

République Algérienne Démocratique et Populaire
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université IBN-KHALDOUN de TIARET

جامعة ابن خلدون تيارت

Institut des Sciences Vétérinaires

معهد علوم البيطرة



Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de doctorat en sciences vétérinaires

Intitulé :

**Evaluation de l'effet d'un gel à base de miel et de la
sulfadiazine argentique sur les plaies diabétiques chez un
animal modèle**

Présentée par : HAMDY Mohamed

Devant le jury composé de :

Président :	BENALLOU Bouabdellah	Professeur	ISV Tiaret
Examineur :	AMARA Karim	Professeur	ISV Tiaret
Examineur :	KAIDI Rachid	Professeur	ISV Blida
Examineur :	AIT-LOUDHIA Khatima	Professeur	ENSV Alger
Examineur :	AMMAM Abdelkader	MCA	Univ-Saida
Rapporteur :	KHIATI Baghdad	Professeur	ISV Tiaret

2020-2021

Dédicace

Je dédie ce travail à :

A mes chers parents, qu'ALLAH, le tout puissant, leur accorde sa miséricorde et me les garde.

La femme de ma vie avec laquelle tout est facile et réalisable, que dieu réunisse nos chemins pour une longue vie commune et sereine, à ma très chère épouse.

Ma source d'inspiration, qui me rend la vie plus belle, mes enfants, Lina Ritedj, Ahmed Younes et Anis.

Mes sœurs, mes frères, ainsi que mes beaux parents, mes beaux frères, belles sœurs, mes neveux et nièces.

Tous mes amis, Amine AYADE, Mohamed, Abdelatif BOUDRAA, Idir BENBELKACEM, Mohamed Saïd SAIM, Sofiane DERRAR, Rachid MRATI, Lhadj Fghoul HALOZ.

Remerciements

Je loue et rends grâce à Allah de m'avoir donné la détermination et le courage tout au long de ce parcours de recherche et d'expérimentation pour mener à bien ce travail

Je remercie notre prophète et éducateur que la paix et le salut d'Allah soient sur lui.

Un remerciement particulier à mon encadreur le **Pr. KHIATI Baghdad** pour toute la peine qu'il s'est donné et de n'avoir ménagé aucun effort pour m'aider et m'encourager, en dépit de ses nombreux engagements. Toute ma gratitude pour sa présence et son assistance.

Mes remerciements aux membres de jury qui vont consacrer un temps précieux à la lecture de ce travail :

Professeur BENALOU Bouabdellah

De l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret, Quinous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de these.

Hommages et respect

Professeur KAIDI Rachid

De l'institut des sciences vétérinaires de Blida, qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de these, Hommages et respect

Professeur AIT-LOUDHIA Khatima

De l'école nationale supérieure vétérinaire d'Alger Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de these, Hommages et respect

Professeur AMARA Karim

De l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret, Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de these, Hommages et respect

Docteur AMMAM Abdelkader

De l'université de Saida Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de these, Hommages et respect

Je remerce aussi chaleureusement :

Docteur **MOUSSA ahmed**, enseignant à l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret pour son aide précieuse et ses encouragements.

Docteur **HEMIDA Houari**, enseignant à l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret pour son aide et sa gentillesse.

Docteur **AYAD Amine**, enseignant à l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret pour son soutien.

Docteur **SMAIL Fadhila**, enseignante à l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret pour son aide

Docteur **AISSAT saad**, enseignant à l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret, pour ses encouragements

Docteur **BOUACHA sofiane** et Docteur **DAHMANI oualid**, enseignants à la faculté des sciences de la nature et de la vie de Tiaret pour leurs aide

AISSA Mohamed Amine et **BOUDALI Soumia** laborantins au niveau de l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret pour leurs aide

Sincères remerciements.

Je remercie tous le personnel de l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret.

Mes remerciements à tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à réaliser ce travail.....

Liste des figures

Figure N°-01: coupe d'histologique d'une peau de lapin (10x H&E).	3
Figure N°-02 : follicule pileux en coupe transversale et topographie cutanée	12
Figure N°-03: les phases d'élaboration du miel	38
Figure N°-04: composition moyenne du miel	40
Figure N°-05 : schéma représentant les effets de l'osmolarité du miel	46
Figure N°-06 : Effets thérapeutiques du miel au niveau des quatre phases du Processuscicatriciel	51
Figure N°-07 : mécanismes moléculaire ciblant l'activité cicatrisante de la propolis	54
Figure N°-08 : composition moyenne de la cire	55
Figure N°-09 : les deux traitements utilisés dans notre expérimentation	58
Figure N°-10: méthodes de préparation et d'ensemencement de l'inoculum bactérien	60
Figure N°-11: les animaux utilisés dans notre étude	61
Figure N°-12: préparation chirurgicale du site opératoire	65
Figure N°-13 : les étapes de réalisation des plaies	66
Figure N°-14: application des différents traitements sur les plaies	67
Figure N°-15 : application des couches de pansement	68
Figure N°-16: les étapes permettant le calcul des superficies des plaies	70
Figure N°-17: différentes étapes de préparation des lames histologiques	73
Figure N°-18: spectre infrarouge du gel à base de miel	76
Figure N°-19 : résultats de l'effet antibactérien des deux produits contre <i>Escherichia coli</i>	77
Figure N°-20 : résultats de l'effet antibactérien des deux produits contre <i>Staphylococcus aureus</i>	77
Figure N°-21 : évolution de la glycémie par rapport au temps chez les lapins diabétiques et non diabétiques	79
Figure N°-22: section d'un pancréas de lapin non diabétiques (40x H&E)	80
Figure N°-23 : Sections du pancréas d'un lapin diabétique	81
Figure N°-24: aspects macroscopiques des plaies des lapins diabétiques et non diabétiques à J 7	90
Figure N°-25: pourcentage de contraction des plaies contrôles, SDA et GM par rapport au temps ;	92

Figure N°-26: aspects macroscopiques des plaies chez les lapins non diabétiques et diabétiques à J 14	93
Figure N°-27: pourcentage de contraction des plaies contrôles, SDA et GM par rapport au temps ;	95
Figure N°-28: aspect macroscopique des plaies des lapins non diabétiques et diabétique à J 21	96
Figure N°-29: pourcentage de contraction des plaies contrôles, SDA et GM par rapport au temps ;	98
Figure N°-30 : aspects macroscopiques des plaies chez les lapins non diabétique est diabétique à J 28.....	99
Figure N°-31: pourcentage de contraction des plaies contrôles, SDA et GM par rapport au temps ;	101
Figure N°-32: coupes histologies des plaies à j7 (10x H&E)	106
Figure N°-33: coupes histologiques d'une plaie traitée par le gel à base de miel à j7de lapin non diabétique (40x H&E).....	107
Figure N°-34 : coupes histologies des plaies à j14 (10x H&E)	108
Figure N°-35: coupes histologies des plaiesà j21 (10x H&E)	111
Figure N°-36 : coupes histologies des plaies à j28 (10x H&E)	113

Liste des tableaux

Tableau N-01 : différentes proportions des produits utilisés dans la préparation du gel à base de miel.	57
Tableau N-02 : répartition expérimentale des groupes d'animaux	64
Tableau N°-03 : critères macroscopiques d'évaluation des plaies et du pansement.....	69
Tableau N°-04 : scores des critères d'évaluation histopathologique du processus cicatriciel des plaies induites chirurgicalement chez le lapin	74
Tableau N°-05 : les diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne en fonction des différents traitements	77
Tableau N°-06 : moyennes des diamètres des zones d'inhibitions du gel à base de miel et de la sulfadiazine contre <i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	77
Tableau N°-07 : moyenne \pm écart-type des scores d'évaluation physique des plaies non diabétiques et des plaies diabétiques contrôlées et celles suivies par les différents traitements en fonction du temps.	85
Tableau N°-08 : moyenne \pm écart-type des scores d'évaluation physique du pansement des plaies non diabétiques et diabétiques contrôlés et celles suivies par les différents traitements en fonction du temps.	88
Tableau N°-09 : comparaison des moyennes d'expansion des plaies des lapins diabétiques et non diabétiques à j0.	89
Tableau N°-10 : comparaison des moyennes d'expansion des plaies contrôles, suivies par la SDA et celles suivies par le GM à j0 des lapins D et ND du groupe S/J 7.....	90
Tableau N°-11 : comparaison des moyennes d'expansion des plaies contrôlées, traitées à la SDA et celles traitées au GM à j0 des lapins D et ND du groupe S /J 14.....	94
Tableau N°-12 : comparaison des moyennes d'expansion des plaies contrôles, suivies par la SDA et ceux suivies par le GM à j0 des lapins D et ND du groupe S /J 21.	97
Tableau N°-13 : comparaison des moyennes d'expansion des plaies contrôles suivies par la SDA et celles suivies par le GM à j0 des lapins D et ND du groupe S/J 28.....	100
Tableau N°-14 : durées moyennes de cicatrisation complète des plaies des animaux diabétiques et non diabétiques (moyenne (js) \pm ET)	102
Tableau N°-15 : moyennes des scores des paramètres d'évaluation histopathologiques des plaies diabétiques et non diabétiques par rapport au temps.....	104

La liste des abréviations

- **ADN** : L'acide désoxyribonucléique
- **ADP** : adénosine-diphosphate
- **AINS** : Les anti-inflammatoires non stéroïdiens
- **APUD** : Amine Precursor Uptake and Decarboxylation
- **ATP** : adénosine-triphosphate
- **A_w** : Activité de l'eau
- **CMC-Na** : Carboxymethyl cellulose sodique
- **D.O** : densité optique
- **DID** : diabète insulino-dépendant
- **DNID** : diabète non insulino-dépendant
- **EGF** : Epidermal Growth Factor
- **ERO** : espèces réactives oxygénées
- **FGF** : facteurs de croissance des fibroblastes
- **FN** : Fibronectine
- **FTIR** : La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
- **GM** : Gel à base de miel
- **GN**: Gélose nutritive
- **IgE** : Immunoglobuline E
- **IFN** : Interféron
- **IGF** : Insulin-Like Growth Factor
- **IL** : Interleukine
- **LND/LD** : Lapins non diabétiques / lapins diabétiques
- **MEC** : matrice extracellulaire
- **MGO** : Le méthylglyoxal
- **MMP** : Matrix metalloproteinase
- **NAD** : nicotinamide adénine dinucléotide
- **NO** : monoxyde d'azote
- **PDGF** : Platelet Derived Growth Factor
- **PF4** :facteur plaquettaire 4
- **SARM** : *Staphylococcus aureus* résistante à la methicilline
- **SDA** : Sulfadiazine argentine
- **STZ** : Streptozotocine
- **TGF** : Transforming Growth Factor
- **TGF** : Transforming Growth Factor
- **TIMP** : inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases
- **UFC** : Unité formant de colonie
- **UVA** : Ultra-violet A
- **UVB** : Ultra-violet B

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	---

Chapitre I : Anatomie de la peau

I-La structure de la peau :	3
I-1-L'épiderme :	4
1-La couche cornée (stratum corneum) :	4
2-La couche claire (stratum lucidum) :	4
3-La couche granuleuse (stratum granulosum) :	4
4-La couche épineuse (stratum spinosum)	5
5-La couche basale (stratum germinatum) :	5
I-2- la jonction dermo-épidermique :	5
I-3-Le derme :	6
1-Composition du derme :	6
a-Fibres de collagènes	6
b-Fibres élastiques	7
c-Fibres réticulaires	7
d-La substance fondamentale	7
e-Les différentes cellules du derme	7
I-4- L'hypoderme :	8
I-5- Les glandes de la peau :	9
1-Les glandes sébacées :	9
2-Les glandes sudoripares :	10
3-Les glandes spécialisées :	10
4-Les poils :	10
5-Les follicules pileux :	11
6-Les griffes :	12
I-6- Vaisseaux de la peau :	13
I-7- Innervation cutanée :	13
I-8- Le réseau lymphatique cutané :	14

Chapitre II : Processus de cicatrisation cutanée

Introduction	15
Déroulement de la cicatrisation cutanée	15
I- Le processus inflammatoire	15
a-Phase silencieuse	16
b-La phase de détersion	17
II- Processus de réparation	18
a-Proliférations capillaire et fibroblastique	19
b-La Contraction	21

c-Epithélialisation ou épidermisation	22
III-Phase de maturation ou de remodelage	23
IV- Diabète et processus cicatriciel.....	25
IV-1 : Définition et classification du diabète.....	25
1- Définition du diabète.....	25
2-Classification du diabète.....	25
a-Le diabète de type 1.....	25
b-Le diabète de type 2	26
c-Autres formes	26
1-Diabète gestationnel.....	27
2-Diabète secondaire	27
IV-2- Physiopathologie du diabète	27
1-Physiopathologie du diabète de type 1	27
2-Physiopathologie du diabète de type 2	28
a-Insuffisance pancréatique	28
b-Résistance à l'insuline	29
IV-3- Diabète expérimental	29
1-Alloxane	30
2-Streptozotocine	31
IV- 4- Effets du diabète sur le processus cicatriciel.....	32

Chapitre III : Effets cicatrisants du Miel, propolis et cire d'abeille

I- Le miel	37
I-1- Formation du miel	37
I- 2-Variétés du miel.....	39
I.2.1. Miels issus du nectar.....	39
a- Miel uni floral ou mono floral.....	39
b- Miel multi floral	39
I.2.2. Miel issu de miellat	39
I-3-Composition du miel	39
a-Glucides	40
b-Protides	40

c-Lipides	41
d-Minéraux	41
e-Enzymes	41
f-Vitamines	42
g-Acides	42
II-Propriétés thérapeutiques du miel	43
II-1- Propriétés anti-oxydantes	43
II-2- Propriétés anti-inflammatoires	44
II-3- Propriétés immunomodulatrices	44
II-4- Activité antibactérienne	45
II-4-1- Origine	45
a-Action osmotique	45
b-Acidité	46
c-Peroxyde d'hydrogène	47
d-Facteurs phytochimiques	48
1-La β -defensine 1	48
2-Le méthylglyoxal	48
3-Autres substances	48
II-4-2- Spectre antimicrobien	49
III-Utilisation du miel dans le traitement des plaies	49
IV-La propolis	51
V-La cire d'abeille	54
V1. Composition	55
V2. Propriété thérapeutiques	55

Chapitre IV : Matériel et méthodes

I- Matériel et méthodes	56
I-1- Déroulement de l'étude	56
I-2- Partie in-vitro	56
I-2-1-Méthode de préparation du gel à base de miel	57
I-2-2 Sulfadiazine argentique à 1% (FLAMAZOLE)	57
I-3- Caractérisation du gel à base de miel par FTIR	58
I-4- Effet antibactérien du gel à base de miel	58

I-4-1-Souches bactériennes	58
a-Préparation de l'inoculum bactérien	59
b-L'ensemencement	59
c-Techniques de diffusion en milieu solide (Méthode des puits)	59
I-5- Partie in-vivo	60
I-5-1 Modèle expérimental animal	60
I-5-2-Protocole expérimental	62
1-Induction du diabète	62
a-Le produit utilisé :	62
b-Préparation du produit et d'induction du diabète	62
c-Suivi des lapins diabétiques	62
2- Répartition des groupes	63
3-Model expérimental de la cicatrisation des plaies	64
4-Suivi des plaies et modes d'application des différents traitements	66
5-Paramètres macroscopiques d'évaluation des plaies	68
6- Paramètres microscopiques d'évaluation des plaies	71
6-1- Préparation des lames histologiques	71
a-Fixation et inclusion	71
b-La déshydratation	72
c-La clarification	72
d-L'inclusion	72
e-L'enrobage	72
f-Confection et coloration des lames.....	72
6-2- Lecture de lames	74
Etude statistique	75

Chapitre V : Résultats

I-Partie in-vitro	76
I-1- Résultats de la caractérisation par FTIR	76
I-2- Résultats de l'effet antimicrobien	76
II-Partie in-vivo	78
II-1- Résultats de l'induction du diabète	78
II-1-1-Comportement et symptômes cliniques	78
II-1-2- Evolution de la glycémie	78

a-Suivi de la glycémie durant le temps	79
b-Résultats histologiques	79
II-2- Résultats macroscopiques des plaies	82
II-2-1-Evaluation semi-qualitative	82
1-Evaluation physique des plaies et du pansement chez les lapins diabétiques et Nondiabétiques.....	82
a-Exsudats.....	82
b-Hydratation	83
c-La couleur	83
d-L'odeur	84
2-Evaluation physique du pansement chez les lapins non diabétiques et diabétiques	86
a-Retrait du pansement	86
b-Accumulation des fluides	86
c-Flexibilité	87
II-2-2-Evaluation quantitative.....	89
1-Expansion des plaies à j0 des groupes diabétiques et non diabétiques	89
2-Evaluation macroscopique des plaies diabétiques et non diabétiques du groupe de lapins sacrifié à j7	89
2-1-La contraction des plaies diabétiques et non diabétiques du groupe de lapins sacrifiés à j7	90
a-Expansion des plaies à j0 des deux groupes D et ND groupe de lapins sacrifiés à j7..	90
b-Evaluation planimétrique des plaies à J7	91
3-Evaluation macroscopique des plaies diabétiques et non diabétiques du groupe de lapins sacrifié à j14	93
3-1-La contraction des plaies diabétiques et non diabétiques du groupe de lapins sacrifiés à j14	94
a-Expansion des plaies à j0 des deux groupes D et ND groupe de lapins sacrifiés à j14	94
b-Evaluation planimétrique des plaies à J14.....	94
4-Evaluation macroscopique des plaies diabétiques et non diabétiques du groupe de lapins sacrifié à j21	95
4-1 La contraction des plaies diabétiques et non diabétiques du groupe de lapins sacrifiés à j21	97
a-Expansion des plaies à j0 des deux groupes D et ND groupe de lapins sacrifiés à j21	97
b-Evaluation planimétrique des plaies à J 21	97

5-Evaluation macroscopique des plaies diabétiques et non diabétiques du groupe de lapins sacrifié à j28	99
5-1-La contraction des plaies diabétiques et non diabétiques du groupe de lapins sacrifiés à j28	100
a-Expansion des plaies à j0 des deux groupes D et ND groupe de lapins sacrifiés à j28	100
b-Evaluation planimétrique des plaies à J 28	100
II-2-3- Durée de cicatrisation totale des plaies	100
II-3- Evaluation microscopique des plaies diabétiques et non diabétiques	103
II-3-1- Suivi histologique de la cicatrisation des plaies	103

Chapitre VI : Discussion

I-Partie in vitro	114
II-Partie in-vivo	118
Conclusion	126
Références bibliographiques :	128

Introduction

INTRODUCTION

La peau et les épithéliums sont en général les seuls tissus capables de se régénérer. Cette propriété confère à la peau un rôle protecteur essentiel au maintien de l'homéostasie de l'organisme. Cette régénération est normalement active pour renouveler et maintenir la fonction barrière, ou exceptionnellement active lors de la réparation suite à une lésion ou plaie cutanée. Ce processus coordonne la prolifération synchronisée de plusieurs tissus (épithélial, connectif, endothélial) afin de restituer la barrière cutanée le plus rapidement possible. Ainsi, chez des sujets sains, ce processus se déroule sans complication. En revanche, chez des personnes développant certaine maladie systémique peut être sujet à des complications. En effet, ce processus de régénération tissulaire est compromis et se traduit par un dysfonctionnement d'un ou de plusieurs de ces composants, entraînant une cicatrisation non-réparée, prolongée (**Ferraq, 2007**).

