

République Algérienne Démocratique & Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur & de la Recherche Scientifique

Université de BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie des Populations et Organismes

Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : Phytothérapie et Santé

THEME

**EVALUATION DU POTENTIEL CICATRISANT DU MIEL ET SON
APPLICATION DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE**

Présenté par : M. OUSENNA NACIM

Devant le jury :

Mme. BENMANSOUR.N	MAA	UB1	Présidente
Melle GHANAÏ.R	MAA	UB1	Examinatrice
Mme. CHERIF.H.S	MCB	UB1	Promotrice
Mme. AYACHI.N	MAA	UB1	Co promotrice
Mme. NOUAR.N	Pr	CHU Beni Messous	Invitée

Année Universitaire 2015-2016

Remerciements

Je tiens à remercier Mme CHERIF.H.S, Maître assistante à l'université de Blida, pour avoir accepté de m'encadrer et pour ses précieux conseils.

J'exprime mes sincères remerciements à Mme BENMANSOUR.N, Maître assistante à l'université de Blida, Présidente de jury et au membre de jury d'avoir accepté de juger et d'évaluer mon présent travail.

Je tiens également à adresser un remerciement à Mme AYACHI Nabila, Maître assistante à l'université de Blida pour sa disponibilité et ses précieux conseils.

Mes remerciements vont aussi à Mademoiselle BOUCHAREB Siham du laboratoire de microbiologie CRD SAIDAL, Monsieur DAHMAN Moussa de l'animalerie CRD SAIDAL, mon ami et collègue Monsieur OUAZIB Farid qui m'ont aidé à réaliser ce modeste travail.

Je tiens également à adresser un remerciement à Monsieur IMOUDACH Hichem, maître assistant et à Madame HALLI Latifa pour leurs précieux conseils et aides.

Je remercie aussi le personnel du laboratoire Anatomie/Pathologie du CHU de Beni Messous : Madame NOUAR Nouria Professeur pour sa disponibilité et sa gentillesse, Professeur SLIMANI pour sa collaboration, sans oublier Madame YESRI pour son aide.

Enfin, je désire remercier profondément toute ma famille et plus particulièrement ma femme, merci de m'avoir soutenue, encouragée, merci tout simplement d'avoir été là. Quant à ma chère mère et ma chère sœur, merci pour votre bienveillance et vos encouragements.

A mon cher défunt Père

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u> : Recommandations et exigences internationales sur la qualité analytique du miel.....	3
<u>Tableau II</u> : Classification des plaies selon leur l'évolution bactériologique.....	8
<u>Tableau III</u> : Classification des plaies selon leur degré de propreté.....	9
<u>Tableau IV</u> : Caractéristiques des différentes souches utilisées	19
<u>Tableau V</u> : Formule qualitative et quantitative du gel à base de miel	27
<u>Tableau VI</u> : Formule qualitative et quantitative de la crème à base de miel.....	28
<u>Tableau VII</u> : Différente étapes de déshydratation des tissus.....	37
<u>Tableau VIII</u> : Valeurs du pH, Acidité libre, Acidité lié, Acidité totale.....	41
<u>Tableau IX</u> : Résultats de la CCM.....	41
<u>Tableau X</u> : Valeurs des indices de réfraction.....	42
<u>Tableau XI</u> : Valeur de la conductivité électrique.....	42
<u>Tableau XII</u> : Teneur en HMF du miel de thym (sans dilution).....	43
<u>Tableau XIII</u> : Teneur en HMF du miel de thym (après dilution).....	43
<u>Tableau XIV</u> : Valeur de la teneur en eau.....	43
<u>Tableau XV</u> : Valeur de l'osmolarité.....	44
<u>Tableau XVI</u> : Distribution granulométrique des particules dans l'émulsion à T0.....	44
<u>Tableau XVII</u> : Evolution du pH en fonction du temps à 25°C.....	45
<u>Tableau XVIII</u> : Les diamètres des zones d'inhibitions des différentes souches (en mm) par la méthode des puits.....	48
<u>Tableau XIX</u> : Evolution de la contraction de la plaie en fonction du temps en pourcentage.....	50
<u>Tableau XX</u> : Observations au microscope optique effectuées sur les coupes histologique.....	57

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Etape inflammatoire, afflux des neutrophiles et des macrophages dans la plaie.....	12
Figure 2 : Ré épithélialisation avec les kératinocytes.....	13
Figure 3 : Phase de maturation.....	13
Figure 4 : Technique de préparation des boîtes de Pétri.....	33
Figure 5 : Etapes de préparation des rats.....	35
Figure 6 : Différentes étapes d'inclusion à la paraffine solide.....	38
Figure 7 : Rhéogramme de la crème à base de miel.....	45
Figure 8 : Variation de la viscosité apparente de la crème à base de miel.....	46
Figure 9 : Rhéogramme du gel à base de miel.....	46
Figure 10 : Variation de la viscosité apparente du gel à base de miel.....	47
Figure 11 : Antibiogramme des différentes souches.....	48
Figure 12 : Evolution de la contraction des plaies traitées (crème) et non traitées.....	51
Figure 13 : Evolution de la contraction des plaies traitées (gel) et non traitée.....	52
Figure 14 : Evolution de la contraction des plaies traitées (miel, madécassol) et non traitée...53	
Figure 15 : Evolution de la contraction des plaies traitées et non traitée.....	56
Figure 16 : coupe histologique de la peau traitée avec le miel pur, vu au MO (x40).....	59
Figure 17 : coupe histologique de la peau traitée avec le gel, vu au MO (x40).....	60
Figure 18: coupe histologique de la peau traitée avec la crème, vu au MO (x40).....	60
Figure 19 : coupe histologique de la peau traitée avec le madécassol, vu au MO (x40).....	61
Figure 20 : coupe histologique de la peau non traitée, vu au MO (x40).....	61
Figure 21 : coupe histologique de la peau traitée avec le crème sans miel, vu au MO (x40)...62	
Figure 22 : coupe histologique de la peau traitée avec le gé l sans miel, vu au MO (x40).....	62

GLOSSAIRE

A

Acide gluconique : est obtenu par l'oxydation de la fonction aldéhyde du glucose, donc sur le carbone n°1.

Angiogenèse : Processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants.

C

Catécholamine : est une molécule produite par un acide aminé, la tyrosine, qui agit en tant qu'hormone ou neurotransmetteur. Elle est sécrétée par la glande médullosurrénale. Parmi les catécholamines, on trouve l'adrénaline et la dopamine.

Collagène : est une famille de protéines, le plus souvent présente sous forme fibrillaire. Elle est présente dans la matrice extracellulaire des organismes animaux. Ces protéines ont pour fonction de conférer aux tissus une résistance mécanique à l'étirement.

Contusion : est une lésion d'une partie du corps, entraînant une douleur sans qu'aucun stigmate du traumatisme ne soit visible. Elle fait généralement suite à un choc plus ou moins violent.

D

Détersion : La détersion intervient lors des phases nécrotique et fibreuse. Son objectif est d'éliminer les débris (tissus morts, sang coagulé, fibrine...) qui encombrant le fond de la plaie et empêche la cicatrisation. C'est un préalable indispensable à la cicatrisation.

E

Enzyme protéolytique : Enzyme qui brise les liaisons peptidiques des protéines. On parle alors de coupure protéolytique ou de protéolyse. Ce processus implique l'utilisation d'une molécule d'eau, ce qui les classe parmi les hydrolases.

Epithélialisation : reconstruction de l'épithélium (tissu mince formé de couches de cellules juxtaposées qui recouvre le corps, les cavités internes ou constitue les glandes) lors de la cicatrisation.

F

Fibrine : La fibrine est une protéine filamenteuse qui dérive du fibrinogène (protéine qui intervient, entre autres, dans le mécanisme de la coagulation).

Fibrinolyse : est un processus physiologique complexe de dissolution des caillots sanguins (constitués de fibrine) par la plasmine. Ce processus clôturait la coagulation sanguine afin de reperméabiliser les vaisseaux sanguins réparés et sert à empêcher la formation de thromboses.

G

Glandes hypopharyngiennes : Structures glandulaires situées dans la tête d'une abeille ouvrière adulte qui produisent des sécrétions protéinées, qui sont données en nourriture au couvain, et aussi différents enzymes qui servent à la conversion du nectar en miel.

H

Histamine : amine naturelle, est une molécule de signalisation du système immunitaire, de la peau, de l'estomac et du cerveau des vertébrés.

J

Jabot : Poche formée par un renflement de l'œsophage, utilisée par les abeilles ouvrières butineuses comme réservoir à nectar lors des prélèvements au niveau des fleurs et du transport jusqu'à la ruche. Il a une capacité de 50 à 70 µl.

K

Kétamine : Le chlorhydrate de kétamine est une molécule utilisée comme anesthésique général en médecine humaine et en médecine vétérinaire. Elle est également utilisée comme analgésique et sédatif, ainsi que pour traiter les douleurs chroniques.

Kératinocytes : sont des cellules constituant 90 % de la couche superficielle de la peau (épiderme) et des phanères (ongles, cheveux, poils, plumes, écailles). Ils synthétisent la kératine (kératinisation), une protéine fibreuse et insoluble dans l'eau, qui assure à la peau sa propriété d'imperméabilité et de protection extérieure.

L

Lysosomes : sont des organites cellulaires de 0,2 à 0,5 micron présents dans le cytosol de toutes les cellules eucaryotes, tant animales que végétales ¹, à l'exception des hématies (« globules rouges »). Ils ont pour fonction d'effectuer la digestion intracellulaire (ou extracellulaire via exocytose dans le cas des chondroblastes, ostéoclastes et macrophages) grâce à des enzymes, dont des lipases, des protéases, des nucléases, des glycosidases, des phosphatases et des sulfatases.

M

Métalloprotéinase : Constitue une famille d'enzymes de la classe des peptidases, appelées ainsi en raison de la présence dans leur site actif d'un ion métallique, qui participe à la catalyse de la coupure de la liaison peptidique dans les protéines.

Myofibroblastes : sont des fibroblastes possédant la particularité d'exprimer l'actine α -SMA. Ils jouent un rôle important dans la plasticité, la migration et la motilité de la cellule au sein du tissu conjonctif.

N

Nectar : Suc sécrété généralement par les nectaires (glandes) des plantes, soit directement par les cellules épithéliales ou les trichomes, soit indirectement, via les stomates par le parenchyme foliaire, pouvant être considéré comme de la sève élaborée modifiée pendant la phase d'excrétion.

Neutrophile : Les granulocytes neutrophiles ou polynucléaires neutrophiles ou simplement « les neutrophiles ») sont des cellules sanguines appartenant à la lignée blanche (leucocytes), qui ont donc un rôle dans le système immunitaire. On les appelle polynucléaires de par le caractère lobé de leur noyau (de deux à cinq lobes en général), on a longtemps cru que ces cellules possédaient plusieurs noyaux. Le qualificatif de « neutrophile » vient aussi d'une caractéristique visible en microscopie optique : après ajout des colorants vitaux usuels (May-Grünwald Giemsa ou MGG), ces cellules restent neutres (elles fixent mal les colorants acides et basiques). Les autres granulocytes sont les granulocytes éosinophiles et basophiles. Les neutrophiles représentent à eux seuls environ 65 % de l'ensemble des leucocytes du sang, et 99 % des granulocytes.

O

Osmolarité : est définie comme le nombre de particules osmotiquement actives par litre de solution, c'est-à-dire, plus exactement, le nombre de moles en solution qui interviennent dans la pression osmotique s'exerçant sur une membrane lorsque le phénomène d'osmose se produit.

P

Phagocytose : est le processus cellulaire par lequel certaines cellules regroupées sous la dénomination générale de phagocytes peuvent ingérer des particules étrangères solides d'échelle micrométrique.

S

Solution de continuité de la peau : Le terme solution de continuité signifie « rupture, interruption qui se présente dans la continuité de la peau.

Sérineprotéase : Elles sont appelées protéases à sérine car leur site actif contient un résidu de sérine qui joue un rôle essentiel dans la catalyse.

Sérotonine : La sérotonine provoque soit une vasoconstriction par effet 5-HT₂, en particulier des vaisseaux rénaux, soit une vasodilatation. La réponse dépendrait du tonus préalable des vaisseaux et de leur état normal ou pathologique.

T

Tension de vapeur : Pression de vapeur saturante. La pression de vapeur saturante (ou tension de vapeur) est la pression à laquelle la phase gazeuse de cette substance est en équilibre avec sa phase liquide ou solide. Sa valeur dépend essentiellement de la température.

Tissu conjonctif : Les tissus conjonctifs (TC) sont des tissus dont les cellules sont séparées par une matrice extracellulaire, contrairement aux épithéliums où les cellules sont jointives.

Tissu de granulation : Par granulation (lat. *granulum* = particule) on désigne en dermatologie et en chirurgie la formation de nouveau tissu conjonctif dans le cadre de la cicatrisation, fortement irrigué par des capillaires (petits vaisseaux sanguins). À cause de la présence de nombreux capillaires, la surface apparaît être granulaire.

V

Vasoconstriction : processus naturel qui consiste à diminuer le calibre des vaisseaux sanguins grâce à la contraction des fibres musculaires

Vasodilatation : est une augmentation de la taille (diamètre) des vaisseaux par dilatation. Cette dilatation est rendue possible par un relâchement des muscles qui composent la paroi des vaisseaux sanguins (artères et veines).

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE:

CHAPITRE I: Le Miel

I.1 Définition.....	1
I.2 Origine.....	1
I.3 Qualité du miel.....	2
I.3.1 Caractéristique physicochimique du miel.....	2
I.3.2 Caractéristique physicochimique du miel à usage pharmaceutique.....	3
I.3.3 Propriétés du miel pour une utilisation cutanée (effet cicatrisant).....	6

CHAPITRE II : Plaie et cicatrisation

II.1 Définition des plaies cutanée.....	7
II.2 Classification des plaies cutanées.....	7
II.3 Cicatrisation cutanée.....	9
II.3.1 Les différentes phases de la cicatrisation.....	10
II.3.1.1 Processus inflammatoire.....	10
II.3.1.2 La phase de réparation.....	10
II.3.1.3 La phase de maturation.....	11

CHAPITRE III : Les préparations semi-solides pour application cutanée

III.1 Généralité.....	14
III.1.1 Les préparations semi-solides monophasique.....	14
III.1.2 Les préparations semi-solides multiphasiques.....	15

PARTIE EXPERIMENTAL :

CHAPITRE I : Matériel et Méthode

I.1 Matériels.....	18
I.1.1 Matériel biologique.....	18
I.1.2 Matériel non biologique.....	19
I.2 Méthode.....	19
I.2.1 Contrôle qualité du miel de thym.....	19
I.2.2 Formulation.....	27
I.2.2.1 Formulation d'un gel à base de miel.....	27
I.2.2.2 Formulation d'une crème à base de miel.....	28
I.2.2.3 Contrôle réalisé sur les deux formes galéniques.....	29
I.2.3 Evaluations de l'activité antimicrobienne.....	31

I.2.4 Evaluations de l'activité cicatrisante.....	34
I.2.4.1 Protocole d'étude de la cicatrisation chez les rats.....	34
I.2.4.2 Lecture macroscopique et microscopique.....	36

CHAPITRE II : Résultats et discussions

II.1 Résultats du contrôle qualité du miel de thym.....	41
II.2 Résultats des contrôles réalisés sur les deux formes galéniques.....	44
II.3 Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	47
II.4 Evaluation de l'activité cicatrisante.....	49

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Absract:

The use of honey in cicatrization is widespread around the world. To ease the implementation, we put it in two dosage forms: gel and cream. The effectiveness of two forms relative to pure honey led us to evaluate the antimicrobial and antifungal activity, as well as to a review of the healing activity that encompasses a macroscopic study (Flatness) and a microscopic study (Histology).

Keywords: thyme honey, honey-based gel, honey-based cream, wound healing

Résumé :

L'utilisation du miel dans la cicatrisation est répandue à travers le monde. Afin de faciliter son application, nous l'avons mis sous deux formes galéniques : gel et crème. L'efficacité des deux formes par rapport au miel pur nous a conduits à une évaluation de l'activité antimicrobienne et antifongique ainsi qu'à une évaluation de l'activité cicatrisante qui englobe une étude macroscopique (Planimétrie) et une étude microscopique (Histologique).

Mots clés: miel de thym, gel à base de miel, crème à base de miel, cicatrisation.

ملخص

إن استعمال العسل لإلتئام الجروح شائع في مختلف أنحاء العالم ، ولتسهيل قمنا ,استعماله للقطريات ,فضلا عن بتحضير مرهم و موهلا بالعسل. لمعرفة فعالية هذا الشكلين بالنسبة إلى العسل الصافي ,قمنا بتقييم فعاليتهما كمضادات للميكروبات و كمضادات استعراض نشاط الجرح شفاء الذي يشمل دراسة عينة البشرة دراسة سطحية ودراسة مجهرية(علم الأنسجة)

كلمات البحث:

التئام الجروح ، مرهم بالعسل ، عسل الزعتر، هلام بالعسل

INTRODUCTION

Le miel est un allié pour la cicatrisation. En ce moment, son utilisation est de plus en plus fréquente en milieu hospitalier, il est utilisé principalement pour la cicatrisation de deuxième intention : plaies post opératoires, brûlures, ulcères et escarres (**RIGAL, 2012**).

Le développement d'une infection dans une plaie peut en effet ralentir voire interrompre le processus de cicatrisation d'où l'importance des propriétés antibactériennes du miel utilisé comme agent cicatrisant (**Al-Waili et al., 2011**).

Après de longue recherche bibliographique sur le pouvoir cicatrisant et antibactérien des miels, nous avons trouvé que les nectars issus de plantes telles la lavande et *surtout le thym*, avaient une importante activité antibactérienne et cicatrisante (**RIGAL, 2012**). Cette synthèse nous a permis de choisir le type de miel sur lequel sera portée notre étude.

Malgré tout ces avantages, l'utilisation du miel brut sur une plaie a des inconvénients d'ordre pratique tel que :

- L'effet collant qui est désagréable pour le patient,
- Le phénomène de cristallisation qui rend l'application du miel difficile,
- Sa viscosité qui change avec la température et les conditions de stockage,
- L'osmolarité élevée et l'acidité du miel pourraient être à l'origine de sensations désagréables de picotements et de brûlures localisées de courte durée (**Tomczak, 2010**).
- Son nettoyage difficile sur une plaie

C'est pour ces raisons que le Centre de Recherche et de Développement du Groupe Sidal a jugé intéressant d'inscrire un projet de recherche afin de développer une forme galénique à base de miel pour une utilisation plus pratique pour les patients. Ce projet de recherche a été validé par les membres de la commission recherche du conseil scientifique du Groupe Sidal, constituée d'éminents professeurs.

Pour mon projet de fin d'étude, nous avons choisie de développer deux formes galéniques : une crème à base de miel de thym et un gel à base de miel de thym. L'objectif est d'évaluer l'efficacité de l'une ou de l'autre par rapport au miel brut, en faisant une étude comparative. Ce travail constitue une partie du projet de recherche sus cité, d'où la confidentialité de quelques donnés.

La première partie de ce travail présente une synthèse bibliographique sur : le miel, les plaies et cicatrisation et les préparations semi-solides pour application cutanées.

La seconde partie est expérimentale, elle correspond au contrôle qualité du miel de thym selon la pharmacopée européenne 2014, 8^{ème} édition suivi de la formulation de la crème et du gel avec leurs différents contrôles.

