après rasage de la partie dorsale. Ce test est très important avant d'entamer l'expérimentation pour éviter d'influencer les résultats de l'étude. Le test consiste à appliquer une couche de la formule préparée sur la région rasée des rats. Un contrôle continu a été faite afin de constater n'importe quel changement sur les sujets. Les résultats de test n'ont montré aucun signe d'allergie ou d'inflammation locale, ainsi qu'aucun signe clinique général. Ceci nous a permis d'entamer l'expérimentation.

5.2.4.3. Répartition des groupes

Les dix-huit rats ont été répartis d'une façon aléatoire en trois groupes de six sujets

- Le premier **groupe A** (Témoin négatif) : six rats dont les plaies ont été traitées par l'eau distillée.

- Le deuxième **groupe B** : six rats dont les plaies ont été traitées par le gel à base de miel.
- Le troisième **groupe C** : six rats dont les plaies ont été traitées par la sulfadiazine argentique.

5.2.4.4. Model expérimental de la cicatrisation des plaies

Dans notre étude, une plaie excisionnelle de pleine épaisseur a été induite sur le dos de chaque sujet, en suivant le protocole suivant :

- Une anesthésie générale a été administrée en utilisant une association de xylazine et de kétamine par injection intramusculaire, à des doses respectives de 10 mg/kg et 90 mg/kg [205].
- Après le rasage des poils à l'aide d'une tondeuse électrique, la peau du dos a été préparée chirurgicalement avec de la povidone iodée. Ensuite, une plaie carrée d'une superficie de 1 cm x 1 cm a été délimitée à l'aide d'un marqueur et d'une règle (Figure 5.3).

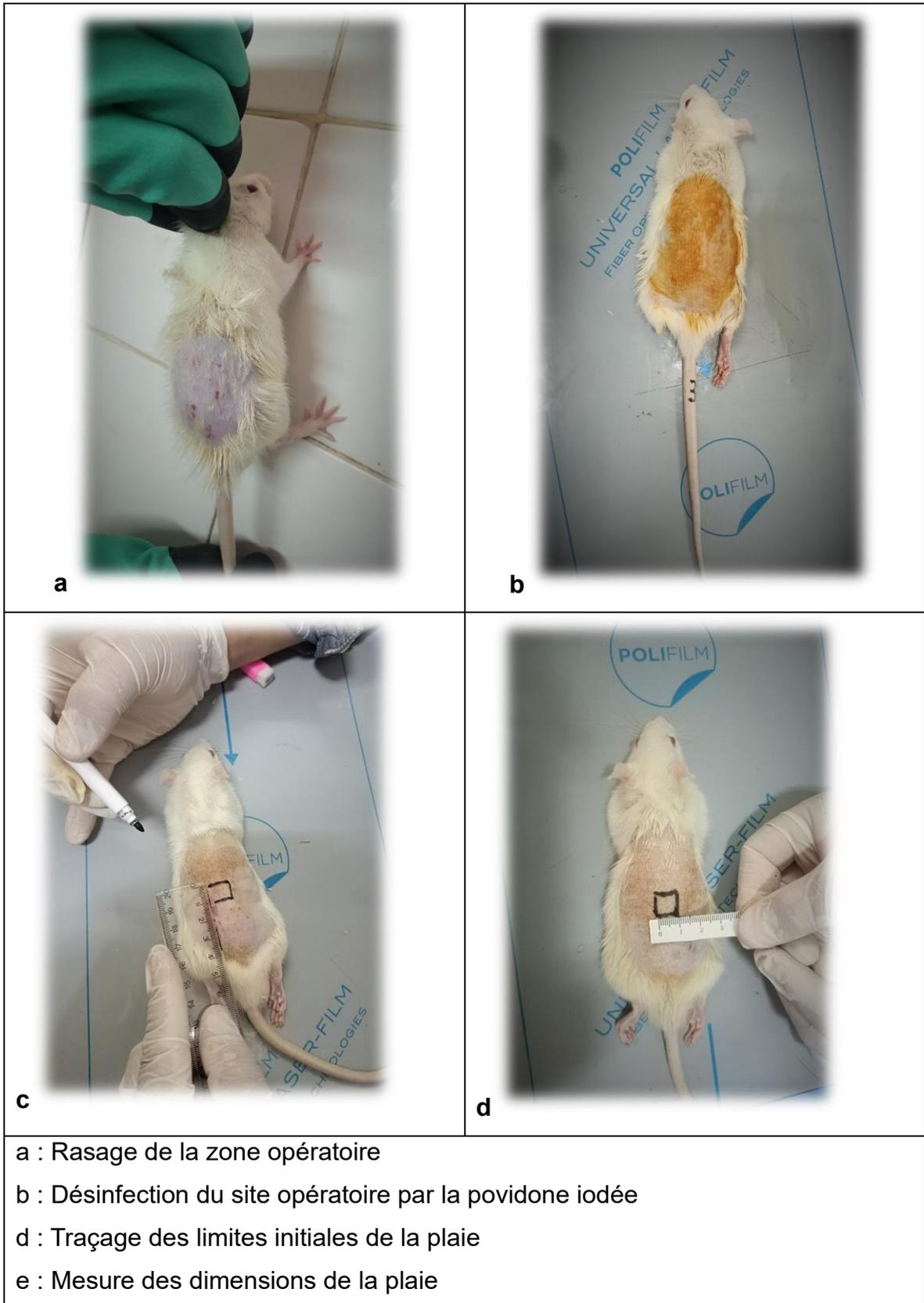


Figure 5.3 : Préparation chirurgicale du site opératoire (photos personnelles).

- Une fois la préparation de l'animal terminée, le champ opératoire a été mis en place. Avec une approche lente et minutieuse, le segment de peau de pleine épaisseur a été excisé selon la méthode suivante :
- Quatre incisions nettes, suffisamment profondes pour atteindre toutes les couches de la peau, ont été effectuées à l'aide d'une lame de bistouri N°11, en suivant les traits délimités par le marqueur comme guide. Enfin, pour retirer le lambeau cutané, une dissection a été réalisée en utilisant une pince à préhension et un ciseau à section pointue (Figure 5.4).

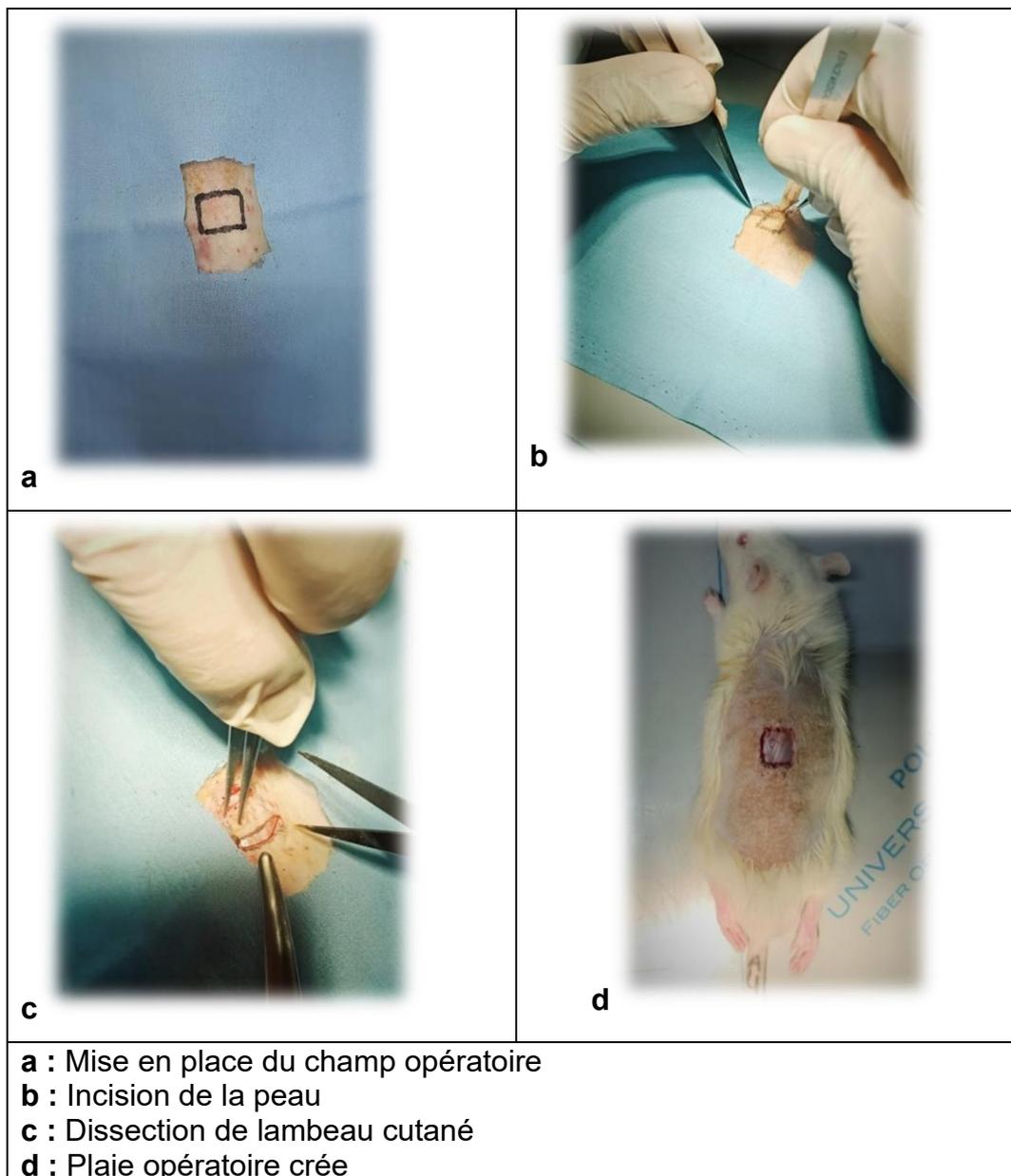


Figure 5.4 : Etapes de réalisation des plaies (photos personnelles).

5.2.4.5. Suivi des plaies et modes d'application des différents traitements

Les sujets du groupe "A" en tant que témoin négatif ont été exposés à quelques gouttes d'eau distillée. Les plaies des animaux du groupe "C", en tant que témoin positif, ont été traitées avec une application d'une couche de 2 à 3 mm de sulfadiazine argentique à 1%.

En ce qui concerne le groupe "B", un gel à base de miel a été uniformément étendu sur la plaie à raison de 1 mL par cm² (Figure 5.5).

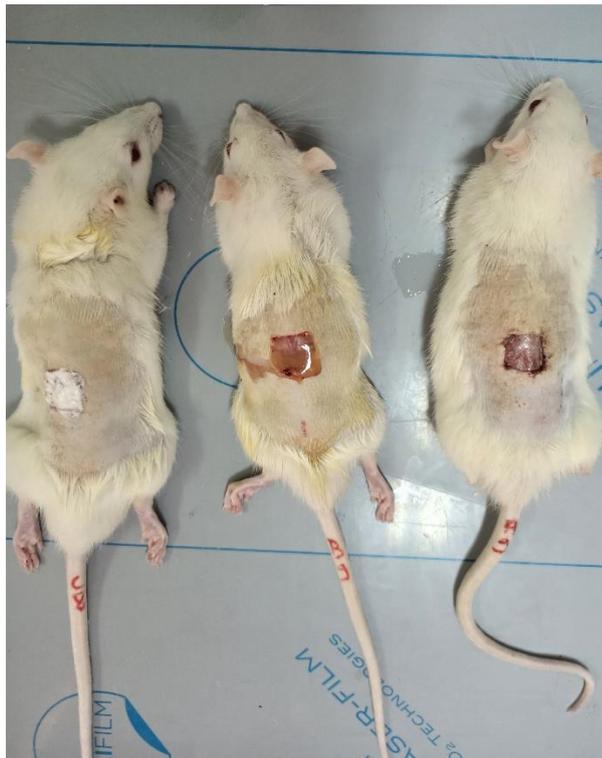


Figure 5.5 : Application des différents traitements sur les plaies (photo personnelle).

(Du droite à gauche : Eau distillée ; Miel ; Sulfadiazine argentique)

Par la suite, des compresses sèches et stériles sont appliquées sur les plaies, et un pansement semi-imperméable est placé pour les préserver contre toute contamination extérieure (Figure 5.6). Ce pansement est renouvelé toutes les 24 heures. Une fois que la formation complète de la croûte est terminée, l'utilisation des pansements a été interrompue.



Figure 5.6 : Application de pansement (photo personnelle).

Pour garantir le bon déroulement de l'expérimentation et consigner chaque modification, une surveillance attentive des sujets a été maintenue tout au long des 21 jours de l'étude.

Remarque : Aucun antibiotique n'a été utilisé par voie parentérale afin d'éviter toute influence de ce dernier sur les résultats escomptés.

5.2.4.6. Paramètres macroscopiques d'évaluation des plaies

Une évaluation macroscopique ainsi que la documentation photographique des plaies ont été effectuées jusqu'à l'achèvement du processus de cicatrisation, tout en respectant strictement les règles d'asepsie pour prévenir toute contamination éventuelle. La zone de cicatrisation de la plaie de chaque animal a été évaluée en délimitant les contours de la plaie aux jours 0, 7, 14 et 21 de l'expérimentation. Le taux de fermeture de la plaie a été exprimé en pourcentage de la superficie initiale de la plaie par rapport au premier jour postopératoire, selon la formule suivante basée sur Santos et *al.* (2021) :

$$TCP = \left[\frac{SPi - SPj}{SPi} \right] * 100$$

TCP : Taux de contraction de la plaie.

SPi : Superficie initiale de la plaie.

SPj : Superficie de la plaie à un jour spécifique.

Le périmètre lésionnel a été tracé en utilisant du papier transparent et un marqueur permanent à pointe fine comme décrit par Masson-Meyers et ses collaborateurs [206]. De plus, le logiciel Image J[®] a été utilisé afin d'apporter plus de précision dans le calcul des superficies des plaies [207],[208]. Sachant qu'il est largement utilisé dans les recherches cliniques et qu'il est disponible gratuitement sur le site web des National Institutes of Health (NIH) [206].

5.2.4.7. Paramètres microscopiques d'évaluation des plaies

Une fois que le suivi macroscopique est terminé, une évaluation histologique du déroulement de la cicatrisation (J21) a été effectuée. Après le sacrifice des rats, la lésion et la peau saine environnante ont été prélevées à l'aide de bistouri N° 23. Une fois prélevé, elles sont mises immédiatement dans des pots contenant du formol à 10% pour les fixer.

Les prélèvements de différents groupes sont acheminés vers le laboratoire d'histopathologie de l'institut des Sciences Vétérinaires de Tiaret où la préparation des lames histologiques a été réalisée.

A. Préparation des lames histologiques

Pour l'analyse histologique, la méthode standard employée dans le laboratoire d'histologie de l'Institut des Sciences Vétérinaires de Tiaret a été utilisée, impliquant les étapes suivantes :

➤ Fixation et inclusion

L'objectif de cette étape est de préserver la morphologie cellulaire et tissulaire, en maintenant l'échantillon dans un état aussi proche que possible de l'état *in vivo* tout en renforçant la consistance du tissu. Pour obtenir des pièces de petite taille, les prélèvements initiaux ont été recoupés de manière à inclure le centre et la périphérie de la plaie, ainsi que la peau saine péri-lésionnelle. Ils ont ensuite été placés dans des cassettes histologiques perforées et identifiées avant d'être immergés dans un récipient contenant le fixateur. Ces cassettes ont ensuite été positionnées dans un panier de l'appareil automate de circulation, composé de 12 cuves, facilitant la réalisation des étapes suivantes :

➤ Déshydratation

Les prélèvements ont été déshydratés par des passages successifs à travers des bains d'éthanol de concentrations croissantes (70%, 80%, 95% et 100%), visant à éliminer l'eau présente dans les tissus pour les préparer à l'inclusion.

➤ Clarification

Cette étape vise à éliminer toute trace de déshydratant et à le remplacer par une substance miscible avec la paraffine. Pour ce faire, deux passages dans des bains de xylène ont été effectués.

➤ Inclusion (ou imprégnation)

Il s'agit du dernier passage des cassettes dans l'automate, ayant pour objectif de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Il consiste en une immersion dans deux bains de paraffine fondue chauffée à une température de 56°C.