L'altération de la cicatrisation des plaies est l'une des complications les plus courantes du diabète sucré. Le processus de guérison des plaies chez les patients atteints de diabète sucré est détérioré en raison de conditions hyper-glycémiques qui mènent à des complications chroniques majeures, telles que les ulcères du pied diabétique. La cicatrisation anormale entraîne souvent la formation d'un ulcère chronique, qui a causé une morbidité mondiale majeure en raison de divers problèmes cliniques et socioéconomiques. Il s'agit d'un risque de 15% d'ulcères du pied chez les diabétiques, dont 85 % devront subir des amputations des membres inférieurs (**Tan et al., 2019**).

Au cours des dix dernières années, l'importance d'utiliser des traitements alternatifs et des produits naturels dans la gestion des plaies a augmenté rapidement (**Pereira et Bartolo, 2016**).

Il y a eu diverses tentatives pour accélérer la cicatrisation chez les diabétiques, mais jusqu'à présent seulement quelques remèdes thérapeutiques efficaces sont disponibles. Les traitements thérapeutiques alternatifs utilisant des produits naturels sont très demandés (**Tan et al., 2019**).

Aucun traitement unique n'a prouvé qu'il était suffisant et des approches thérapeutiques à multiples facettes peuvent être nécessaires pour rétablir la guérison des plaies dans la population diabétique. L'emplacement superficiel et l'accessibilité de ces ulcères

chroniques offrent une occasion unique de développer de nouveaux véhicules qui peuvent livrer leur cargaison de médicaments pharmacologiques directement à la zone de pathologie par voie topique (**Rabbani et al., 2017**).

Malgré les progrès récents des soins de santé, la gestion inadéquate des plaies et le développement d'infections secondaires entraînant une morbidité accrue demeurent un problème de santé publique majeur dans le monde, en particulier dans les pays en développement. Par conséquent, la gestion de la plaie demeure un point important des recherches.

Récemment, l'intérêt d'utiliser des thérapies alternatives et des remèdes naturels dans la gestion des plaies a rapidement augmenté. Les méthodes alternatives ont un grand potentiel pour améliorer la guérison des plaies pour la population mondiale car elles réduisent le fardeau financier des traitements actuels. Un des produits naturels d'intérêt à cet égard est le miel qui avait attiré l'attention de nombreux chercheurs (**Mui Koon, 2014**).

Aujourd'hui, le miel fascine de plus en plus la médecine moderne : les travaux scientifiques prouvant ses propriétés cicatrisantes et antiseptiques puissantes se multiplient. Parallèlement, l'apparition de souches bactériennes toujours plus résistantes ainsi que l'augmentation du coût des pansements et des antibiotiques amènent l'homme à exploiter toutes les vertus de cette denrée noble. Le miel est redevenu une alternative à reconsidérer dans le traitement des plaies cutanées non cicatrisées (**Koechler, 2015**).

Pour ces diverses raisons on a conclu qu'il y a un intérêt grandissant dans la recherche de nouvelles thérapies pour les plaies diabétiques à travers la médecine alternative. Les objectifs de notre étude se résument comme suite :

- Evaluer les propriétés cicatrisantes du gel à base de miel dans les plaies de pleines épaisseurs chez l'animal diabétique et non diabétique;
- Corréler l'effet antimicrobien du gel à base de miel avec la prévention de l'infection des plaies de l'animal diabétique et non diabétique;
- Comparer l'effet du gel à base de miel à celui de la sulfadiazine argentique dans la gestion des plaies chez l'animal diabétique et non diabétique;
- Déterminer une formulation efficace, économique et rentable pour la gestion des plaies chez les diabétiques.

Chapitre I

Anatomie de la peau

I-La structure de la peau :

La peau des mammifères constitue un organe à part entière et joue un rôle d'une importance fondamentale : celui d'interface entre l'organisme et le milieu extérieur. Elle tient lieu de barrière protectrice contre les agressions physiques, chimiques et biologiques (par la sécrétion de substances aux propriétés antibactériennes et antifongiques) de l'environnement. Elle intervient également dans l'immunorégulation, par les kératinocytes, les cellules de Langerhans et les lymphocytes et dans la thermorégulation. Sa sensibilité est à la base de la perception sensorielle (c'est l'organe du toucher, sensible à la pression, la douleur, le chaud et le froid). Sa pigmentation assure une protection contre les agressions par les radiations solaires, ceux-ci participant aussi à la synthèse de la vitamine D par la peau. Enfin, il s'agit d'un organe de réserve d'électrolytes, d'eau, de vitamines, de graisses et de protéines (**Malnoux, 1991 ; Scott et al., 1995 ; Palazzi, 2002**).

Dans les différentes régions du corps, la peau varie par son épaisseur, sa couleur, et la présence ou non d'annexes cutanées que sont les poils, les glandes sébacées et les productions cornées. En dépit de ces différences traduisant des besoins fonctionnels variés, tous les types de peau présentent la même structure de base. Le revêtement cutané est constitué de trois couches superposées, de la surface vers la profondeur, l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Muguet, 2002**).

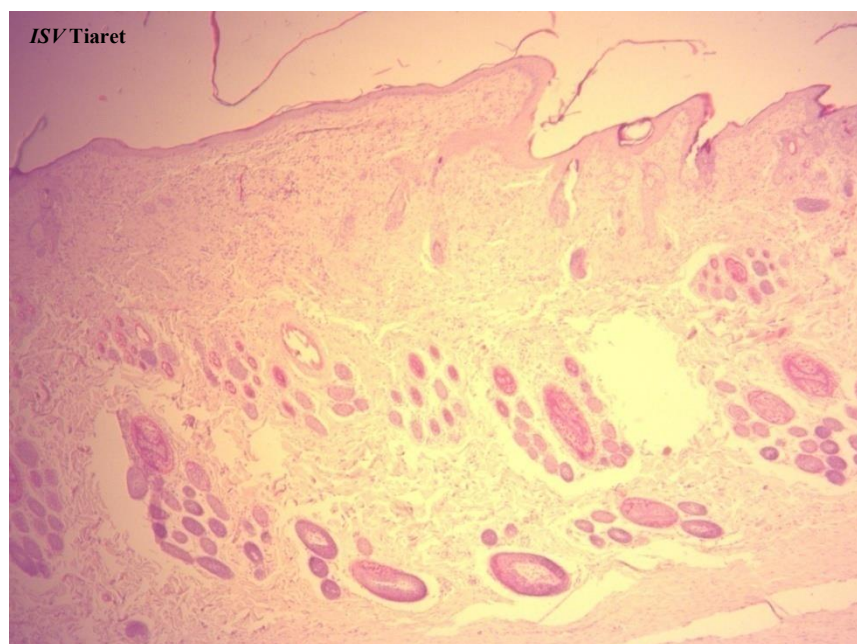


Figure N°-01: coupe histologique d'une peau de lapin (**Photo personnelle**).

I-1-L'épiderme :

L'épiderme, couche la plus externe de la peau, est en contact direct avec le milieu extérieur. Globalement, il s'agit d'un épithélium pavimenteux stratifié, à kératinisation superficielle et à renouvellement continu (**Delagoutte, 1977**).

Il est constitué de cinq couches cellulaires distinctes : la couche basale (*stratum basale*), la couche épineuse ou corps muqueux de Malpighi (*stratum spinosum*), la couche granuleuse (*stratum granulosum*), la couche claire (*stratum lucidum*) et la couche cornée (*stratum corneum*) (**Malnoux, 1991 ; Palazzi, 2002**). Le *stratum granulosum* et le *stratum lucidum* sont inconstants (**Mialot, 1993**).

1-La couche cornée (*stratum corneum*) :

La couche cornée est composée de plusieurs dizaines de strates de cellules kératinisées, mortes et anucléées. Ces cellules, appelées cornéocytes desquament en permanence isolément, à la surface de la peau. L'épiderme doit donc se renouveler constamment, ce qui est réalisé par la multiplication et la maturation permanente de cellules basales, afin de conserver une épaisseur fixe (**Malnoux, 1991 ; Palazzi, 2002**). L'équilibre entre la desquamation et la prolifération cellulaire de la couche basale assure une épaisseur épidermique constante en un point donné ainsi qu'un renouvellement constant des cellules. La perte brutale de cellules épidermiques lors des plaies cutanées devra être compensée par une augmentation du rythme de multiplication des cellules épidermiques (**Olivry et al., 1993**).

2-La couche claire (*stratum lucidum*) :

La couche claire est extrêmement fine, parfois absente (**Palazzi, 2002**). Elle se compose d'une assise de kératinocytes morts, anucléés, hyalinisés et complètement kératinisés (**Mialot, 1993**). On ne la trouve chez le lapin qu'au niveau de la peau des tétines et des coussinets plantaires (**Arvy et More, 1975**).

3-La couche granuleuse (*stratum granulosum*) :

La couche granuleuse est composée d'une à quatre strates de kératinocytes aplatis, dont le cytoplasme renfermant des grains de kératohyaline, et dont le noyau apparaît contracté (**Malnoux, 1991 ; Palazzi, 2002**).

4-La couche épineuse (*stratum spinosum*)

La couche épineuse est encore appelée corps muqueux de Malpighi. Elle est constituée de 2 à 3 couches de cellules nucléées, de forme cubique et aplatie. Ces cellules, appelées acanthocytes, sont issues de la division des kératinocytes de la couche basale (**Malnoux,1991 ; Palazzi, 2002**). Elle est appelée épineuse à cause de la rétraction des nombreux desmosomes lors de la préparation histologique, ils sont alors proéminents et bien visibles à l'examen microscopique (**Olivry et al., 1993**).

5-La couche basale (*stratum germinatum*) :

Une seule couche de cellules constitue la couche basale. Il s'agit de cellules cubiques acylindriques, non différenciées, implantées perpendiculairement à la jonction dermo-épidermique. Cette assise de cellules repose sur la membrane basale qui sépare l'épiderme du derme. Elles ont un index mitotique qui varie en fonction du cycle nyctéméral. Le pic d'activité mitotique se situe aux alentours de 12h-15h (**Delagoutte, 1977**). On trouve également des populations restreintes d'autres types cellulaires dans cette couche basale : des mélanocytes, qui synthétisent des granules de mélanine, et des cellules du système APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) qui appartiennent au système neuro-endocrinien diffus (**Arvy et More, 1975**).

I-2- la jonction dermo-épidermique :

L'épiderme est relié au derme au niveau d'une membrane basale complexe : la jonction dermo-épidermique. Elle se compose dans sa partie superficielle, de la membrane cytoplasmique basale des kératinocytes du *stratum basale*, ancrée à la *lamina lucida* par des tonofibrilles et des hémidesmosomes. La *lamina lucida* ou lame claire, composée de fibronectine, est traversée par des filaments de kalinine et de laminine qui vont s'ancrer dans la *lamina densa*. La *lamina densa* est composée, entre autres, d'héparans sulfate, de chondroïtine-6-sulfate et de collagène de type IV. Au niveau de la *sublamina densa*, un système de fibrilles et de plaques d'ancrage de collagène permet la cohésion au derme (**Olivry et al., 1993**).

Le réseau fibrillaire de collagène et de glycoprotéines présent au niveau de cette jonction joue aussi un rôle de barrière, de filtre physico-chimique entre le derme et l'épiderme. De nombreux antigènes sont présents au niveau de cette jonction comme les antigènes pemphigoïde bulleuse des desmosomes. (**Olivry et al., 1993**).

Lors de maladie auto-immune, ces antigènes sont la cible du système immunitaire. Leur rôle dans la cohésion du derme et de l'épiderme n'est plus assuré, expliquant l'aspect particulier des plaies au cours de ces maladies (décollement de l'épiderme) (**Olivry et al., 1993**).

I-3-Le derme :

Appelé aussi communément tissu conjonctif lâche, le derme est composé de cellules (fibroblastes, macrophages et mastocytes), de diverses fibres (collagène, fibres élastiques) et d'une matrice extracellulaire (substance fondamentale). C'est un tissu vascularisé et innervé qui contient la plupart des annexes épidermiques : les follicules pileux, les glandes sébacées et le muscle arrécteur (**McEwan, 1970 ; Olivry et al., 1993**).

Le derme est responsable de la texture, de l'élasticité, de la solidité et de la cicatrisation de la peau. Son rôle est majeur lors de cicatrisation par seconde intention ou la contraction fait intervenir ses propriétés élastiques.

1-Composition du derme :

a-Fibres de collagènes :

Représentent près de 90% des fibres dermiques. Ces fibres sont synthétisées par les fibroblastes et les myofibroblastes. Elles forment des rubans épais formés de multiples fibrilles protéiques, de grande résistance mécanique (**Palazzi, 2002**).

Les divers types de collagène diffèrent en fonction de l'assemblage des différentes chaînes polypeptidiques (**Braun, 2001**). Le collagène de type I est le principal composant structural de la peau. Le collagène de type III est aussi présent dans le derme et celui de type IV est un composant essentiel des membranes basales il s'agit d'un collagène de structure réticulaire (**Fowler, 1993**).

Au niveau cutané, le collagène est synthétisé par les fibroblastes sous la forme de larges molécules solubles : les procollagènes. Des triples hélices de procollagène sont secrétées hors des fibroblastes puis s'assemblent pour former des fibres de collagène dont les liaisons intracaténares sont assurées par l'hydroxylysine. Cette dernière est issue de la transformation de la lysine par la lysyl-hydroxylase (**Braun, 2001**).

b-Fibres élastiques :

Elles composent le second grand groupe de fibres dermiques. Elles sont responsables de la souplesse et de l'élasticité de la peau (**Olivry et al., 1993 ; Palazzi, 2002**). Leur quantité diminue au niveau des cicatrices cutanées. Elles sont formées de deux protéines dont le principal est l'élastine, un polypeptide linéaire (**Olivry et al., 1993**). Elles s'organisent en fins rameaux isolés. Certaines s'ancrent au niveau de la lame basale(**Palazzi, 2002**).

c-Fibres réticulaires :

Ce sont de fins éléments ramifiés et correspondent à des fibres de collagène immatures (**Malnoux, 1991 ; Palazzi, 2002**).

d-La substance fondamentale :

Elle est riche en glycosaminoglycanes et en protéoglycanes, molécules très hygroscopiques qui contribuent à l'équilibre hydroélectrique. Ces molécules très visqueuses jouent aussi le rôle de support pour les autres composants du derme. Elles permettent également la migration, la croissance et la différenciation de certaines cellules dermiques(**Mialot, 1993 ; Olivry et al., 1993**)

e-Les différentes cellules du derme :

Les cellules majoritaires du derme sont les fibroblastes. Ce sont des cellules d'origine mésenchymateuse responsables de la synthèse et de la dégradation des protéines matricielles fibreuses ou non fibreuses du tissu conjonctif. Les fibroblastes sont capables de synthétiser simultanément plusieurs types de collagène ainsi que de l'élastine et divers glycosaminoglycanes. Ils synthétisent des collagénases responsables de la dégradation des fibres de collagène. Ils sont également capables de produire de l'interferon b (IFN β) en réponse aux infections virales et peuvent induire une réaction inflammatoire par la stimulation de la production des cytokines de la famille de l'IL-8(**Olivry et al., 1993**).