Par la suite, d'une façon raisonnée et planifiée, nous avons évalué l'activité antimicrobienne, antifongique ainsi que l'activité cicatrisante des deux formes en les comparants au miel pur et au Madicassol à 1%, préconisée dans le traitement des plaies.

I.1. Définition

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

I.2. Origine

On distingue généralement deux origines de miel : le miel issu du nectar et le miel issu du miellat.

Une fois dans la ruche, nectar et miellat sont régurgités et passent dans le jabot d'une autre ouvrière avant d'être stocké dans les alvéoles. Sous l'effet de ses allers-retours entre la bouche et le jabot, ils subissent un processus complexe de transformation sous l'action des sucs digestifs : partiellement déshydratés, ils se transforment en pâte plus ou moins fluide qui, entreposés à l'intérieur des cellules, poursuivent leur lente transformation en miel. Dès que le miel ne contient plus qu'un peu moins de 20% d'eau, les abeilles obstruent les alvéoles avec de la cire (**ROMAN, GAUTHIER, 2009**).

L'extraction par centrifuge ne fournit pas directement un miel prêt à la mise en pots. Pour obtenir un miel commercialisable, il est indispensable de l'épurer (**LOUVEAUX, 1985**). Selon **Prost (1987)**, la maturation signifie épuration, quand il s'agit du miel. Selon le même auteur, la maturation est une simple décantation dans un récipient où le miel abandonne ses impuretés (débris de cire, amas de pollen), ainsi que les bulles d'air incorporées pendant l'extraction. D'après **Louveaux (1985)**, la meilleure façon d'épurer le miel est encore de le laisser reposer pendant quelques jours dans un récipient appelé « maturateur ».

I.2.1. Miel issu du nectar

I.2.1.1. Miels mono-floraux

Les miels mono-floraux désignent les miels élaborés à partir de nectar butiné sur une espèce florale particulière en majorité, même si d'autres espèces végétales sont également présentes mais en petite quantité. Ils proviennent de ruches installées près d'une source de nectar bien

ciblée. Un miel dit mono-floral comprend donc au maximum entre 70 et 95% de substances issues du nectar et pollen de la même espèce végétale tel que le miel de sainfoin et Robinia (SAURY, 1981).

I.2.1.2. Miels poly-floraux

Les miels poly-floraux est une appellation qui désigne un miel élaboré à partir de nectar de fleurs très variées, sans prédominance d'une espèce végétale. Ce type de miel est souvent lié à un univers naturel particulier : plaine, montagne, forêt.

I.3. Qualité du miel

I.3.1. Caractéristiques physicochimiques du miel

Il est connu que les paramètres physico-chimiques des miels naturels, tels que le pH, teneur en eau, la composition en sucre, hydroxyméthylfurfural (HMF) contenu, la couleur, acidité et la conductivité électrique, représentent les indicateurs de qualité qui caractérisent chaque variété de miel.

Dans le tableau ci-après (Tableau I), figurent les exigences et les recommandations de l'Union Européenne et du Codex Alimentarius concernant le miel (MSDA, 2004) :

Tableau I : Recommandations et exigences internationales sur la qualité analytique du miel

Caractéristiques qualitatives	Exigences	Recommandations
	UE	Codex
Eau (g/100g) Miel, en général Miel de bruyère, miel de trèfle	max. 21 max. 23	max. 21 max. 23
Teneur apparente en sucres réducteurs (g/100 g) Miel de fleurs Miel de miellat ou mélanges avec miel de fleurs	min. 65 min. 60	min. 65 min. 60
Teneur apparente en saccharose (g/100 g) Miel en général Miel de miellat ou mélanges avec miel de fleurs (miel d'acacias, de lavande, de Banksia, d'Eucryphia)	max. 5 max. 10	max. 5 max. 10
Substances non hydrosolubles (g/100 g)	0,1	0,1
Sels minéraux (g/100g) Miel en général Miel de miellat ou mélanges de miel de fleurs	max. 0,6 max. 1	max. 1 pas d'indication
Acides libres (milliéquivalents/kg)	40	40
Indice d'amylase (en unités de Schade) Miel en général Miels pauvres en enzymes, comme le miel d'acacias, de fleurs d'oranger	min. 8 min. 3	min. 3 pas d'indication
Hydroxyméthylfurfural (mg/kg)	max. 40	max. 80

(Source : MSDA, 2004)

I.3.2. Caractéristiques physicochimiques du miel à usage pharmaceutique

Avant d'utiliser le miel produit par l'abeille dans l'industrie pharmaceutique, il doit subir des tests pour qu'il soit conforme à cet usage. La monographie du miel est décrite dans la Pharmacopée Européenne 2014, 8^{ème} édition, élaboré par la Direction Européenne de la Qualité du Médicament et Soins de Santé.

➤ **Aspect**

Le miel a un aspect visqueux qui peut être partiellement cristallin, sensiblement blanc à brun sombre (**Pharmacopée européenne 2014, 8^{ème} édition**).

➤ **Composition en sucre**

ANUPAMA et al. (2002) révèle que le glucose et le fructose sont les principaux constituants de sucre dans le miel. Le fructose et le glucose proviennent de l'hydrolyse du saccharose. Cette hydrolyse se fait soit par le biais de l'acidité du miel, soit par une enzyme, l'invertase, produite par l'abeille. Les sucres proviennent du nectar ou du miellat (**DOMEREGO, et al., 2009**).

➤ **Indice de réfraction (IR)**

L'indice de réfraction est une propriété optique qui caractérise toute substance transparente. Il est en fonction de la teneur en eau et de la température (**LOUVEAUX, 1985**). Il doit être au minimum 1.487 (équivalent à une teneur en eau maximale de 20%).

➤ **Teneur en eau**

La teneur en eau change en fonction des fleurs butinées, de la saison, du nombre d'ouvrières et de la méthode d'extraction.

➤ **Conductivité électrique**

La conductivité électrique est un excellent critère de détermination de l'origine botanique du miel. Cette mesure est liée à la teneur en minéraux et à l'acidité du miel. Des travaux de recherches de **SURENDRA et al., (2000)** ont montré qu'il existe une relation linéaire entre ces trois paramètres.

➤ **5-Hydroxyméthylfurfural (HMF)**

L'HMF est un sucre issu de la dégradation du fructose. Son taux le plus faible, c'est-à-dire à l'état de trace, se trouve lors de la récolte (1 à 3mg/kg) (**ADAM, et al., 1974**). Ce taux augmente avec l'élévation de la température et le vieillissement du miel (**ACCORTI, et al., 1987**).

Le principal critère d'évaluation mesurable de la qualité du miel est la concentration en HMF. L'apparition de ce composé est le résultat de la transformation des sucres simples et plus particulièrement du fructose en hydroxyméthylfurfural. L'acidité et une teneur en eau élevées favorisent cette transformation, ainsi qu'un entreposage prolongé du miel (**ACCORTI, et al., 1987**).

➤ **Chlorures**

Il s'agit d'un test pour détecter la présence ou l'absence des ions chlorures dans le miel par observation macroscopique (**Pharmacopée européenne 2014, 8^{ème} édition**).

➤ **Sulfates**

Il s'agit d'un test pour détecter la présence ou l'absence des ions sulfates dans le miel par observation macroscopique (**Pharmacopée européenne 2014, 8^{ème} édition**).

I.3.3. Propriétés du miel pour une utilisation cutanée (effet cicatrisant)

➤ **pH**

Le pH du miel permet de maintenir des conditions optimales pour l'activité fibroblastique. Selon **Schweitzer (2005)**, les miels de nectar ont un pH compris entre 3,5 et 4,5. Les miels de miellats, moins acides, ont un pH supérieur à 4,5.

➤ **L'osmolarité**

Le miel a un effet osmotique qui permet de drainer le plasma et la lymphe (qui peuvent contenir des éléments favorisant la reconstitution cutanée) à partir des tissus sous-jacents. De plus, cette osmolarité favorise l'exsudation donc la diminution de l'œdème au sein de la plaie.

➤ **Les sucres**

Les sucres et notamment le fructose présents dans le miel, améliorent localement la nutrition de la plaie et donc accélèrent le processus d'épithélialisation. Les cellules impliquées dans le processus de cicatrisation trouvent, grâce à ces sucres, une source d'énergie supplémentaire qui contribue à leur bon fonctionnement (**FERFARA, 1990**).

➤ **Le peroxyde d'hydrogène**

La glucose-oxydase est une enzyme sécrétée par les glandes hypopharyngiennes de l'abeille qui transforme le glucose en présence d'eau et d'oxygène, en peroxyde d'hydrogène et la δ -gluconolactone.

Encore appelée eau oxygénée, le peroxyde d'hydrogène joue un rôle dans la détersion des plaies. Lorsqu'il est en contact avec des tissus et du sang, il se décompose en eau et oxygène, ce qui crée une « micro effervescence » et un nettoyage mécanique de la plaie (**SAURY., 1981**).

➤ **Vitamines et oligoéléments**

Les vitamines du groupe B stimulent la régénération cellulaire et contribuent à l'hydratation de la peau.

L'acide pantothénique ou vitamine B5 stimule la croissance cellulaire et de ce fait, réduit le temps de cicatrisation des plaies et favorise la granulation au niveau des lésions.

L'acide ascorbique ou vitamine C stimule la synthèse de collagène et ainsi améliore le micro relief cutané.

Les oligoéléments jouent un rôle important à différents stades de la cicatrisation (DOMEREGO, et al., 2009).

➤ **Propriétés biologiques et pharmacologiques**

• **Activité antibactérienne et antifongique**

L'activité antibactérienne est plus importante quand le miel est administré de façon topique, directement sur les zones contaminées (KOC AN, et al., 2011).

Le miel en concentration allant de 5 à 80% a des effets inhibiteurs contre *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* et *Trichosporon spp.* Ces effets contre les levures s'avèrent néanmoins moins intéressants que ceux de la propolis et du pollen (VAN DEN BERG, et al., 2008).

• **Activité antioxydante**

Les enzymes, les acides organiques, les peptides mais surtout les composés phénoliques, les pigments flavonoïdes et caroténoïdes jouent le rôle d'antioxydants (MOLAN, 2001).

➤ **Innocuité du miel**

Un certain nombre d'études histologiques examinant les tissus lésés confirme que l'usage du miel est sûr (ALLEN, et al., 1991). Il existe un risque hypothétique de contamination et de transmission de botulisme car le miel peut parfois contenir des spores de *Clostridium butulinum*. Mais le moindre risque de contamination peut être éliminé par des irradiations gamma afin de tuer les spores de *Clostridium* et ceci, sans affecter l'activité antibactérienne (ALLEN, et al., 1991).

II.1. Définition des plaies cutanées

Les plaies cutanées sont des effractions cutanées traumatiques ou chirurgicales caractérisées par une solution de continuité de la peau, à la différence des contusions dans lesquelles le revêtement épithélial reste intact. Par extension, les plaies cutanées comprennent également les brûlures (TOMCZA, 2010).

II.2. Classification des plaies cutanées

Actuellement, il n'existe pas de classification officielle des plaies. L'évaluation précise d'une plaie est indispensable au clinicien pour prévoir son évolution et les risques de complications et pour mettre en œuvre un traitement approprié.

Les plaies peuvent être classées en fonction (WHITE, 1999) :

- ✓ De la nature lésionnelle (coupure, abrasion, piqûre, escarres, brûlure, etc.),
- ✓ De l'étiologie (plaie chirurgicale, plaie accidentelle ou traumatique),
- ✓ Des tissus lésés (plaie simple, plaie composée, pénétrante ou non),
- ✓ Des caractéristiques physicochimiques,
- ✓ Des caractéristiques bactériologiques : les plaies peuvent être divisées en trois classes (Tableau II) selon leur évolution bactériologique dans le temps (SWAIM, HENDERSON, 1997) :

Tableau II : Classification des plaies selon leur évolution bactériologique

Classes	Evolution de la plaie dans le temps	Observations
Classe 1	De 0 à 6 Heures	Contamination de la plaie est minime : - la multiplication bactérienne subit un temps de latence inhérent à toute culture bactérienne. - pouvoir antitryptique du sérum qui empêche la libération des constituants cellulaires servant de nutriments aux bactéries.
Classe 2	De 6 à 12 Heures	Plaie contaminée : - modification tissulaire et le pH de la plaie fournissent des conditions favorables à la multiplication des bactéries dans les tissus morts.
Classe 3	Après 12 Heures	Plaie infectée : -les bactéries se multiplient dans les tissus vifs.

(Sources : SWAIM, HENDERSON, 1997)

- ✓ De la propreté (Tableau III), selon la classification d'ALTEMEIER (MASON L.K., 1993) :

Tableau III : Classification des plaies selon leur degré de propreté

Degré de Propreté	Type de plaie	Risque d'infection en %
Plaie propre	Créée chirurgicalement dans des conditions aseptiques, en l'absence d'ouverture des tractus respiratoire, gastro-intestinal ou uro-génital.	2.5%
Plaie propre- contaminée	Créée chirurgicalement avec effraction du tractus respiratoire, gastro-intestinal ou uro-génital mais sans contamination significative. Faute d'asepsie mineure.	4.5%
Plaie contaminée	Plaie traumatique récente (moins de 4 à 6 heures). Créée chirurgicalement avec effraction du tractus respiratoire, gastro-intestinal ou uro-génital avec contamination majeure. Créée chirurgicalement avec incision d'un foyer inflammatoire non purulent. Faute d'asepsie majeure.	5.8%
Plaie sale et infectée	Plaie traumatique ancienne (plus de 6 heures). Créée chirurgicalement en présence d'un processus abcédatif. Plaie accompagnée de corps étrangers et d'une quantité importante de tissus mortifié ou avec perforation de viscère.	18.1%

(Sources : MASON L.K., 1993)

II.3. Cicatrisation cutanée

La cicatrisation cutanée fait intervenir une succession de mécanismes biochimiques et cellulaires qui concourent à la restauration de la continuité de la peau et de la majorité de ses fonctions. Ces mécanismes se résument en un processus inflammatoire spécifique au tissu cutané qui se termine par la mise en place d'un tissu conjonctif cicatriciel très fibreux (MOISSONIER, 2002).

II.3.1. Les différentes étapes de la cicatrisation

En général la cicatrisation passe par quatre étapes dont les deux premiers peuvent être réunies au sein d'un même processus inflammatoire. Cette division est arbitraire car il existe des chevauchements entre les différentes étapes au cours de la cicatrisation (**JOHNSTON, 1992**).

II.3.1.1. Processus inflammatoire

Ce processus apporte des nutriments à la zone lésée, permet d'éliminer les bactéries et les débris présent dans la plaie et de fournir les stimuli nécessaires à l'étape ultérieure de réparation (**JOHNSTON, 1992**).

Phase vasculaire

Cette phase ne dure que quelques heures (environ 6 heures) après le traumatisme. On note d'importantes modifications vasculaires et biochimiques au niveau des endroits lésés mais aucune modification morphologique. En effet, une vasoconstriction se met en place sous l'effet de molécules vaso-actives (les catécholamines, sérotonine) (**HOSGOOD, 2006**). Cette vasoconstriction est couplée aux mécanismes de coagulation afin de limiter les pertes sanguines (**FOWLER, 1993**). Après 5 à 10 min, la vasoconstriction est remplacée par une vasodilatation importante et une augmentation de la perméabilité vasculaire engendrant le passage d'un liquide proche du plasma contenant des enzymes, des protéines, des anticorps vers les tissus lésés (**HOSGOOD, 2006**).

Phase de détersion

Elle dure en moyenne 3 à 5 jours voir même plus car elle ne s'arrête que quand tous les obstacles à la cicatrisation tels que les bactéries, débris nécrotiques, corps étrangers, excès de fibrine ont été éliminés. Les mécanismes mis en œuvres (phagocytose, fibrinolyse, action des enzymes des lysosomes et des organites cellulaires) dans cette phase, concourent à la mise au propre de la plaie et à la préparation de la phase ultérieure de réparation (**JOHNSTON, 1992**).

II.3.1.2. Etape de réparation

Elle dure en général 10 à 15 jours. Cette étape englobe trois phases (**JOHNSTON, 1992**) :

a. Formation du tissu de granulation :

La formation du tissu de granulation est dû à deux mécanismes : la prolifération fibroblastique et la angiogénèse.

Les fibroblastes (cellules du tissu conjonctif) apparaissent en grande quantité après stimulation par les macrophages. Elles produisent de grandes quantités de collagène, d'élastine et d'autres éléments de la matrice cellulaire du derme. En même temps, les cellules qui tapissent l'intérieur des vaisseaux (cellules endothéliales) forment des bourgeons aux extrémités des capillaires lésés. Ces bourgeons dans le réseau de collagène en formation, donnent à la plaie un aspect rouge et granuleux, d'où le nom de cette phase. Cette prolifération s'arrête lorsque le tissu de granulation a comblé la perte de substance et que les fibroblastes ont atteint les berges de la plaie. Ce processus commence autour du 4^{ème} jour et se termine vers le 15^{ème} jour (AERTS, *et al.*, 2008).

b. Contraction de la plaie

Elle commence généralement dans les 5 à 9 jours suivant le traumatisme et permet la diminution de la taille de la plaie. Il s'agit d'un mouvement centripète de la peau environnante dans toute son épaisseur.

c. L'épithélialisation

Permet la restauration de l'épiderme qui constitue une barrière contre le dessèchement et les agressions du milieu extérieur ; elle débute dès lors qu'un tissu de granulation sain a été mis en place.

Les fibres de collagène se remodelent. Parallèlement, des cellules épithéliales apparaissent et migrent au bord de la plaie. La plaie ainsi se contracte et se recouvre de cellules épithéliales, ce qui correspond à la fermeture de la plaie par une cicatrice primaire, dont le teint est proche de celui de la peau qui l'entoure. La formation de cette cicatrice primaire s'achève autour du 21^{ème} jour, sauf dans les cas des plaies superficielles suturées de petite taille, où l'épithélialisation est visible après 24 heures (AERTS, *et al.*, 2008).

II.3.1.3. Etape de maturation

Elle débute entre le 17^{ème} et le 20^{ème} jour après le traumatisme et peut durer jusqu'à 6 mois, voire même plus. Elle permet à la cicatrice de retrouver les caractéristiques proches à celle d'une

peau saine (GREGORY, 1999). La cicatrice devient plus pâle du fait de la régression de la vascularisation mais également plus souple, plus solide et moins volumineuse. En effet, la production excessive de collagène lors des trois premières semaines d'évolution de la plaie confère à la cicatrice un aspect hypertrophique (JOHNSTON, 1992).

Une fois la cicatrice primaire formée, le collagène commence à se dégrader de façon importante et marque le début du remodelage de la cicatrice primaire. Au cours de cette phase, les berges de la plaie continuent à se contracter lentement grâce à l'action des myofibroblastes et au renforcement de l'union entre l'épiderme et le derme. Le résultat est que peu à peu, la cicatrice devient plus souple, plus lisse et plus douce au toucher. Ce remodelage aboutit à la formation de la cicatrice définitive au bout de 6 mois à un an ou plus (AERTS, et al., 2008).

La cicatrisation se termine avec cette phase au cours de laquelle la cicatrice aura acquis une résistance environ égale à 80% de celle de la peau saine (FOWLER, 1993).