➤ Enrobage

Cette étape est effectuée à l'aide d'un équipement spécifique appelé station d'enrobage (Figure 5.7), permettant le montage final et le durcissement manuel des blocs. La paraffine chauffée à 56°C est versée dans des moules en acier inoxydable contenant les spécimens correctement orientés. Ensuite, les moules sont déplacés vers une surface de refroidissement, favorisant la solidification définitive du bloc de paraffine, qui sera ensuite démoulé pour être positionné dans le microtome afin de réaliser des coupes fines d'une épaisseur de 5 µm sous forme d'un ruban.



a : Mise en place des cassettes dans l'automate.

b : Mise en place des cassettes dans la station d'inclusion.

c : Utilisation de microtome pour la préparation des rubans.

d : Utilisation de bain marie pour l'étalement des rubans sur les lames.

e : Mise en place des lames dans l'étuve pour une bonne fixation sur les lames.

Figure 5.7 : Etapes de préparation des lames histologiques (photos personnelles).

B. Confection et coloration des lames

Ces rubans sont déposés à la surface de l'eau dans un bain-marie maintenu à une température de 50°C afin de les aplanir et d'éliminer la paraffine. Ensuite, à l'aide d'une lame, les coupes sont retirées du bain puis séchées dans une étuve à une température de 37°C pendant 24 heures.

La coloration standard à l'Hématoxyline-Éosine a été réalisée en suivant plusieurs étapes dans des bacs différents :

- 1^{er} bac : contient du xylène/toluène pendant 2 à 4 minutes avec une agitation occasionnelle dans un but d'enlever la cire (déparaffinage).
- 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} bac : contiennent de l'éthanol à des doses décroissantes (100, 95, 85, 70%) pendant 5 minutes dans chaque bac ; suivi par un lavage à l'eau sous faible débit. L'objectif de cette étape est la réhydratation des tissus.
- 6^{ème} bac : contient de l'Hématoxyline de Harris (un colorant basique) pendant 4 minutes afin de colorer les noyaux ; suivi par un lavage à l'eau sous faible débit.
- 7^{ème} bac : contient un Acide-alcool (HCL 1% dans éthanol 95%) pour un trempage seulement afin d'éliminer l'excès de premier colorant ; suivi par un lavage à l'eau sous faible débit, un lavage à l'ammoniaque et un deuxième lavage à l'eau.
- 8^{ème} bac : contient de l'éosine (un colorant acide) pendant 2 minutes afin de colorer le cytoplasme ; suivi par un lavage à l'eau sous faible débit.
- 9^{ème}, 10^{ème}, 11^{ème} et 12^{ème} bac : contiennent de l'éthanol à des doses croissantes (70, 85, 95 et 100%) ; nettoyer dans du xylène/toluène. L'objectif de cette étape est la déshydratation des tissus.

La dernière étape consiste au montage des lamelles sur les lames afin de fixer et protéger les tissus. Pour ce faire, il suffit de rajouter une goutte de Baume de Canada sur une lamelle et de couvrir la lame par cette lamelle.

Les coupes obtenues ont été examinées au microscope optique et photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique intégré.

C. Lecture de lames

La microscopie et l'analyse histopathologique du processus de cicatrisation des plaies chez les rats ont été effectuées en se conformant aux critères histopathologiques décrits par Vyver Mari Van et *al.*, 2021 [209]. Ces critères comprennent la ré-épithélialisation, l'épaisseur épithéliale, la kératinisation, le tissu de granulation, le remodelage, et la maturation (l'évaluation de la cicatrisation). Des scores de 0 à 3 ont été attribués, comme indiqué dans le tableau 5.1.

Tableau 5.1 : Critères et score de l'analyse histopathologique [209].

Paramètres histopathologiques	Critères	Score attribué
Ré-épithélialisation	Complète	2
	Partielle	1
	Absente	0
Indice de l'épaisseur épithéliale	Normal	2
	Hypertrophie	1
	Hypoplasie	0
Kératinisation	Oui	2
	Non	0
Présence de tissu de granulation	Intact	2
	Epais	1
	Mince	0
Remodelage	Complet	2
	Partiel	1
	Absent	0
Evaluation de la cicatrisation (maturation)	Normal	2
	Hypertrophie	1
	Hypoplasie	0

L'échelle de notation a été établie de manière à attribuer le score le plus bas (0) à une plaie ouverte et non cicatrisée, état évident dans les premiers instants suivant la blessure. À l'inverse, le score maximal (12) correspond à une plaie entièrement refermée et cicatrisée, sans excès de tissu cicatriciel.

5.2.5. Analyses statistiques

Le traitement et l'interprétation statistique des données ont été effectués à l'aide du logiciel SPSS. Les tests statistiques employés ont été choisis en adéquation avec les caractéristiques et la répartition des données collectées.

5.3. Résultats

5.3.1. Partie *in vitro*

5.3.1.1. Effet antibactérien

L'évaluation de l'effet antibactérien de notre préparation à base de miel a été faite en les comparant à la sulfadiazine argentique comme témoin positif et l'eau distillée comme témoin négatif. Le tableau 5.2 montre les différents diamètres des zones d'inhibition (mm) de la croissance bactérienne. Les résultats montrent une différence hautement significative entre l'action inhibitrice de notre gel de miel vis-à-vis la sulfadiazine argentique ($P < 0,001$). En revanche, le témoin négatif n'a montré aucune zone d'inhibition.

Tableau 5.2 : Diamètres des zones d'inhibition contre les différentes souches bactériennes.

Souche bactérienne	Diamètre de la zone d'inhibition (mm) + ET	
	Gel à base de miel	Sulfadiazine Argentique
<i>S. aureus</i>	27,33 ± 0,58	11,67 ± 0,58
<i>E. feacalis</i>	22,33 ± 1,53	10,33 ± 1,53
<i>P. aeruginosa</i>	18,67 ± 1,53	11,00 ± 1,00
<i>E. coli</i>	20,00 ± 1,73	9,33 ± 1,53

5.3.1.2. Effet antioxydant

5.3.1.2.1. Dosage des antioxydants

➤ Dosage des polyphénols totaux

La valeur moyenne du contenu phénolique total de notre gel à base de miel est de $116,57 \pm 1,09$ mg EAG/100g de miel. Ces résultats ont été déduits en utilisant la

courbe d'étalonnage de l'acide gallique dont l'équation standard de la courbe (Figure 5.8) est :

$$y = 0,001 \times [AG] + 0,0317 ; R^2 = 1$$

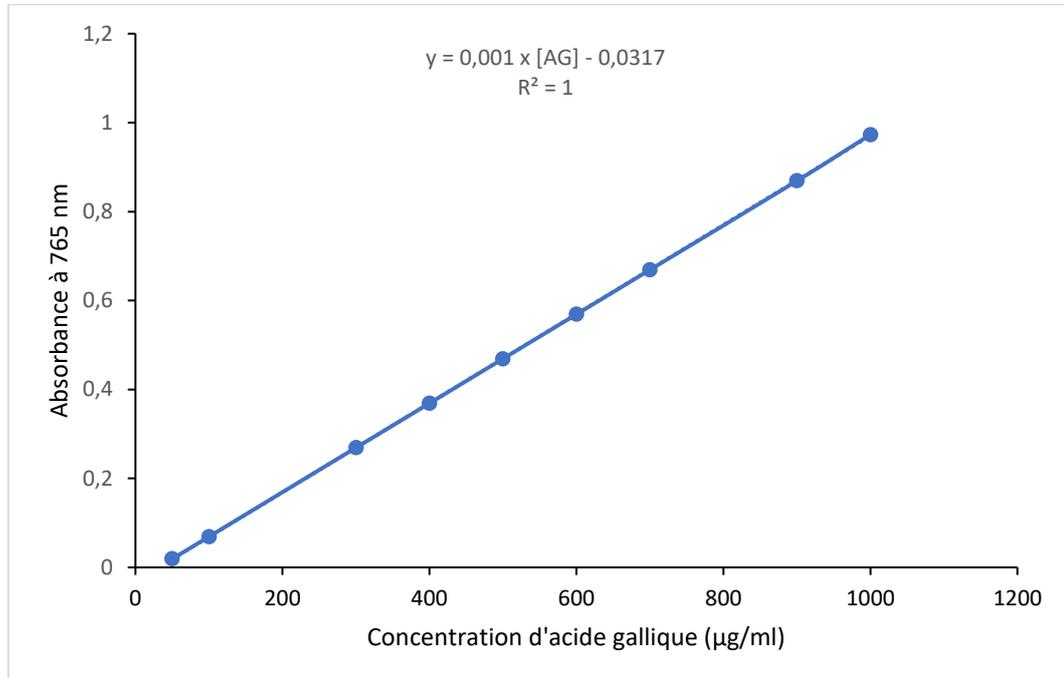


Figure 5.8 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

➤ Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes de notre échantillon était de $29,3 \pm 0,19$ mg EQ/100g de miel. Le résultat a été calculé en se référant à une courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (Figure 5.9). L'équation de la courbe standard de la quercétine est donnée par :

$$y = 0,0381 \times [EQ] - 0,0087 ; R^2 = 0,9983$$

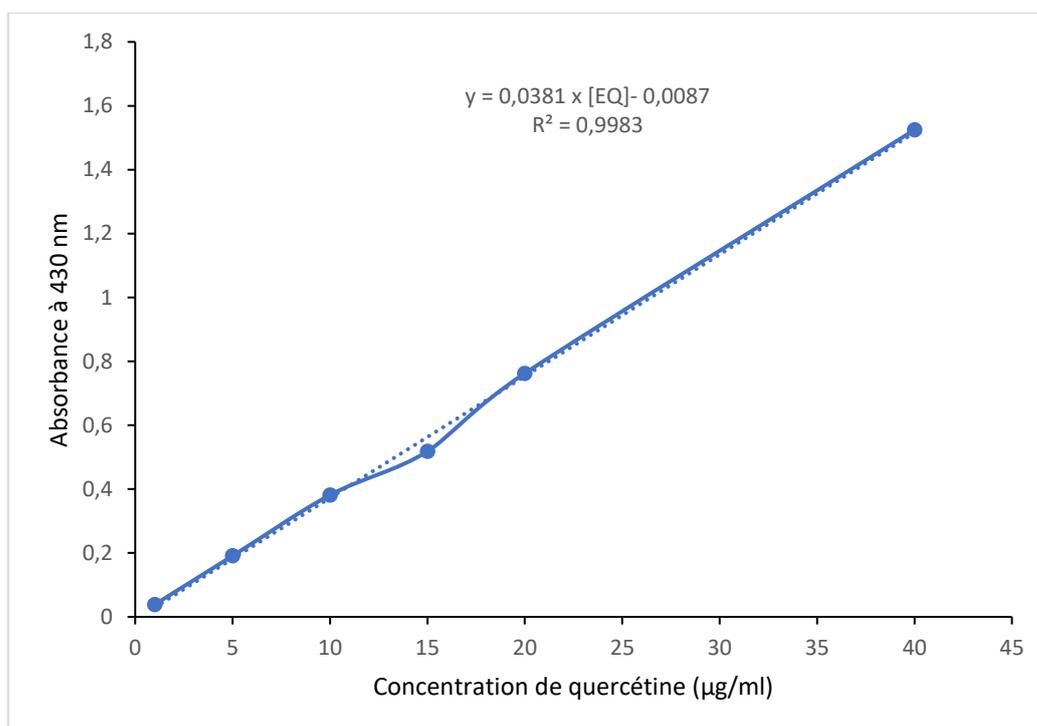


Figure 5.9 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

5.3.1.2.2. Test de DPPH

L'activité antioxydante de notre préparation vis-à-vis du radical libre DPPH a été mesurée par spectrophotométrie. Cette méthode consiste à suivre la diminution de la coloration violette du DPPH, qui devient jaune lorsqu'il est réduit, en mesurant l'absorbance à 517 nm. Les résultats ont montré que l'échantillon possède un pouvoir anti radicalaire de type dose-dépendant, c'est-à-dire que leur capacité à neutraliser les radicaux libres augmente avec la concentration (Tableau 5.3).

Tableau 5.3 : Pourcentages d'inhibition des radicaux libres (%).

Concentrations (µL/mL)	Hydrogel de miel
20	19,10
40	50,50
60	68,60
80	72,26
100	74,42
200	75,58
250	77,74

La Figure 5.10 illustre l'évolution du pourcentage d'inhibition des radicaux libres en fonction de la concentration en miel, allant de 0 à 250 $\mu\text{L/mL}$ en le comparant à ceux des antioxydants de référence : acide ascorbique et BHT. Malgré la diminution significative du radical de DPPH en présence de l'hydrogel de miel, cette activité anti radicalaire demeure légèrement plus faible que celle du BHT et de l'acide ascorbique utilisés comme contrôles positifs.

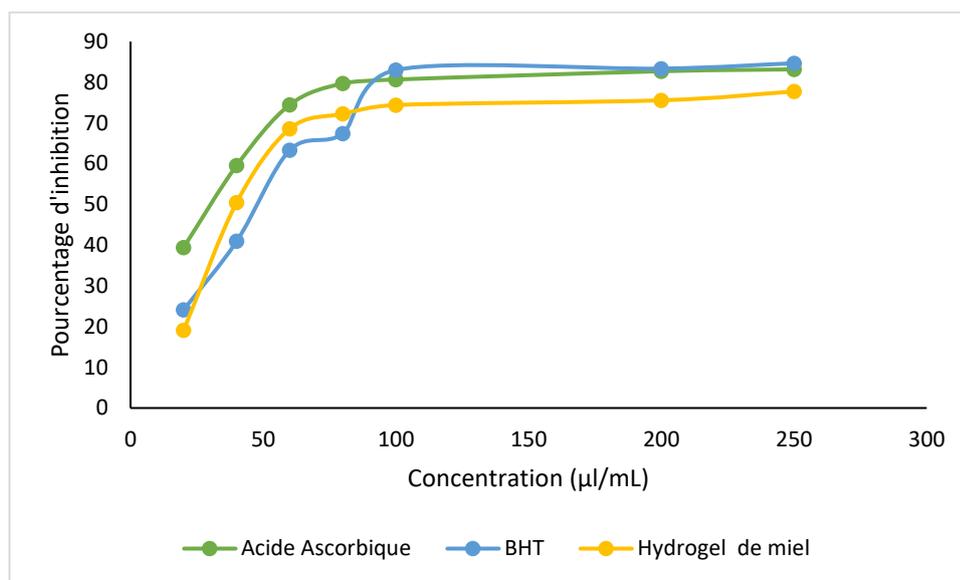


Figure 5.10 : Pourcentage de piégeage des radicaux DPPH par les antioxydants standards (acide ascorbique et BHT) et l'hydrogel de miel.

Afin de comparer les activités antioxydantes, nous avons également calculé le paramètre IC_{50} , sachant qu'une valeur d' IC_{50} plus faible indique une activité antioxydante plus élevée[210]. Le gel de miel a présenté un IC_{50} de 43,18 mg/mL, supérieur à celui de l'acide ascorbique (31,05 mg/mL) mais inférieur à celui du BHT (47,35 mg/mL). Cela signifie que notre préparation de miel possède une activité antioxydante plus élevée que l'antioxydant synthétique BHT et moins importante que l'acide ascorbique. De plus, cette activité antioxydante est considérée comme une forte activité en le comparant aux normes.

5.3.2. Partie *in vivo*

5.3.2.1. Poids des rats

Au début de l'expérimentation, le poids corporel moyen des rats des groupes A, B, et C était de $134,8 \pm 7,2$ g ; $136,8 \pm 10,0$ g ; $139,1 \pm 9,6$ g, respectivement ; c'est-à-dire que les groupes étaient homogènes et congénères.

Une deuxième pesée a été faite après la réalisation des plaies, une baisse légère du poids corporel a été observée dans tous les groupes, probablement dû au stress lié à l'acte chirurgical. Par la suite, ce paramètre est revenu à ces valeurs initiales avec une augmentation progressive du poids moyens de groupes jusqu'à la fin de l'expérimentation.

5.3.2.2. Evaluation des plaies

Aucune complication n'a été constatée pendant l'acte chirurgical que ce soit sur le plan anesthésique, technique ou des mortalités.

A. Expansion des plaies au J1

La superficie des plaies au J1 est plus grande que celles tracée sur le dos de tous les rats utilisés dans notre expérimentation. Cette expansion est de moyenne de $1,32 \pm 0,22$ cm², $1,78 \pm 0,25$ cm² et $1,55 \pm 0,19$ cm² dans les groupes A, B et C respectivement (Figure 5.11). Le test ANOVA a enregistré une différence significative entre les moyennes des superficies de plaies de trois groupes ($p < 0,05$). Cette différence est signalée entre le groupe témoin négatif et le groupe traité par le miel (Test de Turkey HSD) ($p < 0,05$).