Les cellules inflammatoires telles que les mastocytes, les macrophages et les plasmocytes sont en quantité variable dans le derme. Les mastocytes sont des cellules de grande taille dont le noyau est plutôt rond on les trouve généralement à proximité des vaisseaux sanguins, des capillaires. Leur cytoplasme renferme des granulations contenant des médiateurs préformés et néoformés de l'inflammation tels que l'histamine ou la sérotonine.

Libérés, ils participent à la réaction inflammatoire, en particulier lors de réaction allergique ce qui se traduira alors par de l'érythème et de l'œdème (**Malnoux, 1991 ; Palazzi, 2002**). Ils permettent également le recrutement des cellules inflammatoires sous l'action des diverses cytokines et des facteurs chimiotactiques (Neutrophil Chemotactic Factor », « Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis) et par l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales vasculaires. C'est l'une des premières cellules inflammatoires à intervenir au cours de la constitution d'une plaie cutanée(**Olivry et al., 1993**).

Les macrophages du derme sont aussi appelés histiocytes. Leur rôle ne se limite pasqu'à la phagocytose, bien que ce soit un de leurs rôles majeurs. Ils interviennent aussi dans l'induction d'une réponse inflammatoire non spécifique (phase aigue), dans la stimulation de nombreuses autres classes de cellules (fibroblastes...) et dans l'activation de mécanismes de défense immunologique en tant que cellules présentatrices d'antigènes. Ils secrètent denombreuses cytokines (INFa, TNFa, IL-1, IL-6, IL-8...) qui vont permettre la mise en place de mécanismes indispensables à la cicatrisation des plaies(**Olivry et al., 1993**).

I-4- L'hypoderme :

Il possède une structure mixte consistant en des lobules d'adipocytes disperses au sein de septa conjonctifs vascularisés (fibres de collagène très lâches et fibres élastiques)(**Muller et al., 1989 ; Olivry et al., 1993**).

L'hypoderme est caractérisé par la grande laxité du tissu conjonctif qui le constitue. Son développement varie avec le degré de mobilité de la peau ; il est extrêmement réduit dans les paupières et autour des orifices naturels et surtout important sur les parois du tronc. Ses faisceaux de fibres de collagènes et élastiques sont continus avec ceux du stratum réticulaire du derme. Ils prennent en profondeur une orientation généralement parallèle à la surface cutanée. Leur réseau est lâche et pauvre dans les régions les plus mobiles, dense au contraire dans les secteurs les plus adhérents, où les rétinaculum de la peau sont forts et nombreux ; il constitue à la partie la plus profonde de la toile sous-cutanée une mince couche tangentielle densifiée, le **fascia superficialis**. Selon les endroits, celui-ci est directement appliqué sur les plans anatomiques sous-jacents ou en est séparé par du tissu conjonctif lâche, surtout abondant dans les régions les plus mobiles (**Barone, 2010**).

La limite entre le derme profond et l'hypoderme peut apparaître mal définie, notamment dans les territoires où ces deux plans contiennent une très grande quantité de tissu adipeux. Cependant, il existe entre le derme profond et l'hypoderme une couche de fibres musculaires striées, discontinues : le muscle panniculaire ou *Panniculus carnosus*, bien développé dans certaines zones comme le dos (Olivry et al., 1993).

L'épaisseur de l'hypoderme varie en fonction des territoires cutanés mais aussi en fonction de l'état d'engraissement de l'animal. Les rôles de l'hypoderme sont principalement d'assurer une réserve énergétique adipeuse, une isolation thermique, une protection mécanique (amortissement des chocs) et un maintien des formes de la surface corporelle. Il possède également un rôle de réservoir et de synthèse d'hormones stéroïdes telles que les œstrogènes (Muller et al., 1989 ; Olivry et al., 1993).

I-5- Les glandes de la peau :

Les glandes de la peau sont très nombreuses mais très diverses par leur taille, leur structure et leurs fonctions. Deux types principaux sont présents dans presque toutes les régions de la peau et dans presque toutes les espèces : ce sont les glandes sudoripares et les glandes sébacées (Barone, 2010).

1-Les glandes sébacées :

Ces glandes sont habituellement annexées à la gaine radulaire externe des follicules pileux, par l'intermédiaire desquels leur sécrétion est conduite à la surface de la peau. Quelques-unes, surtout près des jonctions cutané-muqueuses, s'ouvrent toutefois directement en surface. En règle générale, on constate que les glandes sébacées sont d'autant plus développées que le poil correspondant est plus grêle (Barone, 2010).

Chez le lapin, le type de glandes sébacées rencontré varie aussi selon la zone considérée. Elles sont bilobées sur tout le corps mais multilobées sur les pavillons auriculaires et minuscules sous les doigts (McEwan Jenkinson, 1970 ; Arvy et More, 1975 ; Delagoutte, 1977).

Il s'agit de glandes acineuses simples ou composées, dont le fonctionnement est holocrine, les cellules glandulaires subissent une lyse pour former le produit de sécrétion. Chaque acinus comporte une partie sacculaire, sécrétoire et un bref conduit sécrétoire (Barone, 2010).

Le sébum est formé par la dégénérescence grasseuse et la lyse des sébocytes issues des cellules basales des lobules sébacés. Celui-ci permet de garder la peau souple et élastique en formant un film en surface qui recouvre le *stratum corneum* et retient l'humidité, maintenant une hydratation correcte de l'épiderme. En plus de ce rôle de barrière physique, le sébum forme également une barrière chimique contre les pathogènes, par l'action antimicrobienne de certains acides gras le constituant (acide linoléique, oléique et palmitique). Il contient également des phéromones (**Scott et al., 1995**). Sa sécrétion est sous contrôle hormonal (**Olivry et al., 1993**) :

- Les androgènes provoquent l'hypertrophie et l'hyperplasie des glandes sébacées ;
- Les œstrogènes et les glucocorticoïdes provoquent leur involution.

2-Les glandes sudoripares :

Chez le lapin, les glandes sudoripares font défaut sur les parties du corps couvertes par la fourrure. Elles existent toutefois sur les lèvres, où elles sont annexées aux follicules pileux, ainsi qu'à la face interne des conques auriculaires et sur les régions périnéale et génitale (**Barone, 2010**).

3-Les glandes spécialisées :

Des glandes cutanées spéciales sont représentées par les glandes périnéales (parfois improprement qualifiées de glandes inguinales). Il en existe deux paires : la glande périnéale majeure et la glande périnéale mineure (**Barone, 2010**); et les glandes mentonnières qui servent au mâle dominant d'un harem à marquer ses femelles de son odeur (**Delagoutte, 1977**). On peut citer également les glandes labiales, les glandes anales (appelées aussi glandes paraproctodéales) (**Arvy et More, 1975**).

4-Les poils :

Les poils sont des productions épidermiques minces et souples ou flexibles, qui font saillie à la surface de la peau des mammifères. Formés de cellules kératinisées et produits par des invaginations de l'épiderme nommées **follicules pileux**, ils sont tous caractéristiques des mammifères, que les mamelles (**Barone, 2010**).

On distingue chez le lapin plusieurs types de poils. Les poils les plus soyeux, qui sont visibles de premier abord, sont les **poils de jarre**. Ensuite, on trouve le **duvet**, qui est constitué de poils plus courts, plus fins et plus doux. Ils sont dissimulés sous les poils de jarre (**Arvy et More, 1975**).

L'organisation la plus typique est généralement présentée par les poils du jarre. La tige est la plus grande partie de la racine y présentent trois couches : **médulla**, centrale, entourée par le **cortex**, lui-même revêtu d'une **cuticule** (**Barone, 2010**).

Les poils du jarre forment dans la plupart des espèces l'essentiel du pelage, longs de 4 à 5 cm, ont jusqu'à 0,13 mm de diamètre. Leur apex est effilé et la moelle s'y prolonge. Celle-ci est large occupant habituellement les neuf dixièmes du diamètre. Elle est cloisonnée, formé d'un assemblage régulier de petits îlots cubiques alignés en files régulières et séparés par des travées, aérifères, épaisses. la cuticule est formée d'écailles étroites et un peu allongées, serrées et à bord libre à peine ondulés. Le calibre des poils de duvet est très variables, de 3 à 5 µm. La moelle y est très réduite, voire absente. La cuticule montre des écailles allongées et peu découpées. Chez le lapin Angoras, tous les poils de la fourrure, bien que présentant les mêmes caractéristiques que les autres races, sont beaucoup plus longs : ils atteignent une dizaine de centimètres (**Barone, 2010**).

Les poils tactiles sont répartis sur la tête à peu près comme chez les carnivores. Ceux de la lèvre supérieure sont les plus développés. Ce sont des tiges rigides de 5 à 8 cm de long et de 0,22 à 0,27 mm de diamètre. Leurs follicules arrivent jusqu'au voisinage de la muqueuse orale (**Barone, 2010**).

Suivant les régions corporelles considérées, la taille du poil est variable. Ainsi, les poils des oreilles sont petits et simples (individualisés). Sur les membres, ils sont au contraire longs et complexes (regroupés), c'est-à-dire que 12 à 16 poils émergent d'un seul ostiole folliculaire (**McEwan, 1970 ; Arvy et More, 1975**).

5-Le follicule- pileux :

Il loge et fixe la racine du poil, qu'il a pour rôle initial de produire. Il est formé par une profonde invagination de l'épiderme dans le derme et parfois jusque dans la toile sous-cutanée. D'abord plein, il se creuse lors de la formation du poil en un **canal** (*Canalis folliculi*) qui loge la racine de celui-ci et s'ouvre en surface. L'extrémité profonde, qui loge le bulbe du

poil, est renflée comme celui-ci. C'est le **fundus** (*Fundus folliculi*). L'extrémité opposée, voisine de la surface, se rétrécit légèrement en **un col** (*Collum folliculi*). Il est exceptionnel qu'un follicule soit perpendiculaire à la surface de la peau. Il est presque implanté selon un angle très net avec celle-ci. La structure du follicule pileux est double, épithéliale et conjonctivale : l'invagination épidermique constitue le follicule épithélial, autour duquel se différencie une gaine conjonctive formant la bourse du poil. Le fond de celle-ci se soulève dans le fundus pour constituer la papille nourricière de la matrice du poil (**Barone, 2010**).

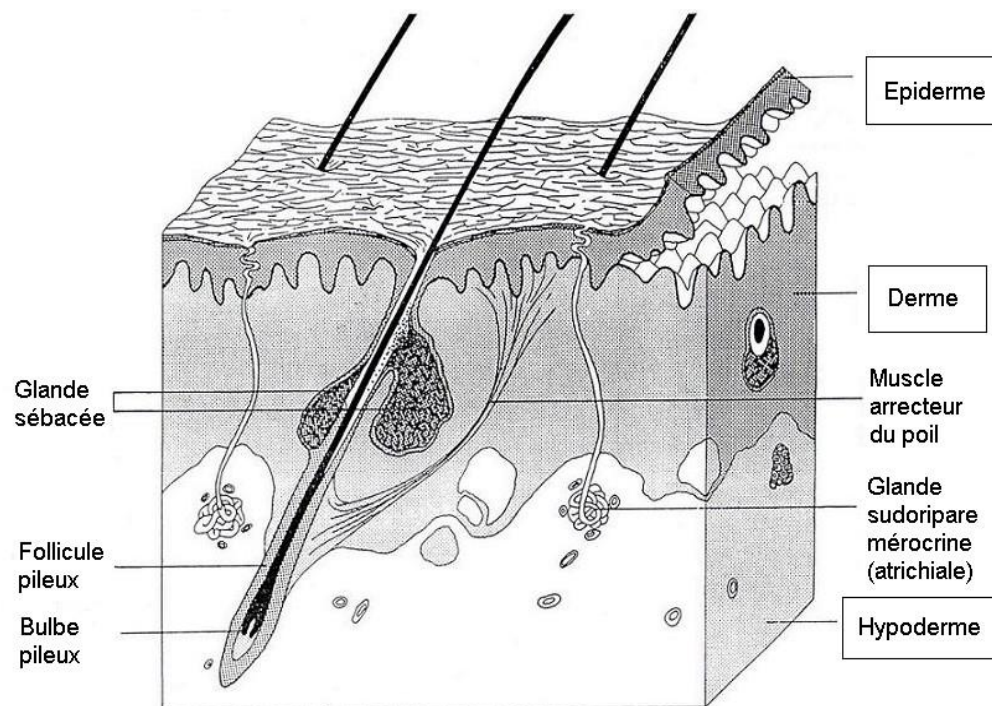


Figure N°-02: Follicule pileux en coupe transversale et topographie cutanée (**Bourges-abella, 2001**)

6-Les griffes :

Sont des structures spécialisées, kératinisées et très dures. Elles sont en continuité directe avec le derme et l'épiderme.

Leur partie découverte (corps et apex) atteint 16 à 18 mm dans la main, 20 à 30 mm dans le pied. Elles ne sont pas rétractiles et sont portées dans le prolongement des doigts. Les coussinets digitaux sont fort peu développés, étroits et minces. Ils ne sont pas revêtus de corne ni même d'un épiderme très épais, celui-ci n'ayant que 50 à 60 μm . En outre leur peau n'est pas glabre mais partout velue. Il n'existe pas de torus métacarpien ou métatarsien.

Les faces palmaires de la main et plantaire du pied, doigts compris, sont revêtues d'une fourrure épaisse et courte, à travers laquelle elle prend au repos contact avec le sol par toute leur longueur (**Barone, 2010**).

I-6- Vaisseaux de la peau :

La vascularisation de la peau est très riche car elle assure, outre la nutrition de l'organe, une part importante de la thermorégulation. Elle est associée à une abondante innervation, qui contrôle la régulation circulatoire et surtout forme le support de la sensibilité (**barone, 2010**).

Les artères proviennent d'un grand nombre de divisions plus au moins anastomosées, issues des rameaux musculaires, péri-articulaires ou péri-osseux des artères profondes. Très nombreuses, elles traversent la toile sous-cutanée et forment à la limite du derme un **réseau dermique** (Rete arteriosum dermal) à large mailles, parallèles à la surface cutanée. Ce réseau, qui concourt à irriguer la toile sous-cutanée et la couche réticulaire du derme, ainsi que les follicules pileux et les glandes sudoripares, est formé d'anastomoses relativement grêles, alors que chaque artère afférente se continue par des branches flexueuses et plus au moins divergentes jusqu'à la limite de la couche papillaire, ses divisions alimentent un **réseau sous-papillaire** (Rete arteriosum subpapillare) à mailles serrées. De ce dernier découlent, outre d'abondants et très fins ramuscules descendants pour les follicules pileux et les glandes sébacées, de très nombreuses **anses capillaires intra-papillaires** (Ansa capillare intrapapillare) qui se disposent au voisinage immédiat de l'épiderme (**Barone, 2010**).

Les veines ont la même disposition générale que les artères mais leurs plexus sont très riches. Le réseau artériel sous-papillaire est ainsi accompagné de deux plexus **veineux sous-papillaire**, l'un superficiel (venosus subpapillaris superficialis) qui reçoit les veinules efférentes des anses capillaires intrapapillaires et l'autre profond (venosus subpapillaris profundus) dont partent des veines qui plongent dans la surface profonde du derme. Se constitue le **plexus veineux dermique profond** (venosus dermalis profundus) à grosses mailles. Celui-ci est drainé par des efférents à leur tour anastomosés dans la toile sous-cutanée en un **plexus veineux sous-cutané** (venosus subcutaneus) dont partent enfin de multiples veinules à destination des collecteurs profonds (**Barone, 2010**).

I-7- Innervation cutanée :

Les nerfs cutanés sont très nombreux et constituent comme les vaisseaux des plexus étagés. L'un de ces plexus est **sous-cutané** (*plexus nervorum subcutaneus*), situé dans la toile

sous-cutanée ; un second est **dermique** (*plexus nervorum dermalis*), dans la partie profonde du derme et un dernier **sous-épidermique** (*plexus nervorum subepidermalis*). On y trouve des fibres myélinisées et des fibres amyéliniques. Les premiers sont essentiellement sensitives et les secondes interviennent surtout dans la vasomotricité, accessoirement sur les fibres musculaires lisses et les glandes cutanées (**barone, 2010**).