La qualité de la cicatrice définitive dépend de sa taille, de sa situation et tout particulièrement de l'évolution initiale de la cicatrisation, d'où l'importance des soins et du suivi lors de la formation de la cicatrice primaire.

Une altération du processus de cicatrisation primaire d'une plaie aiguë peut conduire à la formation d'une plaie chronique et compliquée nécessitant des soins spécialisés avec des pansements et du matériel permettant une cicatrisation dite "dirigée", ou à la constitution d'une cicatrice anormale, peu esthétique et pouvant même présenter des séquelles fonctionnelles (AERTS. et al., 2008).

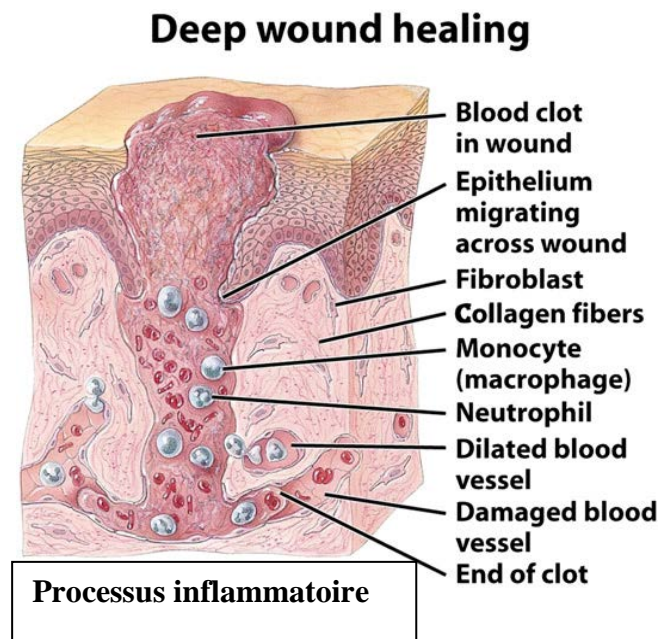


Figure 1 : Processus inflammatoire, afflux des neutrophiles et des macrophages dans la plaie. (JENKINS, 2006)

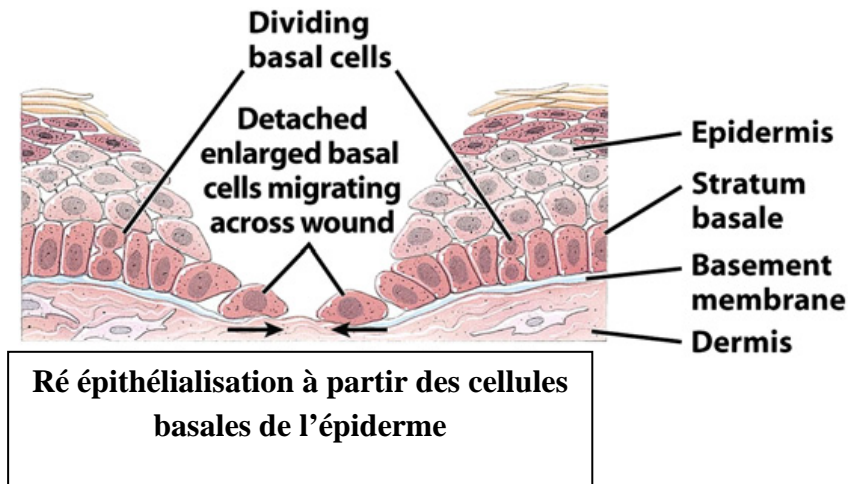


Figure 2 : Ré épithélialisation avec les kératinocytes. (JENKINS, 2006)

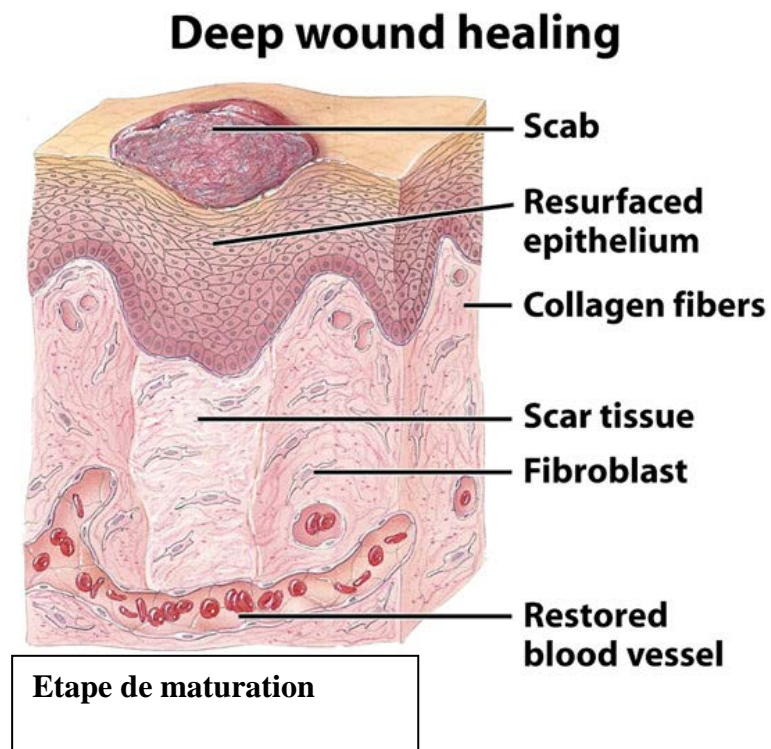


Figure 3 : Etape de maturation. (JENKINS, 2006)

III.1. Généralité

Ce sont des préparations de consistance semi-solide destinées à être appliquées sur la peau ou sur certaines muqueuses afin d'exercer une action locale ou de réaliser la pénétration percutanée de principes médicamenteux (ALLO, et *al.*, 2005).

Il existe deux types de préparation des produits de consistance semi-solide :

III.1.1. Les préparations semi-solides monophasiques

On distingue plusieurs préparations telles que les pommades, les pâtes et les gels.

III.1.1.1. Les pommade

L'appellation « pommade » peut être utilisée comme un terme général regroupant en fait diverses formes galéniques destinées à l'application cutanée.

En réalité, elle correspond à une définition précise : préparation qui contient un ou plusieurs principes actifs, sous forme solide ou liquide, dispersés ou dissouts dans un excipient à phase unique, soit hydrophile, soit lipophile.

III.1.1.2. Les pâtes

Ce sont des pommades contenant une forte proportion de poudre finement pulvérisée avant d'être dispersée dans l'excipient, il existe des pâtes lipophiles et des pâtes hydrophiles.

III.1.1.3. Les gels

Ceux sont des préparations constituées de liquides que l'on a gélifiés avec des excipients particuliers appelés gélifiants, qui peuvent être d'origines naturelle, semi-synthétique ou synthétique (ALLO, et *al.*, 2005). Il existe des gels hydrophobes mais la plupart sont hydrophiles.

- Gélifiant d'origine naturelle : (macromolécules polysaccharidiques)
 - Alginate, carraghénates (algues)
 - Gomme arabique, gomme adragante (sève des arbres)
 - Pectine, amidon, gomme de guar, caroube (grains, pépins)
 - Gel d'aloès (feuille)
- Gélifiant semi-synthétique : (polysaccharides, obtenus à partir de matières premières naturelles transformées)

- Dérivés de cellulose (l'hydroxypropyl méthylcellulose, carboxyméthylcellulose sodique, hydroxyéthylcellulose)
- Gélifiant synthétique : (résultent de l'association de multiples molécules d'acide vinylique)
 - Polymères carboxyvinyliques (Carbopol, Synthalen, Ultrez)

Ces préparations doivent être homogènes : les composants solubles ou insolubles doivent être parfaitement dissouts ou dispersés et non visibles à l'application.

III.1.2. Les préparations semi-solides multiphasiques

Ceux sont des préparations composées au moins d'une phase hydrophile et d'une phase lipophile.

Une émulsion est la dispersion d'un liquide sous forme de gouttelettes dans un autre liquide dans lequel il n'est pas miscible. En fonction de leur consistance, les émulsions, sont appelées crèmes (préparation de consistance ferme), lait (préparation de consistance fluide), cérats (phase lipophile constituée d'un mélange d'huile et de cire) (ALLO, et *al.*, 2005).

III.1.2.1. Les crèmes

On distingue :

- Les émulsions hydrophiles : la phase continue est aqueuse, les gouttelettes d'huile sont dispersées dans l'eau. On parle d'émulsion L/H.
- Les émulsions lipophiles : la phase continue est huileuse, les gouttelettes d'eau sont dispersées dans l'huile. On parle d'émulsion H/L.
- Les émulsions multiphasiques : ceux sont des émulsions où des particules aqueuses dispersées dans des gouttelettes d'huile, elles-mêmes dispersées dans un excipient hydrophile ou bien des particules huileuses dispersées dans des gouttelettes d'eau, elles-mêmes dispersées dans un excipient lipophile).

La préparation des émulsions passent par trois étapes qui sont (ALLO, et *al.*, 2005) :

- A- La préparation de la phase hydrophile,
- B- La préparation de la phase lipophile,
- C- Le mélange des deux phases (à une température égale entre les deux phases, éviter le refroidissement trop rapide),

D- L'émulsification, étape critique, permet de fractionner les gouttelettes dans la phase dispersée.

Pour la formulation d'une émulsion, on utilise principalement les tensioactifs ou agents de surface ou encore surfactifs, appelés en anglais « surfactant ».

Ces tensioactifs ont la propriété de s'adsorber aux interfaces et donc de diminuer la tension interfaciale eau/huile afin de permettre la dispersion des deux liquides non miscibles (augmentation de l'aire de l'interface).

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles, ils possèdent une partie polaire (hydrophile, lipophile, présentant une affinité pour l'eau) et une partie apolaire (hydrophobe, lipophile, présentant une affinité pour les huiles).

III.2. Etude rhéologique

La rhéologie est une branche de la physique qui étudie l'écoulement ou la déformation des corps sous l'effet des contraintes qui leurs aient appliquées. L'objet de la rhéologie est l'étude du comportement mécanique, mettant en relation deux grandeurs physiques : la contrainte (force par unité de surface agissant sur et dans le matériau) et la déformation (degré de la déformation induite par la contrainte) (COUARRAZE, *et al.*, 2000).

La rhéologie se décompose en plusieurs sortes d'études :

- Rhéologie expérimentale : détermination expérimentale des relations de comportement
- Rhéologie structurale : explication des comportements à partir de la structure du matériau
- Rhéologie théorique : fournir des modèles mathématiques en nombre limité des comportements indépendamment de la structure microscopique.

Pour notre cas, nous allons nous intéresser à la rhéologie expérimentale.

III.2.1. Classification des fluides selon leur comportement rhéologique (PORE, 1992)

On distingue deux catégories principales de fluides :

III.2.1.1. Fluides newtoniens indépendants du temps

Leur comportement rhéologique est indépendant de la durée de l'application de la contrainte. Ces fluides sont caractérisés par des droites passant par l'origine. Leur viscosité est constante et indépendante du taux de cisaillement pour la plupart des fluides usuels : eau, lait, jus de fruits naturels (non concentrés).

III.2.1.2. Fluides non newtoniens indépendants du temps

Un fluide non newtonien correspond à un fluide dont la viscosité dépend du taux de cisaillement. Concrètement lorsqu'on soumet un tel matériau à une contrainte de cisaillement, la réponse de ce fluide n'est pas proportionnelle, ce qui serait le cas pour un fluide newtonien. Il existe plusieurs types classiques de fluide non newtonien.

On distingue deux catégories de fluides non newtoniens indépendants du temps :

➤ **Fluides à contrainte seuil d'écoulement (fluide plastique)**

Il s'agit de fluide qui ne s'écoule qu'à partir d'une certaine valeur de la contrainte, appelée seuil d'écoulement. Au-delà de ce seuil, la structure rigide que possède le fluide est détruite et l'écoulement s'effectue sous l'effet de la contrainte effective. On distingue deux types de fluide plastique : les fluides de Bingham et les fluides de Casson.

➤ **Fluides sans contrainte seuil d'écoulement :**

✓ **Fluide rhéofluidifiant ou pseudo-plastique**

L'écoulement commence dès l'application de la contrainte, la viscosité du fluide décroît avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement.

✓ **Fluide rhéoépaississant ou dilatant**

Le comportement rhéoépaississant, inverse de la rhéofluidification, est assez rare. La viscosité augmente lorsque le taux de cisaillement augmente.

Il existe des fluides non newtoniens dépendants du temps mais qui ne concernent pas nos formules, aussi, nous avons jugé inutile de les citer.

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel biologique

Matériel issu du végétal :

- Miel de thym :
Origine : région de BENI MESTER, commune de la wilaya de TLEMCCEN. Le territoire de la commune de Beni Mester est situé au centre de la wilaya de Tlemcen, à environ 9 km à vol d'oiseau à l'Ouest de Tlemcen. Date de récolte : juillet 2015)
- Huile de lentisque de la région d'EL KALA, récolté durant l'année 2015.

Matériel animal :

- Rats mâles de la lignée Wistar provenant de l'animalerie du CRD-SAIDAL :
 - Poids : [180 g- 220 g]
 - Sexe : mâle
 - Alimentation : granulés dont l'origine est l'ONAB, Bejaia
 - Boisson : eau de robinet.

Les conditions d'hébergements :

- Température : 20 - 27 °C
- Eclairage : 12 heures
- Alimentation et boisson à volonté.

Microorganisme :

- Souches de références des bactéries Gram - et Gram + : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*.
- Levure : *Candida albicans*

Tableau IV : Caractéristiques des différentes souches utilisées

Souches de références		ATCC	Famille	
Bactéries	Gram -	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	Pseudomonodaceae
		<i>Escherichia coli</i>	4157	Enterobacteria
	Gram +	<i>Bacillus subtilis</i>	6051	Bacillaceae
		<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	Staphylococaceae
Levure		<i>Candida albicans</i>	24433	Saccharomycetaceae

I.1.2. Matériel non biologique

Le matériel utilisé au laboratoire (appareillage, verreries) est listé en annexe II.

I.2. Méthode

Dans le cadre de ce travail, nous avons opté pour la méthodologie suivante :

- ✓ Contrôle qualité du miel de thym
- ✓ Essais de formulation d'un gel à base de miel
- ✓ Essais de formulation d'une crème à base de miel
- ✓ Evaluation de l'activité antimicrobienne et antifongique du :
 - Gel à base de miel - gel sans miel
 - Crème à base de miel - crème sans miel
 - Miel de thym
- ✓ Evaluation de l'activité cicatrisante du : Gel à base de miel - gel sans miel
 - Crème à base de miel - crème sans miel
 - Miel de thym

I.2.1. Contrôle qualité du miel de thym

I.2.1.1. Acidité (libre, liée, totale)

a. Principe

Titrage au point d'équivalence à l'aide d'un potentiomètre (Photo en Annexe II).

L'acidité libre est obtenue en traçant la courbe de neutralisation avec une solution d'hydroxyde de sodium et détermine le pH au point d'équivalence.

L'acidité des lactones est obtenue par addition d'un excès d'hydroxyde de sodium à la solution de miel. Le titrage en retour avec l'acide sulfurique de l'excès de l'hydroxyde de sodium permet de tracer la courbe de neutralisation (**INTERNATIONAL HONEY COMMISSION, 2009**).

b. Mode opératoire

- 5g de miel sont pesés et dissouts dans quelques millilitres d'eau distillée, transférés puis complétés dans une fiole de 50 ml.
- Après avoir bien mélangé cette solution, 25 ml sont prélevés et versés dans le bécher du potentiomètre.
- Le liquide est agité puis dosé automatiquement avec l'hydroxyde de sodium à 0,05N.
- Le potentiomètre nous donne le premier point d'équivalence (en volume) qui correspond aux acides libres.
- On rajoute le reste de l'hydroxyde de sodium (jusqu'à 10 millilitres) et on opère un dosage potentiométrique en retour avec de l'acide sulfurique 0.05 N (**INTERNATIONAL HONEY COMMISSION, 2009**).

c. Expression des résultats

L'acidité libre est exprimée en milliéquivalents d'hydroxyde de sodium nécessaire pour porter à pH équivalent, 1000 grammes de miel :

$$\text{Acidité libre} : \frac{1000 \times V \times N}{M} = \text{milliéquivalent } \%$$

L'acidité due aux lactones est exprimée en milliéquivalents d'hydroxyde de sodium nécessaire pour 1000 grammes de miel :

$$\text{Acidité liée} : \frac{1000 \times [(10-V)N - 0,05 \times V']}{M} = \text{milliéquivalent } \%$$

L'acidité totale est exprimée en milliéquivalents d'hydroxyde de sodium et correspond à la somme des acidités libres et combinées de 1000 grammes de miel :

Acidité totale = Acidité libre + Acidité liée.

Soit :

V : le volume en millilitre d'hydroxyde de sodium versé pour atteindre le pH du point équivalent E lors de la neutralisation des ions d'hydrogène.

V' : le volume en millilitre d'acide sulfuriques pour atteindre le pH du point équivalent lors d'un dosage en retour.

N : la normalité de l'hydroxyde de sodium.

M : Prise d'essai.

I.2.1.2. Identification des sucres par Chromatographie Couche Mince (CCM)

a. Principe

La chromatographie sur couche mince est une technique de séparation dans laquelle une phase stationnaire, constituée d'un matériau approprié, est répandue en une couche mince et uniforme sur un support (plaque) de verre, de métal ou de plastique. Des solutions d'analyses sont appliquées sur la plaque avant le développement. La séparation repose sur les mécanismes d'adsorption, de partage ou d'échange d'ions ou sur des combinaisons de ces mécanismes (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2014**).

b. Mode opératoire

Solution à examiner : 1 g de miel est dissout dans 10 ml d'éthanol à 30% V/V.

Solution témoin : 1 g de fructose R, 1 g de saccharose R sont dissouts dans 20 ml d'éthanol à 30% V/V.

Plaque : plaque au gel de silice pour CCM.

Phase Mobile : eau R, acétonitrile R (13:87 V/V).

Dépôt : 5 μ L en bandes.

Développement : 3 fois sur un parcours de 15 cm.

Séchage : à l'air chaud.

c. Détection

On pulvérise une solution préparée comme suit :

2g de diphénylamine R et 2 ml d'aniline R sont dissouts dans 100 ml d'acétone R; on ajoute une solution d'acide phosphorique R à 850 g/L jusqu'à dissolution du précipité formé. On chauffe à 100-105 °C pendant 5-10 min, puis on examine à la lumière du jour (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2014**).

I.2.1.3. Indice de réfraction (IR)

a. Principe

L'indice de réfraction d'un milieu rapporté à l'air est égal au rapport du sinus de l'angle d'incidence d'un rayon lumineux dans l'air au sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré. L'indice de réfraction du miel est en fonction de la teneur en eau et de la température (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2014**).

b. Mode opératoire

- On introduit 100g de miel dans un ballon. On ferme hermétiquement et on place dans un bain-marie à 50°C ±0.2°C jusqu'à dissolution de tous les cristaux de sucres.
- On laisse la solution se refroidir à 20°C puis on homogénéise.
- Après 4 min et à l'aide d'une spatule, on dépose une goutte de miel sur le prisme du réfractomètre (Photo en Annexe II) puis on note la température du prisme.