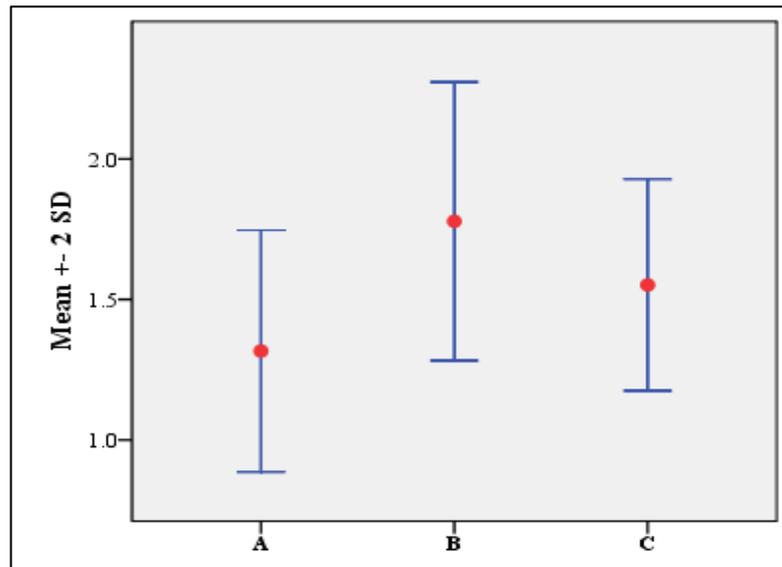


Figure 5.11 : Moyennes et écart type des expansions des plaies au J1.

N= 18, $p < 0, 05$ significative, test ANOVA.

5.3.2.3. Evaluation des plaies à J7

A. Evaluation macroscopique des plaies à J7

Les plaies du groupe A (Témoin) apparaissent avec une croûte sèche, ferme et épaisse. Les sujets de groupe C qui sont traités par la sulfadiazine argentique présentent une croûte qui est moins dure et moins épaisse que la précédente.

Les plaies traitées par notre préparation à base de miel sont recouvertes d'une croûte molle et fine (Figure 5.12). Ainsi aucun signe d'infection n'a été détecté.

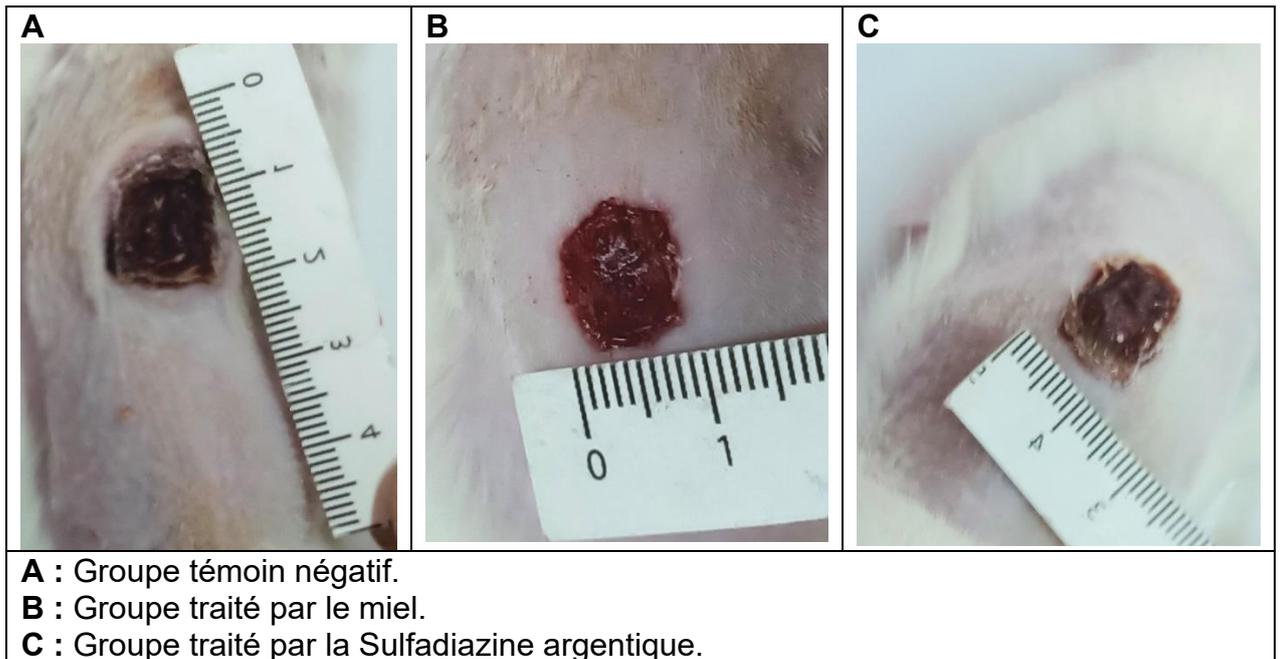


Figure 5.12 : Aspect macroscopique des plaies au J7 (photos personnelles).

B. Evaluation planimétrique des plaies à J7

Le graphique présenté dans la figure 5.13 illustre la comparaison du taux de contraction entre les plaies non traitées, les plaies traitées avec la sulfadiazine argentique et celles traitées avec la préparation de miel chez les rats après une période de suivi de sept jours.

Les résultats ont montré que le pourcentage de contraction était plus important chez les sujets traités par la sulfadiazine argentique (43,61%) suivis par ceux traités par la préparation à base de miel (43,49%) et ceux de groupe témoin négatif (24,84%). L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative ($p > 0,05$) entre les pourcentages de contraction observés dans les différents groupes.

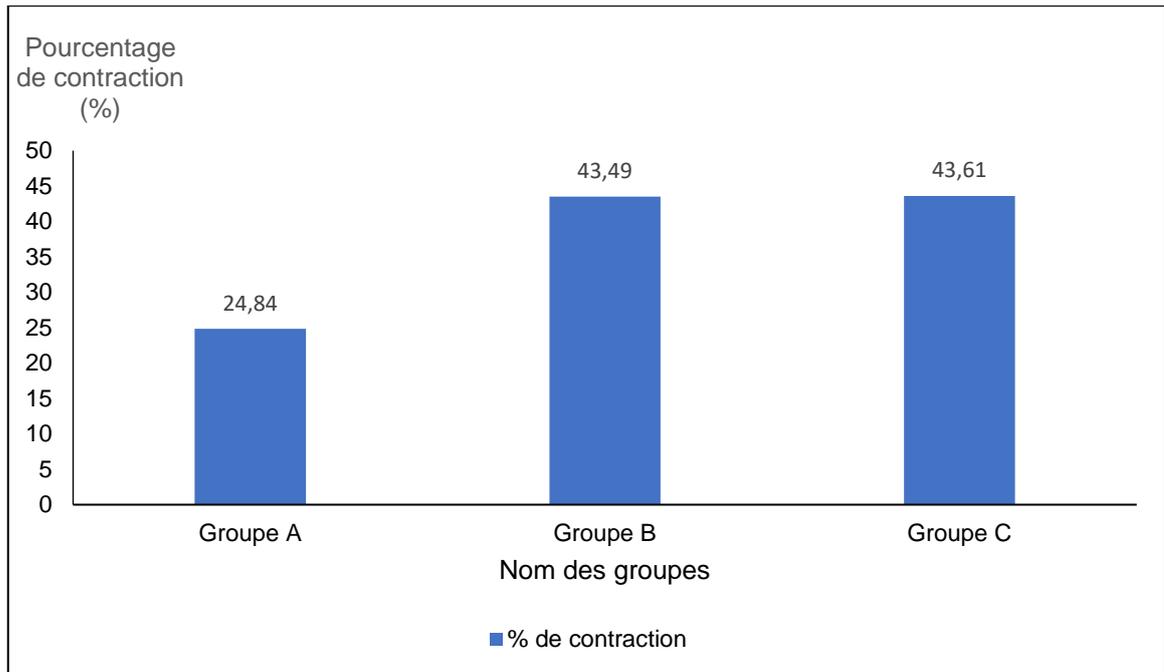


Figure 5.13 : Pourcentage de contraction des plaies au J7.

5.3.2.4. Evaluation des plaies à J14

A. Evaluation macroscopique des plaies à J14

Les observations macroscopiques indiquent une diminution de la taille de toutes les plaies, avec des variations entre les sujets du même groupe et entre les groupes, attribuables au processus de contraction. Ces variations seront quantifiées en pourcentage lors de l'évaluation planimétrique. De plus, on observe un détachement des croûtes, l'émergence d'un tissu de granulation rougeâtre comblant la perte de substance, et la formation d'un liséré rosâtre aux marges des plaies, signe d'épithélialisation.

À ce stade du suivi, aucune manifestation d'infection n'est décelée dans les plaies des trois groupes. Il est important de noter que la cicatrisation n'est pas complètement achevée pour toutes les plaies au cours de cette phase de suivi.

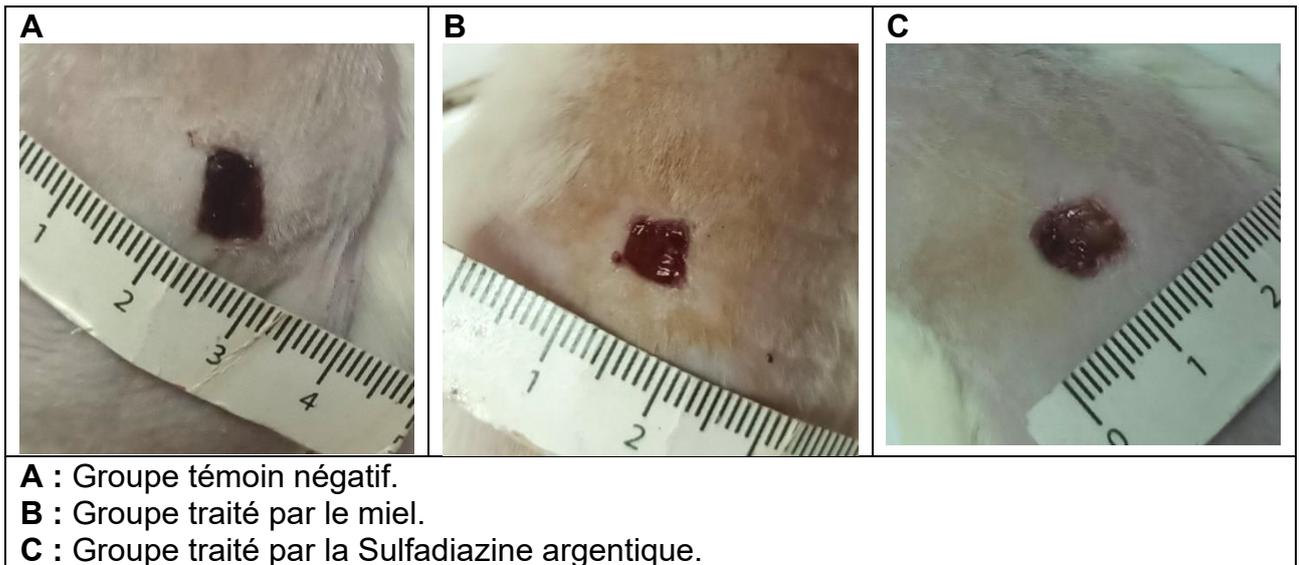


Figure 5.14 : Aspect macroscopique des plaies au J14 (photos personnelles).

B. Evaluation planimétrique des plaies à J14

Les résultats planimétriques ont rapporté que le pourcentage de contraction des plaies traitées avec le gel à base de miel (82,38%) est supérieur à celui des plaies témoins (69,92%) et des plaies traitées à la sulfadiazine argentique (82,19%) (Figure 5.15). L'analyse statistique indique une différence significative ($p < 0,05$) entre les sujets des groupes traités (par la formulation de miel et la sulfadiazine argentique) et les sujets de groupes témoins négatifs. Cependant aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été signalée entre le groupe de miel et le groupe de sulfadiazine argentique.

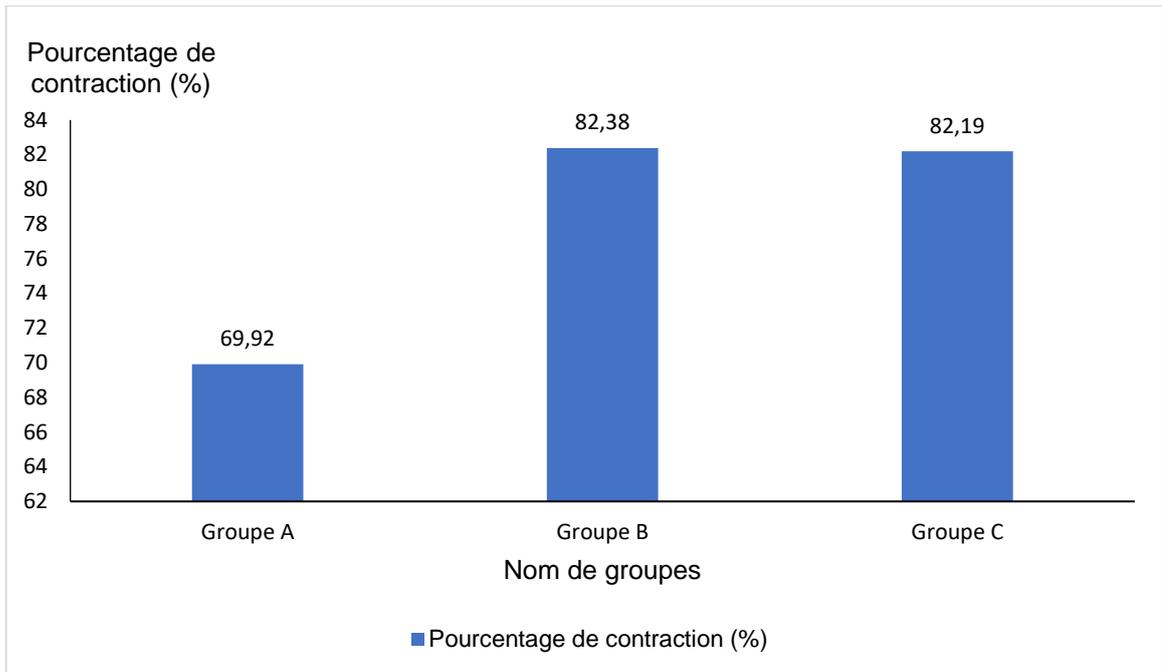


Figure 5.15 : Pourcentage de contraction des plaies au J14.

5.3.2.5. Evaluation des plaies à J21

A. Evaluation macroscopique des plaies à J21

Après une période de suivi de 21 jours, plusieurs sujets dans les trois groupes ont présenté une cicatrisation complète, tandis que certains sujets gardent des petites zones centrales de tissu de granulation non épithélialisée. Ces zones ont des tailles plus importantes dans les sujets de groupe témoins en comparant avec ceux traités avec la sulfadiazine argentique et la préparation de miel. Ces éléments indiquent que ces plaies ne sont pas entièrement cicatrisées, comme illustré dans la figure 5.16.

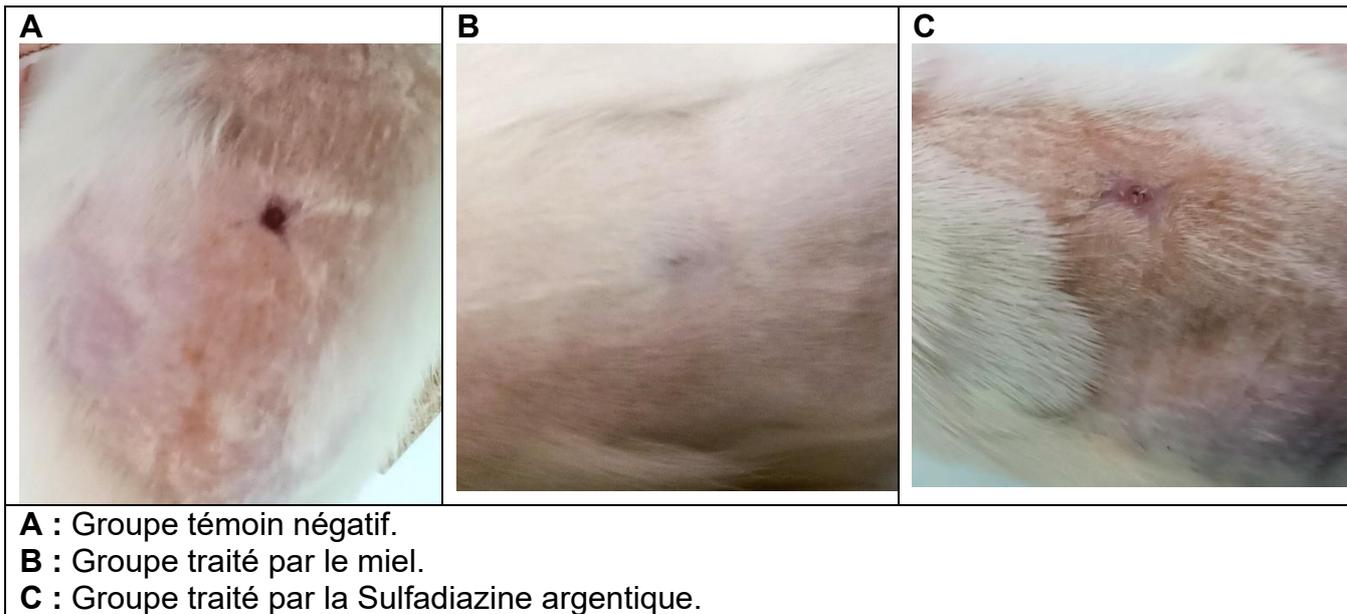


Figure 5.16 : Aspect macroscopique des plaies au J21 (photos personnelles).