I-8- Le réseau lymphatique cutané :

Les vaisseaux lymphatiques sont indispensables aux mouvements du fluide interstitiel et au drainage de retour des protéines et des lymphocytes vers la circulation sanguine, en passant par des nœuds lymphatiques (**Olivry et al., 1993**). Les lymphatiques sont, comme les vaisseaux sanguins, absents dans l'épiderme. Ils constituent dans la couche papillaire un réseau très grêle, drainé dans la partie profonde du derme par le **réseau lympho-capillaire profond** de la peau (Rete lymphocapillare cutis profundum). Les efférents de ce dernier sont collectés par un réseau **lympho-capillaire sous-cutané** (Rete lymphocapillare subcutaneum) situé dans la toile sous-cutané et drainé plus généralement en direction des nœuds lymphatiques superficiels que vers les réseaux lymphatiques des organes profonds (**Barone, 2010**).

Chapitre II

Processus de cicatrisation cutanée

Introduction :

La cicatrisation d'une plaie est un processus physiopathologique naturel, multifactoriel et dynamique visant à rétablir l'intégrité et la fonctionnalité des tissus lésés (**Martin, 1997; Singer et Clark, 1999**). C'est un phénomène inflammatoire, c'est-à-dire une réponse du tissu conjonctif ou conjonctivo-vasculaire à une agression tissulaire (**Delverdier, 2002**). Elle peut être assimilée à une cascade d'évènements cellulaires et biochimiques qui conduit à la restauration de l'intégrité d'un tissu lésé par la formation d'une cicatrice. La régénération des glandes et des follicules pileux est limitée (**Johnston, 1992**).

Déroulement de la cicatrisation cutanée :

De manière générale, le processus de cicatrisation peut être divisé en trois phases majeures (**Stadelmann et al., 1998 ; Hosgood, 2006**).

- Une phase inflammatoire, généralement initiée par une étape d'hémostase.
- Une phase de prolifération ou de granulation correspondant à la phase de réparation tissulaire. La transition entre la phase inflammatoire et la phase de prolifération/réparation est sous le contrôle d'une étape dite de **résolution de l'inflammation**
- Enfin, la phase de remodelage, la plus longue. Elle permet aux structures nouvellement créées, de retrouver des caractéristiques fonctionnelles et esthétiques proches des tissus originaux.

La durée des différentes phases est très variable en fonction de l'individu, de l'espèce et surtout du type de plaie : pour une plaie présentant une grande quantité de tissu nécrotique, la phase de détersion sera plus longue (**Johnston, 1990**).

Bien que traditionnel, ce découpage est assez arbitraire. En effet, le processus cicatriciel ne se déroule pas comme une succession de phases strictement indépendantes mais comme un enchevêtrement d'étapes dépendantes les unes des autres (**Gosain et DiPietro, 2004**). Ces étapes sont des repères cliniques qui permettent d'adapter le traitement aux besoins spécifiques de chacune d'entre elles (**Moissonier, 2002**).

I- Le processus inflammatoire :

« Rubor et tumor cum calor et dolore », cette description de l'inflammation par Cornelius Celsus médecin romain au 1^{er} siècle avant JC a traversé le temps.

Les aspects qui y sont décrits sont généralement proches de la réalité : la rougeur, tuméfaction avec chaleur et douleur résument bien les signes cliniques relatifs à une inflammation, semblables à ceux rencontrés dans le contexte cicatriciel. Le processus inflammatoire est un processus complexe qui implique une série d'événements cellulaires et biochimiques interdépendants essentiels au déclenchement de la réparation des tissus endommagés (Medzhitov, 2008).

Le processus inflammatoire peut se décomposer en trois phases, une phase silencieuse fugace, une phase de réactions vasculo-exsudatives et une phase de détersion cellulaire. Les deux premières phases de l'inflammation correspondent à l'inflammation aiguë qui était aussi appelée phase de latence en raison de l'absence de signes cliniques perceptibles par le clinicien. Cette phase dite de latence porte mal son nom car c'est en fait une phase particulièrement active où des cascades d'activations sont mises en place pour permettre la réalisation des événements suivants (Delverdier, 2002).

a-Phase silencieuse :

La phase silencieuse débute par une vasoconstriction locale associée à l'agrégation plaquettaire qui, permet le comblement des brèches vasculaires et l'hémostase primaire. Les plaquettes sanguines sont les premières cellules à intervenir lors de brèche vasculaire. Elles adhèrent aux parois endothéliales lésées et s'agrègent suite à leur exposition au collagène sous endothélial des parois lésées et forment alors le clou plaquettaire primaire temporaire ou clou hémostatique de Hayem. Elles assurent ainsi l'hémostase primaire et initient la coagulation plasmatique (Fowler, 1993). Les plaquettes ainsi agrégées libèrent des facteurs prothrombotiques comme la sérotonine à l'origine d'une vasoconstriction capillaire et des glycoprotéines intervenant dans le processus de coagulation: le fibrinogène, la fibronectine, le facteur Von Willebrand et la thrombospondine. Ces médiateurs, associés aux médiateurs libérés par les cellules lésées, provoquent, entre autres, une vasoconstriction locale, favorisent l'agrégation et l'activation plaquettaire, activent les voies de la coagulation et la synthèse de fibrine aboutissant ainsi à la formation d'un clou hémostatique secondaire (Fowler, 1993 ; Dereure, 2001).

Le caillot qui se forme alors permet non seulement de combler la perte de substance et d'unir les lèvres de la plaie, mais aussi de limiter l'infection et la perte des fluides (Hosgood, 2006 ; Hedlund, 2007).

En, outre ce caillot de fibrine fournit une matrice extravasculaire nécessaire à la migration ultérieure des neutrophiles, fibroblastes et cellules endothéliales (**Gregory, 1999**). Cette réponse immédiate permet d'arrêter l'épanchement sanguin au niveau de la brèche vasculaire (**Zucker, 1947**)

Les plaquettes libèrent de nombreux autres médiateurs peptidiques intervenant dans l'inflammation et les autres processus de la cicatrisation (**Pierce *et al*, 1989 ; Fowler, 1993**).

Les granules plaquettaires contiennent quatre facteurs essentiels à la cicatrisation. Il s'agit du PDGF (Platelet Derived Growth Factor), du TGF β (Transforming Growth Factor β), de la famille des TGF α (Transforming Growth Factor α) qui inclut l'EGF (Epidermal Growth Factor) et du Platelet Factor 4 (**Terkeltaub et Ginsberg, 1988 ; Fowler, 1993**). La libération des facteurs de croissance par les plaquettes activées est reconnue pour être l'élément initiateur du processus de réparation dans toutes les plaies. Les facteurs de croissance d'origine plaquettaire induisent le déplacement, la division des cellules mésenchymateuses et épithéliales locales et l'augmentation des synthèses de collagène et de glycosaminoglycanes. Ces facteurs de croissance sont capables d'induire la plupart des activités biologiques requises pour la formation du tissu de granulation (**Hosgood, 1993**).

b-La phase de détersion :

Elle commence environ six heures après la blessure et se prolonge pendant une durée très variable, jusqu'à l'obtention d'une plaie propre, c'est-à-dire après élimination des tissus nécrosés. Dans le cas d'une plaie chirurgicale, cette phase passe inaperçue (**Moissonier, 2002**).

L'ensemble des mécanismes mis en œuvre lors de cette phase (phagocytose, fibrinolyse, action des enzymes des lysosomes et des organites cellulaires mais aussi bactériennes) concourent à la mise au propre de la plaie et à la préparation de la phase ultérieure de réparation (**Johnston, 1992**).

L'histamine, libérée par les mastocytes et les plaquettes, ainsi que les produits du catabolisme de l'acide arachidonique et l'activation des facteurs du complément, sont à l'origine d'une vasodilatation locale, de l'augmentation de la perméabilité membranaire et d'un chimiotactisme positif sur certains leucocytes.

L'ensemble des signes classiques de l'inflammation décrit par Celse : « rougeur, tuméfaction avec chaleur et douleur » sont alors présents, accompagnés d'une colonisation de la plaie par des leucocytes (Delverdier *et al.*, 1993 ; Dereure, 2001).

Les leucocytes accumulés aux marges des vaisseaux sanguins traversent la paroi vasculaire et migrent jusqu'au site de l'inflammation sous l'influence des substances chimiotactiques principalement produites par les mastocytes et les plaquettes (Swaim et Henderson, 1997 ; Gregory, 1999). Au début, les granulocytes sont majoritaires ; ils libèrent des enzymes qui dégradent les débris et tissus nécrosés. Le catabolisme au sein de la plaie est intense et du pus, formé de cellules dégénérées, de débris tissulaires et d'exsudat inflammatoire, apparaît (Johnston, 1990 ; Swaim et Henderson, 1997).

Ces polynucléaires ont une durée de vie courte : au bout de 24 heures, les monocytes deviennent prédominants. Dans la plaie, ils se transforment en macrophages ou en cellules géantes plurinucléées qui poursuivent le nettoyage de la plaie (Swaim et Henderson, 1997).

Leur action est facilitée par le parage qui élimine les plus gros débris servant de protection aux micro-organismes (Johnston, 1990).

La phase de détersion est d'abord une phase catabolique. Grâce aux neutrophiles, aux macrophages et aux lymphocytes, tous les débris néfastes à la phase de réparation sont éliminés, les bactéries qui pourraient provoquer une infection sont tuées. Cette phase ne se termine que lorsque la plaie est saine. La persistance des macrophages signe la présence de matériel étranger que les granulocytes n'ont pu éliminer. Si l'agent persiste, les monocytes continuent d'affluer et l'inflammation devient chronique.

La détersion et l'inflammation doivent s'arrêter lorsque tous les débris et micro-organismes pouvant gêner les phases suivantes de réparation sont bien éliminés. Sans stabilisation de la réaction inflammatoire, les protéases s'attaqueraient aussi aux tissus sains et la réaction inflammatoire excessive, deviendrait délétère. La régulation et l'arrêt de la réaction inflammatoire surviennent grâce à la neutralisation des médiateurs de l'inflammation (Delverdier *et al.*, 1993).

La phase de détersion ne prend fin que quand tous les obstacles à la cicatrisation (bactéries, débris nécrotiques, caillots sanguins) ont été éliminés de la zone lysée (Johnston, 1992).

II- Processus de réparation :

Elle débute peu après le traumatisme, dans les zones dénuées de débris, caillots, tissus nécrotiques et bactéries. Elle progresse au fur et à mesure du nettoyage de la plaie, ce qui met en évidence le rôle essentiel des cellules polynucléées puis mononucléées. Il semblerait, en outre, que les monocytes soient des facteurs d'attraction des fibroblastes, ce qui leur conférerait un rôle supplémentaire et tout aussi important dans la phase de réparation (**Johnston, 1990 ; Swaim et Henderson, 1997**).

La reconstruction résulte de l'action de trois mécanismes (**Swaim et Henderson, 1997 ; Moissonier, 2002**):

- Prolifération fibroblastique ;
- Néo-capillarisation ;
- Prolifération et migration épithéliale ou épithélialisation.

Un quatrième phénomène intervient dans la cicatrisation, mais uniquement pour les plaies laissées ouvertes : la contraction (**Johnston, 1992**).

a-Proliférations capillaire et fibroblastique :

A partir de l'endothélium des vaisseaux entourant la plaie, se forment des structures borgnes ou bourgeons, à l'origine de néo-capillaires. Ces nouveaux vaisseaux pénètrent dans la plaie où ils se ramifient jusqu'à former des anses vasculaires ayant macroscopiquement l'aspect de bourgeons charnus visibles à partir de trois à six jours après le traumatisme (**Johnston, 1990**).

Progressivement, ces bourgeons se différencient en artérioles, capillaires et veinules (**Swaim et Henderson, 1997**).

Cette phase est également nommée phase de granulation en raison de l'aspect macroscopique granuleux de la plaie. Le tissu de granulation, formé de vaisseaux, de fibroblastes et de substance fondamentale, joue un rôle primordial dans la cicatrisation, il comble la perte de substance, est très résistant à l'infection et sert de support à la migration de l'épithélium à sa surface. La mise en place de la vascularisation est peut-être liée au gradient en oxygène existant au sein de la plaie. En effet, la lésion tissulaire entraîne des dégâts vasculaires qui diminuent les apports en oxygène au sein de la plaie.

Cette diminution est plus marquée au centre de la lésion qu'en périphérie. Le développement de la vascularisation suit ce gradient, en se mettant en place des zones les plus oxygénées vers les moins oxygénées (**Johnston, 1990 ; Swaim et Henderson, 1997 ; Moissonier, 2002**).

La formation de néo-capillaires permet l'apport de sang et de nutriments indispensables à la fibrogénèse. Celle-ci commence par la migration de fibroblastes provenant de cellules mésenchymateuses indifférenciées du tissu conjonctif avoisinant et plus particulièrement de l'adventice des vaisseaux sanguins (**Johnston, 1990 ; Swaim et Henderson, 1997**). Ces cellules qualifiées de « fibroblastes migrants » apparaissent en 24 à 48 heures sur les bords de la plaie et progressent dans la plaie, attirées par les macrophages, Cette progression ne peut se faire que dans les zones dénuées de débris, caillots et bactéries(**Johnston, 1990**).

La migration des fibroblastes dépend également de facteurs environnementaux comme la pression partielle en oxygène. Le gradient de pression partielle en oxygène induit un stimulus nécessaire à la migration des fibroblastes (**Fowler, 1993**). En effet, au centre de la plaie, il y a peu de capillaires et la pression partielle en oxygène est donc la plus faible alors qu'à la périphérie, les capillaires sont plus nombreux et la pression partielle en oxygène y est donc plus élevée. La migration des fibroblastes se fait alors des zones les mieux oxygénées vers les zones les plus pauvres en oxygène (**Johnston, 1992**).

Après avoir migré au niveau de la plaie, les fibroblastes se multiplient et commencent leurs synthèses afin de combler la perte de substance. Le composant sérique spécifique nécessaire à la multiplication des fibroblastes *in vitro* a été isolé. Il s'agit du PDGF ou Platelet Derived Growth Factor sécrété par les plaquettes (**Fowler, 1993**).

Le réseau de fibrine présent dans la plaie sert de trame à la migration des fibroblastes qui commencent par synthétiser les polysaccharides et les protéoglycanes de la substance fondamentale. C'est seulement vers les 4^{ème} ou 5^{ème} jours, que débute la synthèse et le dépôt de collagène de type I (mature) et de type III (immature) (**Johnston, 1992 ; Fowler, 1993 ; Hedlund, 2007**).

La synthèse de collagène se poursuit selon un rythme très rapide et la quantité de collagène au sein de la plaie atteint un pic après deux à trois semaines avant de diminuer progressivement.

Le collagène est en effet éliminé sous l'effet des collagénases libérées par les cellules épithéliales et par les fibroblastes entrant en contact avec l'épithélium nouvellement formé. **(Johnston, 1992).**

Cette étape va durer de deux à quatre semaines pour aboutir à un équilibre dans la formation du collagène et à une régression d'une partie des vaisseaux néoformés **(Johnston, 1990 ; Swaim et Henderson, 1997).**

b-La Contraction :

La contraction de la plaie se définit comme la diminution de surface d'une plaie par un mouvement centripète de la peau environnante dans toute son épaisseur. Elle est particulièrement importante dans la cicatrisation par seconde intention où les pertes de substances sont étendues. Elle est quasi inexistante dans la cicatrisation par première intention. Elle est particulièrement efficace dans les zones où la peau est lâche et peu adhérente **(Johnston, 1992 ; Fowler, 1993).**

Cette contraction permet de réduire la surface à ré-épithélialiser et donc de réduire la durée de la phase de ré-épithélialisation dans les zones où la peau est peu adhérente aux tissus sous-jacents, la contraction peut même aboutir à une fermeture complète de la plaie **(Fowler, 1993 ; Swaim *et al.*, 2001).**

La contraction dépend du tissu de granulation mais peu de l'épidermisation. Elle peut avoir lieu en même temps que l'épidermisation **(Skalli et Gabbiani, 1988 ; Fowler, 1993).**

La contraction de la plaie débute environ une semaine après le trauma, lorsque le tissu de granulation a comblé toute la plaie. Elle progresse alors à un rythme à peu près constant de 0,6 à 0,7 mm/jour. La contraction se produit sous l'épithélium néoformé qui est progressivement effacé au fur et à mesure que les marges cutanées de pleine épaisseur se rapprochent **(Johnston, 1992 ; Fowler, 1993).**

Il existe plusieurs théories expliquant le phénomène de contraction. Autrefois, on pensait que la contraction était liée au collagène du tissu de granulation. Des recherches récentes ont montré que la contraction avait lieu même sans synthèse de collagène : des cobayes carencés en vitamine C ne pouvant synthétiser de collagène présentent un processus de contraction normal **(Fowler, 1993).**

L'étude de l'ultra-structure et de la biochimie des fibroblastes du tissu de granulation a révélé que certains fibroblastes possédaient des caractéristiques intermédiaires entre les fibroblastes normaux et les cellules musculaires lisses. Ces cellules possèdent un important matériel fibrillaire qui leur donne des propriétés identiques à celles des cellules musculaires lisses, d'où leur appellation « myofibroblastes » (Skalli et Gabbian, 1988 ; Johnston, 1992 ; Fowler, 1993).