Si la mesure a été effectuée à une température différente de 20°C, la lecture doit être corrigée pour ramener l'indice de réfraction à 20°C (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2014**).

La correction est additive, si la mesure est faite au-dessus de 20°C, soustractive dans le cas contraire. Le terme correctif est de 0,00023 par 1°C.

I.2.1.4. Conductivité

a. Principe

Le courant d'intensité I (en ampères) qui traverse un conducteur est directement proportionnel à la force électromotrice E (en volts) appliquée et inversement proportionnel à la résistance R (en ohms) du conducteur (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2014**) :

$$I (\mu\text{s/cm}) = \frac{E}{R}$$

b. Mode opératoire

- On utilise la valeur obtenue pour l'indice de réfraction pour déterminer la teneur en eau.
- On dissout une quantité de miel équivalent à 20 g de matière sèche dans de l'eau R, de façon à obtenir 100 ml de solution.
- On transvase cette dernière dans un bécher, dans lequel on place l'électrode du conductivimètre (Photo en Annexe II) et on note la conductivité (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2014**).

I.2.1.5. Dosage de l'HydroxyMéthylFurfural (HMF)**a. Principe**

L'absorbance (A) d'une solution est le logarithme décimal de l'inverse de la transmittance (T) pour un rayonnement monochromatique. Elle s'exprime par l'équation (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2014**):

$$A = \log_{10}(1/T) = \log_{10} (I_0 / I)$$

$$T = I / I_0,$$

I_0 = intensité du rayonnement monochromatique incident,

I = intensité du rayonnement monochromatique transmis.

b. Mode opératoire

- On utilise la valeur obtenue pour l'indice de réfraction pour déterminer la teneur en eau.
- Une quantité de miel équivalente à 5 g en matière sèche est dissoute dans 25 ml d'eau R et transvasée dans une fiole jaugée de 50 ml à l'aide du même solvant.
- On ajoute 0,5 ml d'une solution de ferrocyanure de potassium R à 150 g/l et 0,5 ml d'une solution d'acétate de zinc R à 300 g/l.
- On mélange et on complète à 50 ml avec de l'eau R.
- On filtre et on transfère 5 ml de la solution filtrée dans deux tubes à essais séparés.
- Dans l'un des tubes, on ajoute 5 ml d'eau R (solution à examiner) et dans l'autre tube, on ajoute 5 ml d'une solution de bisulfite de sodium R à 2 g/l (solution témoin).

- On détermine dans les 60 min l'absorbance de la solution à examiner par rapport à la solution témoin, à 284 nm et 336 nm.
- Si l'absorbance à 284 nm est supérieure à 0,8, on dilue, dans les mêmes proportions, la solution à examiner avec de l'eau R et la solution témoin avec une solution de bisulfite de sodium R à 2 g/l, de façon à obtenir une absorbance inférieure à 0,8 (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2014**).

c. Expression des résultats

$$(A_1 - A_2) \times D \times 149,7$$

Soit :

A_1 : absorbance à 284 nm;

A_2 : absorbance à 336 nm;

D : facteur de dilution, dans les cas appropriés.

La valeur obtenue de la concentration de l'HMF avec cette méthode ne reflète pas la concentration exacte car certains composés peuvent avoir une absorbance identique à celle du HMF, donc ils s'additionnent. De ce fait, on a utilisé une méthode de dosage mise au point et validée par le laboratoire de chimie analytique du CRD SAIDAL de l'HMF par HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY).

Le principe de l'HPLC repose sur une séparation des constituants d'un mélange même très complexe.

Un fluide appelé phase mobile parcourt un tube appelé colonne. Cette colonne contient des "granulés" poreux (colonne remplie), appelée phase stationnaire. A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne. Les constituants du mélange, appelés généralement « solutés », sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne.

De ce phénomène appelé rétention, il résulte que les constituants du mélange injectés se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés.

Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme.

Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise

qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permettent de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté.

- **Conditions chromatographiques**

Phase mobile : un mélange de 10 volumes de solution d'acétate d'ammonium R à 10 g/l et de 60 volumes de méthanol R

Débit : 1 ml/min

Température de la colonne : 25°C

Longueur d'onde du détecteur : 288 nm

Volume d'injection : 20 µl

- **Réactifs**

Acétate d'ammonium et Méthanol grade HPLC

Substance chimique de référence : 5 hydroxyméthylfurfural (5 HMF)

Miel de thym (5 gr/50 ml d'eau purifiée, filtré avec un filtre de porosité de 0.45 µm)

- **Système de chromatographie liquide à haute performance Waters Alliance**

Détecteur DAD

Logiciel Empower 3

Colonne en acier inoxydable, d'une longueur de 0,25 m et d'un diamètre intérieur de 4,6 mm, remplie de gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R (5 µm).

I.2.1.6. Teneur en eau par Réfractométrie

a. Principe

L'indice de réfraction d'un milieu rapporté à l'air est égal au rapport du sinus de l'angle d'incidence d'un rayon lumineux dans l'air au sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2014**).

b. Mode opératoire

On utilise la valeur obtenue de l'indice de réfraction pour déterminer la teneur en eau. Les indices de réfraction sont convertis selon le tableau qui représente la Table de Chataway (1932) (Tableau en Annexe I) en teneur en eau (**CHATAWAY, 1935**).

I.2.1.7. Test des chlorures**a. Principe**

Le test des chlorures est basé sur l'intensité de l'opalescence des tubes à essais.

b. Mode opératoire

- A 15 ml d'une solution de miel à 10 g/l, on ajoute 1 ml d'acide nitrique dilué R à 20 g/100 ml.
- On verse le mélange en une seule fois dans un tube à essais contenant 1 ml de solution de nitrates d'argent R à 17 g/l.
- On prépare le témoin dans les mêmes conditions en utilisant un mélange de 10 ml de solution à 5 ppm de chlorures (0.824 g de NaCl/l puis 1ml complété à 100 ml) et de 5 ml d'eau R.
- On examine latéralement les tubes à essais sur fond noir.
- Après 5 min à l'abri de la lumière, si la solution à examiner présente une opalescence, celle-ci n'est pas plus prononcée que celle du témoin (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2014**).

I.2.1.8. Test des sulfates**a. Principe**

Le test des sulfates est basé sur l'intensité de l'opalescence des tubes à essais.

b. Mode opératoire

- A 4,5 ml de la solution à 10 ppm de sulfates, on ajoute 3 ml d'une solution de chlorure de baryum R à 250 g/l.
- Après agitation, on laisse reposer pendant une minute; à 2,5 ml de cette solution, on ajoute 15 ml d'une solution de miel à 40 g/l et 0,5 ml d'acide acétique R.
- On prépare le témoin dans les mêmes conditions en utilisant 15 ml de solution à 10 ppm de sulfates, au lieu de la solution de miel.
- Après 5 min, si la solution à examiner présente une opalescence, celle-ci n'est pas plus prononcée que celle du témoin (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2014**).

I.2.2. Formulation

I.2.2.1. Formulation d'un gel à base de miel

a. Choix de la formule

Les excipients utilisés dans ce cadre ont été choisis en fonction de leurs rôles et en fonction de leurs disponibilités, l'idée étant de proposer un produit le plus naturel possible et dont les excipients font l'objet d'un achat commun au niveau du groupe SAIDAL.

Après plusieurs essais de formulation, nous avons opté pour la formule suivante :

Tableau V : Formule qualitative et quantitative du gel à base de miel

Constituants	Rôle	Formule centésimale (%)
Miel de thym	Principe actif	[60-80]
Alginate de Na	Gélifiant	[40-20]

b. Choix du procédé de fabrication

Le procédé de fabrication a été arrêté sur la base des propriétés du miel, des excipients et de l'expérience acquise dans le domaine pharmaceutique.

c. Description du procédé de fabrication

Afin d'optimiser ce procédé, plusieurs essais ont été réalisés avec différentes approches pour aboutir à un produit conforme. Les étapes de fabrication sont :

Etape 0 : Pesée des matières premières

Etape 1 : Préparation du gel d'alginate de Na :

- Disperser dans une quantité suffisante d'eau distillée l'alginate de Na en fine pluie sous agitation.

Etape 2 : Mélange du gel avec le miel :

- Mélanger le miel (préalablement chauffé à 40°C au bain-marie pendant 10 min) avec le gel d'alginate de Na.
- Ajouter le chlorure de calcium.

I.2.2.2. Formulation d'une crème à base de miel

a. Choix de la formule

Les excipients utilisés dans ce cadre ont été choisis en fonction de leurs rôles et de leur fonctionnalité.

Après plusieurs essais de formulation, nous avons opté pour la formule suivante :

Tableau VI : Formule qualitative et quantitative de la crème à base de miel

Constituants	Rôle	Formule centésimale (%)
Miel de thym	Principe actif	[70-80]
Huile de lentisque	Phase lipophile	[30-20]
Sorbitane monostearate	Tensioactif	
Polyoxyethylene sorbitan monostearate	Tensioactif	

b. Choix du procédé de fabrication

Le procédé de fabrication a été arrêté sur la base des propriétés du miel et de l'expérience acquise dans le domaine pharmaceutique.

c. Description du procédé de fabrication

Afin d'optimiser ce procédé, plusieurs essais ont été réalisés avec différentes approches pour aboutir à un produit conforme.

Etape 0 : Pesée des matières premières

Etape 1 : Préparation de la phase aqueuse

Dans un bécher, chauffer au bain-marie, le miel de thym avec quelques grammes de tension actif hydrophile à 45° C.

Etape 2 : Préparation de la phase huileuse

Dans un autre bécher, chauffer au bain-marie, l'huile de lentisque avec quelques grammes de tension actif lipophile à 60° C.

Etape 3 : Mélange des deux phases

Mélangez la phase huileuse à la phase aqueuse sous agitation en utilisant un agitateur à hélices (Photo en Annexe II), puis homogénéiser l'émulsion à l'aide d'un homogénéisateur (Photo en Annexe II) pendant 5 min à 1800 tr/min.

Remettre l'émulsion sous agitation à 500 tr/min jusqu'à atteindre une température de 30 °C.

Les deux phases doivent avoir la même température lors du mélange qui avoisine les 50 °C.

I.2.2.3. Contrôle réalisé sur les deux formes galéniques

Les contrôles effectués sur les deux formes galéniques et le miel pur sont :

➤ L'osmolarité

Etant donné que l'osmolarité a un rôle dans la reconstitution cutanée, nous l'avons mesurée à l'aide d'un osmomètre (Photo en Annexe II) sur les deux formes pharmaceutiques (gel et crème) et l'avons comparée à celle du miel pur. En pratique, l'osmolalité est une façon globale de mesurer la contribution des différents solutés, présents dans une solution, à la pression osmotique de cette solution (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2014**).

a. Principe

La mesure est basée sur une méthode hydrodynamique de détermination de tension de vapeur. La tension de vapeur et le point de congélation font partie des propriétés dépendantes de la concentration d'une solution. Comparées au solvant pur, ces propriétés varient proportionnellement aux nombres de particules solubles dissoutes dans chaque kilogramme de solvant (l'eau dans le cas des solutions biologiques). Ainsi, la mesure de l'une ou l'autre de ces propriétés est un moyen indirect de déterminer la concentration de la solution ou osmolarité.

b. Mode opératoire

L'utilisation de l'équipement est très simple : on dépose une goutte de 20 µl de notre échantillon à l'aide d'une micropipette dans l'échantillonneur puis on lance la mesure.

➤ **Distribution granulométrique par diffraction laser**

a. Principe

La granulométrie laser (Photo en Annexe II) est une technique basée sur la diffraction de la lumière laser par la matière. La détermination de la distribution granulométrique d'un échantillon de particules dispersées est déduite de l'interaction entre l'ensemble des particules et le rayonnement laser incident par l'analyse de diffraction du faisceau. Il permet la détermination de la taille des particules dans les émulsions (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2014**).

b. Mode opératoire

Optimiser la concentration de l'échantillon afin d'éviter deux cas de figures :

- Echantillon en faible quantité : lumière diffusée sera insuffisante pour être détectée.
- Echantillon en grande quantité : la lumière d'une particule individuelle sera elle-même diffusée par d'autres particules, c'est le phénomène de diffusion multiple. Pour cela, effectuer des mesures à différentes concentrations afin d'atteindre une plage d'obscurité optimale (La concentration est adaptée en contrôlant l'obscurité).

➤ **pH**

La modification du pH au cours du temps est un paramètre important sur la qualité de nos formules. Les variations du pH, indiquent qu'il existe des réactions chimiques qui peuvent moduler l'activité biologique de nos produits. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un pH mètre en effectuant des dilutions de 10% pour chaque produit.

➤ **Mesure rhéologique**

a. Principe

L'échantillon à analyser est emprisonné entre deux cylindres. Le mouvement laminaire de cisaillement est obtenu en communiquant à l'un des cylindres un mouvement de rotation uniforme de vitesses angulaires W_0 , l'autre cylindre demeure immobile. La substance se décompose en couches cylindriques coaxiales animées d'une vitesse angulaire différente, qui varie de 0 à W_0 . Suite au mouvement relatif des couches les unes par rapport aux autres, il apparaît en tout

point de l'échantillon, une vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ et une contrainte de cisaillement τ .

b. Mode opératoire

Le rhéomètre de Marque *Anton paar* est relié à un micro-ordinateur qui permet de traiter les données.

I.2.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne

I.2.3.1. Etude qualitative de l'effet antimicrobien et antifongique par la méthode de diffusion sur milieu solide (gélose)

a. But

L'objectif de cette étude est de déterminer le taux d'inhibition de la croissance des microorganismes (bactéries et levure) et ceci, par la méthode de diffusion sur milieu gélosé.

b. Principe

C'est la méthode la plus utilisée dans les laboratoires de microbiologie pour les tests de sensibilité aux antibiotiques, la seule différence c'est le remplacement des antibiotiques par le miel :

Nous avons utilisé deux milieux différents :

- Le milieu Muller Hinton (MH) pour les bactéries.
- Le milieu Sabouraud (SAB) pour la levure.

c. Mode opératoire

1-Préparation de la première couche

- On fait fondre les deux milieux MH et SAB dans un bain-marie à 95°C et on les laisse refroidir.
- On fait verser, aseptiquement, la première couche des milieux dans des boites de Pétri d'un diamètre de 9 cm, on laisse refroidir et solidifier (environ 30 min) sur la paillasse.

2-Préparation de l'inoculum

- à partir de jeune culture (18 à 24h pour les bactéries et 48h pour la levure), réaliser des suspensions bactériennes qu'on dépose dans 5 ml d'eau physiologique stérile ;
- on agite au vortex puis on réalise une première lecture de la concentration de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm, tout en estimant la transmittance T entre 22 et 32% ou bien la densité optique DO (0,2 à 0,3) pour les bactéries, sauf pour *Staphylococcus aureus* qui doit être comprise entre 20 et 30% (0,3 à 0,4) et entre 2 et 3, pour la levure.
- les valeurs comprises entre les intervalles ci-dessus correspondent à une concentration optimale de 10^7 - 10^8 UFC/ml. Si une de ces valeurs trouvées à la première lecture n'est pas comprise dans l'intervalle :
 - o si elle est supérieure à la valeur maximale, on ajuste en ajoutant de l'eau physiologique,
 - o si elle est inférieure à la valeur minimale, on ajoute les colonies, et à chaque fois, une nouvelle lecture est réalisée jusqu'à l'ajustement de la suspension aux valeurs désirées.
- L'inoculum doit être utilisé dans les 15 min qui suivent sa préparation.

3-Préparation de la deuxième couche

- On fait fondre les deux milieux MH et SAB dans un bain-marie et on laisse refroidir un peu.
- On verse une prise d'essais de 50 ml dans un flacon, on ajoute 200 μ l de la suspension bactérienne à l'aide d'une micropipette dans le flacon puis on agite manuellement, on dépose rapidement 4 ml de chaque milieuensemencé sur la surface de la première couche en faisant pivoter la boîte d'une façon similaire pour avoir une surface uniforme et on laisse refroidir et solidifier sur la paillasse.

4-Confection des puits

- On confectionne un puits dans lequel on dépose une quantité bien précise de produits à tester (50 μ l).
- On laisse diffuser pendant 30 min puis on incube à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 48h pour les levures. La technique est illustrée dans la figure ci-après :

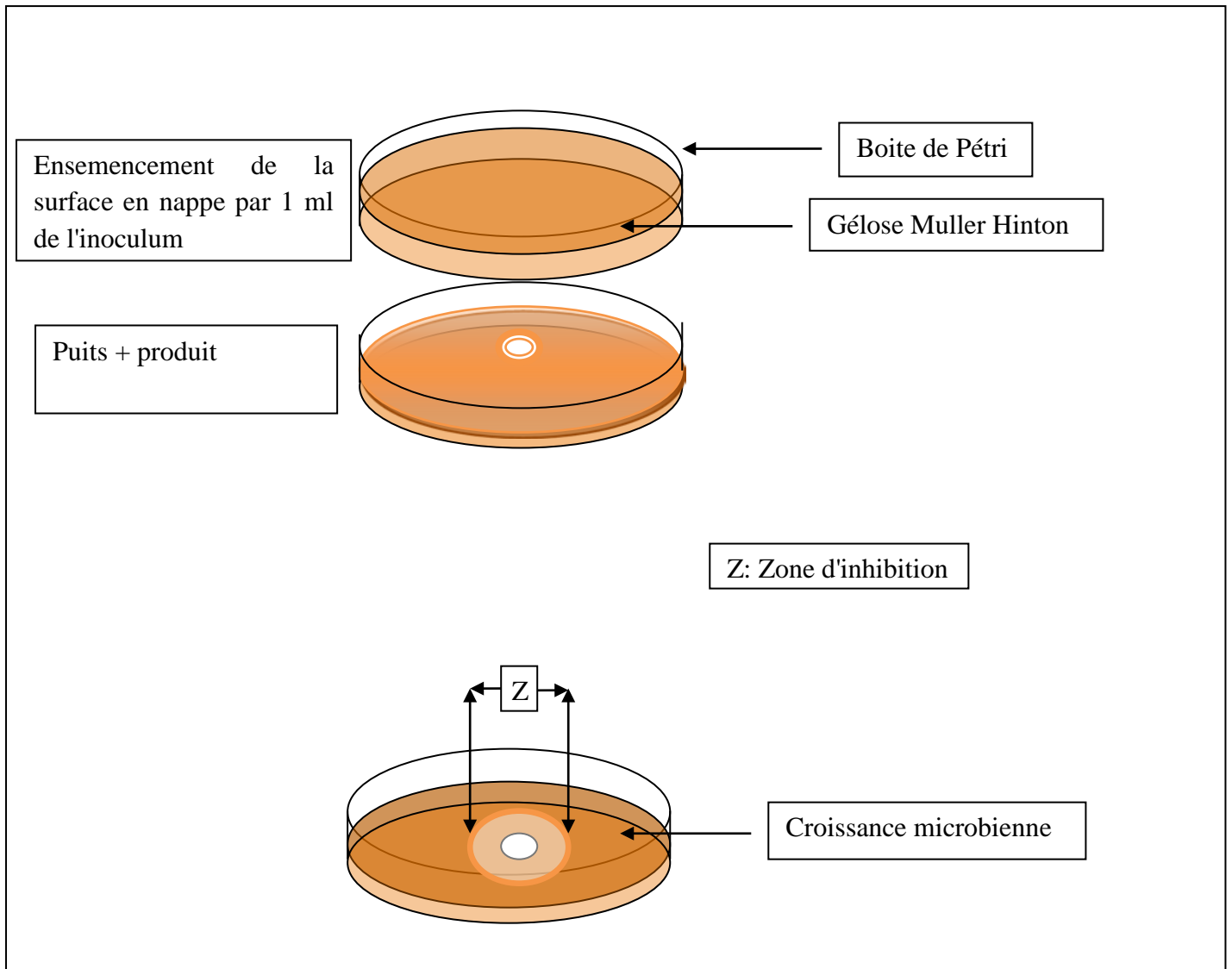


Figure 4 : Technique de préparation des boîtes de Pétri.

d. Lecture

- Présence de zone claire autour du disque : Présence d'activité inhibitrice.
- Absence de zone claire autour du disque : Absence d'activité inhibitrice.