B. Evaluation planimétrique des plaies à J21

Au J21, les performances de cicatrisation des sujets traités avec notre préparation (88,75%) surpassent celles des groupes témoins (82,46%) ainsi que celles traitées avec la sulfadiazine argentique (88,01%) (Figure 5.15). L'analyse statistique révèle une différence significative ($p < 0,05$) entre les plaies traitées (avec la formulation de miel et la sulfadiazine argentique) et celles de groupes témoin. Cependant, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée entre les sujets traités avec la préparation miel et ceux traités avec de la sulfadiazine argentique.

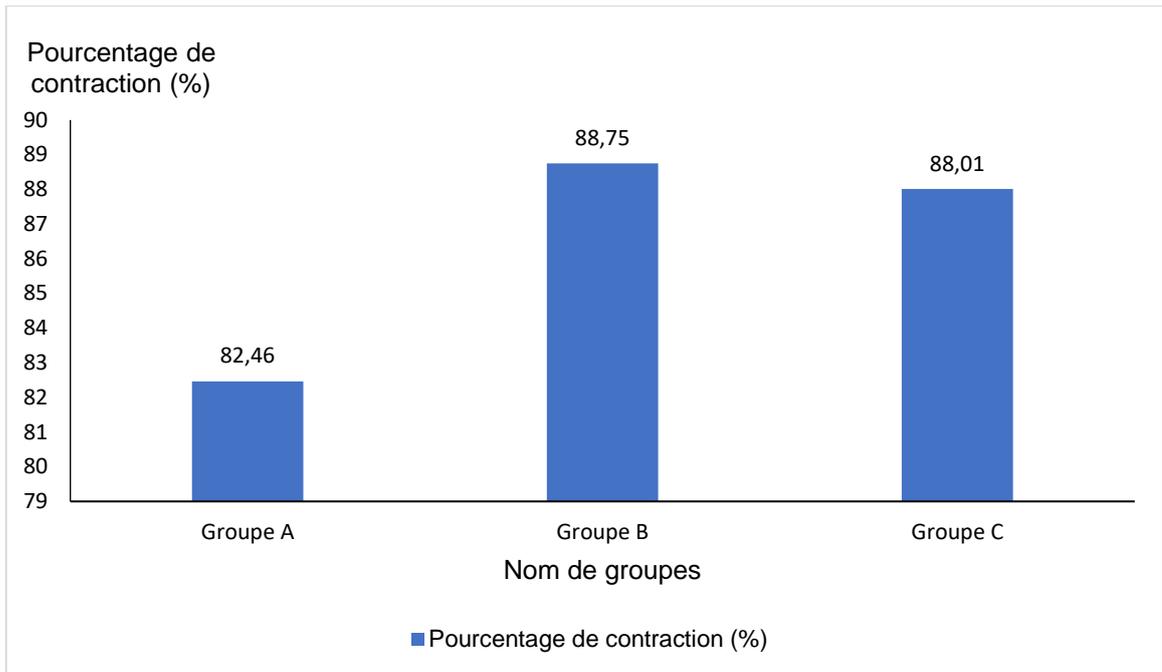


Figure 5.17 : Pourcentage de contraction des plaies à J21.

5.3.2.7. Evaluation microscopique des plaies

L'évaluation histopathologique des plaies dans les divers groupes repose sur les critères suivants : la ré-épithélialisation, l'indice d'épaisseur épithéliale, la kératinisation, la présence de tissu de granulation, le remodelage, et en dernier le degré d'évaluation de la cicatrisation (la maturation). Les moyennes des scores attribués à ces paramètres en fonction du temps sont présentées dans le tableau 5.4.

Tableau 5.4 : Moyennes des scores des paramètres d'évaluation histopathologiques des plaies

	Moyennes des scores par groupe	Groupe A	Groupe B	Groupe C
Paramètres histologiques (Moyenne \pm écart type)	Ré-épithélialisation	1,33	1,83	1,67
	Indice d'épaisseur épithéliale	0,50	1,33	1,00
	Kératinisation	0,67	1,67	1,33
	Présence de tissu de granulation	1,00	1,25	1,17
	Remodelage	0,50	1,00	0,83
	Degré d'évaluation de la cicatrisation	0,42	1,33	1,33
	Total	4,42	8,42	7,33

Groupe A : Témoin.

Groupe B : Traité par le gel à base de miel.

Groupe C : Traité par la sulfadiazine argentique.

Le jour de sacrifice (le J21), l'évaluation histopathologique des prélèvements de peau a révélé une régénération épithéliale complète au niveau des plaies traitées avec le gel à base de miel, présentant un degré de différenciation épidermique bien défini chez la plupart des sujets (5/6) avec un score de 1,83 et chez 4/6 sujets traités par la sulfadiazine argentique.

Cette ré-épithélialisation est considérée complète et évidente lorsque le tissu épithélial nouvellement formé couvrait 95 % à 100 % de la zone cicatrisée. Pour l'épaisseur épithéliale, l'observation a montré qu'il a repris son état initial chez la moitié de rats (3/6) et une hypertrophie a été constatée chez deux sujets pour le lot de miel.

Pour le lot de sulfadiazine argentique, il y avait deux sujets qui ont repris l'épaisseur initiale. Tandis que deux sujets ont présentés une hypertrophie et deux autres avec une hypoplasie de cette épaisseur. L'indice de l'épaisseur épithélial est utilisé comme un indicateur de maturation épithéliale dans la zone concernée par la blessure.

En revanche, la ré-épithélialisation était incomplète chez plus de la moitié de rats témoins (4/6). Cependant, aucun sujet n'a repris l'épaisseur épithéliale initiale ; trois sujets ont eu une hypertrophie et les trois autres ont présenté une hypoplasie de l'épaisseur épithéliale qui est associée à une ré-épithélialisation incomplète.

Concernant la kératinisation, elle est observée sous forme de couches de kératine détachées ou perdues, ou sous forme d'une couche cornée parakératosique épaisse à la surface superficielle au-dessus de l'épiderme. Pour le lot traité par notre préparation, la kératinisation était présente pour 5/6 sujets. Elle était chez quatre sujets pour le groupe traité par la sulfadiazine argentique et uniquement chez deux sujets pour le groupe témoin.

Parallèlement, les résultats de l'évaluation du tissu de granulation ont été plus positifs chez les sujets traités au miel. Dans ces derniers, une infiltration de tissu de granulation mature et peu vascularisé a révélé des couches dermiques intactes, indiquant une bonne cicatrisation. En revanche, pour les sujets des autres

groupes, ils ont présenté un tissu de granulation (riche en fibroblastes et cellules inflammatoires et pauvres en vaisseaux sanguins et fibres de collagènes) indiquant une cicatrisation inachevée.

Le remodelage est un paramètre semi-quantitatif basé sur une inspection visuelle. Plusieurs sujets dans les différents groupes ont présenté un remodelage partiel qui se figure sous forme d'une déposition de collagène et/ou de tissu adipeux blanc. Dans certains cas, il y a eu une observation de quelques annexes cutanées.

En ce qui concerne le score de cicatrisation global, le groupe ayant reçu le traitement à base de miel (8,42/12) a obtenu les résultats les plus élevés par rapport aux autres groupes (7,33/12) pour ceux traités par la sulfadiazine argentique et (4,42/12) pour le lot témoin.

D'un point de vue statistique, une différence significative a été enregistrée entre le score totale obtenu dans les trois groupes ($P < 0,05$). Cependant, aucune différence significative n'a été constaté entre les différents paramètres histologiques étudiés des sujets traités par la préparation de miel ou la sulfadiazine argentique ($P > 0,05$).

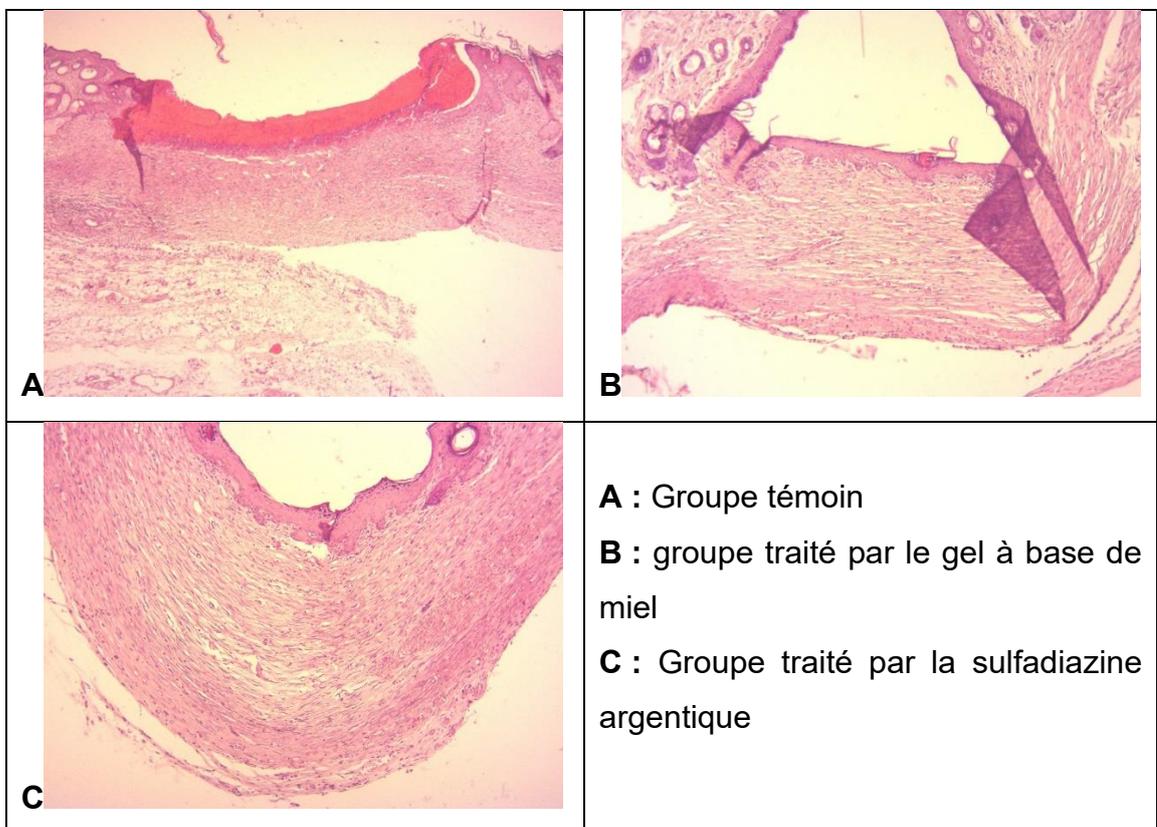


Figure 5.18 : Coupes histologiques des plaies au J21 (photos personnelles).

5.4. Discussion

La cicatrisation des plaies comporte plusieurs phases qui pourraient être perturbée par plusieurs paramètres. Parmi les quelles, il y a les infections des plaies qui entrave le processus de guérison. Ces infections sont causées par plusieurs agents bactériens qui nécessite une prise en charge pour lutter contre ces bactéries ; à savoir des antibiotiques. Cependant, au cours des dernières années une émergence importante de l'antibiorésistance a été signalé à l'échelle mondiale ce qui a alarmé le staff de la santé publique. Pour cette raison, plusieurs chercheurs ont mené des études afin de trouver des solutions alternatives ; comme de la phytothérapie ou l'apithérapie. Pour l'utilisation des produits de la ruche, plusieurs études ont mis en évidence les effets bénéfiques de ces produits *in vitro* et *in vivo*.

Il existe plusieurs traitements alternatifs qui ont été testés pour leur pouvoir cicatrisant. Dans notre étude, nous avons opté pour une formulation à base de miel en raison de ses nombreux bienfaits pour la cicatrisation tissulaire. Cette propriété curative est favorisée par le fort pouvoir de diffusion du miel au niveau tissulaire, ce qui stimule et accélère les processus de réparation et de régénération cellulaire [211],[212]. Les composants actifs de miel peuvent ainsi être acheminés directement aux zones endommagées et y exercer pleinement leurs effets bénéfiques, notamment antibactériens, anti-inflammatoires et pro-cicatrisants [213].

L'évaluation de l'effet antibactérien *in vitro* a révélé que notre produit possède une activité inhibitrice importante contre les différentes souches bactériennes testées. Les zones d'inhibition moyennes (en mm) ont été de $27,33 \pm 0,58$ pour *S. aureus*, $22,33 \pm 1,53$ pour *E. faecalis*, $20,00 \pm 1,73$ pour *E. coli* et $18,67 \pm 1,53$ pour *P. aeruginosa*.

Nos résultats indiquent une plus grande sensibilité des bactéries à Gram positif face à l'activité antibactérienne de notre gel à base de miel, en comparaison aux bactéries à Gram négatif. Cette observation est corroborée par de nombreuses études antérieures ayant évalué l'efficacité antimicrobienne de différents types de miels [214], [215]. Cette constatation pourrait être expliquée par la structure de la paroi cellulaire des Gram positif, principalement composée de peptidoglycanes, qui est plus perméable aux composés antibactériens présents dans le miel comme le peroxyde d'hydrogène, les défensines et les composés phénoliques [216], [217]. A

l'inverse, la membrane externe des Gram négatif constitue une barrière plus efficace limitant la diffusion de ces agents antimicrobiens [218].

Ce pouvoir antibactérien pourrait être attribué aux propriétés physico-chimiques du miel, telles que son pH acide (généralement entre 3,2 et 4,5) [136], sa haute pression osmotique due à sa teneur élevée en sucres [138], ainsi qu'à la présence d'autres composants naturels possédant une activité antibactérienne, tels que le peroxyde d'hydrogène, le méthylglyoxal, la défensine-1 et les flavonoïdes [213], [219]. L'inhibine, le glucose oxydase et d'autres enzymes antimicrobiennes pourraient également contribuer à cette activité [217], [137].

De nombreuses recherches ont été consacrées à l'évaluation des propriétés antibactériennes du miel *in vitro*, que ce soit en Algérie ou dans d'autres régions du monde. En ce qui concerne le miel d'euphorbe spécifiquement, une étude réalisée par Hamdi et *al.* en 2020 a révélé une activité inhibitrice moins importante avec des zones d'inhibition de $23,10 \pm 4,60$ mm contre *S. aureus* et de $22,95 \pm 4,76$ mm contre *E. coli*, en testant un gel à base de miel additionné d'autres produits apicoles [197]. Des résultats similaires ont été obtenus par Haderbache et *al.* en 2013, avec des zones d'inhibition respectives de $21,4 \pm 5,6$ mm et $20,5 \pm 6,0$ mm pour *S. aureus* et *E. coli*. Par ailleurs, les travaux d'Ait Abderrahim et *al.* (2019) ont mis en évidence les propriétés antibactériennes du miel d'euphorbe, aussi bien utilisé seul qu'en synergie avec l'ail.