Les myofibroblastes seraient donc responsables de la contraction du tissu de granulation (Fowler, 1993).

c-Épithélialisation ou épidermisation :

La ré-épithélialisation est la dernière étape avant que la continuité de la peau soit rétablie. La réparation de cette dernière couche cutanée est indispensable à la récupération fonctionnelle de la peau. Après la ré-épithélialisation, la protection contre le dessèchement et les autres agressions du milieu extérieur sera opérationnelle. La phase d'épithélialisation débute aux marges de la plaie environ 48 heures après le traumatisme (Swaim, 1990 ; Johnston, 1992 ; Fowler, 1993).

Elle commence par la libération des cellules basales épidermiques de leurs attaches dermiques aux marges de la plaie. Ces cellules migrent ensuite vers les zones déficitaires de façon centripète et parfois centrifuge lorsque des îlots épidermiques intacts sont présents. Ces cellules prolifèrent ensuite par mitose (Swaim, 1990 ; Johnston, 1992).

Quand la perte de substance est étendue, la migration cellulaire seule n'est pas suffisante pour la recouvrir en totalité. La réparation épithéliale nécessite alors une intensification de l'activité mitotique des cellules épithéliales. Cette activité concerne avant tout les cellules épithéliales périphériques éloignées des marges de la plaie (Fowler, 1993).

En présence d'une croûte ou d'un caillot, les cellules épithéliales migrent sous la croûte puis secrètent diverses protéases et collagénases qui permettent de dissoudre la base de la croûte. Cette dernière tombe lorsque les cellules épithéliales ont recouvert toute la perte de substance (Swaim, 1990).

A la fin de cette phase d'épidermisation, toutes les couches de la peau sont reconstituées. La membrane basale est reformée alors que les cellules épithéliales retrouvent un phénotype différencié (Fowler, 1993).

Cependant, le recouvrement épithélial reste toujours incomplet et dépigmenté. En effet, la migration des cellules épithéliales des glandes annexes de la peau (sébacées ou sudoripares) ne s'accompagne pas d'une multiplication de leur nombre. De même, les cellules pigmentaires n'accompagnent pas les cellules épithéliales dans leur migration (Sevestre, 1981).

III-Phase de maturation ou de remodelage :

Cette troisième phase correspond au remodelage de la matrice, à la régression progressive de la vascularisation des tissus et à la réduction numérique des cellules. Le remodelage des tissus cicatriciels peut durer jusqu'à un an et parfois plus. Durant cette période, le collagène est remodelé afin de constituer la cicatrice mature, car le collagène déposé lors de la formation du tissu de granulation est fin et nonorganisé. Les cicatrices demeurent inesthétiques et moins résistantes mécaniquement. La dégradation et le dépôt de la matrice extracellulaire, débutée durant la fibroplasie, se poursuivent. Il s'établit un équilibre entre la synthèse et la dégradation matricielle. Grâce au remodelage, la matrice extracellulaire devient plus résistante. Il consiste à la dégradation progressive de la matrice extracellulaire et, en parallèle, à la synthèse de nouveaux constituants afin d'en modifier la structure (Calvin, 1998).

La matrice déposée depuis le début de la fibroplasie, initialement riche en collagène de type III, fibronectine et acide hyaluronique, continue à être dégradée et remplacée par une matrice de collagène de type I, de fibres élastiques, de sulfates de chondroïtine et de dermatane. Afin d'accroître la résistance du tissu, les fibres de collagène se réorientent dans le sens des tensions cutanées grâce au dépôt de nouvelle matrice par les fibroblastes alignés dans cette même direction (Ordman *et al.*, 1966 ; Calvin, 1998).

L'augmentation du diamètre des fibres de collagène, grâce notamment à des enzymes (pexlysyl oxidase), contribue aussi à améliorer la résistance mécanique de la plaie (Mast, 1992 ; Miller et Gay, 1992 ; Cohen *et al.*, 1994 ; Dyson et Bannister, 1995). Toutefois, son organisation demeure distinguable de celle du collagène dermique normal (Ordman *et al.*, 1966), ce qui explique que la peau ne retrouve pas sa résistance initiale. La résistance mécanique de la plaie augmente rapidement jusqu'à trois mois, puis continue légèrement à croître jusqu'à un an, où elle atteint un plateau de 70 à 80 % de la résistance cutanée initiale (Mast, 1992 ; Clark, 1993 ; Robbins *et al.*, 1994 ; Calvin ; 1998).

Si le tissu de granulation est fortement vascularisé, la peau non lésée comporte peu de capillaires. La régression de la vascularisation accompagne le remodelage de la matrice **(Ingber et Folkman, 1989)**. La formation définitive de certains vaisseaux sanguins se termine par l'arrivée de cellules musculaires lisses qui se disposent en multicouches autour de la membrane basale afin de former des artérioles ou des veinules **(Arnold et West, 1991)**. La prolifération des cellules musculaires lisses est modulée par le TGF- β **(Majack et al, 1990)** ainsi que par le PDGF **(Nilsson et al, 1983)**. Les cellules musculaires et les péricytes ont une action inhibitrice sur la prolifération des cellules endothéliales. Cette action est probablement due à des interactions cellule /cellule **(Arnold et West, 1991)** ainsi que par l'activation par les péricytes du TGF- β , facteur inhibiteur de la croissance des cellules endothéliales **(Madri et Marx, 1992)**.

Le TGF- β semble être un des facteurs clés intervenant dans l'arrêt de l'angiogenèse. En effet, outre son rôle direct sur les cellules, le TGF- β inhibe l'action mitogène de nombreux facteurs angiogènes comme les FGF1 et 2 **(Nilsson et al.,1983)** ou l'EGF **(Takehara et al., 1987)**. L'arrêt de l'angiogenèse semble refléter la balance entre l'effet stimulateur des facteurs angiogènes et l'effet inhibiteur du TGF- β et d'autres molécules comme le PF4 **(Maione et al., 1990)** ou des produits de dégradation du collagène. Des changements dans la composition de la matrice extracellulaire jouent également un rôle important. En effet, si les cellules endothéliales migrent facilement en présence de fibronectine, elles se déplacent plus difficilement sur du collagène I.

Le remodelage de la matrice par les cellules induit donc un arrêt de l'angiogenèse. De plus, la liaison des facteurs angiogènes avec les constituants matriciels module leur action sur les cellules. C'est le cas des FGF sur les héparanes sulfates ou du TGF- β sur du collagène de type IV **(Paralkar et al., 1991)** ou des protéoglycanes. L'INF- α , quant à lui, induit la nécrose des vaisseaux sanguins et diminue leur nombre dans la plaie. Pour finir, les macrophages éliminent les capillaires **(Sidky et Borden, 1987)**.

En fin de processus de remodelage, les fibroblastes et myofibroblastes retrouvent un phénotype quiescent ou meurent par apoptose, ce qui réduit la cellularité du tissu cicatriciel. Le stress oxydatif, le NO, le Ca²⁺, l'IL-1, les protéases, les nucléases et le potentiel membranaire mitochondrial figurent parmi les possibles intervenants de l'apoptose **(Calvin ; 1998)**.

Cette étape est cruciale pour le bon déroulement d'une cicatrisation harmonieuse puisque la persistance d'une synthèse de collagène élevée et la présence continue de myofibroblastes mènent à des pathologies fibroprolifératives comme les cicatrices hypertrophiques et chéloïdes, par exemple (**Singer et Clark, 1999**).

IV- Diabète et processus cicatriciel :

IV-1 : Définition et classification du diabète :

1- Définition du diabète :

Le diabète est un problème majeur de santé publique, il connaît une expansion très significative, selon les dernières estimations de l'OMS, 422 millions de personnes dans le monde sont diabétiques, ce chiffre atteindrait 552 millions d'ici 2030, soit une personne sur dix et la moitié des personnes atteintes de diabète ne sont pas diagnostiquées. Actuellement, Il y a plus de 199 millions de femmes diabétiques dans le monde soit 47% et ce total devrait augmenter à 313 millions. Le diabète se caractérise aussi par la gravité des complications qu'il engendre. En effet, il est la première cause d'insuffisance rénale terminale, de cécité et d'amputation des membres inférieurs, il est aussi la sixième cause de mortalité (**OMS, 2016**).

Le diabète est une maladie chronique définie comme une affection métabolique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit plus suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise plus correctement celle qu'il produit : la déficience sécrétoire et les anomalies de l'action de l'insuline sur les tissus cibles (muscles et tissu adipeux) peuvent être associées. L'insuline est une hormone qui régule la concentration de sucre dans le sang, son action est hypoglycémisante et lors du diabète, une hyperglycémie chronique s'installe laquelle va conduire avec le temps à une atteinte grave de nombreux systèmes organiques et plus particulièrement des nerfs et des vaisseaux sanguins à l'origine des complications cliniques du diabète (**OMS, 2013**).

2- Classification du diabète :

La diabétologie humaine a coutume de scinder le diabète sucré en deux groupes : le diabète insulino-dépendant (DID ou diabète de type 1) et le diabète non insulino-dépendant (DNID ou diabète de type 2) (**Leroy, 1999**).

a- Le diabète de type 1 :

Ce diabète correspond à une forme sévère de la maladie. Il est particulièrement représenté chez les jeunes mais peut aussi apparaître chez des individus adultes non obèses (Leroy, 1999).

Ce diabète se caractérise par l'absence d'insuline circulante ou insulinopénie, une concentration plasmatique élevée en glucagon et une incapacité des cellules β pancréatiques à répondre aux stimuli insulinosécréteurs. Ceci entraîne des modifications d'ordre général. En effet, à cause de l'absence d'insuline, les trois principaux tissus cibles de l'insuline, qui sont le foie, les muscles et le tissu adipeux, ne se chargent plus de l'absorption des nutriments et libèrent de manière plus importante du glucose, des acides α -aminés et des acides gras dans la circulation générale. De plus, les changements dans le métabolisme lipidique provoquent la synthèse et l'accumulation de corps cétoniques (Leroy, 1999).

La prise en charge thérapeutique de ce type de diabète passe obligatoirement par l'insulinothérapie (Leroy, 1999).

b- Le diabète de type 2 :

Ce diabète est défini de manière différente par rapport au diabète de type 1. En effet, il s'agit d'un groupe hétérogène, non pas fondé sur des caractéristiques propres mais sur l'absence des caractéristiques du diabète de type 1 (Leroy, 1999).

C'est donc un diabète non acidocétosique. Sa caractéristique principale est l'insulinorésistance des tissus cibles (diminution de l'action inhibitrice de la production endogène et de l'action stimulatrice de l'utilisation périphérique du glucose de l'insuline) qui entraînent une hyperinsulinémie réactionnelle. Il existe une adaptation physiologique de la sécrétion d'insuline par rapport à l'insulinosensibilité (Rigalleau et al., 2007).

L'insuline est effectivement produite par les îlots endocrines du pancréas et dans certains cas (chez les sujets non obèses) la sécrétion de cette hormone est même anormalement élevée. Par conséquent, le traitement de ce type de diabète ne repose pas sur l'insulinothérapie. La prise en charge thérapeutique est constituée par un traitement hygiénique (régime alimentaire spécifique) et par l'administration de sulfamides hypoglycémiants. Néanmoins, dans les formes graves et compliquées secondairement d'insulinopénie, une insulinothérapie peut être instaurée (Leroy, 1999). L'incidence de ce

type de diabète est particulièrement élevée chez les adultes, notamment ceux atteints d'obésité (85% des cas sont obèses).

c- Autres formes :

1- Diabète gestationnel :

Le diabète sucré gestationnel est défini comme toute intolérance anormale aux glucides qui commence, ou est reconnu pour la première fois pendant la grossesse. Cela n'exclut pas la possibilité que l'intolérance non identifiée au glucose ait précédé l'état de grossesse (**Siddiqui et al., 2013**).

La pathogénie de cette forme de diabète s'explique par les modifications métaboliques physiologiques qui interviennent au cours de la grossesse pour privilégier l'alimentation fœtale, et qui vont générer une insulino-résistance particulièrement sévère au 3^{ème} trimestre. Celle-ci résulte de l'action des hormones placentaires mais peut être majorée par des facteurs maternels tels que l'obésité ou l'inactivité physique. Le pancréas augmente alors sa production d'insuline mais si la sécrétion est inadaptée au niveau de l'insulino-résistance, il apparaît alors une intolérance au glucose ou un diabète gestationnel. La pathogénie de cette forme peut ainsi être considérée comme une « version accélérée » dans le temps de celle de la plupart des diabètes de type 2 (**Fenichel et al., 1998**).

2- Diabète secondaire :

Un diabète sucré peut être secondaire à une pancréatopathie (pancréatite chronique ou aiguë, mucoviscidose, tumeur), à l'hémochromatose, à des cirrhoses, à diverses endocrinopathies (phéochromocytomes, acromégalie, syndrome de Cushing, hyperthyroïdie, tumeurs endocrines pancréatiques et digestives ou iatrogènes) (**Maugendre et al., 2007**).

Ce type de diabète peut être à l'origine d'une destruction des îlots pancréatiques et donc d'une insulino-pénie, d'une insulino-résistance ou d'une association des deux. Devant toutes formes de diabète, il convient donc de rechercher ces affections afin d'améliorer la prise en charge clinique (**Maugendre et al., 2007**).

IV-2- Physiopathologie du diabète :

La compréhension de la physiopathologie du diabète repose sur la connaissance des bases du métabolisme des glucides et de l'action de l'insuline. Suite à la consommation de

nourriture, les glucides sont décomposés en molécules de glucose dans l'intestin. Le glucose est absorbé dans le sang en élevant les niveaux de glucose dans le sang. Cette augmentation de la glycémie stimule la sécrétion d'insuline par les cellules bêta du pancréas. L'insuline est nécessaire à la plupart des cellules pour permettre l'entrée du glucose. L'insuline se lie à des récepteurs cellulaires spécifiques et facilite l'entrée du glucose dans la cellule, qui utilise le glucose comme source d'énergie (**Burket et al., 2003**). L'augmentation de la sécrétion d'insuline par le pancréas et l'utilisation cellulaire subséquente du glucose entraînent une diminution des taux de glucose dans le sang. Des niveaux de glucose inférieurs entraînent alors une diminution de la sécrétion d'insuline (**Schuit., 2001**).

1- Physiopathologie du diabète de type 1 :

La cause du diabète de type 1 est une carence en insuline par destruction auto-immune des cellules bêta du pancréas. Bien que l'origine de cette maladie soit encore incertaine, plusieurs facteurs ont été mis en évidence. La réaction auto-immune survient sur un terrain de susceptibilité génétique à la suite de facteurs environnementaux déclenchant, telles que des infections virales (**Boitard,1995**).

La maladie apparaît souvent de manière brutale dans l'enfance ou l'adolescence, cependant, elle est toujours précédée par une phase dite pré-diabétique qui dure plusieurs semaines ou mois pendant lesquels les cellules bêta pancréatiques sont détruites progressivement, entraînant ainsi une sécrétion d'insuline réduite. Le diabète se déclare lorsque 80 ou 90% des capacités sécrétoires du pancréas sont détruites. Les 10 à 20% restant suffisent pour les besoins habituels, mais en cas de stress ou de maladie infectieuse, l'hyperglycémie qui en résulte épuise les cellules bêta restantes, et les signes cliniques du diabète apparaissent (soif intense, urine fréquente, amaigrissement, nausées, fatigue) (**Biotard, 1995**).

Même si dans plus de 90% des cas, le diabète de type 1 apparaît dans des familles non touchées par cette maladie, une susceptibilité génétique est évidente (**Redondo et Eisenbarth, 2002**).

2- Physiopathologie du diabète de type 2 :

Le diabète de type 2 est une maladie multifactorielle. L'hyperglycémie est due à une altération de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par les cellules bêta du pancréas

endocrine, et une diminution de la sensibilité tissulaire principalement des muscles squelettiques, du tissu adipeux et du foie aux effets de l'insuline, ce qui se traduit par une Insulinorésistance (**WHO, 1999**).