Selon le diamètre de la zone d'inhibition l'activité est comme suit (**MEENA, SETHI, 1994**) :

- Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de $ZI \geq 28$ mm;
- Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de $ZI \leq 28$ mm;
- Légèrement inhibitrice lorsque $9 \text{ mm} \leq \text{le diamètre de } ZI \leq 16$ mm;
- Non inhibitrice lorsque le diamètre de $ZI \leq 9$ mm.

I.2.4. Evaluation de l'activité cicatrisante

I.2.4.1. Protocole de l'étude de la cicatrisation

a. But

Evaluation macroscopique et microscopique du processus de cicatrisation d'une plaie ouverte induite chirurgicalement chez des rats recevant des traitements en local.

b. Principe

Réalisation de plaies propres de classe 1, exposant le fascia musculaire sur le dos de chaque animal puis l'application journalière des produits à tester.

c. Mode opératoire

Au total, 16 rats albinos Wistar ont été aléatoirement répartis en 4 groupes égaux en fonction du traitement :

Groupe A : traité avec la crème (dorsolombaire) / traité avec la crème sans miel (dorso-omoplate).

Groupe B : traité avec le gel (dorsolombaire) / traité avec le gel sans miel (dorso-omoplate).

Groupe C : traité avec le miel pur (dorsolombaire) / non traité (dorso-omoplate).

Groupe D : traité avec le Madécassol à 1% (dorsolombaire) / non traité (dorso-omoplate).

Les rats sont mis à jeun la veille de l'expérimentation, protocole décrit par **Sagliyan et al, (2010)** :

- Anesthésie des rats par injection de la kétamine par voie intra péritonéale, à la dose de 100 mg/ kg.
- Epilation de la région dorsolombaire et dorso-omoplate de chaque rat à l'aide d'une tondeuse.
- Désinfection des deux régions ainsi rasées avec de la povidone 10%.
- Marquage de la zone à exciser à l'aide d'un marqueur cylindrique de diamètre de 2.5 cm.
- Excision de la zone marquée à l'aide d'une paire de ciseaux et d'une pince.
- Attendre 20 min avant d'appliquer le produit, le temps nécessaire pour avoir une vasodilatation importante et une perméabilité vasculaire.

- Après excision, un contrôle microbiologique a été effectué afin de déterminer le degré de propreté des plaies.

Les empreintes des plaies sont prises suivant les phases de cicatrisation, sur une feuille transparente :

J0 : Processus inflammatoire (phase vasculaire) : empreinte prise à J0

J3 à J5 : Processus inflammatoire (phase de détersion) : empreinte prise à J4

J5 à J9 : Etape de réparation (formation de tissu de granulation) : empreinte prise à J8

J10 à 15 : Etape de réparation (contraction de la plaie/épithélialisation) : empreinte prise à J14

J17 à J20 : Etape de maturation : empreinte prise à J20

Les images suivantes montrent les étapes de préparation des rats :



Figure 5 : Etapes de préparation des rats (photo originale)

Les surfaces des plaies sont estimées à l'aide d'un logiciel AUTOCAD Architecture.

Le pourcentage de rétrécissement ou de contraction de la plaie est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ de la contraction} = \frac{S_{j0} - S_{jn}}{S_{j0}} \times 100$$

S_{j0} : Surface de la plaie initiale au jour 0.

S_{jn} : Surface de la plaie cicatrisée au jour n .

I.2.4.2. Lecture macroscopique et microscopique

❖ Lecture macroscopique

L'évolution de la contraction de la plaie a été déterminée en mesurant la réduction de la taille de la plaie par planimétrie.

❖ Lecture microscopique

Avant la lecture microscopique des échantillons, ces derniers doivent être préparés. Cette préparation requiert plusieurs étapes successives : fixation, déshydratation, inclusion, coupe, coloration et montage. C'est un protocole interne au service d'Anatomie/ Pathologie du CHU de Beni Messous :

- **Etape 1 : Fixation**

- a. **But**

La fixation est destinée à immobiliser les structures cellulaires et tissulaires dans un état aussi proche que possible de leur état vivant. Autrement dit, la fixation permet la conservation des structures et le durcissement des pièces.

- b. **Principe**

La fixation a pour effet de polymériser les protéines et, dans certains cas, les lipides présents dans l'organe afin d'assurer une conservation et une image fidèle du tissu et des cellules.

- c. **Mode opératoire**

Mettre la pièce anatomique dans un bain de formol à 10% pendant 24h à 48h.

Il faut veiller à préparer un bain qui représente 10 fois la masse de la pièce à fixer.

- **Etape 2 : Déshydratation des échantillons**

- a. **But**

Cette étape a pour objectif de remplacer l'eau contenue dans les tissus par de la paraffine.

b. Principe

La paraffine n'étant pas miscible à l'eau, les pièces fixées sont déshydratées dans des bains d'alcools à degrés croissants puis dans du xylène et pour finir, dans de la paraffine chauffée à son point de fusion (+ 1 ou 2°C).

c. Mode opératoire

Mettre les cassettes contenant les pièces anatomiques dans le panier de l'automate de déshydratation, ce dernier est un appareil qui permet la déshydratation et l'infiltration des tissus biologiques de façon automatique (Photo en Annexe II). L'équipement est programmé comme suit :

Tableau VII : Différente étapes de déshydratation des tissus

N° du Bécher	Réactifs	Durée d'immersion	N° de Bécher	Réactifs	Durée d'immersion
1	Formaldéhyde 10%	1 h 00	7	Alcool 100%	1 h 00
2	Formaldéhyde 10%	1 h 00	8	Alcool 100%	1 h 00
3	Alcool 70%	1 h 30	9	Xylène	1 h 30
4	Alcool 80%	1 h 30	10	Xylène	1 h 30
5	Alcool 96%	1 h 30	11	Paraffine	2 h 00
6	Alcool 100%	1 h 00	12	Paraffine	2 h 00

- **Etape 3 : Inclusion**

a. But

Le but est le durcissement des tissus biologiques imprégnés dans la paraffine afin d'être par la suite coupés à l'aide d'un microtome. Cette étape est réalisée grâce à un appareil appelé « station d'enrobage » (Photo en Annexe II).

b. Principe

L'appareil dispose d'un bain métallique chauffé à 60°C pour conserver les échantillons avant le montage. La plate-forme de travail est séparée en deux surfaces : une surface tempérée qui maintient la paraffine liquide pour permettre la manipulation et l'orientation de l'échantillon et une surface refroidie pour la solidification de la paraffine. Le réservoir à paraffine, le bac à moules et le distributeur de paraffine sont également tempérés pour faciliter l'enrobage.

c. Mode opératoire :

Les images suivantes montrent les étapes d'enrobage de nos échantillons de tissu :

Disposition des échantillons → Remplissage → Solidification → Démoulage



Figure 6 : Différentes étapes d'inclusion à la paraffine solide (photo originale)

- **Etape 4 : Coupe histologique**

a. But

Cette étape permet de réaliser des coupes histologiques dont l'épaisseur varie entre 2 à 5 μm sur le bloc de paraffine à l'aide d'un microtome (Photo en Annexe II).

b. Principe

A chaque avancée du bloc de paraffine vers la lame, une coupe est réalisée. L'ensemble des coupes forme un ruban récupéré sur une pince.

c. Mode opératoire

- Mettre le bloc en place et le serrer. Le bloc peut, une fois en place, être orienté selon un axe horizontal ou vertical.
- Ajuster l'épaisseur de coupe (entre 2 μm et 5 μm).
- Débloquer le bloc couteau et l'avancer au plus proche de l'organe sans le toucher.
- Réaliser les coupes à l'aide de la roue.
- Poser les coupes voulues sur l'eau chaude des lames.
- Sécher la lame dans l'étuve pendant 2 heures à 80°C.

• Etape 5 : Déparaffinage et Coloration**a. But**

Accentuer les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments qui composent l'échantillon. La coloration de routine nous permet d'avoir une vision globale de la morphologie des tissus (noyau, cytoplasme et collagène).

b. Principe

Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Celle-ci est effectuée après déparaffinage des coupes (par la chaleur et des bains de xylène) en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant puis dans de l'eau distillée.

c. Mode opératoire

- Passage de la lame dans deux bains de toluène pendant 2 min chacun.
- Passage dans de l'alcool (100%, 80% et 50%) pour réhydrater l'échantillon pendant 2 min pour chaque passage.
- On place la lame dans un bain d'eau de robinet pendant quelques secondes.
- On place la lame dans un bain d'eau distillée pendant quelques secondes puis on procède comme suit :
 - Bain à l'hématoxyline pendant 5 min (permet de colorer les noyaux en violet),
 - Rinçage à l'eau de robinet pendant 3 min,
 - Rinçage à l'eau distillée par un simple passage,
 - Bain à l'éosine pendant 3 min (permet de colorer le cytoplasme en rose),
 - Rinçage à l'eau distillée par un simple passage,

- Bain dans l'alcool à 95% pendant 1 min,
- Bain dans l'alcool à 100 % pendant 1 min.
- Laisser tremper la lame dans le Xylène jusqu'au montage.

- **Étape 6 : Le montage**

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique (baume de canada) dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre. On dispose alors d'une « préparation microscopique » (simplement appelée « lame » dans le langage courant) prête à être observée au microscope optique.

II.1. Résultats du contrôle qualité du miel de thym

II.1.1. Acidité (libre, liée, totale)

Dans le tableau ci-dessous figurent les résultats obtenus pour le pH, l'acidité libre, l'acidité liée ainsi que l'acidité totale.

Tableau VIII : Valeurs du pH, Acidité libre, Acidité liée, Acidité totale

Produit	pH	Acidité libre (meq.Kg ⁻¹)	Acidité liée (meq.Kg ⁻¹)	Acidité totale (meq.Kg ⁻¹)
Miel de thym	4.11	33.76	43.07	76.83

L'acidité libre de notre miel est de 33.76 meq/kg, ce résultat est inférieur à la valeur tolérée par la norme européenne qui est de 40 meq.Kg⁻¹. Ce qui nous permet d'affirmer que ce miel est de bonne qualité.

II.1.2. Analyse des sucres par chromatographie couche mince (CCM)

La composition du miel en sucres est déterminée par la méthode de chromatographie sur couche mince (CCM).

La pharmacopée européenne indique que la bande en brun intense représente le Fructose, en bleu-gris représente le Glucose et en brun le Saccharose.

Tableau IX : Résultats de la CCM

Produit	Glucose	Fructose	Saccharose
Miel de thym	+	+	+

Chaque miel est susceptible de contenir une dizaine de sucres. Ceux sont des mono, di, tri ou polysaccharides qui représentent en tout, plus de 80% du poids total du miel. Les principaux sucres dans les miels sont le fructose et le glucose.

II.1.3. Indice de réfraction

L'indice de réfraction est le rapport entre le sinus des angles d'incidence de la réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air puis dans le miel maintenu à une température constante.

Les résultats obtenus pour l'indice de réfraction sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau X : Valeurs de l'indice de réfraction

Produit	Température	Indices de réfraction	Moyenne
		1,496	
Miel de thym	20 °C	1,498	1,496
		1.496	

La pharmacopée européenne 8^{ème} édition, exige une norme minimale de 1,487 (équivalent à une teneur en eau maximale de 20%) : nos résultats sont conformes face à cette norme.

II.1.4. Conductivité

La conductivité électrique constitue un critère de détermination de l'origine botanique du miel. Cette mesure dépend de la teneur en minéraux et de l'acidité du miel : plus elles sont élevées, plus la conductivité correspondante est élevée (CAILLAS, 1968).

Les résultats obtenus pour la conductivité électrique sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau XI : Valeur de la conductivité électrique

Produit	Conductivités électriques ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
Miel de thym	230

L'échantillon présente une conductivité inférieure à 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

II.1.5. Dosage de l'HydroxyMéthylFurfural (HMF)

L'apparition de ce composé est le résultat de la transformation des sucres simples et plus particulièrement du fructose en hydroxyméthylfurfural, nommé aussi 5- (hydroxyméthyl)-2-furaldéhyde.

Les résultats des absorbances obtenus sont représentés dans les tableaux XII et XIII suivants :

Tableau XII : Teneur en HMF du miel de thym (sans dilution)

L'absorbance (nm)	Témoin (ppm)	Miel (ppm)
284	1,489	0,800
336	0,372	0,321

D'après les résultats obtenus, on remarque que l'absorbance du témoin est supérieure à 0,8 ppm donc on procède à une dilution (1/2).

Tableau XIII : Teneur en HMF du miel de thym (après dilution)

L'absorbance (nm)	Témoin (ppm)	Miel (ppm)
284	0,741	0,285
336	0,189	0,108

On calcule la teneur en HMF du miel :

$$(0,285-0,108) \times (1/2) \times 149,7 = 13,248 \text{ ppm}$$

La teneur obtenue dans le miel est nettement inférieure par rapport au témoin qui est de 41.317 ppm.

La teneur en HMF obtenue lors du dosage par HPLC est de 7.84 ppm (voir en Annexe III). Cette valeur est beaucoup moins importante que celle obtenue par Spectrophotométrie.

II.1.6. Teneur en eau par Réfractométrie

La teneur en eau du miel est l'une des caractéristiques les plus importantes car elle conditionne la qualité et notamment le mode de conservation (**LOUVEAUX, 1976**). En effet, seuls les miels dont la teneur en eau est inférieure à 18% sont de bonne conservation (**GONNET, 1993**).

Tableau XIV : Valeur de la teneur en eau

Produit	Teneur en eau (%)
Miel de thym	16.2 %

La valeur enregistrée n'excède pas cette norme, ce qui dénote une bonne conservation du miel.

II.1.7. Test de chlorure

La comparaison de la coloration de la solution essai (solution du miel) à la solution témoin, montre que la couleur de solution essai est moins intense, ce qui veut dire que la teneur en chlorure est plus basse que la teneur en chlorure dans la solution témoin.

II.1.8. Test de sulfate

La comparaison de la coloration de la solution essai (solution du miel) à la solution témoin, montre que la couleur de solution essai est moins intense, ce qui veut dire que la teneur en sulfate est plus basse que la teneur en sulfate dans la solution témoin.

II.2. Résultats des contrôles réalisés sur les deux formes galéniques

➤ Osmolarité

Tableau XV: Valeur de l'osmolarité

Produit	Résultat (mmol/kg)
Miel	2450
Crème à base de miel	1882
Gel à base de miel	1887
Gel sans miel	544

D'après les résultats obtenus, le miel pur a une osmolarité supérieure par rapport au gel et à la crème, qui eux, ont la même osmolarité. Cela s'explique par le fait que notre formule (gel ou crème) ne contient pas 100% de miel.

➤ Distribution granulométrique

Tableau XVI: Distribution granulométrique des particules dans l'émulsion à T0

Produit	D [4,3]	D [3,2]	D (v, 0.1)	D (v, 0.5)	D (v, 0.90)
Crème à base de miel	7.31m	3.87 µm	1.59 µm	6.68 µm	13.76 µm

D'après ses résultats (en Annexe III), on peut dire que notre huile est bien dispersée dans la phase aqueuse avec un diamètre moyen en volume de 7.31 µm. La distribution granulométrique se résume comme suit :

- 10% des particules d'huile ont une taille inférieure à 1.59%

- 50% des particules d'huile ont une taille inférieure à 6.68%
- 90% des particules d'huile ont une taille inférieure à 13.76%

➤ **pH :**

Les variations du pH peuvent modifier la qualité du miel, d'où la nécessité de contrôler le pH du miel des produits à base de miel à des temps espacés.

Tableau XVII : Evolution du pH en fonction du temps à 25°C

Produit	pH à T0	pH à T2 (deux mois après)
Crème à base de miel	3.919	3.806
Gel à base de miel	4.059	3.951
Miel de thym	4.11	4.25

Les valeurs obtenues montrent que les pH sont presque les mêmes pour les différents produits.