Dans une étude publiée en 2021 par Aljaghwan et *al.*, différents types de miels provenant de zones géographiques et de sources botaniques variées ont été comparés pour leur activité antibactérienne contre plusieurs souches bactériennes de référence (trois bactéries Gram positif : *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 et MRSA ATCC 43300. Et trois souches Gram négatif : *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, et *P. aeruginosa* ATCC 27853). Parmi les miels testés, le miel de manuka du néo-zélandais qui s'est révélé plus efficace pour inhiber la croissance bactérienne que les miels de talha et le miel de toutes fleurs de l'Arabie saoudite [215]. Cependant, les résultats de notre étude ont révélé que notre préparation à base de miel démontre une activité antibactérienne encore plus puissante que tous les miels testés dans l'étude d'Aljaghwan et *al.* (2021). Ceci pourrait être lié à la présence d'amidon dans notre formulation, qui selon Haralampu

(2000), peut créer une barrière physique contre les agents oxydants externes, protégeant ainsi les composés antioxydants du miel de la dégradation [220].

Nos résultats ont montré une différence hautement significative ($P > 0,01$) entre l'activité antibactérienne de la sulfadiazine argentine, utilisé comme témoin positif, et notre gel à base de miel d'euphorbe. Ce dernier s'est révélé nettement plus efficace pour inhiber la croissance bactérienne. Ces résultats corroborent avec ceux rapportés par Hamdi et al (2020) [197]. De plus, une méta-analyse de Rojas et al. (2017) a rapporté des taux de résistance à la sulfadiazine allant jusqu'à 40% chez certaines souches d'*E. coli*.

Dans cette étude, l'activité antioxydante a été déterminée en mesurant l'activité anti-radicalaire DPPH. La valeur d'IC₅₀ est un paramètre important utilisé pour quantifier l'activité antioxydante dans le test DPPH. Elle correspond à la concentration d'un composé nécessaire pour inhiber 50% du radical DPPH présent [221]. Le IC₅₀ de notre gel à base de miel était de 43,18 mg/mL. Plus cette valeur est faible, plus l'activité antioxydante de l'échantillon est élevée [222]. Dans une étude marocaine, Bouyahya et al. (2017) ont rapporté des valeurs d'IC₅₀ comprises entre 48,15 µg/mL et 94,35 µg/mL pour différents miels locaux testés [223]. La valeur d'IC₅₀ inférieure de notre gel par rapport à cette plage indique que notre formulation à base de miel possède une activité antioxydante plus importante que les miels évalués dans leur étude. Son activité antiradicalaire élevée pourrait être attribuée à la teneur élevée en composés phénoliques ($116,57 \pm 1,09$ mg EAG/100g), car le potentiel antioxydant du miel est généralement proportionnel à sa concentration en polyphénols [224],[225]. Les propriétés antioxydantes et composés phénoliques du miel varient considérablement selon les sources végétales et les espèces florales butinées par les abeilles. De même que pour les polyphénols totaux, il existe une forte relation entre le taux de flavonoïdes et le test de DPPH (%) [226].

Dans la partie *in vivo*, les rats ont été choisis comme des animaux modèles afin d'évaluer l'effet cicatrisant de notre formulation alternative. La sélection des rats comme modèle animal pour cette expérience pourrait être expliquée par le fait que ces animaux offrent un modèle idéal pour étudier la cicatrisation des plaies cutanées en permettant la standardisation du type, de la taille, de la forme et de la profondeur

des lésions. De même, ce choix des rats comme modèle pour les plaies cutanées s'explique par sa disponibilité, son coût faible et sa taille réduite, favorisant ainsi une utilisation efficace de l'espace et une meilleure gestion des installations d'hébergement [227],[228],[229].

Le test de la toxicité cutanée n'a révélé aucun signe clinique. Ce test permet d'évaluer si la formulation provoque des réactions cutanées indésirables comme des allergies ou des inflammations lorsqu'elle est appliquée sur la peau. Même si le miel est généralement considéré comme sûr, d'autres ingrédients ou la formulation finale peuvent entraîner des effets indésirables. De même, Ces tests font partie du processus d'évaluation de l'innocuité requis pour une éventuelle commercialisation du produit. Les tests de toxicité cutanée chez les animaux fournissent aussi des informations précieuses sur l'innocuité et la tolérance cutanée d'un produit avant les essais cliniques chez l'humain [230].

Les résultats ont montré qu'au cours de l'expérimentation, une baisse légère du poids corporel a été observée dans tous les groupes des rats. Cette baisse de poids est un phénomène courant chez les rongeurs après une procédure chirurgicale, probablement causée par le stress et la douleur associés à l'intervention, ainsi que par une diminution temporaire de la prise alimentaire. Ce phénomène est considéré comme une réponse normale au stress chirurgical et devrait être anticipé [231].

La superficie initiale des plaies était prévue à 1cm². Cependant, les mesures des dimensions des plaies au J1 étaient supérieures à la taille initialement estimée pour tous les groupes de rats. La même constatation a été noté par Galiano et al en 2004, ceci pourrait être expliqué par l'élasticité de la peau et de la rétraction des berges de la plaie après l'incision [232].

Dans le groupe témoin négatif, où les plaies n'ont pas reçu de traitement, les taux de contraction des plaies étaient nettement inférieurs à ceux observés dans les groupes traités. Ces résultats suggèrent que la prise en charge adéquate des plaies, qu'elle soit conventionnelle ou avec notre formulation à base de miel, est cruciale pour accélérer le processus de cicatrisation.

Les résultats obtenus montrent des taux de contraction des plaies similaires entre le groupe traité avec notre formulation à base de miel et celui traité avec la sulfadiazine argentique, un agent chimique conventionnel. Cependant, une différence a été constatée concernant la repousse des poils, qui était beaucoup plus abondante dans le groupe traité avec la formulation à base de miel.

D'autre part, la repousse abondante des poils observée dans le groupe traité avec la formulation à base de miel est une preuve tangible que non seulement la cicatrisation de la plaie en surface a été efficace, mais aussi que les annexes cutanées, telles que les follicules pileux, ont été régénérées de manière optimale. Des résultats similaires ont été reportés par Wang et al 2012 [233] qui ont utilisé un hydrogel contenant de miel et d'autres composants sur des plaies de brûlure. Leurs résultats ont montré une meilleure prolifération des follicules pileux comparativement au groupe témoin. Les travaux menés par El-Kased et son équipe (2017) ont mis en évidence les bienfaits d'un hydrogel à base de miel sur la régénération des structures annexes de la peau, notamment les follicules pileux. Cet effet régénérateur du miel pourrait être attribué à ses propriétés anti-inflammatoires, antibactériennes et pro-angiogéniques, qui créent un environnement propice à une régénération tissulaire complète, y compris les structures spécialisées de la peau [11].

D'autre part, les résultats similaires des taux de contraction suggèrent que notre formulation naturelle pourrait être utilisée comme une alternative sûre et efficace au traitement chimique. L'utilisation d'un produit naturel comme le miel présente plusieurs avantages notables. Tout d'abord, il est généralement bien toléré, avec très peu d'effets secondaires signalés, contrairement à de nombreux produits pharmaceutiques synthétiques [18]. De plus, Il était bien démontré que le miel inhibe une large gamme de bactéries, et est tout aussi efficace contre les bactéries sensibles aux antibiotiques que contre celles qui y sont résistantes, réduisant ainsi le risque d'émergence de résistances [234],[235],[236].

Lors de l'observation microscopique, le groupe traité avec du miel a obtenu la meilleure note concernant la ré-épithélialisation (1,83/2). De nombreuses études ont mis en évidence que le miel favorise ce processus de régénération de l'épithélium, ainsi que l'angiogenèse. Il stimule également la prolifération des

cellules de la peau et du système immunitaire, contribuant ainsi à la cicatrisation des plaies [211],[212]. Cet épithélium a repris son épaisseur initiale chez la moitié de sujets traités par la formulation de miel et il est hypotrophique chez uniquement un seul sujet. Ceci est un indicateur d'une bonne maturation épidermique [209].

5.5. Conclusion

L'étude expérimentale, nous a permis de révéler une activité antibactérienne très importante de gel à base de miel vis-à-vis les souches de référence testées. De plus, le gel préparé a eu une bonne activité antioxydante *in vitro*, proche de celle d'antioxydants de synthèse (BHT) et naturel (acide ascorbique) avec une teneur élevée en polyphénols totaux.

Au cours de l'étude *in vivo* sur les rats, le taux de cicatrisation des plaies était plus important chez les sujets de groupes traités par rapport au groupe témoin négatif. L'évaluation microscopique, basée sur des paramètres histopathologiques, indique que le groupe traité avec le gel à base de miel a obtenu le score total le plus élevé, suivi du groupe traité avec la sulfadiazine argentique, tandis que le groupe ayant reçu uniquement de l'eau distillée a obtenu le score le plus faible.

CONCLUSION GENERALE

La présente thèse s'est intéressée aux bactéries responsables des infections des plaies et leur résistance aux antibiotiques. De plus, elle s'est intéressée également à l'effet antibactérien et antioxydant de miel ainsi que son effet cicatrisant sur des plaies chez des animaux modèles.

Cette étude a révélé que les bactéries Gram positif sont les plus fréquentes, avec une prédominance des staphylocoques à coagulase négatif, suivis par ***Staphylococcus aureus*** et ***Streptococcus spp.*** Notamment, près d'un tiers des isolats de ***S. aureus*** étaient résistants à la méthicilline. En matière d'antibiorésistance, les résultats ont montré une forte résistance des bactéries Gram négatif aux pénicillines, suivie par les céphalosporines. Cependant, cette catégorie de bactéries a démontré une sensibilité élevée à l'amikacine et à l'imipénème. Pour les bactéries Gram positif, la vancomycine s'est révélée être l'antibiotique le plus efficace. De plus, les bactéries multirésistantes représentent un tiers des bactéries isolées, avec une prédominance des bactéries Gram négatif.

Tous ces résultats nous interpellent sur la diversité des espèces bactériennes impliquées dans les infections des plaies et sur l'émergence de l'antibiorésistance à l'égard des différentes classes d'antibiotiques au sein de notre population.

Notre gel à base de miel a montré une très bonne activité antibactérienne en le comparant à la sulfadiazine argentique. En outre, il présente des fortes propriétés antioxydantes, bien qu'il soit légèrement moins puissant que l'acide ascorbique et le BHT.

Par ailleurs, l'étude sur l'effet cicatrisant de notre préparation sur les rats a révélé que, d'un point de vue planimétrique, le taux de contraction des plaies ne montrait aucune différence significative entre les sujets traités par le gel à base de miel et ceux traités par la sulfadiazine argentique, contrairement au groupe témoin. Cependant, sur le plan histopathologique, notre préparation a obtenu le meilleur

score comparativement aux autres groupes, indiquant une supériorité potentielle en termes de qualité de cicatrisation.

Bien que notre préparation et le traitement conventionnel présentent une efficacité cicatrisante presque similaire, notre produit se distingue par sa composition entièrement naturelle, exempte de substances chimiques synthétiques. De plus, en capitalisant sur les résultats obtenus *in vitro*, notamment en termes d'activité antibactérienne, nous envisageons d'étendre nos essais cliniques aux plaies infectées.

Ces résultats prometteurs obtenus avec le gel à base de miel motivent la réalisation d'une caractérisation approfondie du produit, en vue de mener des essais à plus grande échelle.

RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

À la lumière des résultats de cette étude, qui a mis en évidence les principales espèces bactériennes isolées sur des plaies infectées, l'importance de l'antibiorésistance et les effets potentiels du miel sur le processus de cicatrisation, nous souhaitons proposer quelques recommandations et perspectives de recherche.

Nous citons les recommandations suivantes :

- Mettre en place un protocole de surveillance efficace afin de lutter contre l'émergence de l'antibiorésistance.
- Sensibiliser notre population sur l'utilisation prudente et rationnelles des antibiotiques et sur le risque de l'automédication.
- Sensibiliser le staff médical et les patients sur l'importance de l'hygiène pour limiter la fréquence des infections des plaies notamment les infections nosocomiales.
- Renforcer les pratiques et la réalisation de l'antibiogramme avant la prescription des antibiotiques.
- Contrôler l'utilisation des antibiotiques à usage hospitalier afin d'éviter l'émergence de résistance contre ces derniers.
- Encourager l'utilisation de miel médicalisé, en insistant sur l'importance de suivre les instructions médicales et sur la manière correcte de l'appliquer.
- Développer et standardiser des protocoles d'application du miel pour les différents types de plaies.
- Mettre en place des systèmes de suivi et d'évaluation pour les patients traités avec du miel, afin de recueillir des données sur l'efficacité et les éventuels effets secondaires.

Pour les perspectives, nous citons les suivants :

- Mener des études longitudinales pour suivre l'évolution des profils de résistance aux antibiotiques.
- Encourager la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques.
- Investir dans la recherche des méthodes d'identification bactérienne et réalisation d'antibiogramme rapides et économiques.
- Réaliser des études épidémiologiques pour identifier les facteurs de risque associés aux infections des plaies.
- Réaliser des études génomiques sur les facteurs de virulence et de résistance des bactéries.
- Développer de nouveaux produits de soin des plaies à base de miel, comme des pansements imprégnés de miel, des crèmes ou des gels, pour faciliter son utilisation clinique.
- Explorer les mécanismes biologiques par lesquels le miel favorise la cicatrisation des plaies.
- Mener des études cliniques randomisées à grande échelle pour évaluer l'efficacité comparative du miel par rapport aux traitements conventionnels pour différents types de plaies.

APPENDICE A

Liste des symboles et des abréviations

°C : Degré Celsius.

ANOVA : Analysis of Variance.

ATCC : American Type Culture Collection.

BHIB : Brain Heart Infusion Broth.

BLSE : β -lactamases à spectre élargi.

BMR : Bactéries multirésistantes.

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute.

CoNS : Staphylocoques à coagulase négative.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

E. coli : *Escherichia coli*.

E. faecalis : *Enterococcus faecalis*.

EAG : Equivalent d'acide gallique.

EPH : Etablissement Public Hospitalier.

EQ : Equivalent de quercétine.

HMF : Hydroxyméthylfurfural.

HPLC : High-performance liquid chromatography.

IC₅₀ : Inhibitor Concentration 50%.

K. pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*.

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

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*.

pH : Potentiel Hydrogène.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

TFA : acide trifluoroacétique.

TSI : Triple Sugar Iron.

UFC : Unité formant colonie.

APPENDICE B

Matériel et appareillage utilisé

1. Matériel utilisé

- Gants
- Seringues
- Écouvillons
- Pipettes Pasteur stériles
- Lames et lamelles
- Boîtes pétri stériles (90mm)
- Cryotubes
- Tubes à essai
- Jarre d'incubation
- Anse de platine
- Portoir
- Spectromètre de masse (Biomérieux, Firenze, Italy).
- Plaque cible métallique
- Bistouris
- Flacons stériles
- Formole

2. Milieux de culture

- Bouillon BHIB
- Gélose Chapman

- Gélose Hekteon
- Gélose au sang
- Gélose Muller Hinton
- Milieu urée-Tryptophane (urée-indole)

3. Réactifs et solutions

- Eau physiologique stérile
- Eau distillée
- Eau oxygénée à 10 volumes
- Glycérol
- Violet de gentiane
- Lugol
- Éthanol
- Fuscine basique
- Huile à immersion
- Réactif de Kovacs
- Réactif de TDA
- Réactifs de Voges-Proskauer (VP I et VP II)
- Disques pour la recherche d'oxydase
- Eau oxygénée à 10 volumes.
- TFA (Acide Trifluoroacétique)
- Réactif de Folin
- Bicarbonate de sodium à 7,5% (Na_2CO_3)
- Acide gallique
- Chlorure d'aluminium à 2% (AlCl_3)
- Quercétine

- 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- BHT (Butylated Hydroxytoluen)
- Acide ascorbique

4. Appareillage utilisé

- Microscope optique
- Bec bunsen
- Étuve réglable
- Bain marie
- Stérilisateur
- Réfrigérateur
- Spectromètre
- Spectromètre de masse (Biomérieux, Firenze, Italy)

APPENDICE C

Attestation d'acquisition d'animaux de laboratoire

وزارة الصحة و السكان و إصلاح المستشفيات
Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière

INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

معهد باستور بالجزائر

Département animalerie
Laboratoire des petits animaux de laboratoire

Alger le **18 MAI 2021**

Attestation d'acquisition d'animaux de laboratoire

Le service des animaux de laboratoire de l'Institut Pasteur D'Algérie (IPA) atteste par la présente que Mr/Mme Aïza Asma de la wilaya de Bordj s'est porté acquéreur d'animaux de laboratoire de type Rat wistar au nombre de 308, et à statut **Holoxénique** ces animaux proviennent d'un élevage de **type conventionnel** et ne présentent aucun signe clinique de pathologies au moment de leurs mises à disposition ; néanmoins l'usage fait de ces animaux après avoir quittés l'enceinte des animaleries de l'IPA, leurs conditions de transport, d'hébergement, et de manipulations (devant obéir à des règles d'hygiène, de sécurité et une compétence dans ce domaine) et les possibles conséquences liées à cela relèvent de la responsabilité exclusive de l'acquéreur.