Cette pathologie comporte une importante prédisposition génétique. Le diabète de type 2 est une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique dont les éléments physiopathologiques comprennent une résistance accrue des tissus périphériques (foie, muscles) à l'action de l'insuline, une insuffisance de sécrétion d'insuline par les cellules bêta du pancréas, une sécrétion inappropriée de glucagon, ainsi qu'une diminution de l'effet des incrétines, hormones intestinales stimulant la sécrétion postprandiale de l'insuline (**Kimmel et Inzucchi, 2005**).

a- Insuffisance pancréatique :

Au bout de 10 à 20 ans d'intolérance au glucose, le patient devient diabétique. Le pancréas n'arrive plus à fournir la demande en insuline. La sollicitation excessive du pancréas par l'hyperglycémie entraîne son usure prématurée. Ainsi, les cellules bêta du pancréas endocrine ne peuvent plus assurer une production suffisante d'insuline. La baisse d'activité des cellules bêta est quantitative et qualitative. Lors d'une injection intraveineuse de glucose, il y a absence du pic précoce d'insuline. Cette absence de pic est préjudiciable pour le patient car il joue un rôle majeur dans la tolérance postprandiale au glucose. Une baisse d'insulinosécrétion à tous stimuli est observée même si l'insulinémie basale reste identique. L'insuline réellement active ne représente que 50% de l'insulinémie alors qu'elle est de 80% chez un patient non diabétique (**Pinget, 2002**).

b- Résistance à l'insuline :

L'insuline produit tout un éventail d'effets biologiques sur les processus métaboliques et mitogéniques. Cependant, le terme de résistance à l'insuline se traduit par une diminution de l'effet de l'insuline sur les tissus insuline-sensibles (tissu musculaire, tissu adipeux, foie). La résistance à l'insuline est donc un état physiopathologique dans lequel les niveaux normaux ou élevés d'insuline produisent des effets biologiques atténués. Les principales manifestations cliniques de la résistance à l'insuline sont l'hyperinsulinémie résultant de la surproduction de l'insuline par les cellules bêta pancréatiques dans le but de contenir l'hyperglycémie, et l'intolérance au glucose qui est caractérisée par un taux élevé du glucose

dans le sang suite à un repas, mais par des concentrations plasmatiques normales du glucose à jeun (**Ashcroft et Rorsman, 2012**).

En fait, une diète hypercalorique associée à un manque d'exercice physique et à l'obésité peut conduire à un état de résistance à l'insuline. La résistance à l'insuline est considérée comme un état pré-diabétique quand le diabète de type 2 représente l'étape subséquente où la sécrétion exagérée d'insuline ne parvient plus à maintenir une glycémie normale (**Brothers et al., 2010**).

IV-3- Diabète expérimental :

Le diabète expérimental consiste à produire, chez l'animal, un état comparable au diabète sucré, en vue de mieux comprendre le diabète sucré de l'homme ou de trouver de nouvelles thérapies (**Wright et al., 1980**).

Afin d'étudier l'étiologie du diabète et en raison de la gravité de ses nombreuses répercussions métaboliques et dégénératives, l'utilisation des modèles expérimentaux, qui sont utilisés depuis plusieurs décennies, représente autant de voies d'accès de la compréhension de la genèse et les complications de cette pathologie. Les modèles animaux du diabète peuvent être soit spontanés, soit provoqués chirurgicalement, chimiquement, immunologiquement ou par sélection ou génie génétique (**Cheta, 1998**).

Deux agents sont couramment utilisés pour induire une pancréatectomie chimique, tous deux des analogues du glucose : l'alloxane, dérivé pyrimidique (synthétisé en 1938) et la streptozotocine, agent antimicrobien et alkylant.

1- Alloxane :

L'alloxane est une pyrimidine oxygénée, son nom scientifique est le 2,4,5,6-tetraoxypyrimidine. Cette molécule est préparée par oxydation de l'acide urique sous l'action de l'acide nitrique (**Szkudelski, 2001**).

Grâce à une analogie structurale au glucose, l'alloxane pénètre à travers les transporteurs de glucose GLUT2 des cellules bêta pancréatiques. C'est au cytosol que se déroule la réduction de l'alloxane en acide dialurique. Cette réduction est due à plusieurs agents tels que le glutathion réduit, la cystéine, l'acide ascorbique et les groupements SH des

protéines. Un pont disulfure est formé par deux groupements thiol du site actif de la glucokinase et l'alloxane. Ce pont inactive l'enzyme (**Lenzen et al., 1988**).

La ré-oxydation de l'acide dialurique formé en alloxane, favorise la production des espèces réactives oxygénées et l'activation de la réaction de Fenton (**Szkudelski, 2001**). De l'autre côté, les espèces réactives oxygénées attaquent l'ADN et induisent une défragmentation de ce dernier. Ce mécanisme ressemble à celui de la streptozotocine (**Rohilla et Ali, 2012**).

2- Streptozotocine :

Streptozotocine, ou Streptozocine ou Izostazin ou Zanosar, (STZ) est un agent antinéoplasique synthétique, initialement identifié dans les années 1950 comme un antibiotique, et est chimiquement lié à d'autres nitrosoureas utilisés dans la chimiothérapie anticancéreuse. La streptozotocine (2-désoxy-2- (3- (méthyl-3-nitrosouréido) -D-glucopyranose) est synthétisée par *Streptomycesachromogenes*(**Graham et al., 2011**), L'utilisation de STZ a été signalée pour la première fois en 1963 (**Asrafuzzaman et al., 2017**), elle entraîne un effet cytotoxique sélectif des cellules bêta des îlots de Langerhans (**Anderson et al., 1974**).

Malgré les efforts déployés dans ce domaine par de nombreux chercheurs, le mécanisme d'action de cet agent diabétogène reste encore mal connu. Cependant, des études antérieures ont montré son action sur les îlots de Langerhans. Cette action réduit la masse des cellules bêta et par conséquent une insulino-pénie caractéristique d'une hyperglycémie chronique ou transitoire (**Szkudelski, 2001**).

La molécule de la STZ pénètre les cellules bêta pancréatiques à travers les transporteurs de glucose GLUT2. La pénétration est assurée par la présence du glucose dans la molécule. La décomposition de la STZ en espèces réactives oxygénées (ERO) se fait à l'intérieur de la cellule. Les ERO provoquent une alkylation de l'ADN qui se défragmente, ce qui active la poly (ADP-ribose) polymérase, enzyme clé de la réparation de l'ADN. Cette réaction consomme le NAD et l'ATP comme cofacteurs enzymatiques conduisant à leur déplétion et à la nécrose de la cellule bêta (**Szkudelski, 2001**).

IV- 4- Effets du diabète sur le processus cicatriciel :

Tous les diabétiques, insulino-dépendants ou non insulino-dépendants, sont exposés à des complications qui sont bien souvent responsables de la morbidité et de la mortalité. En pratique, on distingue des atteintes du système nerveux, le développement de maladies cardiovasculaires, des troubles rénaux et de multiples dysfonctionnements cellulaires et tissulaires. Parmi ces complications, les défauts de cicatrisation des plaies tiennent une place importante (**Falanga, 2005**).

Chez les patients diabétiques, le développement préférentiel d'ulcération du pied (15% en présenteront au cours de leur vie) associé à des infections accrues aboutit à une amputation pour 20 % des cas. Les troubles de la microcirculation locale associés à un défaut de l'inflammation et de sa résolution sont pour la majorité des cas à l'origine du développement et de l'extension de ces pathologies. Ainsi, la régénération des tissus dermiques et la cicatrisation des plaies chroniques des sujets diabétiques restent de nos jours, un défi clinique majeur (**Boulton et al., 2005**).

Le glucose est la 1^{ère} source d'énergie pour les cellules et en particulier pour les leucocytes et les fibroblastes (**Campos, 1998 ; Crane, 1989**). Même si la glycémie est augmentée lors de diabète sucré, le glucose doit être disponible et pouvoir entrer dans les cellules. L'insuline permet au glucose de rentrer dans les fibroblastes et agit également comme un facteur de croissance pour ces cellules (**Deodhar et Rana, 1997**). L'insuline, à des concentrations physiologiques, serait nécessaire à la prolifération et aux synthèses fibroblastiques (**Bitar et al., 1999**). Des études cliniques et expérimentales ont montré que toutes les phases de la cicatrisation étaient affectées lors de diabète sucré, y compris la réaction inflammatoire (**Bitar, 2000**).

Chez les diabétiques, les risques d'infection sont augmentés car les immunoglobulines glyquées sont inactivées. L'augmentation de la glycémie procure un substrat favorable à la multiplication bactérienne alors que les cellules (fibroblastes, macrophages...) assimilent difficilement le glucose en l'absence de quantité suffisante d'insuline. Le défaut d'insuline diminue également la formation de collagène et la résistance de la cicatrice (**Curray, 1989 ; Bitar, 2000**).

Des études menées principalement chez le rat et l'homme, convergent pour montrer que l'IGF-1 (Insulin-Like Growth Factor 1), jouait un rôle central dans

l'évolution pathologique des plaies chez les diabétiques. L'IGF-1 est un polypeptide qui présente de nombreuses homologies fonctionnelles et structurales avec l'insuline. Comme l'insuline, il a des effets sur la glycémie lorsqu'il est administré par voie générale. Il est synthétisé par le foie et d'autres tissus extrahépatiques et circule dans le sang lié à des protéines spécifiques (IGF-Binding Proteins) (Mathews *et al.*, 1986 ; Shimaski *et Ling*, 1991 ; Bitar, 2000). L'IGF-1 peut être produit localement et régule divers mécanismes dont la réparation tissulaire (Roith *et al.*, 1992 ; Roith, 1997 ; Bitar, 2000).

Au cours de la cicatrisation, les plaquettes, les macrophages et les fibroblastes produisent et sécrètent de l'IGF-1 dans l'environnement local de la plaie (Bitar, 2000). Simultanément, le nombre de récepteurs à IGF-1 à la surface des membranes des fibroblastes et des cellules endothéliales, augmente (Steenfos *et Janssen*, 1992 ; Gartener *et al.*, 1992 ; Hakim *et al.*, 1997 ; Bitar, 2000). Lors du diabète sucré, le taux d'IGF-1 dans le sang et dans l'environnement local de la plaie est très inférieur à la normale (Bitar *et Labbad*, 1996 ; Bitar, 2000). L'administration directe d'IGF-1 exogène diminue les effets néfastes du diabète sur la cicatrisation (Bitar, 1997 ; Bitar, 2000). Ces études suggèrent que le diabète sucré altère la cicatrisation en inhibant le système local mettant en jeu l'IGF-1. Un contrôle strict de l'hyperglycémie par l'administration d'insuline permet un fonctionnement normal du système mettant en jeu l'IGF-1 et empêche ainsi la diminution de la formation de collagène, la diminution de résistance de la cicatrice et la diminution du nombre de cellules inflammatoires induites par l'état diabétique (Bitar, 2000).

L'importance du monoxyde d'azote (NO) dans la cicatrisation a été démontrée. Lors du diabète, la synthèse d'oxyde nitrique est réduite dans l'environnement de la plaie. La L-arginine est le seul substrat nécessaire à la synthèse de NO. La supplémentation alimentaire en L-arginine chez des rats diabétiques permet de rétablir une synthèse normale de monoxyde d'azote et de diminuer partiellement les effets néfastes du diabète sur la cicatrisation (Witte *et al.*, 2002 ; Witte *et Barbul*, 2003).

Chez le diabétique, il est observé une baisse de la production de NO et de prostacycline par l'endothélium, ce qui favorise l'agrégation des plaquettes. De plus, les patients diabétiques présentent une augmentation de l'expression membranaire de la glycoprotéine Ib et du complexe GPIIb/IIIa au niveau des membranes des plaquettes. Ces glycoprotéines ont la faculté de lier le facteur von Willebrand présent sur les cellules endothéliales et sur le fibrinogène, et donc, elles interviennent dans l'adhésion et l'agrégation

plaquettaire. L'hyperglycémie altère l'homéostasie du calcium au niveau des plaquettes, sachant que le calcium régule l'activation et l'agrégation des plaquettes (**Renard et al., 2004**).

L'état d'hyperglycémie chronique du diabète sucré, conduit de manière systématique au développement d'un stress oxydant (**Giugliano et al., 1996 ; Mizuta, 2005**) délétère pour la cicatrisation (**Giacco et Brownlee, 2010**). Ce phénomène est médié par une augmentation de la production des radicaux libres et une diminution des défenses antioxydantes (**Leverve, 2003**).

La cicatrisation des plaies du diabétique se caractérise par un processus inflammatoire perturbé avec une accumulation de cytokines pro-inflammatoires (**Dinh et al., 2012; Ochoa et al., 2007**), de protéases (**Lobmann et al., 2002; Yager et al., 1996**) mais également une baisse de certains facteurs de croissance (**Blakytyn and Jude, 2006; Goren et al., 2003; Greenhalgh et al., 1990**) qui interfèrent avec le processus de cicatrisation. Les facteurs de croissance et cytokines contrôlent la prolifération, la différenciation, la migration et le métabolisme cellulaire durant les différentes phases de la cicatrisation (**Brem et Tomic-Canic, 2007**).

Il a été montré que le tissu des plaies chroniques de diabétiques ainsi que l'exsudat contenaient moins de PDGF, de FGF- β , d'EGF (**Falanga, 1993**) et de TGF- β (**Cooper et al., 1994**). Les forts taux plasmatiques des métalloprotéases (MMP-2, MMP-8, MMP-9) et les faibles taux de TIMP1/TIMP2 (**Lobmann et al., 2002; Lobmann et al., 2005; Menghini et al., 2013**) combinés à de fortes sécrétions d'élastase et de Cathepsines (D et G), entraînent une dégradation anormale des protéines de la MEC (**Ahmad et al., 2012**).

Dans le contexte de diabète les kératinocytes prolifèrent mais présentent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles anormales (**Usui et al., 2008**). Les cytokératines K2, K6 et K10 sont des facteurs exprimés par les kératinocytes durant la différenciation épidermique. Le diabète induit à la fois une diminution de ces facteurs (**Stojadinovic et al., 2005; Usui et al., 2008**) et une augmentation du TGF- β 3, qui bloque la migration des cellules dermiques (**Bandyopadhyay et al., 2006; Jude et al., 2002**).

La diapedèse est fortement diminuée, ce qui entraîne une baisse d'activité de ces cellules sur la zone à cicatrifier. D'autres facteurs qui stimulent l'activité des cellules épithéliales durant la phase de réépithélialisation (IL-8, IL-10, IL-15, TGF- β , IGF-1, PDGF,

NGF sont également sous-exprimés dans les plaies du pied diabétiques (**Barrientos et al., 2008; Guvakova, 2007**).

Les artériopathies et athéroscléroses, fréquentes dans le cadre du diabète, limitent les apports d'oxygène et sont à l'origine d'hypoxies voire d'anoxie tissulaire. La plupart des processus engagés dans les phases de la cicatrisation requièrent la présence d'oxygène (**Bishop, 2008; Rodriguez et al., 2008**) pour la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes, la différenciation de ces cellules et synthèse de collagène (**Michiels et al., 2000; Tandara et Mustoe, 2004**).

Seule la prolifération des cellules endothéliales peut se faire en condition hypoxique (**Tong et al., 2006**). En condition normale, un état d'hypoxie induit l'expression du facteur de transcription HIF1 α (Hypoxia inducible factor) qui combiné à HIF β permet l'expression de nombreux facteurs angiogéniques comme le VEGF (**Fong, 2008; Hickey et Simon, 2006**).

De nombreuses cytokines (TNF- α , TGF- β) mais également des facteurs de croissance comme le PDGF, l'endothelin-1 et d'autres médiateurs impliqués dans la prolifération cellulaire sont également synthétisés via ce facteur de transcription (**Rodriguez et al., 2008**).

L'hyperglycémie entraîne une anomalie de la transactivation de HIF1 α et le maintien d'un environnement hypoxique délétère (**Thangarajah et al., 2010; Thangarajah et al., 2009**). La glycation induit une néo-vascularisation altérée et la formation de lésions athéromateuses induites par une hyperagrégabilité plaquettaire (**Peppas et Raptis, 2008; Peppas et Vlassara, 2005**).

De plus, l'hyperglycémie et l'inflammation chronique rencontrées dans le diabète sont les causes principales des dysfonctions fonctionnelles des progéniteurs des cellules endothéliales (EPC) ainsi que de leur recrutement (**Fadini et al., 2007**).

La glycation non-enzymatique des membranes basales vasculaires serait à l'origine du défaut de « homing » de ces cellules et retarderait de ce fait la régénération vasculaire du site lésionnel (**Kim et al., 2012**).

Le terrain inflammatoire chronique chez le diabétique est un élément majeur dans la pathogenèse des complications qui sont associées au diabète. Ainsi, Goren et al, ont montré que l'administration systémique chez des souris diabétiques *ob/ob*, à la fin de la phase inflammatoire de cicatrisation d'une plaie aiguë d'anticorps monoclonaux neutralisants dirigés

contre le TNF- α , améliore la vitesse de cicatrisation de la plaie sans modifier le phénotype diabétique des souris (**Goren et al., 2007**).

D'autres études ont montré que les macrophages isolés de plaies de patients diabétiques ou de modèles murins diabétiques présentaient un phénotype M1 pro-inflammatoire, caractérisé par une forte sécrétion d'IL-1 β . Un anticorps neutralisant l'IL-1 β a aussi permis d'établir que cette cytokine contribuait au maintien de l'état inflammatoire de la plaie. L'anticorps neutralisant induit un changement de phénotype des macrophages inflammatoires M1 vers un macrophage M2 associé à la cicatrisation de la plaie (**Mirza et al., 2013**).

D'autres études ont confirmé sur des modèles murins, que l'environnement diabétique induit des changements intrinsèques stables des cellules hématopoïétiques notamment des macrophages. Ces changements conduisent à des phénotypes de macrophages hyper-réactifs au niveau des plaies cutanées (**Bannon et al., 2013**).