➤ **Mesure rhéologique :**

La mesure effectuée concerne le gel à base de miel et la crème à base de miel :

La crème à base de miel :

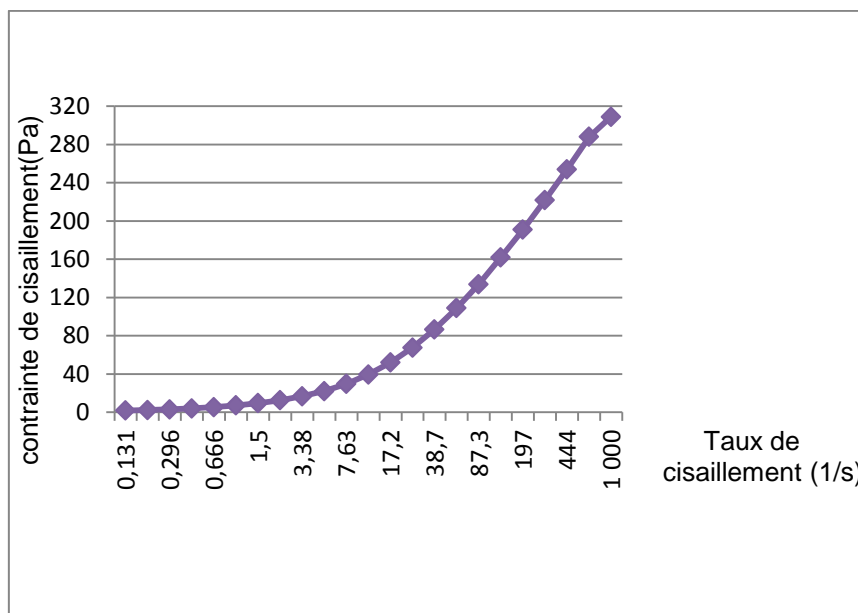


Figure 7 : Rhéogramme de la crème à base de miel

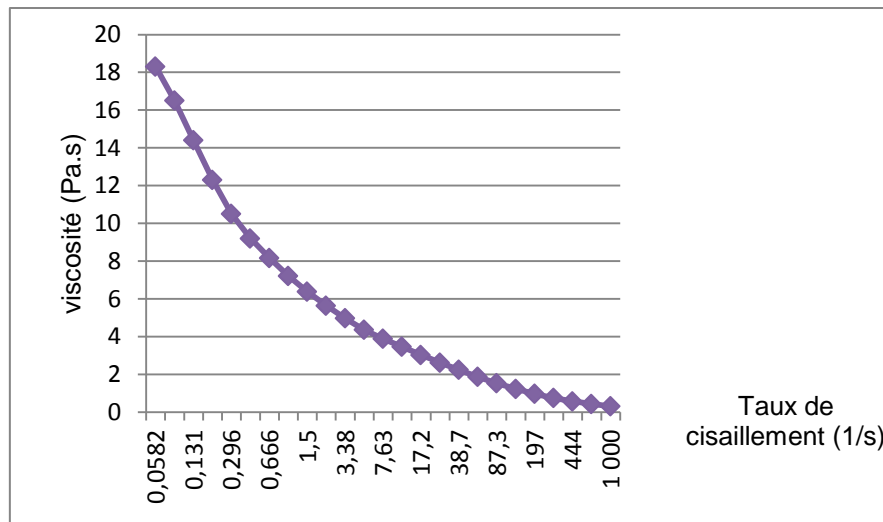


Figure 8 : Variation de la viscosité apparente de la crème à base de miel

Le gel à base de miel :

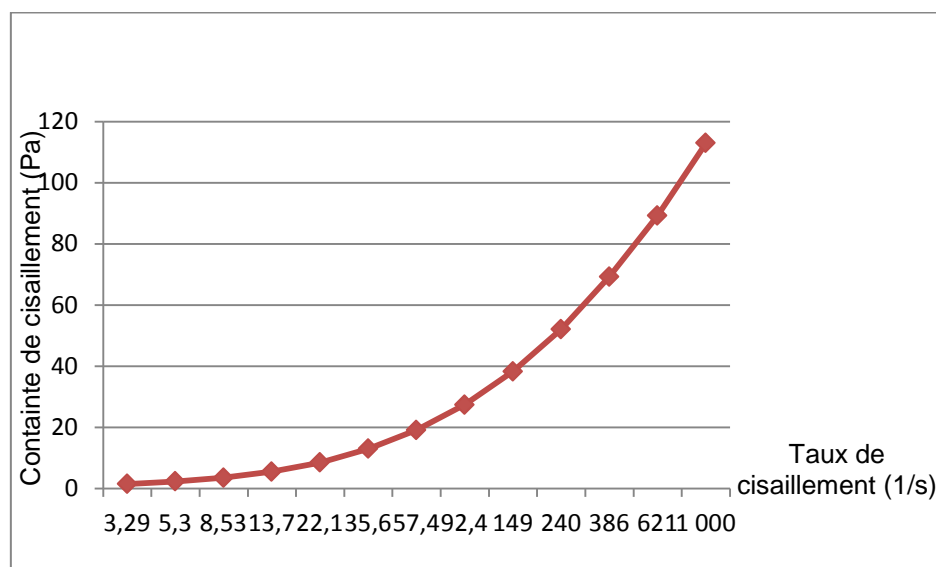


Figure 9 : Rhéogramme du gel à base de miel

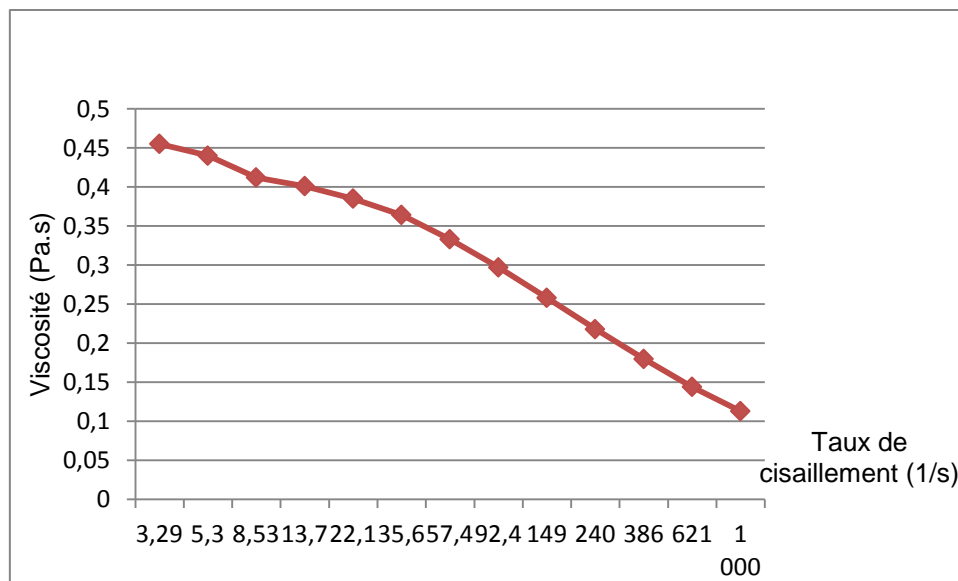


Figure 10 : Variation de la viscosité apparente du gel à base de miel

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que la crème et le gel ont un comportement rhéofluidifiant. L'interprétation moléculaire est qu'au repos ou pour de faibles contraintes, les chaînes de molécules sont disposées au hasard et enchevêtrées. Les molécules s'alignent progressivement dans le sens de l'écoulement au fur et à mesure que la vitesse de cisaillement augmente, elle favorise ainsi l'écoulement des différentes couches du fluide. Ou c'est la modification de structure du fluide (rupture de liaisons) en fonction de la vitesse de cisaillement (COUARRAZE, *et al.*, 2000).

3. Evaluation de l'activité antimicrobienne et antifongique

Les résultats de l'évaluation de l'activité sont représentés dans le Tableau XVIII et la Figure 4.

Tableau XVIII : Les diamètres des zones d'inhibitions des différentes souches (en mm) par la méthode des puits.

Souches de références			Résultats				
			Gel sans miel (1)	Gel avec Miel (2)	Crème sans Miel (3)	Crème avec Miel (4)	Miel (5)
Bactéries	Gram -	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≤ 9	≤ 9	≤ 9	≤ 9	≤ 9
		<i>Escherichia Coli</i>	≤ 9	40.25	≤ 9	41.50	40
	Gram +	<i>Bacillus subtilis</i>	≤ 9	53	≤ 9	52	61
		<i>Staphylococcus aureus</i>	≤ 9	49.5	≤ 9	38	41.5
Levures		<i>Candida albicans</i>	≤ 9	≤ 9	≤ 9	≤ 9	≤ 9



Figure 11 : AntibioGramme des différentes souches (photo originale).

D'après les résultats obtenus, les produits testés ont une activité antimicrobienne et agissent différemment sur les souches :

- Miel : activité antimicrobienne fortement inhibitrice pour *Bacillus subtilis* (ZI ≥ 61 mm), suivie respectivement par *Staphylococcus aureus* (ZI ≥ 41.5 mm) et *Escherichia*

Coli ($ZI \geq 40$ mm). Par contre, on ne note aucune activité sur *Pseudomonas aeruginosa* et sur *Candida albicans* ($ZI \leq 9$ mm).

- Crème à base de miel : même comportement que le miel pur mais à des intensités moindres : *Bacillus subtilis* ($ZI \geq 52$ mm), *Staphylococcus aureus* ($ZI \geq 41.5$ mm) et *Escherichia Coli* ($ZI \geq 40$ mm), aucune activité sur *Pseudomonas aeruginode* et sur *Candida albicans* ($ZI \leq 9$ mm).
- Crème sans miel : Aucune activité antimicrobienne n'a été décelée, les excipients de la formule de cette crème n'ont aucune activité sur les souches testées.
- Gel à base de miel : même comportement que le miel pur mais à des intensités moindres, on remarque que l'activité antimicrobienne sur *Staphylococcus aureus* est plus intense. Cela peut être expliqué par la présence d'excipients ayant une activité sur cette bactérie.
- Gel sans miel : Aucune activité antimicrobienne n'a été décelée, les excipients de la formule de cette crème n'ont aucune activité sur les souches testées.

D'après ces résultats, on peut dire que le gel à base de miel a une activité antimicrobienne et antifongique qui ressemble à celle du miel pur.

II.4. Evaluation de l'activité cicatrisante

Pour la comparaison, nous avons utilisé la spécialité pharmaceutique : Madécassol[®] crème à 1% d'hydrocotyle du laboratoire BAYER, préconisée pour le traitement local d'appoint des ulcérations cutanées.

II.4.1. Evaluation macroscopique

La contraction des plaies a été déterminée en mesurant la réduction de la taille de la plaie par planimétrie. Le tableau ci-dessous représente la contraction des plaies en pourcentage pour chaque traitement en fonction du temps.

Tableau XIX : Evolution de la contraction de la plaie en fonction du temps en pourcentage

Traitements	Temps				
	J0	J4	J8	J14	J20
Crème avec miel	0	8,294	26,250	85,808	92,717
Crème sans miel	0	10,517	18,086	82,812	89,496
Gel avec miel	0	18,11	30,308	89,593	95,423
Gel sans miel	0	9,874	18,871	83,638	91,681
Miel pur	0	20,905	29,252	86,358	94,597
Madécassol	0	2,241	17,934	83,777	92,554
Témoin	0	0,45	7,678	65,503	86,92

L'étude comparative entre les différents traitements est réalisée comme suit :

- Crème à base de miel et crème sans miel :
 - L'évolution de la contraction de la plaie pour la crème sans miel durant la période allant du premier jour (J0) au 4^{ème} jour (J4) est de 10.517%, alors que pour la même période, le pourcentage de contraction n'est que de 8.294% pour la crème à base de miel. Pour le témoin, la contraction durant la même période est de 0.45%.
 - Durant le 4^{ème} et le 8^{ème} jour de traitement, on remarque une augmentation de la contraction de la plaie pour le traitement crème sans miel. Par contre, on relève une importante évolution de la contraction pour le traitement avec crème à base de miel.
 - Au 14^{ème} jour de la cicatrisation, on note une contraction importante pour le traitement crème avec miel de 85.808%, alors que pour la crème sans miel, la contraction est de 82.812%. Au bout du 20^{ème} jour de traitement, la contraction est de 92.717% pour le traitement crème avec miel et de 89.496% de contraction pour le traitement avec la crème sans miel. Pour le témoin, la contraction de la plaie est de 86.92%.

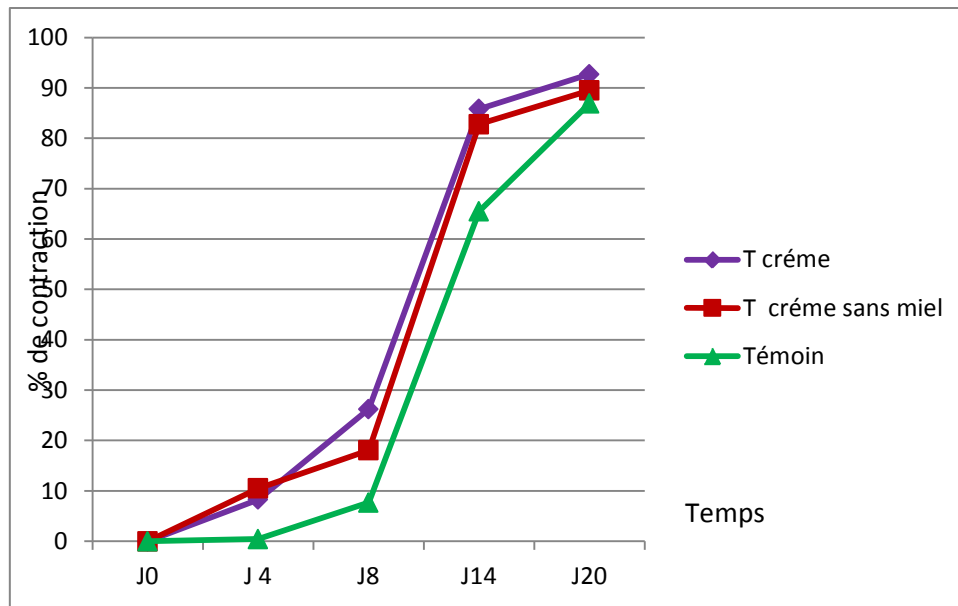


Figure 12 : Evolution de la contraction des plaies traitées (crème) et non traitée.

Les prises de vue ci-dessous montrent les cicatrices après 20 jours de traitement :

- ✓ Traitement avec la crème à base de miel

R1



R2



R3



R4



- ✓ Traitement avec la crème sans miel :

R1



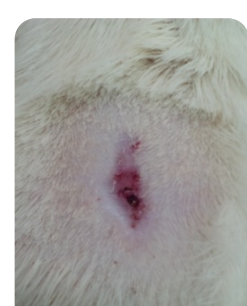
R2



R3



R4



- Gel à base de miel et gel sans miel :

- Le graphe ci-dessous montre que la contraction de la plaie est nettement plus accentuée dans le temps pour le traitement gel à base de miel par rapport au traitement gel sans miel, qui passe respectivement de 0% à 18.11 % et de 0% à 9.874% au 4^{ème} jour.

L'évolution de la contraction atteint les 30.308% au 8^{ème} jour pour le traitement gel à base de miel contre 18.871% pour le traitement gel sans miel.

- A partir du 8^{ème} jour, on remarque une évolution importante de la contraction pour atteindre 89.593% concernant le traitement gel à base de miel, contre 83.638% pour le gel sans miel.
- Au bout de 20 jours, la surface de la cicatrice a diminué de 95.423% pour le traitement gel à base de miel, alors que le traitement gel sans miel a atteint 91.681% de contraction.

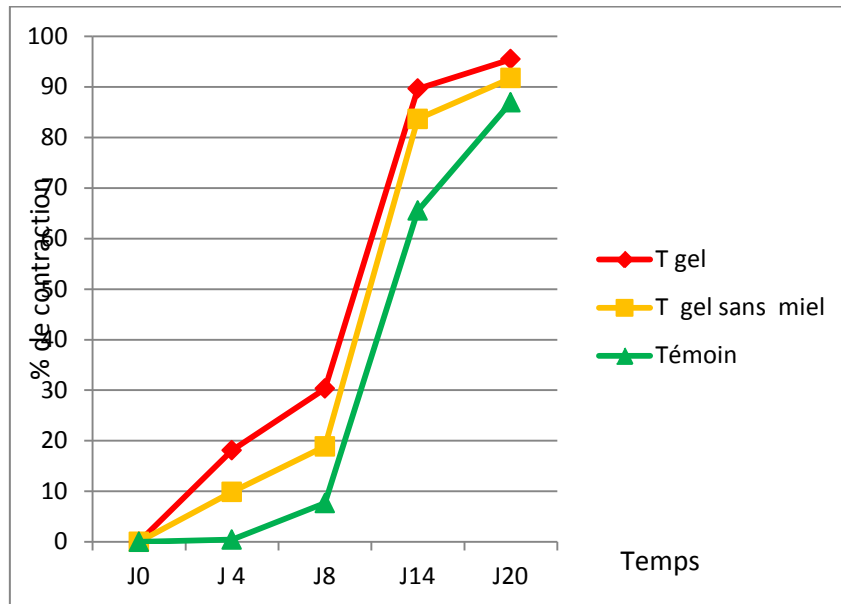
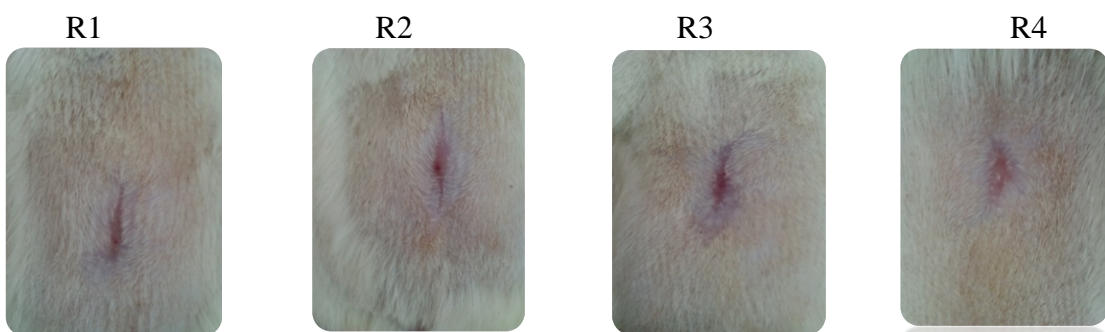
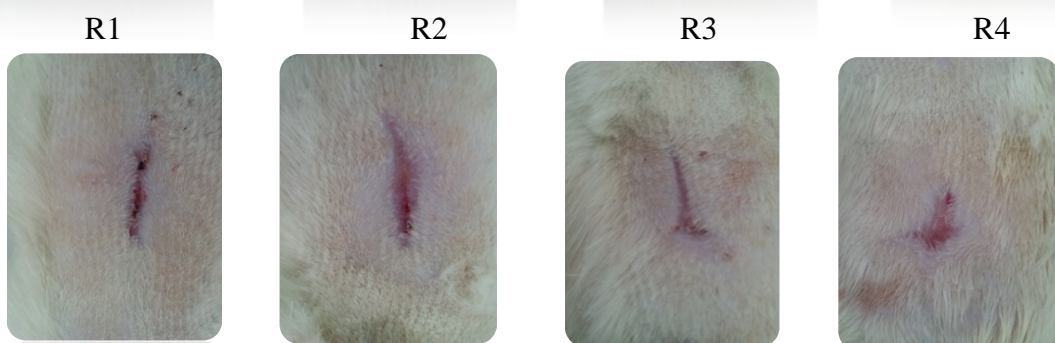


Figure 13 : Evolution de la contraction des plaies traitées (gel) et non traitées.

- ✓ Traitement gel à base de miel après 20 jours de traitement :



- ✓ Traitement gel sans miel après 20 jours de traitement :



- Miel pur, Madécassol et le témoin :

Le graphe ci-dessous montre que le traitement miel pur provoque une contraction de la plaie plus élevée par rapport au traitement Madécassol. Cette contraction est de 20.905% au 4^{ème} jour, 29.252% au 8^{ème} jour pour atteindre respectivement 86.358% et 94.597 au 14 et 20^{ème} jour.