Mr/Mme
Aïza Asma

Service des animaux de laboratoire
Institut Pasteur d'Algérie
Laboratoire des petits Animaux
Dr Vétérinaire R. FOURAR

REFERENCES

1. Frykberg, R. G. and Banks, J., "Challenges in the Treatment of Chronic Wounds.," *Advances in wound care*, (2015), V. 4, n° 9, 560–582.
2. Järbrink, K. , Ni, G., Sönnergren, H., Schmidtchen, A. , Pang, C., Bajpai, R., and Car, J., "The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review," *Systematic Reviews*, (2017), V. 6, n° 1, 15.
3. Guo, S. and DiPietro, L. A., "Factors Affecting Wound Healing," *Journal of Dental Research*, (2010), V. 89, n° 3, 219–229.
4. Cossin, S., Malavaud, S., Jarno, P. , Giard, M. , L'Hériteau, F. , Simon, L. , Bieler, L. , Molinier, L., Marcheix, B., Venier, A.G., "Surgical site infection after valvular or coronary artery bypass surgery: 2008–2011 French SSI national ISO-RAISIN surveillance," *Journal of Hospital Infection*, (2015), V. 91, n° 3, 225–230.
5. Ahmed, M. I. , "Prevalence of nosocomial wound infection among postoperative patients and antibiotics patterns at teaching hospital in Sudan," *North American Journal of Medical Sciences*, (2012), V. 4, n° 1, 29–34.
6. Negut, I. , Grumezescu, V. , and Grumezescu, A. M., "Treatment Strategies for Infected Wounds," *Molecules (Basel, Switzerland)*, (2018), V. 23, n° 9.
7. Zerouki, A., Abada, S., Tali-Maamar, H., Rahal, K., and Naim, M., "Caractérisation des infections du site opératoire à *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline en chirurgie orthopédique et traumatologique dans un Hôpital algérien," *Revue de Chirurgie Orthopedique et Traumatologique*, (2015), V. 101, n° 2, 176–180.
8. Bouharkat, B., Tir Touil, A., Mullié, C., Chelli, N., and Meddah, B., "Bacterial ecology and antibiotic resistance mechanisms of isolated resistant strains from diabetic foot infections in the north west of Algeria," *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, (2020), V. 19, n° 2, 1261–1271.

9. Jones, R., "Prologue: Honey and healing through the ages," *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, (2009), V. 1, n° 1, 2–5.
10. Minden-Birkenmaier, B. A. and Bowlin, G. L., "Honey-Based Templates in Wound Healing and Tissue Engineering," *Bioengineering* (Basel, Switzerland), (2018), V. 5, n° 2
11. El-Kased, R. F., Amer, R. I., Attia, D., and Elmazar, M. M., "Honey-based hydrogel: In vitro and comparative *in vivo* evaluation for burn wound healing," *Scientific Reports*, (2017), V. 7, n° 1, 1–11.
12. Holubová, A., Chlupáčová, L., Krocová, J., Cetlová, L., Peters, L. J. F., Cremers, N. A. J., and Pokorná, A., "The Use of Medical Grade Honey on Infected Chronic Diabetic Foot Ulcers-A Prospective Case-Control Study," *Antibiotics* (Basel), (2023), V. 12, n° 9
13. Almasaudi, S., "The antibacterial activities of honey," *Saudi journal of biological sciences*, (2021), V. 28, n° 4, 2188–2196.
14. Khiati, B. and Ahmed, M., "Comparison of efficacy of unheated and heat-treated Sahara honey on wound healing in rabbits," *Journal of Coastal Life Medicine*, (2015), V. 3, n° 2, 162–165.
15. Jull, A. B., Cullum, N. , Dumville, J. C., Westby, M. J., Deshpande, S., and Walker, N., "Honey as a topical treatment for wounds," *The Cochrane database of systematic reviews*, (2015), V. 2015, n° 3, CD005083.
16. Medeiros, V. de F. L. P., Azevedo, Í. M., Rêgo, A. C. M., Egito, E. S. T., Araújo-Filho, I., and Medeiros, A. C., "Antibacterial properties and healing effects of *Melipona scutellaris* honey in MRSA-infected wounds of rats," *Acta cirurgica brasileira*, (2016), V. 31, n° 5, 327–332.
17. Yupanqui Mieles, J., Vyas, C., Aslan, E., Humphreys, G., Diver, C., and Bartolo, P., "Honey: An Advanced Antimicrobial and Wound Healing Biomaterial for Tissue Engineering Applications," *Pharmaceutics*, (2022), V. 14, n° 8.
18. Oryan, A., Alemzadeh, E., and Moshiri, A., "Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: A narrative review and meta-analysis," *Journal of Tissue Viability*, (2016), V. 25, n° 2, 98–118.

19. Davies, B. and Morris, T. Physiological parameters in laboratory animals and humans, *Pharmaceutical Research*, 10(7), 1093–1095. (1993).
20. Hall, B. K., "Germ layers, the neural crest and emergent organization in development and evolution," *Genesis*, (2018), n° December 2017, 1–9.
21. Sundberg, J. P., Booth, C. J., Nanney, L. B., Fleckman, P., and King, L. E., "Skin and Adnexa, In: " *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas, Second Edition*, (2018), 511–542.
22. Williams, P.L., Bannister, L.H., Berry, M.M., Collins, P., Dyson, M., Dussek, J.E., and Ferguson, M.W., "Gray's Anatomy, 39th Edition: The Anatomical Basis of Clinical Practice", *American Journal of Neuroradiology*, V. 26, n° 10, (2005), 2703–2704.
23. Marieb, E., Hoehn, K., Lachaine, R., and Moussakova, L., "Anatomie et physiologie humaines", Plateforme numérique MonLab - Licence étudiant 60 mois. ERPI, (2014).
24. BREUGNOT, J., "Modélisation Surfaceut Volumique de La Peau", *Classification et Analyse Couleur*, (2011).
25. Olivry, T., Muller, R.S., Walder, E.J., and Atlee, B.A. "Anatomie et physiologie microscopiques de la peau". *Encyclopédie Vétérinaire*, (1993).
26. Agache, P. "Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées". Ed. médicales internationales, (2000).
27. Thomas, J. R., "Effects of Age and Diet on Rat Skin Histology," (2005), n° March, 405–411.
28. Yousef, H., Alhajj, M., and Sharma, S., "Anatomy, Skin (Integument), Epidermis" *In: StatPearls [Internet]*; StatPearls Publishing, (2022).
29. Rinnerthaler, M., Streubel, M. K., Bischof, J., and Richter, K., "Skin aging, gene expression and calcium," *Exp Gerontol*, (2015).
30. Scott, D. W., Muller, G. H., Kirk, R. W., Miller, W. H., and Griffin, C. E., "Muller & Kirk's small animal dermatology", Elsevier Health Sciences, Philadelphia, (2012), 948.

31. Wulf, H. C., Sandby-møller, J., Kobayasi, T., and Gniadecki, R., "Skin aging and natural photoprotection," (2004), V. 35, 185–191.
32. Burgeson, R. E. and Christiano, A. M., "The dermal-epidermal junction," *Current Opinion in Cell Biology*, (1997), V. 9, 651–658.
33. Naylor, E. C., Watson, R. E. B., and Sherratt, M. J., "Molecular aspects of skin ageing," *Maturitas*, (2011), V. 69, n° 3, 249–256.
34. Debelle, L. and Alix, A. J. P., "The structures of elastins and their function," *Biochimie*, (1999), V. 81, n° 10, 981–994.
35. Niczyporuk, M., "Rat skin as an experimental model in medicine," *Progress in Health Sciences*, (2018), V. 8, n° 2, 223–228.
36. Driskell, R. R., Jahoda, C. A. B., Chuong, C. M., Watt, F. M., and Horsley, V., "Defining dermal adipose tissue," *Experimental Dermatology*, (2014), n° 23, 629–631.
37. Mélissopoulos, A. and Levacher, C., "La peau: structure et physiologie", Tec & Doc Lavoisier, (1998).
38. Wells, M. Y., Voute, H., Bellingard, V., Fisch, C., Boulifard, V., George, C., and Picaut, P., "Histomorphology and vascular lesions in dorsal rat skin used as injection sites for a subcutaneous toxicity study," *Toxicologic Pathology*, (2010), V. 38, n° 2, 258–266.
39. Bain, S." *Pathology of the Fischer Rat - Reference and Atlas*", *Pathology*, (1991), V. 23, n° 4, 368.
40. Mauro, T. M., "Chapter 83 : Biology of Eccrine and Apocrine Glands", *In : Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 8e. Goldsmith, L. A., Katz, S. I., Gilchrest, B. A., Paller, A. S., Leffell, D. J., Wolff, K., The McGraw-Hill Companies, New York, (2012).
41. Tortora, G. J. and Derrickson, B., "Principles of Anatomy and Physiology", Wiley, (2016).
42. Cui, C.-Y. and Schlessinger, D., "Eccrine sweat gland development and sweat secretion.," *Experimental dermatology*, (2015), V. 24, n° 9, 644–650.

43. Kolarsick, P. A. J., Kolarsick, M. A., and Goodwin, C., "Anatomy and Physiology of the Skin," *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, (2011), V. 3, n° 4.
44. Barone, R. and Simoens, P., "Anatomie comparée des mammifères domestiques", tome 7: neurologie, II: système nerveux périphérique ; glandes endocrines ; esthésiologie, Paris, (2010).
45. Venereol, A. D., "Structure des annexes cutanées," *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, (2005), V. 132, n° 11, 33–46.
46. Alonso, L. and Fuchs, E., "Stem cells of the skin epithelium," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (2003), V. 100 , n° 1, 11830–11835.
47. Shimomura, Y. and Christiano, A. M., "Biology and genetics of hair," *Annual review of genomics and human genetics*, (2010), V. 11, 109–132.
48. Kanitakis, J., "Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin," *European journal of dermatology*, (2002), V. 12, n° 4, 390–391.
49. Kierszenbaum, A. L., Validire-Charpy, P., and Validire, P., "Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique", De Boeck Supérieur, (2006).
50. Ross, M. H. and Pawlina, W., "Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology", Wolters Kluwer, Philadelphia, (2016).
51. Lüllmann-Rauch, R. and Sprumont, P., "Histologie", De Boeck Supérieur, (2008).
52. Sherwood, L., Lockhart, A., and Molotchnikoff, S., "Physiologie humaine: A Human Perspective", De Boeck Supérieur, (2006).
53. Crossman, A. R. and Neary, D., "Neuroanatomy", E-Book: An Illustrated Colour Text, Elsevier Health Sciences, (2010).
54. Genç, B., Lagrimas, A. K. B., Kuru, P., Hess, R., M. W. , Menichella, D. M., Miller, R. J., Paller, A. S., and Özdinler, P. H., "Visualization of Sensory Neurons and Their Projections in an Upper Motor Neuron Reporter Line", *PloS one*, (2015), V. 10, n° 7, e0132815.
55. Park, K., "Role of micronutrients in skin health and function," *Biomolecules &*

therapeutics, (2015), V. 23, n° 3, 207–217.

56. Lee, D. H., Oh, J.-H., and Chung, J. H., “Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging,” *Journal of dermatological science*, (2016), V. 83, n° 3, 174–181.

57. Draelos, Z., “Aquaporins: an introduction to a key factor in the mechanism of skin hydration,” *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, (2012), V. 5, n° 7, 53–56.

58. Dreno, B., Araviiskaia, E., Berardesca, E., Bieber, T., Hawk, J., Sanchez-Viera, M., and Wolkenstein, P., “The science of dermocosmetics and its role in dermatology,” *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, (2014), V. 28, n° 11, 1409–1417.

59. Alexander, C. M., Kasza, I., Yen, C.L. E., Reeder, S. B., Hernando, D., Gallo, R. L., Jahoda, C. A. B., Horsley, V., and MacDougald, O. A., “Dermal white adipose tissue: a new component of the thermogenic response,” *Journal of lipid research*, (2015), V. 56, n° 11, 2061–2069.

60. Miller, W. H., Griffin, C. E., and Campbell, K. L., "Muller and Kirk's : Small Animal Dermatology", Elsevier Health Sciences, (2012).

61. Richmond, J. M. and Harris, J. E., “Immunology and skin in health and disease,” *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, (2014), V. 4, n° 12.

62. Lindsay, D. "Functional Human Anatomy", McGraw-Hill Education, (1995).

63. Warner, P. M., Coffee, T. L., and Yowler, C. J., “Outpatient burn management,” *Surgical Clinics of North America*, (2014), V. 94, n° 4, 879–892.

64. Bryant, R. and Nix, D., "Acute and Chronic Wounds: Current Management Concepts", Elsevier Health Sciences, (2015).

65. Eming, S. A. , Martin, P. , and Tomic-Canic, M. , “Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation.,” *Science translational medicine*. (2014), V. 6, n° 265, 265sr6.

66. Steed, D. L., “Wound-healing trajectories,” *Surgical Clinics of North America*, (2003), V. 83, n° 3, 547–555.

67. Whitney, J. A. D., “Overview: Acute and chronic wounds,” *Nursing Clinics of*

North America, (2005), V. 40, n° 2, 191–205.

68. Trinh, X.T., Long, N.V., Thi Van Anh, L., Thi Nga, P., Ngan Giang, N., Ngoc Chien, P., Nam, S.Y., and Heo, C.Y., “A Comprehensive Review of Natural Compounds for Wound Healing: Targeting Bioactivity Perspective,” *International Journal of Molecular Sciences*, (2022).

69. Brown, M. S., Ashley, B., and Koh, A., “Wearable technology for chronic wound monitoring: Current dressings, advancements, and future prospects,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, (2018), V. 6, n° APR, 1–21.

70. McCulloch, J. M., Kloth, L. C., and Feedar, J. A., “Wound healing : alternatives in management”, *Medecine*, (1990).

71. Grotendorst, G. R., Chang, T., Seppä, H. E., Kleinman, H. K., and Martin, G. R., “Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells,” *Journal of cellular physiology*, (1982), V. 113, n° 2, 261–266.

72. Werner, S. and Grose, R., “Regulation of wound healing by growth factors and cytokines,” *Physiological reviews*, (2003), V. 83, n° 3, 835–870.

73. Goldman, R., “Growth Factors and Chronic Wound Healing: Past, Present, and Future,” *Advances in Skin & Wound Care*, (2004), V. 17, n° 1.

74. Gosain, A. and DiPietro, L. A., “Aging and wound healing,” *World journal of surgery*, (2004), V. 28, n° 3, 321–326.

75. Zhao, R., Liang, H., Clarke, E., Jackson, C., and Xue, M., “Inflammation in Chronic Wounds,” *International journal of molecular sciences*, (2016), V. 17, n° 12.

76. Medzhitov, R., “Inflammation 2010: new adventures of an old flame,” *Cell*, (2010), V. 140, n° 6, 771–776.

77. Mosser, D. M. and Edwards, J. P., “Exploring the full spectrum of macrophage activation,” *Nature reviews. Immunology*, (2008), V. 8, n° 12, 958–969.

78. Reinke, J. M. and Sorg, H., “Wound repair and regeneration,” *European Surgical Research*, (2012), V. 49, n° 1, 35–43.

79. Gonzalez, A. C. O., Costa, T. F., Andrade, Z. de A., and Medrado, A. R. A. P., “Wound healing - A literature review,” *Anais brasileiros de dermatologia*, (2016), V.

91, n° 5, 614–620.

80. Han, G. and Ceilley, R., “Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments,” *Advances in therapy*, (2017), V. 34, n° 3, 599–610.

81. Gurtner, G. C. and Evans, G. R., “Advances in head and neck reconstruction,” *Plastic and reconstructive surgery*, (2000), V. 106, n° 3, 672–82.

82. Robson, M. C., Steed, D. L., and Franz, M. G., “Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories,” *Current problems in surgery.*, (2001), V. 38, n° 2, 72–140.

83. Bishop, A., “Role of oxygen in wound healing,” *Journal of wound care*, (2008), V. 17, n° 9, 399–402.

84. Rodriguez, P. G., Felix, F. N. , Woodley, D. T., and Shim, E. K., “The role of oxygen in wound healing: a review of the literature,” *Dermatologic surgery*, (2008), V. 34, n° 9, 1159–1169.