L'ensemble de ces résultats, obtenus pour la plupart sur des modèles murins génétiquement diabétiques, suggèrent que dans un environnement diabétique, les monocytes/macrophages présentent une déficience de leur capacité à passer d'un phénotype inflammatoire M1 ou M2b vers un phénotype réparateur/régulateur M2a/M2c favorisant la résolution de l'inflammation et la cicatrisation des plaies. Cette altération du potentiel de polarisation des macrophages contribuerait à une mauvaise cicatrisation des plaies des sujets diabétiques (**Bannon et al., 2013**).

Les macrophages inflammatoires de type M1/M2b présents au début de l'inflammation persistent et retardent l'arrivée des macrophages M2s anti-inflammatoires et réparateurs. Ainsi le ratio entre ces différents phénotypes serait un bon indicateur d'une inflammation chronique chez les sujets diabétiques (**Pradhan Nabzdyk et al., 2013**).

Chapitre III

Effets cicatrisants du Miel, propolis et cire d'abeille

I- Le miel :

I-1- Formation du miel :

Le miel est un produit naturel résultant de la transformation du nectar des fleurs par les abeilles du genre *Apis*. Une fois récolté, le nectar, un liquide sucré composé principalement d'eau et de saccharose, s'accumule dans le jabot des abeilles, de retour à la ruche, l'abeille régurgite le nectar qui va alors subir de nombreuses transformations qui permettront d'obtenir le miel. Le nectar va être concentré par évaporation afin d'obtenir une solution contenant en moyenne 83% de sucre et 17% d'eau (Namias, 2003 ; Olaitan *et al.*, 2007).

Le nectar passe également de bouche en bouche, ce qui permet l'ajout d'enzymes provenant de la salive des abeilles, dont l'invertase et la glucose-oxydase (Namias, 2003 ; Molan, 2006 ; Ballot Flurin, 2009).

L'invertase catalyse l'hydrolyse du saccharose en un mélange de glucose et de fructose tandis que la glucose-oxydase catalyse l'oxydation de certaines molécules de glucose en acide gluconique qui confère au miel son pH acide. Lors de cette réaction, du peroxyde d'hydrogène est également produit. Une fois le nectar transformé en miel par évaporation de l'eau, la teneur en eau est telle que la glucose oxydase devient inactif. Elle ne redeviendra active que si le miel est dilué. Le miel obtenu est enfin stocké dans des alvéoles recouvertes d'opercule de cire afin de le maintenir à l'abri de l'humidité (Molan, 2006)

Le miel de miellat constitue un cas particulier. Le miellat est un liquide visqueux riche en sucre et en acides excrétés par les insectes du sous ordre des homoptères, en majorité des pucerons. Les abeilles récoltent puis transforment ce miellat en complément ou en remplacement du nectar (Ballot Flurin, 2009).

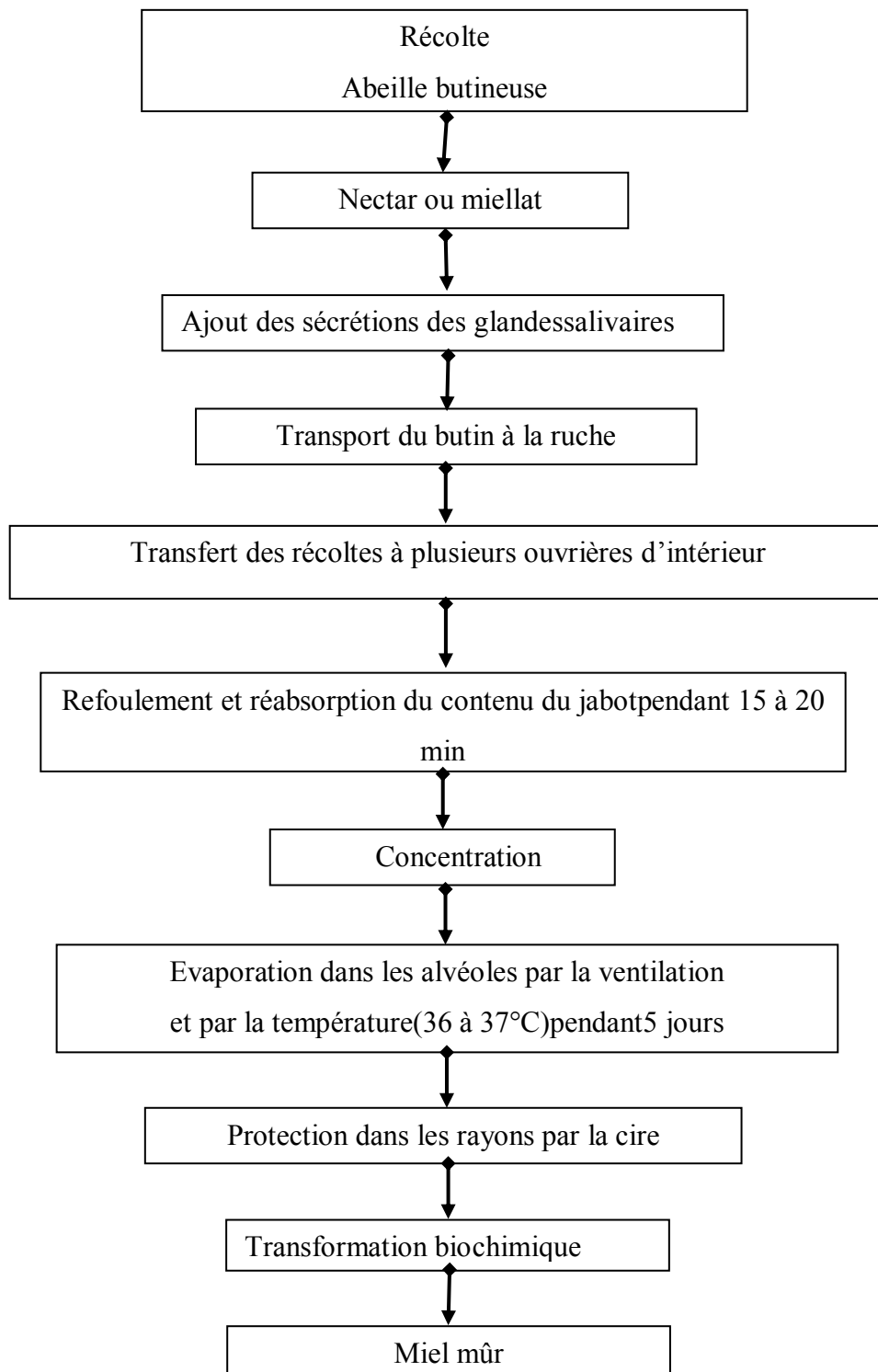


Figure N°-03: Les phases d'élaboration du miel (Gonnet, 1982)

I- 2-Variétés du miel

I.2.1. Miels issus du nectar

a- Miel uni floral ou mono floral

Un miel uni floral est un miel naturel produit par les abeilles, provenant principalement d'une seule espèce florale déterminée, tel que le miel de Callune, le miel d'Acacia, le miel d'Eucalyptus et le miel d'Oranger (**Marchenay, 2007**). Ces miels contiennent certains principes de la plante ayant fourni le nectar, qui selon leur origine botanique possède des propriétés thérapeutiques naturel divers (**Huchet et Laurent., 1996 et Gout et Jardel, 1998**).

D'après Clement, (**2002**), on ne trouve pratiquement pas de miel provenant d'une seule espèce végétale, sauf si le nombre des grains de pollen atteint 40 à 50% du nombre total du pollen, à ce moment le nom de cette plante est donné au miel.

b- Miel multi floral

Appelés parfois miels toutes fleures, ce sont des miels récoltés à partir de plusieurs espèces de plantes (**Clement, 2002**) et qui proviennent de mélange sans prédominance et donc sans origine florale précise (**Chauvin, 1968**).

I.2.2. Miel issu de miellat

Se sont des miels d'origine forestière, récoltés en été. Leur couleur va du bleu clair ou brun verdâtre à une teinte presque noire (**Caillas, 1974**). Ils sont reconnaissables par leur couleur foncé, généralement verdâtre (**Biri, 1999**).

I-3-Composition du miel :

A l'heure actuelle, tous les constituants n'ont pas encore été identifiés. On y retrouve en majorité des sucres simples (ou oses) et de l'eau (**figure N°-04**). La teneur en eau change en fonction des fleurs butinées, de la saison, du nombre d'ouvrières et de la méthode d'extraction. Elle peut varier de 14 à 25% avec un optimum de 17% qui assure une extraction plus aisée, un meilleur conditionnement en évitant une fermentation précoce et néfaste pour le produit (**Bruneau, 2009**).

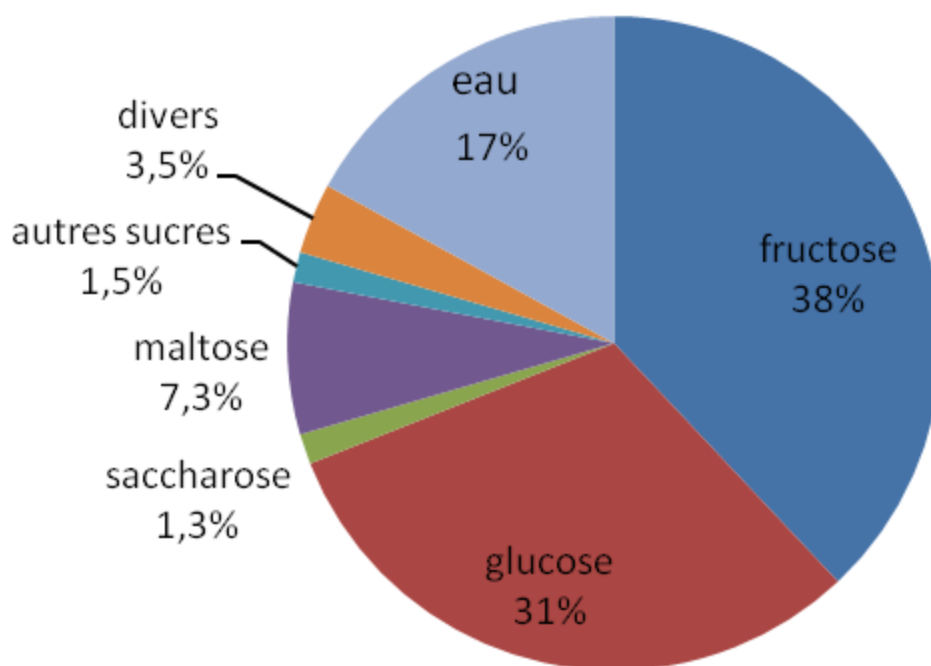


Figure N°-4: Composition moyenne du miel (Bruneau, 2009).

a-Glucides :

Une quinzaine de sucres ont été identifiés. Ils représentent de 95 à 99 % de la matière sèche mais ne sont pas tous présents dans tous les miels :

- Fructose, glucose ;
- Maltose, saccharose ;
- Iso-maltose, maltotriose, turanose, nigérose, kojibiose, leucrose, mélézitose ; erlose, kestose raffinose, dextrantriase ...

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).

b-Protides :

Les protides, représentés par les acides aminés et les protéines ne sont présents qu'en très petite quantité (environ 0,3%). Ce sont le nectar des plantes, les sécrétions de l'abeille et la présence de grains de pollen qui apportent peptones, albumines, globulines et nucléoprotéines (Domerego et al., 2009).

Plus de 19 acides aminés sont présents. La proline et l'hydroxyproline, sécrétée par les glandes salivaires de l'abeille, est présente dans tous les miels. De même, on retrouve systématiquement l'alanine, l'acide glutamique, la glycine et la leucine. Au contraire, le tryptophane n'est presque jamais présent ou seulement en infime proportion (**Oryan et Zaker, 1998**). Le miel contient également une protéine d'intérêt, la bee-defensin 1 (**Kwakman et al., 2010**).

c-Lipides :

Les stérols forment la très grande majorité des lipides présents dans les miels. On les retrouve sous forme de cholestérol libre et sous forme d'esters de cholestérol. Ces derniers pouvant après consommation, devenir précurseurs d'hormones stéroïdiennes. Les autres lipides présents sont les triglycérides et les acides gras libres. Mis à part le miel de tournesol, les miels ne contiennent que très peu de lipides (**Apimondia, 2001**). Les lipides proviennent également des microparticules de cire qui composent le miel (**Domerego et al., 2009**).

d-Minéraux :

Parmi les 0,26% de minéraux qui composent en moyenne les miels, le potassium en représente environ la moitié (**Bruneau, 2009**). Plus de 30 oligo-éléments ont été décelés. La teneur en minéraux des miels est fortement corrélée à l'origine géo-botanique du nectar (**Stocker et al., 2005**). En règle générale, les miels de miellat contiennent deux fois plus de minéraux que les miels de nectar (**Bruneau, 2009**). Plus un miel est foncé, plus il est riche en minéraux (**Huchet et al., 1996**). La teneur et la nature des minéraux dépendent du type de sol (**Domerego et al., 2009**).

e-Enzymes :

Les enzymes proviennent soit de la salive de l'abeille, soit du nectar (**Jeffrey et Echazarreta, 1996**). On en retrouve en très grande proportion :

Apportée par la salive :

- Invertase : catalyse l'hydrolyse du saccharose en fructose et glucose ;
- Amylase : catalyse l'hydrolyse de l'amidon en molécules de glucose ;
- Glucose-oxydase : catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique, ce qui produit du peroxyde d'hydrogène.

Apporté par le nectar :

- Catalase : catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène ;
- Phosphatases acides.

Ces enzymes sont dénaturées par chauffage (**Apimondia, 2001**).

f-Vitamines :

Les vitamines sont majoritairement apportées via les grains de pollen. Les vitamines liposolubles A, D, E et K sont présentes de façon virtuelle. Elles ne sont quasiment pas détectées par nos méthodes de dosage actuelles. Les vitamines hydrosolubles sont composées essentiellement par les vitamines du groupe B : B1, B2, B3, B5, B6, B8 et B9. La vitamine C peut également être retrouvée de façon occasionnelle, notamment dans le miel de menthe (**Domerego et al., 2009**).

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 (**Nusgens et al., 2001**).

g-Acides :

Des acides organiques (en moyenne 0.57% de la matière sèche) qui lui confèrent son pH acide (3.9 en moyenne) (**Jeffrey et Echazarreta, 1996**). Le principal est l'acide gluconique (en moyenne 0.43 % de la matière sèche) retrouvé dans tous les miels. Les autres acides rencontrés sont les acides acétique, lactique, succinique et formique (**Olaitan et al., 2007 ; Ballot Flurin, 2009**).

Des acides aminés également retrouvés en faible quantité : proline, hydroxyproline, glycine, trypsine, leucine, acide aspartique (**Oryan et Zaker, 1998**).

II-Propriétés thérapeutiques du miel :

II-1- Propriétés anti-oxydantes :

Le stress oxydatif, défini comme un déséquilibre entre la production de radicaux libres et le système de défense antioxydant, joue un rôle significatif dans l'apparition de nombreuses maladies. En effet, l'agression de l'ADN cellulaire par les radicaux libres peut accélérer le vieillissement tissulaire. Les antioxydants sont des substances qui, présentes à faible concentration, sont capables de supprimer, retarder ou empêcher les processus d'oxydation et leurs conséquences. Les capacités antioxydantes du miel sont énormes, à la hauteur de leur nombre dans celui-ci. On retrouve comme antioxydants présents dans le miel : des oxydases du glucose, des catalases, de l'acide ascorbique, des flavonoïdes, des acides phénoliques, des caroténoïdes, des acides organiques, des produits de la réaction de Maillard, des acides aminés et des protéines (**Beretta et al., 2005**).

Le miel est une source importante d'antioxydants naturels. Une étude réalisée par **Alzahrani et al en 2012** a permis de déterminer l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols du miel.

Les composés phénoliques font partie des principaux composants responsables de cette activité. Ce sont des antioxydants primaires ou anti-radicalaires qui inhibent la propagation des réactions radicalaires en fournissant des hydrogènes aux radicaux libres présents. Il a été démontré que la composition du miel, et donc sa capacité antioxydante, dépend à la fois de la source florale utilisée par les abeilles pour collecter le nectar, de la saison, et des facteurs environnementaux (**Lachman et al., 2010**).

Des molécules comme les caroténoïdes, des acides organiques, des enzymes, des peptides, et probablement d'autres composés mineurs semblent contribuer également à ce pouvoir antioxydant (**Hegazi et Elhady, 2009**).

La couleur de miel reflétant en partie la quantité de caroténoïdes et de flavonoïdes qu'il contient, les miels présentant les capacités les plus importantes sont généralement les miels les plus sombres et opaques (**Taormina et al., 2001**).

L'apport d'antioxydants à une plaie, notamment grâce au miel, permettrait donc de protéger les tissus de celle-ci lorsque l'inflammation a causé un afflux important de phagocytes responsable de la libération d'un grand nombre de radicaux libres (**Molan, 2009**).