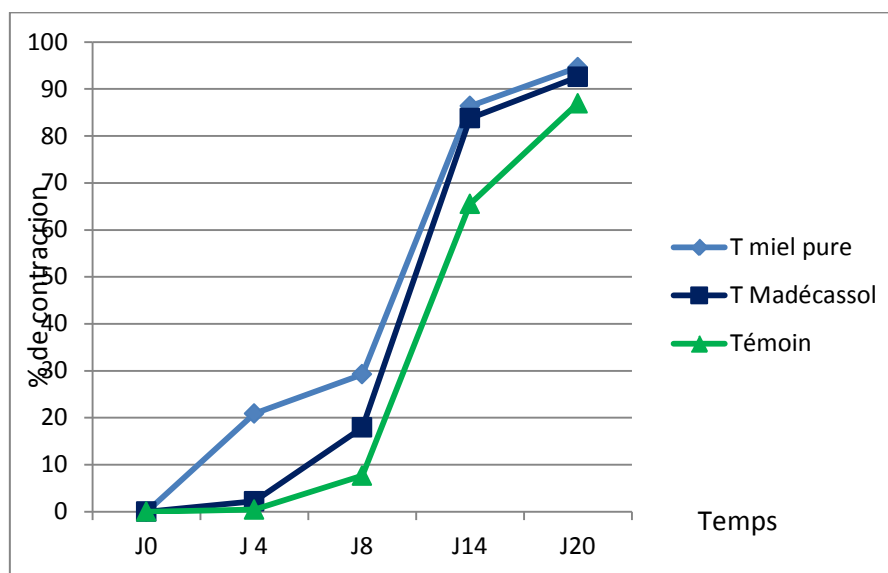
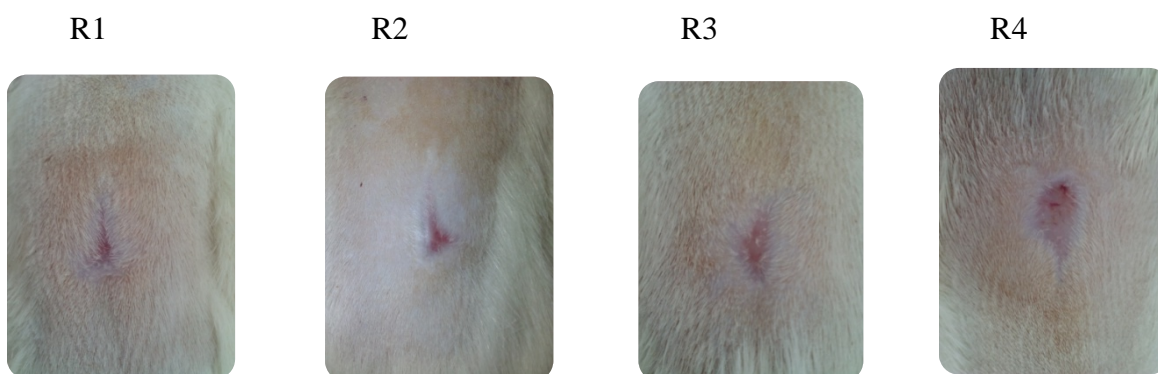


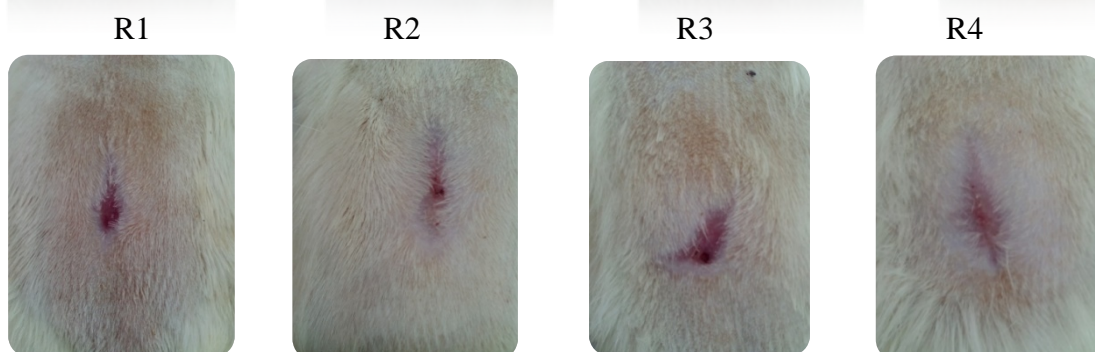
Figure 14 : Evolution de la contraction des plaies traitées (miel, Madécassol) et non traitées.

Les prises de vue ci-dessous montrent les cicatrices après 20 jours de traitement :

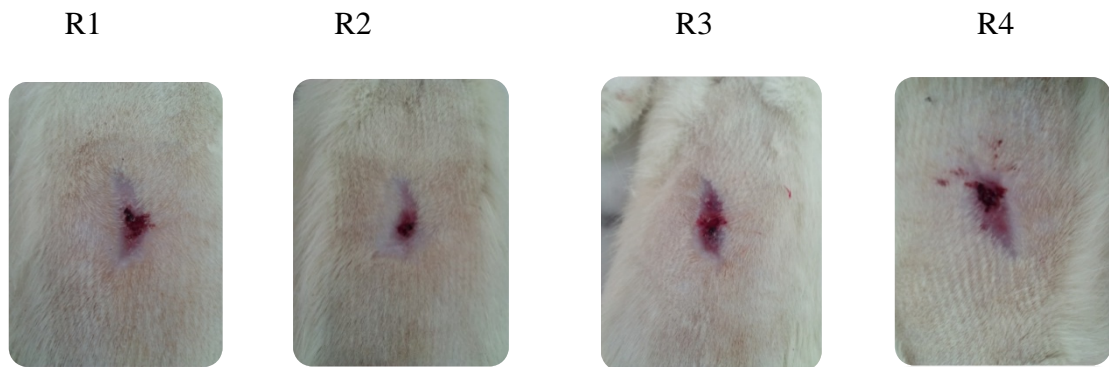
- ✓ Traitement miel pur :



- ✓ Traitement Madécassol :



- ✓ Témoin (sans traitement) :



- Gel à base de miel, crème à base de miel, miel pur et le Madécassol à 1% :

L'évolution de la contraction de la plaie est différente en fonction du traitement, ce qui nous permet de les classer par ordre décroissant pour chaque étape de cicatrisation :

- Processus inflammatoire (phase de détersion) : au 4^{ème} jour
 - Traitement miel pur : 20.905% de contraction
 - Traitement gel à base de miel : 18.11%
 - Traitement crème à base de miel : 8.294%
 - Traitement Madécassol : 2.241%
 - Témoin (sans traitement) : 0.45%

Durant ce processus, on remarque que le miel pur contribue à la contraction de la plaie de 20.905%, suivi, respectivement, de gel à base de miel, crème à base de miel, le Madécassol et enfin le témoin qui vient en dernier, avec 0.45% de contraction.

Selon **Dr. De Bodt (2004)**, les enzymes de lyse protéique, de type métalloprotéase (métalloprotéinases) et sérineprotéase, semblent être activées par les petites quantités d'eau oxygénée produites par le miel. La forte osmolarité du miel génère une force osmotique qui, par une sorte de drainage lymphatique, évacue les œdèmes péri-lésionnels. La faible contraction du gel à base de miel et de la crème à base de miel par rapport au miel pur peut être expliquée entre autres, par la faible osmolarité.

- Etape de réparation (formation de tissu de granulation) : 8^{ème} jour
 - Traitement gel à base de miel : 30.308% de contraction
 - Traitement miel pur : 29.252%
 - Traitement crème à base de miel : 26.250%
 - Traitement Madécassol : 17.934%

- Témoin (sans traitement) : 7.678%

Pour cette phase, le taux de contraction du gel à base de miel et le miel pur est presque le même : 30.308% pour le gel à base de miel et 29.252% pour le miel pur. Cette augmentation de contraction peut s'expliquer par le raccourcissement de la phase de détersion car, selon **Johnston, (1992)**, l'étape de réparation ne peut avoir lieu que lorsque la plaie est mise au propre par le processus inflammatoire, plus précisément la phase de détersion.

- Etape de réparation (contraction de la plaie/épithélialisation) : 14^{ème} jour
 - Traitement avec gel à base de miel : 89.593% de contraction
 - Traitement avec le miel pur : 86.358%
 - Traitement avec la crème à base de miel : 85.808%
 - Traitement avec Madécassol à 1% : 83.777%
 - Témoin (sans traitement) : 65.503%

La plaie se contracte et se recouvre de cellules épithéliales, ce qui correspond à la fermeture de la plaie par une cicatrice primaire dont le teint est proche de celui de la peau qui l'entoure. La formation de cette cicatrice primaire s'achève autour du 21^{ème} jour, sauf dans le cas des plaies superficielles suturées de petite taille, où l'épithélialisation est visible après 24 heures (**AERTS et al., 2008**).

- Etape de maturation : 20^{ème} jour
 - Traitement avec gel à base de miel : 95.423% de contraction
 - Traitement avec le miel pur : 94.597%
 - Traitement avec la crème à base de miel : 92.717%
 - Traitement avec Madécassol à 1% : 92.554%
 - Témoin (sans traitement) : 86.92%

Après 20 jours de traitement, la contraction de la plaie traitée avec le gel à base de miel est de 95.423%, pratiquement le même taux enregistré avec le miel pur (94.597% de contraction).

Ainsi, la contraction de la plaie avec le traitement gel à base de miel est presque la même avec celle du miel pur. Selon **Rigal (2012)**, la durée moyenne de 92 cicatrisations était de 21 jours (traitement avec le miel) pour des plaies non infectées et de surface inférieure ou égale à 10 cm², contre 75 jours pour des plaies supérieures ou égales à 30 cm².

Selon la cinétique de contraction de la plaie, on remarque que le traitement gel à base de miel a la même allure que le traitement avec le Madécassol du laboratoire BAYER. Mais après 20 jours de traitement, la contraction de la plaie est meilleure que le Madécassol avec 94.597% de contraction contre 92.554%.

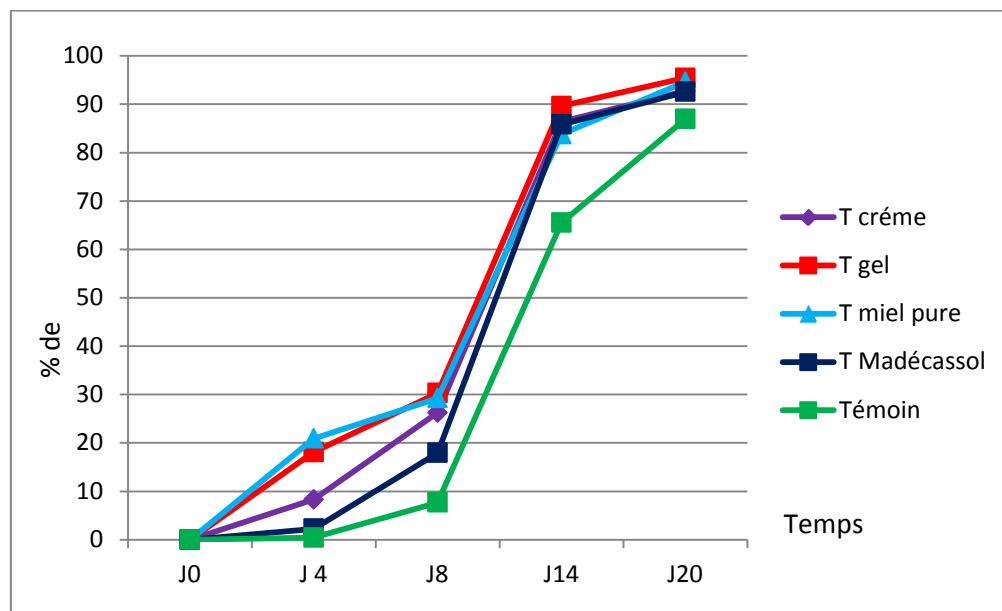


Figure 15 : Evolution de la contraction des plaies traitées et non traitées.

II.4.2. Analyse microscopique des fragments de peaux cicatrisées (Evaluation microscopique) :

Des prélèvements de peaux ont été fixés dans une solution tamponnée neutre à 10 % de formaldéhyde. Après 48 heures de fixation, les tissus sont déshydratés et inclus dans la paraffine. Des coupes de 5 μm ont été colorées. Toutes les préparations histologiques ont été analysées par microscope optique.

Les observations réalisées sur les différentes coupes histologiques, sont mentionnées dans le tableau suivant :

Tableau XX : Observations au microscope optique effectuées sur les coupes histologiques

Traitements	Ré épithélialisation	Tissu conjonctif
Miel pur	Complète	Fibroblastes + Fibres collagènes ++
Crème à base de miel	Complète	Fibroblastes + Fibres collagènes +
Crème sans miel	Incomplète : persistance d'endroit fibrino-leucocytaire	Fibroblastes
Gel à base de miel	Complète	Fibroblastes ++ Fibres collagènes ++
Gel sans miel	Presque complète	Fibroblastes ++ Fibres collagènes ++
Madécassol	Complète	Fibroblastes + Fibres collagènes ++
Témoin (sans traitement)	Incomplète	Fibroblastes + Fibres collagènes + Quelques polynucléaires

Les coupes histologiques ont été examinées par le professeur NOUAR.N au niveau du laboratoire d'Anatomie / Pathologie - CHU de Béni Messous.

L'étude des coupes histologiques montre que le gel à base de miel, la crème à base de miel, le miel et le Madécassol tous, ont contribué à la réépithéliation de la plaie presque de la même façon, c'est-à-dire une réépithéliation complète (voir figures ci-dessous). Par contre, pour le reste des traitements (crème sans miel, gel sans miel), la réépithéliation est incomplète (voir figures ci-dessous). On note par ailleurs, une différence sur l'abondance des fibroblastes et des fibres collagènes. Prise de vue des coupes histologiques réalisées grâce à un microscope optique couplé à une caméra :

Les fibroblastes sont des cellules fusiformes ou étoilées possédant de longs prolongements cytoplasmiques. En microscope optique, leur cytoplasme est peu visible et seul leur noyau, ovoïde, allongé, avec un ou deux nucléoles, est bien visible. Les fibroblastes synthétisent les macromolécules protéiques et polysaccharidiques de la matrice extra-cellulaire du tissu conjonctif. Les fibroblastes sont aussi capables de sécréter de nombreuses autres molécules

(cytokines, facteur de croissance, enzymes) et jouent un rôle important dans les processus de réparation tissulaire ou dans l'entretien des réactions inflammatoires.

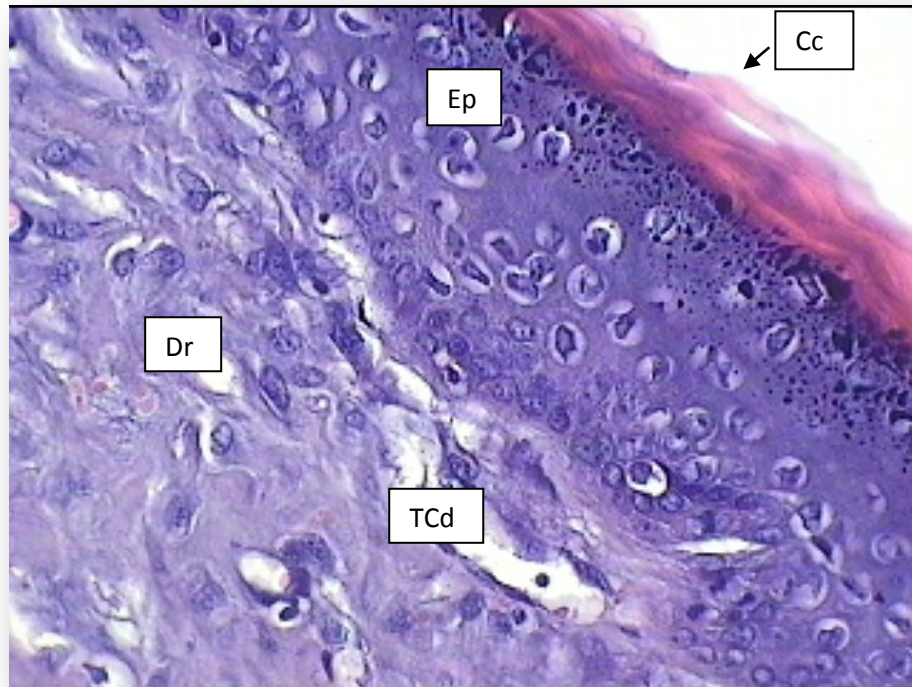


Figure 16 : Coupe histologique de la peau traitée avec le miel pur, vue au MO (x40)

Cc : couche cornée, Ep : épithélium (épiderme), Dr : derme, TCd : tissu conjonctif dense

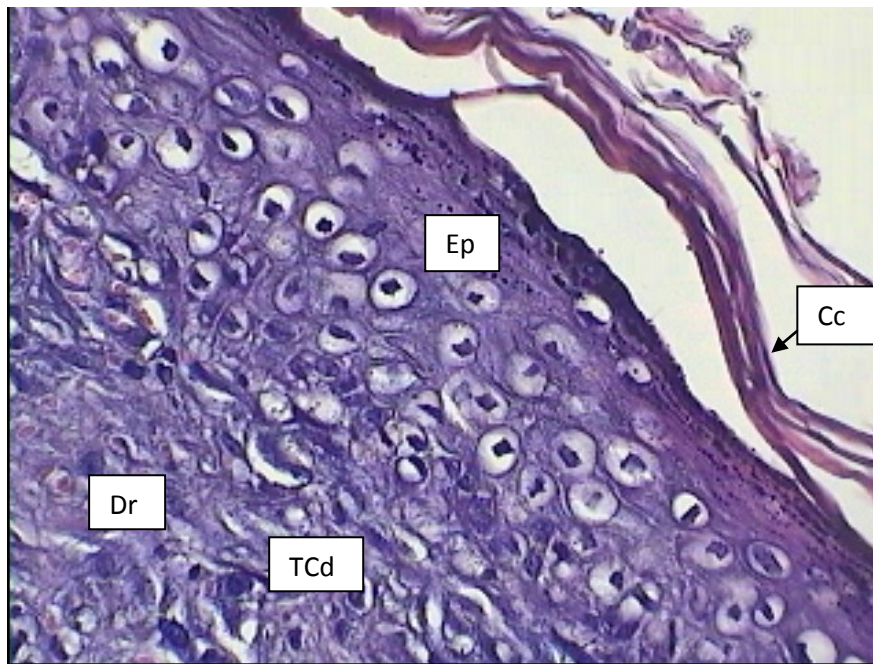


Figure 17 : Coupe histologique de la peau traitée avec le gel, vue au MO (x40) :
Cc : couche cornée, Ep : épithélium (épiderme), Dr : derme, TCd : tissu conjonctif dense

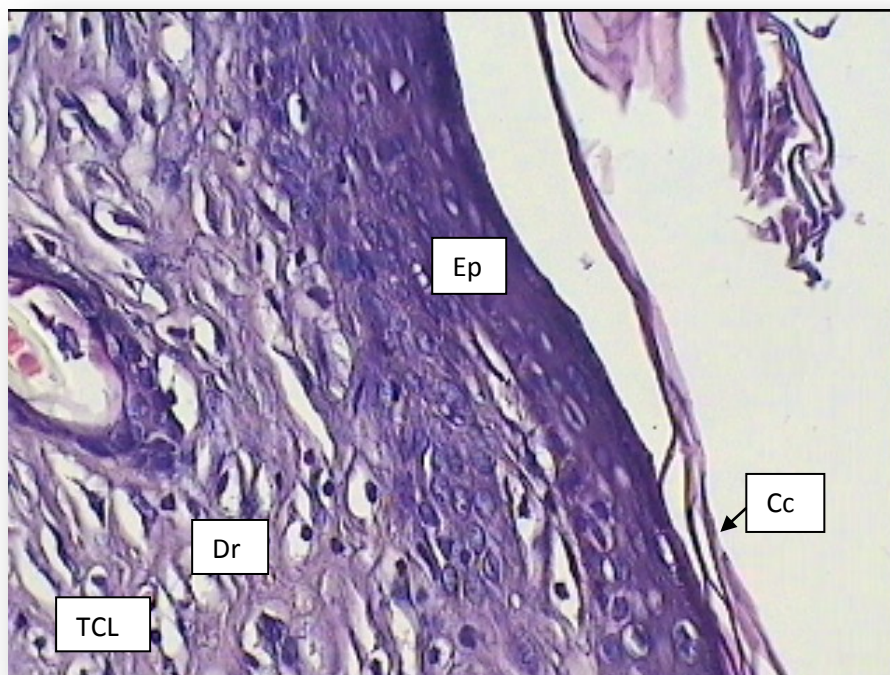


Figure 18: Coupe histologique de la peau traitée avec la crème, vue au MO (x40) :
Cc : couche cornée, Ep : épithélium (épiderme), Dr : derme, TCL : tissu conjonctif lâche