85. Edwards, R. and Harding, K. G., “Bacteria and wound healing Colonisation Contamination,” *Current opinion in infectious diseases*, (2004), 91–96.

86. Dow, G., Browne, A., and Sibbald, R. G., “Infection in chronic wounds: controversies in diagnosis and treatment,” *Ostomy/wound management*, (1999), V. 45, n° 8, 22-29.

87. Kingsley, A., “The wound infection continuum and its application to clinical practice,” *Ostomy/wound management*, (2003), V. 49, n° 7, 1–7.

88. Wall, I. B., Davies, C. E., Hill, K. E., Wilson, M. J., Stephens, P., Harding, K. G., and Thomas, D. W., “Potential role of anaerobic cocci in impaired human wound healing,” *Wound repair and regeneration*, (2002), V. 10, n° 6, 346–353.

89. Bowler, P. G. “The 10(5) bacterial growth guideline: reassessing its clinical relevance in wound healing,” *Ostomy/wound management*, (2003), V. 49, n° 1, 44–53.

90. Menke, N. B., Ward, K. R., Witten, T. M., Bonchev, D. G., and Diegelmann, R. F., “Impaired wound healing,” *Clinics in dermatology*, (2007), V. 25, n° 1, 19–25.

91. Davis, S. C., Ricotti, C., Cazzaniga, A., Welsh, E., Eaglstein, W. H., and Mertz,

- P. M., "Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization *in vivo*," *Wound repair and regeneration*, (2008), V. 16, n° 1, 23–29.
92. Bjarsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Jensen, P. O., Madsen, K. G., Phipps, R., Kroghfelt, K., Hoiby, N., and Givskov, M., "Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis," *Wound repair and regeneration*, (2008), V. 16, n° 1, 2–10.
93. Keylock, K. T., Vieira, V. J., Wallig, M. A., DiPietro, L. A., Schrementi, M., and Woods, J. A., "Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice," *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, (2008), V. 294, n° 1, 179-84.
94. Swift, M. E., Burns, A. L., Gray, K. L., and DiPietro, L. A., "Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury," *The Journal of investigative dermatology*, (2001), V. 117, n° 5, 1027–1035.
95. Swift, M. E., Kleinman, H. K., and DiPietro, L. A., "Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice," *Laboratory investigation ; a journal of technical methods and pathology*, (1999), V. 79, n° 12, 1479–1487.
96. Godbout, J. P. and Glaser, R., "Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer," *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, (2006), V. 1, n° 4, 421–427.
97. Brem, H. and Tomic-Canic, M., "Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes," *The Journal of clinical investigation*, (2007), V. 117, n° 5, 1219–1222.
98. Wilson, J. A. and Clark, J. J., "Obesity: impediment to postsurgical wound healing," *Advances in skin & wound care*, (2004), V. 17, n° 8, 426–435.
99. Szabo, G. and Mandrekar, P., "A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense," *Alcoholism, clinical and experimental research*, (2009), V. 33, n° 2, 220–232.
100. Ahn, C., Mulligan, P., and Salcido, R. S., "Smoking-the bane of wound healing: biomedical interventions and social influences," *Advances in skin & wound care*, (2008), V. 21, n° 5, 227–228.
101. Arnold, M. and Barbul, A., "Nutrition and wound healing," *Plastic and*

reconstructive surgery, (2006), V. 117, n° 7 Suppl, 42S-58S.

102. Décret n° 2003-587 du 30 juin 2003 pris pour l'application de l'article L. 214-1 du code de la consommation en ce qui concerne le miel. <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000785228> (accessed Apr. 16, 2024).

103. Ballot-Flurin, C., "L'apithérapie: Découvrez les bienfaits des produits de la ruche pour votre santé", Cahier de recettes inclus. Eyrolles, (2019).

104. Viel, C. and Doré, J.-C., "Histoire et emplois du miel, de l'hydromel et des produits de la ruche," Revue d'histoire de la pharmacien, (2003), V. 91, n° 337, 7–20.

105. Bogdanov, S., Bieri, K., Kilchaman, U., and Gallaman, P., "Miels monofloraux suisses," ALP forum, (2008), V. 23.

106. Clément, H., "Le guide des miels: 50 miels à découvrir", Rustica Éditions, (2015).

107. Crane, E., "Honey, a Comprehensive Survey", Northern Bee Books, (2020).

108. Subramanian, R., Umesh Hebbar, H., and Rastogi, N. K., "Processing of Honey: A Review," International Journal of Food Properties, (2007), V. 10, n° 1, 127–143.

109. Rosa, A. R. D., Leone, F., Cheli, F., and Chiofalo, V., "Novel approach for the characterisation of Sicilian honeys based on the correlation of physico-chemical parameters and artificial senses," Italian Journal of Animal Science, (2019), V. 18, n° 1, 389–397.

110. Ahmed, S., Sulaiman, S. A., Baig, A. A., Ibrahim, M., Liaqat, S., Fatima, S., Jabeen, S., Shamim, N., and Othman, N. H., "Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action," Oxidative medicine and cellular longevity, (2018), V. 2018, 8367846.

111. Nafea, E. A., Zidan, E. W., Asmaa, M. F., and Sehata, I. A. A., "Determination of Organic Acids in Saudian Bee Honey Types," Acadimic Journal of Biological Sciences, (2013), V. 5, n° 2, 117–120.

112. Manyi-Loh, C. E., Ndip, R. N., and Clarke, A. M., "Volatile compounds in honey: a review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities," *International journal of molecular sciences*, (2011), V. 12, n° 12, 9514–9532.
113. Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., and Gallmann, P., "Honey for nutrition and health: a review," *Journal of the American College of Nutrition*, (2008), V. 27, n° 6, 677–689.
114. Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., and Carmen Seijo, M., "Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area," *Food chemistry*, (2013), V. 138, n° 2–3, 851–856.
115. Zammit Young, G. W. and Blundell, R., "A review on the phytochemical composition and health applications of honey," *Heliyon*, (2023), V. 9, n° 2, e12507.
116. Bonté, F. and Desmoulière, A., "Le miel : origine et composition," *Actualités Pharmaceutiques*, (2013), V. 52, n° 531, 18–21.
117. Domerego, R., Imbert, G., and Blanchard, C., "Remèdes de la ruche : découvrez tous les bienfaits santé des produits de la ruche : miel, pollen, propolis, gelée royale", Alpen édition, (2006).
118. Godart, V., Dan, B., Mascart, G., Fikri, Y., Dierick, K., and Lepage, P., "Botulisme infantile après exposition à du miel," *Archives de Pédiatrie*, (2014), V. 21, n° 6, 628–631.
119. Bera, A., Almeida-Muradian, L. B., and Sabato, S. F., "Effect of gamma radiation on honey quality control," *Radiation Physics and Chemistry*, (2009), V. 78, n° 7–8, 583–584.
120. Kwakman, P. H. S., Boer, L., Ruyter-Spira, C. P., Creemers-Molenaar, T., Helsper, J. P. F. G., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Zaat, S. A. J., and Velde, A. A., "Medical-grade honey enriched with antimicrobial peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant pathogens," *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, (2011), V. 30, n° 2, 251–257.
121. Achouri, M. Y., Selka, M. A., Chenafa, A., Brahim, S., Messafeur, M. A., and

Toumi, H., "5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honeys from North-West of Algeria," *Toxicologie Analytique et Clinique*, (2019), V. 31, n° 2, 100–105.

122. Zhao, H., Cheng, N., Zhou, W., Chen, S., Wang, Q., Gao, H., Xue, X., Wu, L., and Cao, W., "Honey Polyphenols Ameliorate DSS-Induced Ulcerative Colitis via Modulating Gut Microbiota in Rats," *Molecular nutrition & food research*, (2019), V. 63, n° 23, e1900638.

123. Jibril, F. I., Hilmi, A. B. M., and Manivannan, L., "Isolation and characterization of polyphenols in natural honey for the treatment of human diseases," *Bulletin of the National Research Centre*, (2019), V. 43, n° 1, 4.

124. Carvalho, C. A. L., Sodr e, G. S., Fonseca, A. A. O., Alves, R. M. O., Souza, B. A., and Clarton, L., "Physicochemical characteristics and sensory profile of honey samples from stingless bees (Apidae: Meliponinae) submitted to a dehumidification process," *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, (2009), V. 81, n° 1, 143–149.

125. Gomes, S., Dias, L. G., Moreira, L. L., Rodrigues, P., and Estevinho, L., "Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal," *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, (2010), V. 48, n° 2, 544–548.

126. K c k, M., Kolaylı, S., alpay Karaoglu, S., Ulusoy, E., Baltacı, C., and Candan, F., "Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia," *Food Chemistry*, (2007), V. 100, 526–534.

127. Terrab, A., Recamales, A. F., Hernanz, D., and Heredia, F. J., "Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents," *Food Chemistry*, (2004), V. 88, n° 4, 537–542.

128. Khalil, I., Moniruzzaman, M., Boukra , L., Benhanifia, M., Islam, A., Islam, N., Sulaiman, S. A., and Gan, S. H., "Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey," *Molecules (Basel)*, (2012), V. 17, n° 9, 11199–11215.

129. Cavia, M. M., Fern ndez-Mui o, M. A., Alonso-Torre, S. R., Huidobro, J. F., and Sancho, M. T., "Analytical, Nutritional and Clinical Methods," *Food Chemistry*, (2007), V. 100, n° 4, 1728–1733.

130. Nanda, V., Sarkar, B. C., Sharma, H. K., and Bawa, A. S., "Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India," *Journal of Food Composition and Analysis*, (2003), V. 16, n° 5, 613–619.
131. Majewska, E., Drużyńska, B., and Wołosiak, R., "Determination of the botanical origin of honeybee honeys based on the analysis of their selected physicochemical parameters coupled with chemometric assays," *Food Science and Biotechnology*, (2019), V. 28, n° 5, 1307–1314.
132. Ouchemoukh, S., Louaileche, H., and Schweitzer, P., "Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys," *Food Control*, (2007), V. 18, n° 1, 52–58.
133. Bansal, V., Medhi, B., and Pandhi, P., "Honey-a remedy rediscovered and its therapeutic utility," *Kathmandu University medical journal*, (2005), V. 3, n° 3, 305–309.
134. Boateng, J., "Therapeutic Dressings and Wound Healing Applications", Wiley, (2020).
135. Zbucea, A., "Up-to-date use of honey for burns treatment," *Annals of burns and fire disasters*, (2014), V. 27, n° 1, 22–30.
136. Olaitan, P. B., Adeleke, O. E., and Ola, I. O., "Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes," *African health sciences*, (2007), V. 7, n° 3, 159–165.
137. Boukraâ, L. and Sulaiman, S. A., "Rediscovering the antibiotics of the hive," *Recent patents on anti-infective drug discovery*, (2009), V. 4, n° 3, 206–213.
138. Yaghoobi, R., Kazerouni, A., and Kazerouni, O., "Evidence for Clinical Use of Honey in Wound Healing as an Anti-bacterial, Anti-inflammatory Anti-oxidant and Anti-viral Agent: A Review," *Jundishapur journal of natural pharmaceutical products*, (2013), V. 8, n° 3, 100–104.
139. Mandal, M. D. and Mandal, S., "Honey: its medicinal property and antibacterial activity," *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, (2011), V. 1, n° 2, 154–160.
140. Atrott, J., Haberlau, S., and Henle, T., "Studies on the formation of

methylglyoxal from dihydroxyacetone in Manuka (*Leptospermum scoparium*) honey," Carbohydrate research, (2012), V. 361, 7–11.

141. Lu, J., Turnbull, L., Burke, C. M., Liu, M., Carter, D. A., Schlothauer, R. C., Whitchurch, C. B., and Harry, E. J., "Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by *Staphylococcus aureus* strains with different biofilm-forming abilities," PeerJ, (2014), V. 2, e326.

142. Alzahrani, H. A., Alsabehi, R., Boukraâ, L., Abdellah, F., Bellik, Y., and Bakhotmah, B. A., "Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins," Molecules (Basel), (2012), V. 17, n° 9, 10540–10549.

143. Schneider, M., Coyle, S., Warnock, M., Gow, I., and Fyfe, L., "Anti-microbial activity and composition of manuka and portobello honey," Phytotherapy research, (2013), V. 27, n° 8, 1162–1168.

144. Descottes, B., "Cicatrisation par le miel, l'expérience de 25 années," Phytothérapie, (2009), V. 7, n° 2, 112–116.

145. Couquet, Y., Desmoulière, A., and Rigal, M., "Les propriétés antibactériennes," Actualités pharmaceutiques, (2013), V. 52, n° 531, 22–25.

146. LECHAUX, D., TONDUT, L., and PIMENTEL, C., "Pansement au miel médical associé à une dépression contrôlée après dermolipectomie post-chirurgie bariatrique : étude cas témoins," Journal de Chirurgie Viscérale, (2013), V. 150, n° 1S, 30.

147. BODT, G., "Pansements de pointe et pointe de miel," Abeilles & Cie, (2004), n° 103, 26–27.

148. Magalon, G. and Guide, V. R., "Guide des plaies Du pansement à la chirurgie," Annales de chirurgie plastique esthétique, (2004), V. 49, 73.

149. Abuharfeil, N., Al-Oran, R., and Abo-Shehada, M., "The Effect of Bee Honey on the Proliferative Activity of Human B-and T-Lymphocytes and the Activity of Phagocytes," Food and Agricultural Immunology, (1999), V. 11, n° 2, 169–177.

150. Massaux, C., "Polyphénols : des alliés pour la santé," Abeilles & Cie, (2012), V. 149, 1–4.

151. Conseil de l'Europe Pharmacopée Européenne 11ème édition, Monographie "Miel", (2022).
152. Hassan, A. "Le Miel à Usage Médical : Utilisation En Milieu Hospitalier", Thèse de doctorat, Université clermont auvergne, (2023).
153. Granick, M. S. and Gamelli, R. L., "Surgical Wound Healing and Management", CRC Press: Boca Raton, (2007).
154. Hemmati, H., Hasannejad-Bibalan, M., Khoshdoz, S., Khoshdoz, P., Yaghubi Kalurazi, T., Sedigh Ebrahim-Saraie, H., and Nalban, S., "Two years study of prevalence and antibiotic resistance pattern of Gram-negative bacteria isolated from surgical site infections in the North of Iran," BMC Research Notes, (2020), V. 13, n° 1, 383.
155. Kalita, J. M., Nag, V. L., Kombade, S. , and Yedale, K., "Multidrug resistant superbugs in pyogenic infections: A study from Western Rajasthan, India," Pan African Medical Journal, (2021), V. 38, 409.
156. Swanson, T. and Angel, D., " Wound Infection in Clinical Practice, Principles of Best Practice", Wounds International: London, UK, (2022).
157. Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z., and Hameed, S., "Multidrug resistance: An emerging crisis," Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, (2014), V. 2014, 541340.
158. Vivas, R., Barbosa, A. A. T., Dolabela, S. S., and Jain, S., "Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview," Microbial Drug Resistance, (2019), V. 25, n° 6, 890–908.
159. Alkofide, H., Alhammad, A. M., Alruwaili, A., Aldemerdash, A., Almangour, T. A., Alsuwayegh, A., Almoqbel, D., Albati, A., Alsaud, A., and Enani, M., "Multidrug-resistant and extensively drugresistant enterobacteriaceae: Prevalence, treatments, and outcomes – a retrospective cohort study," Infection and Drug Resistance, (2020), V. 13, 4653–4662.
160. Poggio, J. L., "Perioperative strategies to prevent surgical-site infection," Clinics in Colon and Rectal Surgery, (2013), V. 26, n° 3, 168–173.
161. QGIS Geographic Information System. Open source Geospatial Foundation

Project, (2022). <https://qgis.osgeo.org>. Consulté le 20 May 2023.

162. Zabaglo, M. and Sharman, T., "Postoperative Wound Infection", In: StatPearls [Internet], StatPearls Publishing,(2022).

163. Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques.

<https://lh3.googleusercontent.com/p/AF1QipMxWXR03FzBmS2nPQfQPWKQcGgHUPGoNG553cDF=s1360-w1360-h1020> (accessed May 14, 2024).

164. Bergey, D. H. and Holt, J. G., "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", Williams & Wilkins, (1994).

165. Singhal, N. , Kumar, M. , Kanaujia, P. K. , and Viridi, J. S. , "MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis.," *Frontiers in microbiology*. (2015), V. 6, 791.

166. Bruker, The MALDI Biotyper ® System, 1–12. (2022).

167. Clinical and Laboratory Standards Institute M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2015.

168. Société Française de Microbiologie COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE, (2006).

169. Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques Standardisation De L'Antibiogramme En Médecine Humaine à l'Echelle Nationale, (2011).

170. Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., and Hindler, J. F., "Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance," *Clinical Microbiology and Infection*, (2011), V. 18, n° 3, 268–280.

171. Gruskay, J., Smith, J., Kepler, C. k., Radcliff, K., Harrop, J., Albert, T., and Vaccaro, A., "The seasonality of postoperative infection in spine surgery," *Journal of Neurosurgery: Spine*, (2013), V. 18, n° 1, 57–62.

172. Kao, H. K., Chen, M. C., Lee, W. C., Yang, W. E., Chang, C. H., and Chang, Y., "Seasonal temperature and pin site care regimen affect the incidence of pin site

infection in pediatric supracondylar humeral fractures,” *BioMed Research International*, (2015), V. 2015, 838913.

173. Anthony, C. A., Peterson, R. A., Polgreen, L. A., Sewell, D. K., and Polgreen, P. M., “The seasonal variability in surgical site infections and the association with warmer weather: A population-based investigation,” *Infection Control and Hospital Epidemiology*, (2017), V. 38, n° 7, 809–816.

174. Vickers, M. L., Ballard, E. L., Harris, P. N. A., Knibbs, L. D., Jaiprakash, A., Dulhunty, J. M., Crawford, R. W., and Parkinson, B. , “Bacterial profile, multi-drug resistance and seasonality following lower limb orthopaedic surgery in tropical and subtropical australian hospitals: An epidemiological cohort study,” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, (2020), V. 17, n° 2, 657.

175. Rai, S., Yadav, U. N., Pant, N. D., Yakha, J. K., Tripathi, P. P., Poudel, A., and Lekhak, B., “Bacteriological Profile and Antimicrobial Susceptibility Patterns of Bacteria Isolated from Pus/Wound Swab Samples from Children Attending a Tertiary Care Hospital in Kathmandu, Nepal,” *International Journal of Microbiology*, (2017), V. 2017, 2529085.

176. Tchakal-Mesbahi, A., Abdouni, M. A., and Metref, M., “Prevalence of multidrug-resistant bacteria isolated from burn wounds in Algeria,” *Annals of Burns and Fire Disasters*, (2021), V. 34, n° 2, 150–156.

177. Shimekaw, M., Tigabu, A., and Tessema, B., “Bacterial Profile, Antimicrobial Susceptibility Pattern, and Associated Risk Factors Among Patients With Wound Infections at Debre Markos Referral Hospital, Northwest, Ethiopia,” *International Journal of Lower Extremity Wounds*, (2022), V. 21, n° 2, 182–192.

178. Kassam, N. A., Damian, D. J., Kajeguka, D., Nyombi, B., and Kibiki, G. S., “Spectrum and antibiogram of bacteria isolated from patients presenting with infected wounds in a Tertiary Hospital, northern Tanzania,” *BMC Research Notes*, (2017), V. 10, n° 1, 757.

179. Duwadi, K., Khadka, S., Adhikari, S., Sapkota, S., and Shrestha, P., “Bacterial Etiology of Wound Exudates in Tertiary Care Cancer Patients and Antibiogram of the Isolates,” *Infectious Diseases: Research and Treatment*, (2020), V. 13, 1178633720952077.

180. Upreti, N., Rayamajhee, B., Sherchan, S. P., Choudhari, M. K., and Banjara, M. R., "Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, multidrug resistant and extended spectrum β -lactamase producing gram negative bacilli causing wound infections at a tertiary care hospital of Nepal," *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, (2018), V. 7, n° 1, 121.
181. Chiller, K., Selkin, B. A., and Murakawa, G. J., "Skin Micro⁻ora and Bacterial Infections of the Skin," *J Investig Dermatol Symp Proc*, (2001), V. 6, n° 3, 170–4.
182. Manyahi, J., Matee, M. I., Majigo, M., Moyo, S., Mshana, S. E., and Lyamuya, E. F., "Predominance of multi-drug resistant bacterial pathogens causing surgical site infections in Muhimbili national hospital, Tanzania," *BMC Research Notes*, (2014), V. 7, n° 1, 500.
183. Otto, M. , "*Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides," *Expert Review of Dermatology*, (2010), V. 5, n° 2, 183–195.
184. Hamzaoui, N. E., Barguigua, A., Larouz, S., and Maouloua, M., "Epidemiology of burn wound bacterial infections at a Meknes hospital , Morocco," *New Microbes and New Infections*, (2020), V. 38, 100764.
185. Taylor, T. and Unakal, C., "*Staphylococcus aureus*", Ed: StatPearls Publishing: In: StatPearls [Internet]., (2022).
186. Que, Y. A. and Moreillon, P., "*Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock Syndrome)". In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*; Elsevier, (2020), 2393–2431.
187. Partridge, S. R., "Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae," *Pathology*, (2015), V. 47, n° 3, 276–284.
188. Alfei, S. and Schito, A. M., " β -Lactam Antibiotics and β -Lactamase Enzymes Inhibitors, Part 2: Our Limited Resources," *Pharmaceuticals*, (2022), V. 15, n° 4, 476.
189. Mama, M., Abdissa, A., and Sewunet, T., "Antimicrobial susceptibility pattern of bacterial isolates from wound infection and their sensitivity to alternative topical agents at Jimma University Specialized Hospital, South-West Ethiopia," *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, (2014), V. 13, n° 1, 14.

190. Mühlberg, E., Umstätter, F., Kleist, C., Domhan, C., Mier, W., and Uhl, P., "Renaissance of vancomycin: Approaches for breaking antibiotic resistance in multidrug-resistant bacteria," *Canadian Journal of Microbiology*, (2020), V. 66, n° 1, 11–16.
191. Bruniera, F. R., Ferreira, F. M., Saviolli, L. R. M., Bacci, M. R., Feder, D., Pedreira, M. D. L. G., Peterlini, M. A. S., Azzalis, L. A., Junqueira, V. B. C., and Fonseca, F. L. A., "The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects: A review," *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, (2015), V. 19, n° 4, 694–700.
192. Xiao, Y. and Hu, Y., "The major aminoglycoside-modifying enzyme AAC(3)-II found in *Escherichia coli* determines a significant disparity in its resistance to gentamicin and amikacin in China," *Microbial Drug Resistance*, (2012), V. 18, n° 1, 42–46.
193. Brocard, E., Reveiz, L., Régnaux, J. P., Abdala, V., Ramón-Pardo, P., and Bueno, A. R., "Antibiotic prophylaxis for surgical procedures: A scoping review," *Rev Panam Salud Publica*, (2021), V. 45, e62.
194. Abose, S., Genet, C., and Derbie, A., "Antimicrobial Resistance Profile of Bacterial Isolates Identified from Surgical Site Infections at a Referral Hospital, Northwest Ethiopia," *Ethiopian journal of health sciences*, (2021), V. 31, n° 3, 635–644.
195. Becerra-Bayona, S. M., Solarte-David, V. A., Sossa, C. L., Mateus, L. C., Villamil, M., Pereira, J., and Arango-Rodríguez, M. L., "Mesenchymal stem cells derivatives as a novel and potential therapeutic approach to treat diabetic foot ulcers.," *Endocrinology, diabetes & metabolism case reports*, (2020), V. 2020
196. Martinotti, S., Bonsignore, G., and Ranzato, E., "Applications of Beehive Products for Wound Repair and Skin Care," *Cosmetics*, (2023), V. 10, n° 5
197. Hamdi, M., Khiati, B., and Ahmed, M., "Improved Antibacterial Activity of Honey, Propolis and Beeswax-Sodium Carboxymethyl Cellulose Composite Hydrogel," *Indian Journal of Novel Drug delivery*, (2020), V. 12, n° 4, 2–16.
198. Couquet, Y., Desmoulière, A., and Rigal, M. L., "Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel," *Actualites pharmaceutiques*, (2013), V.

52, n° 531, 22–25.

199. Singleton, V., Orthofer, R., and Lamuela Raventos, R., “Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent,” *Methods in enzymology*, (1999), V. 299, 561.

200. Wong, S. P., Leong, L. P., and William Koh, J. H., “Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants,” *Food Chemistry*, (2006), V. 99, n° 4, 775–783.

201. Brighente, I. M. C., Dias, M., Verdi, L. G., and Pizzolatti, M. G., “Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species,” *Pharmaceutical Biology*, (2007), V. 45, n° 2, 156–161.

202. Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J. C., and Pinkas, M., “Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations,” *Arzneimittel-Forschung*, (1996), V. 46, n° 11, 1086–1089.

203. Handayani, V., Ahmad, A. R., Sudir, M., Etlingera, P., and Sm, R. M., “Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga dan Daun Patikala (Etlingera elatior (Jack) R . M . Sm) Menggunakan Abstrak,” *Pharm Sci Res*, (2014), V. 1, n° 2, 86–93.

204. Gül, A. and Pehlivan, T., “Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey,” *Saudi Journal of Biological Sciences*, (2018), V. 25, n° 6, 1056–1065.

205. Perini, J. A., Angeli-Gamba, T., Alessandra-Perini, J., Ferreira, L. C., Nasciutti, L. E., and Machado, D. E., “Topical application of Acheflan on rat skin injury accelerates wound healing: a histopathological, immunohistochemical and biochemical study,” *BMC complementary and alternative medicine*, (2015), V. 15, 203.

206. Masson-Meyers, D. S., Andrade, T. A. M., Caetano, G. F., Guimaraes, F. R., Leite, M. N., Leite, S. N., and Frade, M. A. C., “Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment,” *International journal of experimental pathology*, (2020), V. 101, n° 1–2, 21–37.

207. Suarez-Arnedo, A., Torres Figueroa, F., Clavijo, C., Arbeláez, P., Cruz, J. C.,

- and Muñoz-Camargo, C., “An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays,” *PloS one*, (2020), V. 15, n° 7, e0232565.
208. Santos, T. S., Santos, I. D. D., Pereira-Filho, R. N., Gomes, S. V. F., Lima-Verde, I. B., Marques, M. N., Cardoso, J. C., Severino, P., Souto, E. B., and Albuquerque-Júnior, R. L. C., “Histological Evidence of Wound Healing Improvement in Rats Treated with Oral Administration of Hydroalcoholic Extract of *Vitis labrusca*,” *Current issues in molecular biology*, (2021), V. 43, n° 1, 335–352.
209. Vyver, M., Boodhoo, K., Frazier, T., Hamel, K., Kopcewicz, M., Levi, B., Maartens, M., Machcinska, S., Nunez, J., Pagani, C., Rogers, E., Walendzik, K., Wisniewska, J., Gawronska-Kozak, B., and Gimble, J. M., “Histology Scoring System for Murine Cutaneous Wounds,” *Stem cells and development*, (2021), V. 30, n° 23, 1141–1152.
210. Ridho, E., “UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL BUAH LAKUM (*Cayratia trifolia*) DENGAN METODE DPPH (2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZIL),” *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, (2013), n° 55
211. Andritoiu, C. V., Lungu, C., Danu, M., Ivanescu, B., Andriescu, C. E., Vlase, L., Havarneanu, C., Iurciuc, C. E., and Popa, M., “Evaluation of the healing effect of ointments based on bee products on cutaneous lesions in wistar rats,” *Pharmaceuticals*, (2021), V. 14, n° 11
212. Scepankova, H., Combarros-Fuertes, P., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., Dias, M. S., Pinto, C. A., Saraiva, J. A., and Estevinho, L. M., “Role of Honey in Advanced Wound Care,” *Molecules (Basel)*, (2021), V. 26, n° 16
213. Kwakman, P. H. S. and Zaat, S. A. J., “Antibacterial components of honey,” *IUBMB Life*, (2012), V. 64, n° 1, 48–55.
214. BELHAJ , I. EL ABBADI , and T. OUCHBANI, “Contribution à l’étude de l’activité antibactérienne du miel naturel d’origine marocaine,” *Rev. Mar. Sci. Agron. Vét.*, (2016), V. 4, 12–22.
215. Aljaghvani, A., Allemailem, K. S., Aljaghvani, L. F., Alrumaihi, F., Joseph, R. J., Khan, A. A., aljaghvani, M., Rahmani, A. H., and Almatroudi, A., “Antimicrobial Effect of Different Types of Honey on Selected ATCC Bacterial Strains,”

Pharmacognosy Journal, (2021), V. 13, n° 1.

216. Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G., and Henle, T., "Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand," *Molecular nutrition & food research*, (2008), V. 52, n° 4, 483–489.

217. Brudzynski, K., Abubaker, K., St-Martin, L., and Castle, A., "Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey," *Frontiers in microbiology*, (2011), V. 2, 213.

218. Cushnie, T. P. T. and Lamb, A. J., "Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids," *International journal of antimicrobial agents*, (2011), V. 38, n° 2, 99–107.

219. Bucekova, M., Jardekova, L., Juricova, V., Bugarova, V., Marco, G. D., Gismondi, A., Leonardi, D., Farkasovska, J., Godocikova, J., Laho, M., Kludiny, J., Majtan, V., Canini, A., and Majtan, J., "Antibacterial Activity of Different Blossom Honeys: New Findings," *Molecules (Basel)*, (2019), V. 24, n° 8

220. Haralampu, S. G., "Resistant starch-a review of the physical properties and biological impact of RS3," *Carbohydrate Polymers*, (2000), V. 41, n° 3, 285–292.

221. Kedare, S. B. and Singh, R. P., "Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay," *Journal of food science and technology*, (2011), V. 48, n° 4, 412–422.

222. Molyneux, P., "The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity," *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, (2004), V. 26, n° December 2003, 211–219.

223. Bouyahya, A., Abrini, J., Et-Touys, A., Lagrouh, F., Dakka, N., and Bakri, Y., "Analyse phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des échantillons du miel marocain," *Phytothérapie*, (2017).

224. Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., and Maffei Facino, R., "Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics," *Analytica Chimica Acta*, (2005), V. 533, n° 2, 185–191.

225. Socha, R., Gałkowska, D., Bugaj, M., and Juszczyk, L., "Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland," *Natural product research*, (2015), V. 29, n° 5, 416–422.
226. Zawawi, N., Chong, P. J., Tom, N. N. M., Anuar, N. S. S., Mohammad, S. M., Ismail, N., and Jusoh, A. Z., "Establishing relationship between vitamins, total Phenolic and total flavonoid content and antioxidant activities in various honey types," *Molecules*, (2021), V. 26, n° 15.
227. Dorsett-Martin, W. A. and Wysocki, A. B., "Rat Models of Skin Wound Healing BT - Sourcebook of Models for Biomedical Research", Conn, P. M., Edition Humana Press: Totowa, NJ, (2008), 631–638.
228. Grada, A., Mervis, J., and Falanga, V., "Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing," *The Journal of investigative dermatology*, (2018), V. 138, n° 10, 2095-2105.
229. Ioniță, F., Coman, C., and Codreanu, M., "The Rat As an Animal Model for the Evaluation of the Cutaneous Wound Healing," (2022), V. LXVIII, n° 1, 189–196.
230. Organisation Mondiale de la Santé. "Evaluation des risques des médicaments à usage humain liés aux résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées alimentaires", (2009).
231. National Research Council (US) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academies Press (US): Washington (DC), (2011).
232. Galiano, R. D., Michaels, J., Dobryansky, M., Levine, J. P., and Gurtner, G. C., "Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing," *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, (2004), V. 12, n° 4, 485–492.
233. Wang, T., Zhu, X. K., Xue, X. T., and Wu, D. Y., "Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings," *Carbohydrate Polymers*, (2012), V. 88, n° 1, 75–83.
234. Cooper, R. and Jenkins, R., "Are there feasible prospects for manuka honey as an alternative to conventional antimicrobials?," *Expert Review of Anti-infective Therapy*, (2012), V. 10, n° 6, 623–625.

235. Maddocks, S. E. and Jenkins, R. E., "Honey: A sweet solution to the growing problem of antimicrobial resistance?," *Future Microbiology*, (2013), V. 8, n° 11, 1419–1429.
236. Combarros-Fuertes, P., Estevinho, L. M., Dias, L. G., Castro, J. M., Tomás-Barberán, F. A., Tornadijo, M. E., and Fresno-Baro, J. M., "Bioactive Components and Antioxidant and Antibacterial Activities of Different Varieties of Honey: A Screening Prior to Clinical Application," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2019), V. 67, n° 2, 688–698.