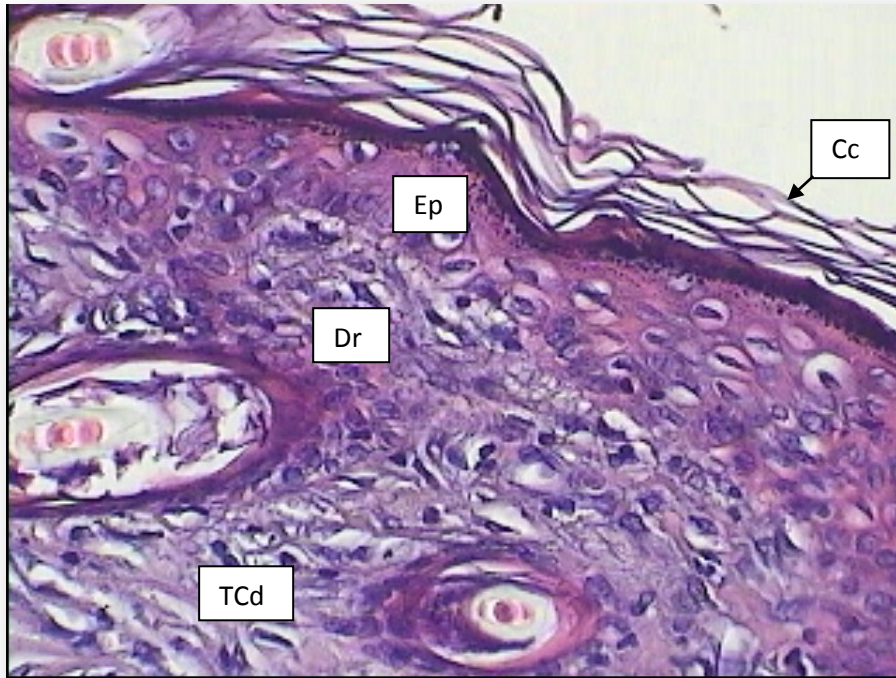


Figure 19 : Coupe histologique de la peau traitée avec le Madécassol, vue au MO (x40) :
Cc : couche cornée, Ep : épithélium (épiderme), Dr : derme, TCd : tissu conjonctif dense

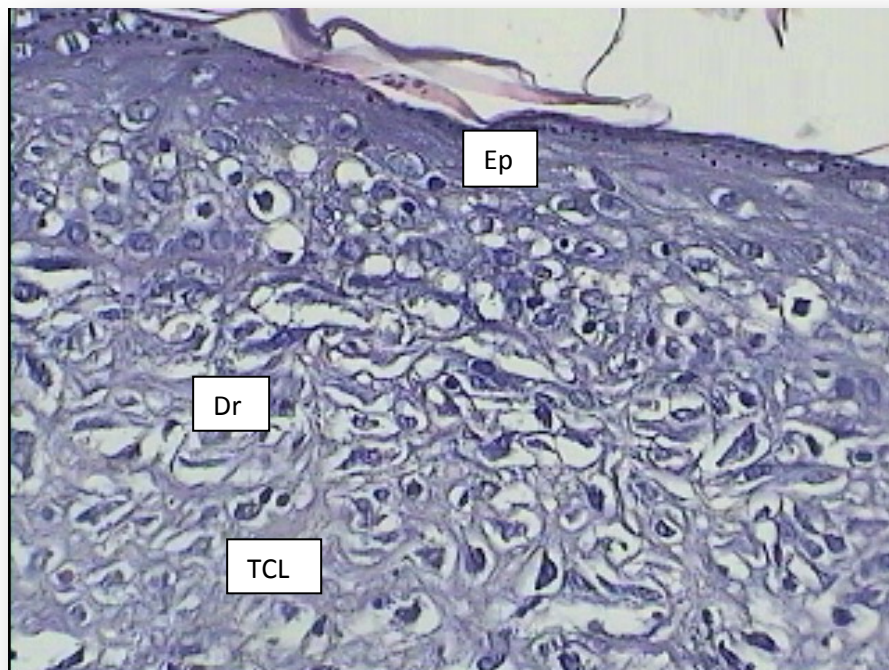


Figure 20 : Coupe histologique de la peau non traitée, vue au MO (x40) :
Ep : épithélium (épiderme), Dr : derme, TCL : tissu conjonctif lâche

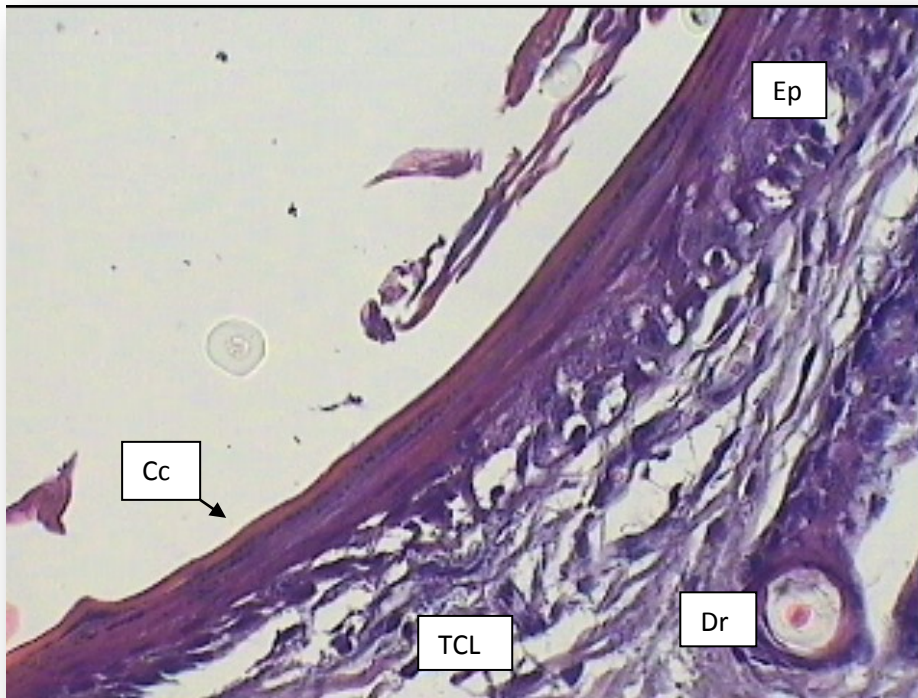


Figure 21 : Coupe histologique de la peau traitée avec le crème sans miel, vue au MO (x40) : Ep : épithélium (épiderme), Dr : derme, TCL : tissu conjonctif lâche

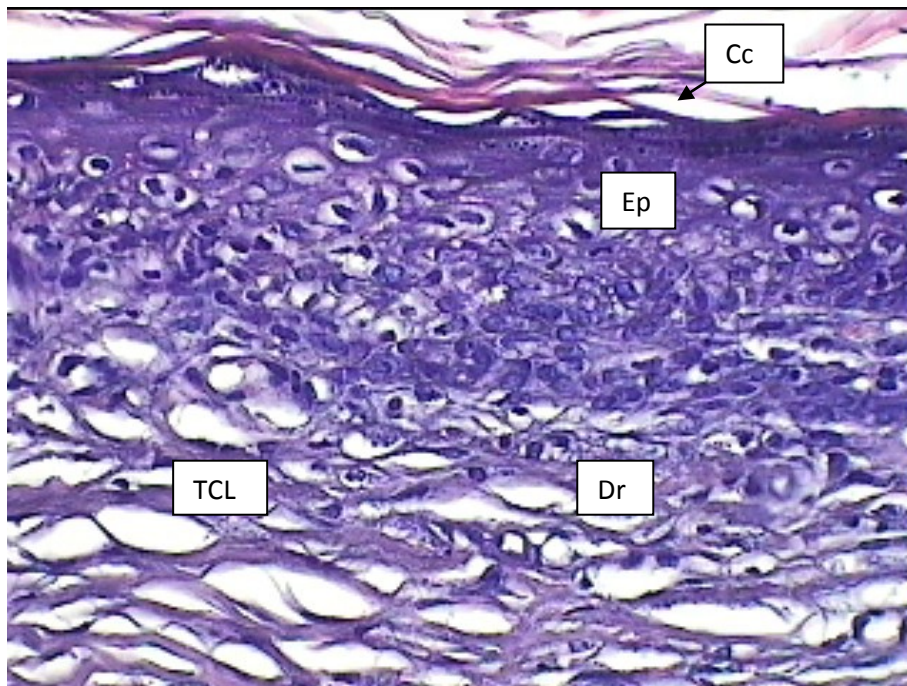


Figure 22 : Coupe histologique de la peau traitée avec le gel sans miel, vue au MO (x40) : Ep : épithélium (épiderme), Dr : derme, TCL : tissu conjonctif lâche

CONCLUSION

Le miel de thym que nous avons utilisé est de bonne qualité comme en témoignent les résultats du contrôle qualité tel que : la teneur en eau 16.2%, l'acidité libre 33.76 (meq.Kg⁻¹), l'indice de réfraction 1.496, la conductivité 230 (μS.cm⁻¹) et HMF 7.84 ppm.

A base de ce miel, nous avons mis au point deux formes pharmaceutiques : gel et crème. Ces formes ont subi plusieurs contrôles tels que l'osmolarité, la distribution granulométrique, le pH et la mesure rhéologique. Tous ces paramètres s'avèrent satisfaisants.

L'évaluation des activités antimicrobiennes et antifongiques ont montré que le gel à base de miel et la crème à base de miel ont les mêmes performances que le miel pur. Par contre, l'évaluation de l'activité cicatrisante a révélé que le gel à base de miel a les mêmes effets (% de contraction de la plaie) que le miel pur suivi de la crème à base de miel.

L'étude microscopique montre clairement l'effet bénéfique du gel à base de miel sur la Ré-épithélialisation, sur l'abondance des fibroblastes et sur les fibres de collagène au même titre que le miel pur.

A la lumière de ce travail, nous pouvons dire que le gel à base de miel a le même effet sur la durée et la qualité de la cicatrisation des plaies que le miel pur. Ainsi, il est possible d'utiliser ce gel pour le traitement des plaies propres de classe 1, qu'elles soient de premier ou second intention, au même titre que le miel pur, tout en profitant des avantages suivants :

- L'application facile du gel sur les plaies.
- Nettoyage plus facile des plaies (contrairement au miel pur, le gel ne colle pas et ne se cristallise pas).
- Le gel a un écoulement rhéofluidifiant, ce qui permet son conditionnement dans des tubes de faible volume.

Perspectives

Il serait intéressant de poursuivre cette étude en prenant en considération les suggestions suivantes :

- ✓ Validation et mise au point d'une méthode d'identification du type de miel par HPLC.
- ✓ Validation et mise au point d'une méthode d'analyse indicatrice de stabilité pour le gel à base de miel.

- ✓ Réalisation d'une étude histologique pour chaque étape de la cicatrisation, afin de déterminer avec exactitude l'impact du gel à base de miel sur chaque étape de la cicatrisation.
- ✓ Poursuivre la cicatrisation au-delà de 20 jours jusqu'à maturation complète de la plaie.
- ✓ Préconiser une stérilisation par rayonnement gamma, vu la sensibilité du gel à base de miel à la température élevée (supérieure à 45°C). Une étude sur l'effet des rayonnements sur la qualité du gel est souhaitable.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **ADAM. F., HADOM. H., et MAURIZIO. A. (1974)** : Livre des denrées alimentaires suisse. Miel et miel artificiel. p34.
- 2- **ACCORTI. M., PIAZZA. M.G. et PERSANO L., (1987)** : La conductivité électrique et le contenu en cendres du miel. *Apiacta*, 22, 19-20.
- 3- **AERTS. A., NEVELSTEEN. D., RENARD. F (2008)** : Soins de plaies. Editions de Boeck, p 409.
- 4- **ALLEN. K.L., MOLAN. P.C., REID G.M. A., (1991)** : Survey of the anti bacterial activity of some New Zeland honeys. *J. pharm. Pharmacol.* ; 43: 817-822.
- 5- **ALLO.O, BLANC.P, DALMASSO.M.A (2005)** : cahier du préparateur : pharmacie galénique, 2^{ème} édition. Ed Groupe liaisons. P 97-99.
- 6- **AI-WAILI.N, SALOM.K, AI-GHAMDLI.A.A (2011)**: Honey for Wound Healing, Ulcers, and Burns; Data Supporting Its Use in Clinical Practice. The Scientific World JOURNAL Volume 11 (2011), Pages 766-787.
- 7- **ANUPAMA.D, BHAT.K.K. , SAPNA.V.K. (2002)** : Sensory and physico-chemical properties of commercial samples of honey. Sensory Science Department, Central Food Technological Research Institute, Mysore-570 013, India.
- 8- **CAILLAS. A., (1968)** : Quelques notions de palynologie pratique des pollens de la flore du sud-est méditerranéen français.
- 9- **CHATAWAY, H. D., (1935)**: Determination of moisture in honey. *Can. J. Res.*, 6: 532-547.
- 10- **CODEX NORME POUR LE MIEL, (2001)** : CODEX STAN 12-1981 : p1-10.
- 11- **COUARRAZE.G, GROSSIOD (2000)** : Initiation à la rhéologie, 3^{ème} édition technique et documentation
- 12- **DE BODT.G (2004)** : Pansements de pointe et pointe de miel abeilles & cie .n°103.6
- 13- **DOMEREGO. R., IMBERT. G., BLANCHARD. C., (2009)** : Les remèdes de la ruche. Ed. ALPENS, p 95.
- 14- **FERFARA. A., (1990)** : Etude des propriétés physico-chimiques de quelques miels d'Algérie. Mémoire d'ingénieur d'état en Agronomie. Institut National d'Agronomie d'Algérie.
- 15- **FOWLER.D. (1993)** :Principals of wound healing. In HARAR.J. Surgical complication and wound healing in the small animal practice. W.B. Saunders (Ed.):1-31.
- 16- **GONNET M., (1982)** : Le miel : composition, propriétés, conservation. Ed. INRA station expérimentale d'apiculture, p. 1-18.
- 17- **GONNET. M., (1993)** : Les principaux critères de la qualité d'un miel, l'abeille de France et de l'apiculteur, vol.783, n°6,269-271.

- 18- **GREGORY.C.R. (1999)** : Wound healing and influencing factors. In FOWLER.D, WILLIAM.J.M. Manual of canine and feline wound management. British small animal veterinary Association (Ed.): 13-23.
- 19- **HOSGOOD. G. (2006)** : Stages of wound healing and their clinical relevance. *veterinary clinical small animal*.36 (4):667-685.
- 20- **INTERNATIONAL HONEY COMMISSION (2009)** : Harmonised methods of the international honey commission, p 21.
- 21- **JENKINS. G.W, TORTORA .GJ, KEMNITZ.CP (2006)** : Anatomie et physiologie: de la science à la vie. Edition J. Wiley and Sons. Chapitre 5. p. 148-71. New York.
- 22- **JOHNSTON.D.E. (1992)** : Cicatrisation des plaies cutanées. *Point veterinary*.24 (numéro spécial « chirurgie plastique et reconstructrice ») :21-24.
- 23- **KOC. AN.,et al .,(2011)** : Antifungal activity of the honeybee products against *Candida* spp. And *Trichosporon* spp. *J. Med. Food* 14(1-2):128-34.
- 24- **LOUVEAUX. J, (1968)** : L'analyse pollinique des miels, in *Traité biologique de l'abeille*, Tome 3. Ed. Masson de Cie, Paris. p 324-361.
- 25- **LOUVEAUX J, (1968)** : Composition propriété et technologie du miel. Les produits de la ruche, in *Traité de biologie de l'abeille*. Tome 03. Ed Masson et Cie. 389p.
- 26- **LOUVEAUX. J., (1976)** : caractéristiques et composition du miel. Ed. INRA, pp. 37-46.
- 27- **LOUVEAUX. J, (1985)** : Les abeilles et leur élevage. Ed Opida. p : 165-181.
- 28- **MASON L.K., (1993)** : Treatment of contaminated wounds, including wounds of the abdomen and thorax. In the HARAR.J. *Surgical complications and wound healing in the small animal practice*. W.B. Saunders (Ed.) : 33-62.
- 29- **MEENA M.R., SETHI V, (1994)** : Antimicrobial activity of essential oils from spices. *Journal of food science and technology*. Mysore.
- 30- **MOISSONIER.P. (2002)** : La cicatrisation des plaies. *Action veterinaire*. Edition spéciale chirurgie : p 3-6.
- 31- **MOLAN P.C., (2001)** : Why honey is effective as a medicine, the scientific explanation of its effects. *Bee world*; 82: 22-40.
- 32- **MSDA, (2004)** : Produit apicole, chapitre 23A Miel, p1-37.
- 33- **NADA V., SARKAR B.C., SHARMA H.K and BAWA A.S. (2003)** : physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in North India. *Journal of Food Composition and Analysis* ,16 :613-619. In *Identification des plantes mellifères et analyses physicochimique des miels Algériens*. Thèse de doctorat : Biochimie. Oran 2014. P 21.
- 34- **NAIR S. (2014)** : Identification des plantes mellifères et analyses physicochimique des miels Algériens. Thèse de doctorat : Biochimie. Oran.

- 35- **PHARMACOPEE EUROPEENNE, (2014)** : 8^{eme} édition, p 2987-2988.
- 36- **PIAZZA.M.G., ACCORTI.M., PERSANO ODDO.L., (1991)** : Electrical conductivity, ash, colour and specific rotatory power in Italian unifloral honeys. *Apicoltura* 7, 51-63.
- 37- **PORE.J (1992)**: Emulsion, microémulsion, émulsion multiple, édition technique des industrie gras
- 38- **PROST. P, (1987)** : Connaître l'abeille, conduire le rucher. Ed J.P. Baillière .Paris. p146, 3 10-1-4-5-6, 356.
- 39- **RIGAL.M.L (2012)** : **Miel et gelée royale** : Utilisations thérapeutiques dans le domaine cutané et application en cosmétologie. thèse de doctorat. Université de limoge, faculté de pharmacie.
- 40- **ROMAN.P, GAUTHIER.J.R (2009)** : Les abeilles et la fabrication du miel. Ed l'astronome. 47 p. France.
- 41- **SAURY, (1981)** : Les plantes mellifères (l'abeille et ses produits).Ed. Le chevalier, p171.
- 42- **SCHWEITZER. P, (2005)** : encore des miels hors normes. *Revue l'abeille de France* N°917 laboratoire d'analyse et d'écologie apicole. 03p.
- 43- **SURENDRA. R. J., HERMANN. P., ALFONS. W., WERNER. O. (2000)** : Physico-chemical characteristics of *Apis dorsata*, *A. cerana* and *A. mellifera* honey from Chitwan district, central Nepal. *Apidologie*. p 367–375.
- 44- **SWAIM S.F, HENDERSON R.A (1997)** : Wound healing. In SWAIM S.F. Small animal wound management. William and Wilkins Company (Ed.): 9-33.
- 45- **TOMCZA. C., (2010)** : Utilisation du miel dans le traitement des plaies. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon.
- 46- **VAN DEN BERG A.J. , et al.,(2008)** : An in vitro examination of the antioxidant and anti-inflammatory properties of buckwheat honey *J. Wound Care*. 17(4):172-174.
- 47- **WHITE R. (1999)** : the aetiology and classification of wounds and skin deficits. In FOWLER D, WILLIAM J.M. *Manual of canine and feline wound management and reconstruction*. British Small Animal. Veterinary Association (Ed.): 5-12.