II-2- Propriétés anti-inflammatoires :

Les propriétés anti-inflammatoires du miel viennent de ses propriétés antioxydantes. Dans le cas où un stimulus inflammatoire persiste, l'activité de phagocytose provoque la libération de radicaux libres, qui stimulent la production de cytokines ce qui amplifie la réponse inflammatoire. En neutralisant les radicaux libres, le miel joue un rôle anti-inflammatoire (**Schreck et al., 1991**).

Des recherches ont mis en évidence l'action du miel sur les cellules responsables du phénomène inflammatoire. Le miel, à une concentration de 1%, stimule *in vitro* la libération par les monocytes de cytokines (TNF- α , IL-1 β et IL-6) qui sont les acteurs de la réponse immunitaire en cas d'infection (**Tonks et al., 2001**).

De plus, le miel contient des flavonoïdes ayant des propriétés anti-inflammatoires, notamment la chrysin ou 5,7-dihydroxyflavone, également présente dans la propolis. Une étude publiée en 2011 a démontré que la Chrysin présente un effet bénéfique sur la protection des kératinocytes contre les lésions causées par les UVA et UVB. Elle peut également atténuer l'apoptose, les radicaux libres et la cyclo-oxygénase-2 induites par les UVA et UVB (**Wu et al., 2011**).

Il peut remplacer la prédnisolone dans le cas de colites. Il combat également les inflammations intestinales en limitant l'émission de radicaux libres à partir de ces zones lésées (**Bilsel et al., 2002**).

II-3- Propriétés immunomodulatrices :

L'effet immunostimulant a été montré chez des rats après injection intrapéritonéale d'une solution contenant 10^5 UFC/mL d'une souche de *Staphylococcus aureus* isolée de mammite clinique chez les bovins. Les rats ayant reçu du miel de fenouil en voie orale ou intrapéritonéale ont montré à l'autopsie des parenchymes pulmonaire et hépatique avec peu ou pas de lésions contrairement aux parenchymes témoins ($p < 0,01$) qui présentaient une bronchopneumonie suppurative typique et une dégénérescence nécrotique sévère du foie. Les tissus lymphatiques des organes des rats traités se trouvèrent également stimulés (**Sayed et al., 2009**).

Des administrations orales de miel (10 ; 100 ou 1000 mg/100g de poids vif) chez des souris ont induit une augmentation des cellules de la moelle osseuse et des macrophages

péritonéaux. Les capacités de phagocytose des macrophages et les fonctions des lymphocytes B et T ont également été augmentées (**Attia et al., 2008**).

II-4- Activité antibactérienne :

L'action antibactérienne du miel est déterminée par plusieurs facteurs. L'activité est plus importante quand le miel est administré de façon topique, directement sur les zones contaminées. Le miel est bactériostatique et bactéricide. Dans ce cas, tous les facteurs antibactériens entrent en jeu (**Cooper, 2007**).

II-4-1-Origine:

a-Action osmotique :

L'osmolarité élevée du miel, dû à sa nature hypertonique, draine le plasma et la lymphe des tissus sous-jacents et périphériques. Les fluides affluent à la surface et participent à la formation d'une couche de miel diluée entre la surface de la plaie et le pansement (**Iftikhar et al, 2010 ; Al-Waili et al, 2011**). Les principales substances du miel sont les sucres, lesquels par leur effet osmotique exercent une action antibactérienne (**Molan, 1992**).

L'action osmotique a été considérée comme un précieux outil dans le traitement des infections, car elle prévient la croissance des bactéries et renforce la cicatrisation (**Archer et al ; 1990**).

Mais quand il est appliqué sur les plaies, la dilution du fait de l'exsudation, réduit l'osmolarité à un niveau tel qu'elle cesse de maîtriser l'infection (**Herszage et al., 1980**).

La quantité d'eau libre ou activité de l'eau est quantifiée par l' A_w , les valeurs moyennes d'activité de l'eau du miel varient entre 0.562 et 0.62, valeurs suffisamment basses pour inhiber la croissance de la majorité des bactéries. En effet, la plupart des bactéries voient leur croissance inhibée pour des A_w comprises entre 0.94 et 0.99. Ce qui correspond à des solutions du miel standard (a_w d'origine environ 0.6) à des concentrations allant de 2% et 12% (**Molan, 1992 ; Olaitan, 2007**).

La forte activité osmotique du miel joue un rôle dans le contrôle de la prolifération bactérienne et permet aussi au miel de drainer les fluides de la plaie tout en maintenant la surface de la plaie humide (**Williams, 1999**).

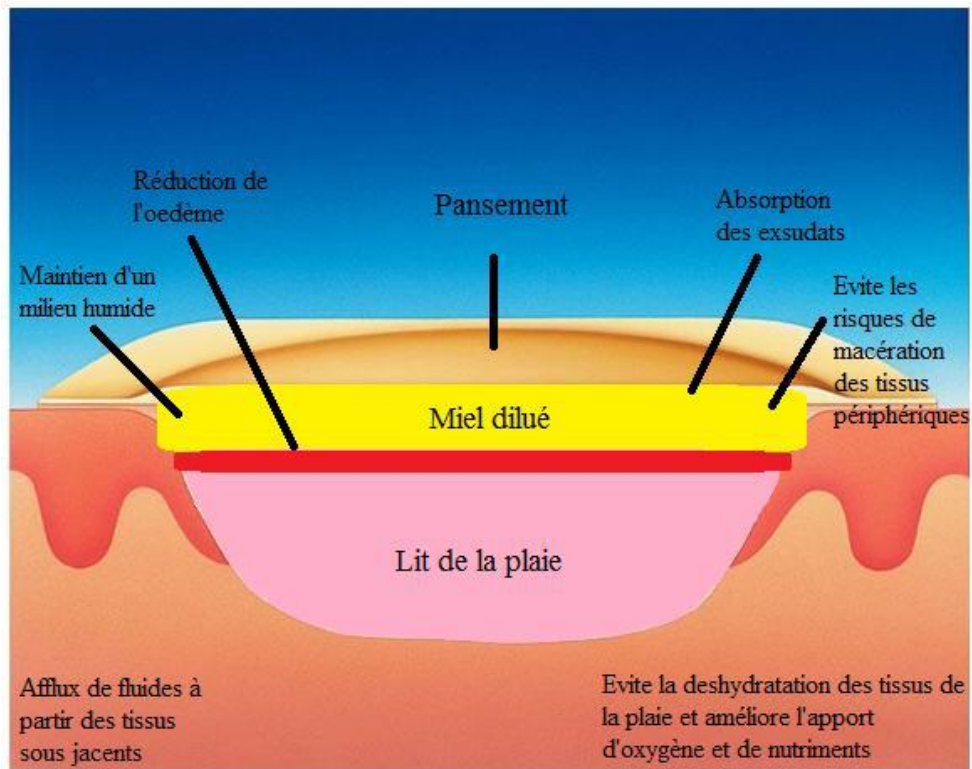


Figure N°-05 : Schéma représentant les effets de l'osmolarité du miel (Tomczak, 2010)

b-Acidité :

Le pH bas du miel associé à l'effet osmotique de ses sucres furent considérés comme les principaux facteurs antibactériens (Yatsunami et Echigo, 1984). Mais si le miel est dilué, particulièrement par les fluides du corps le pH ne sera pas ainsi un inhibiteur efficace de beaucoup d'espèces microbiennes (Molan et Allen, 1996).

Le miel grâce à la présence d'acides organiques, dont le plus abondant est l'acide gluconique, possède un pH bas (généralement entre 3,2 et 4,5). Ce pH est théoriquement suffisant pour inhiber la croissance de la plupart des pathogènes. Par exemple la croissance de *salmonelle spp* n'est possible qu'à un pH supérieur à 4,4 et celle de *Sterptococcus pyogène* à un pH supérieur à 4,5 (Olaitan *etal.*, 2007).

Cependant, lorsque le miel est utilisé sur une plaie, il est possible que les bactéries soient en contact avec un miel beaucoup moins dilué et que l'acidité de celui-ci puisse contribuer à l'activité antibactérienne constatée (Molan, 1992).

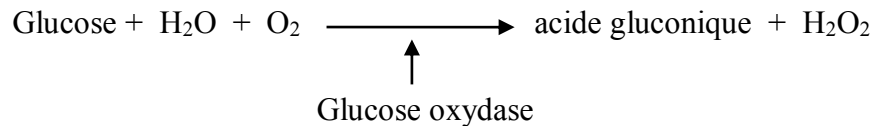
Le pH du miel, permet de maintenir des conditions optimales pour l'activité fibroblastique. En effet, la migration et la prolifération des fibroblastes, ainsi que la synthèse de collagène sont optimales dans un environnement légèrement acide (**Lusby et al., 2002**).

c-Peroxyde d'hydrogène :

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a été communément utilisé dans la prise en charge des plaies pour ces propriétés antiseptiques. Cependant si à des concentrations suffisamment élevées il constitue un agent antimicrobien efficace, à des concentrations trop élevées (comme celles utilisées dans les solutions utilisées comme antiseptique (3 %), le peroxyde d'hydrogène est responsable de retard de cicatrisation, voire d'une aggravation d'une lésion tissulaire (**Roy et al., 2006**).

En effet le peroxyde d'hydrogène donne alors naissance à des radicaux oxygénés responsables de dommages cellulaires et protéiques (**Molan, 1999**).

Le peroxyde d'hydrogène est produit dans le miel suite à une réaction catalysée par la glucose-oxydase :



Le miel contenant un inhibiteur de glucose oxydase, celle-ci ne devient active que quand il est dilué, comme c'est le cas une fois le miel en contact avec les fluides de la plaie. Une fois cette dilution réalisée, le peroxyde d'hydrogène va être produit de façon lente, continue et un taux constant pendant au moins 24heures (**Cooper et Molan, 1999**).

Encore appelé 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 (**Rossant et Desmouliere, 2011**).

Cependant, le fait que l'activité antibactérienne du miel soit réduite suite à une exposition à la lumière et à la chaleur (**White et Subers ; 1964**) ou par l'ajout de la catalase ou de peroxydase (**White et al., 1963**), a conduit les chercheurs à étudier le rôle de celui-ci dans l'activité antibactérienne du miel.

L'acide gluconique et le peroxyde d'hydrogène préservent et stérilisent le miel (miel non mûr) pendant le processus de maturation (Molan, 1992). Dans le miel mur la glucose oxydase est inactive, il contient seulement une petite quantité de peroxyde d'hydrogène non suffisante à empêcher la croissance bactérienne (Bogdanov, 1997). Le peroxyde d'hydrogène donne une protection contre les microorganismes pathogène par un mécanisme biochimique qui interrompt leurs métabolismes et dénature leurs protéines (Jeffrey et Echazaretta, 1996).

Il apparaît également que le peroxyde d'hydrogène stimule la multiplication cellulaire et favorise une évolution normale de l'inflammation au cours de la cicatrisation. Il stimule notamment la croissance des fibroblastes et des cellules épithéliales qui vont participer à la réparation tissulaire. En même temps, il stimule également le développement d'une néovascularisation dans le tissu cicatriciel (Descottes, 2009).

d-Facteurs phytochimiques :

1-La β -defensine 1 :

La β -defensine 1 est une protéine fabriquée par les glandes hypopharyngiennes et mandibulaires des abeilles. Elle est retrouvée dans le miel et la gelée royale. Chez l'homme, les défensines constituent une famille de peptides antimicrobiens naturels largement impliqués dans l'immunité innée.

Ce sont de petits peptides, de masse moléculaire variant de 3,5 à 6 kDa, qui possèdent un large spectre d'activité antimicrobienne. Il a été montré récemment que la grande majorité des propriétés antibactériennes du miel provient de cette protéine (Kwakmanet *al.*, 2010).

2-Le méthylglyoxal

Le méthylglyoxal (MGO) est un antibactérien naturel découvert la première fois par le professeur Thomas Henle, de l'université de Dresde (Allemagne) ; La concentration en MGO varie selon les origines géographique et botanique du miel retrouvé en particulier dans le miel de Manuka (*Leptospermum scoparium*). Cependant, dans le miel du manuka le MGO est formé par la conversion de dihydroxyacétone (DHA) (Atrott *et al.*, 2012).

3-Autres substances:

Les substances antibactériennes non peroxydes du miel sont surtout des lysozymes, des flavonoïdes, des acides aromatiques, des substances volatiles et autres composants

indéterminés (**Bogdanov et Blumer, 2001**). Les flavonoïdes trouvés dans le miel ont un effet antibactérien efficace contre les bactéries et les champignons, ces flavonoïdes sont les pinobanksin, chrysin, galangin, quercétine, lutéoline, kaempferol, et pinocembrin le seul présent en quantité élevée (**Miraglio et al., 2003**).

Une analyse systématique de la nature chimique des substances non peroxydes n'a pas encore été effectuée (**Bogdanov et Blumer, 2001**). Les composés phénoliques sont responsables de l'activité antioxydante du miel (**Miraglio et al., 2003**).

II-4-2- Spectre antimicrobien:

Le spectre antibactérien varie cependant en fonction des différents miels ; il existe ainsi des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et de *streptocoques* résistantes à certains miel (**Efem et al., 1992 ; Nzeako et Hamdi, 2000**).

De nombreuses recherches ont été effectuées pour déterminer un spectre antibactérien du miel en vue de l'appliquer sur des plaies contaminées par les germes sensibles. Les espèces les plus sensibles sont : *Streptococcus pyogènes*, *Staphylococcus aureus*, et *Escherichia coli*. Les autres espèces telles que *Enterococcus faecalis*, *Klesiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus species*, *Clostridium welchii*, *pseudomonas aeruginosa* et *Clostridium tetanis* sont également sensibles au miel, mais à un degré moindre. *Clostridium oedematiens* ne semble pas être inhibé par le miel (**Assie, 2004**).

Le spectre antimicrobien du miel s'étend également à certains champignons et virus. Certains auteurs ont ainsi mis en évidence une activité du miel contre *Candida albicans* et *Aspergillus niger* (**Boukraâ et Bouchehrane, 2007**) ou *Trichophyton mentagrophytes* (**Whadan, 1998**).

Le miel en diverses solutions a montré des effets inhibiteurs *in-vitro* sur le protozoaire *Leishmania* sp. Cet effet est supérieur à celui créé par une solution de sucre classique (**Zeina et al., 1996**).

III-Utilisation du miel dans le traitement des plaies :

Le miel favorise la phase de granulation en permettant la cicatrisation en milieu humide. En outre, le pH acide du miel inhibe la croissance de certaines bactéries et favorise une libération accrue d'oxygène par l'hémoglobine ; il aurait ainsi des effets favorables sur les

fibroblastes et l'angiogenèse. Le peroxyde d'hydrogène, aux faibles concentrations produites par le miel, stimulerait également les fibroblastes et l'angiogenèse. Le miel apporte d'autre part des nutriments qui joueraient un rôle anabolique dans la cicatrisation (**Williams, 1999**).

En plus de ses propriétés antibactériennes, le miel favorise la déterision autolytique, diminue les odeurs et stimulerait la formation du tissu de granulation et l'épithélialisation en maintenant un environnement humide à la surface de la plaie. Le miel aurait aussi des propriétés anti-inflammatoires, diminuerait les œdèmes, la douleur et l'exsudation. Il est en général utilisé avec des pansements humides non adhérents et peut représenter une alternative intéressante aux antibiotiques et aux hydrogels beaucoup plus onéreux et non disponibles dans certains pays (**Efem, 1988 ; Topham, 1988 ; Kumar et al., 1993**).

Les pansements humides ou toute forme d'irrigation humidifient les tissus et donc retardent la cicatrisation. Les pansements secs adhèrent à la surface, causant de la douleur et des dommages au tissu de granulation, chaque fois qu'ils sont changés. Les pansements huileux empêchent les sécrétions de s'écouler librement et pouvant ainsi se répandre dans les surfaces de peau voisines en causant des réactions indésirables ou des effets toxiques. A l'inverse, le miel est un traitement de choix des plaies, car il est non irritant, non toxique, stérile, bactéricide, nutritif, aisément appliqué et plus confortable que les autres pansements (**Amy et al., 1996**).

Les effets thérapeutiques observés lors de l'utilisation du miel comme pansement des plaies incluent une stimulation du processus cicatriciel avec cicatrisation rapide, assainissement des plaies infectées, stimulation de la régénération tissulaire, diminution de l'inflammation, il évite de même les défauts dus à l'adhésion des pansements, par formation d'une interface humide (**Molan, 2001**).

Le miel a été utilisé dans le traitement de divers types de plaies, comprenant les brûlures (**Efem, 1988**) les ulcères veineux des jambes, les ulcères des jambes d'étiologies diverses, ulcères des pieds des diabétiques, sites de prélèvement de greffons non cicatrisés, abcès, furoncles, plaies opératoires (**Betts et Molan, 2001**), processus nécrotique (**Efem, 1993**), infection post-opératoire des plaies néonatales (**Efem, 1988**).

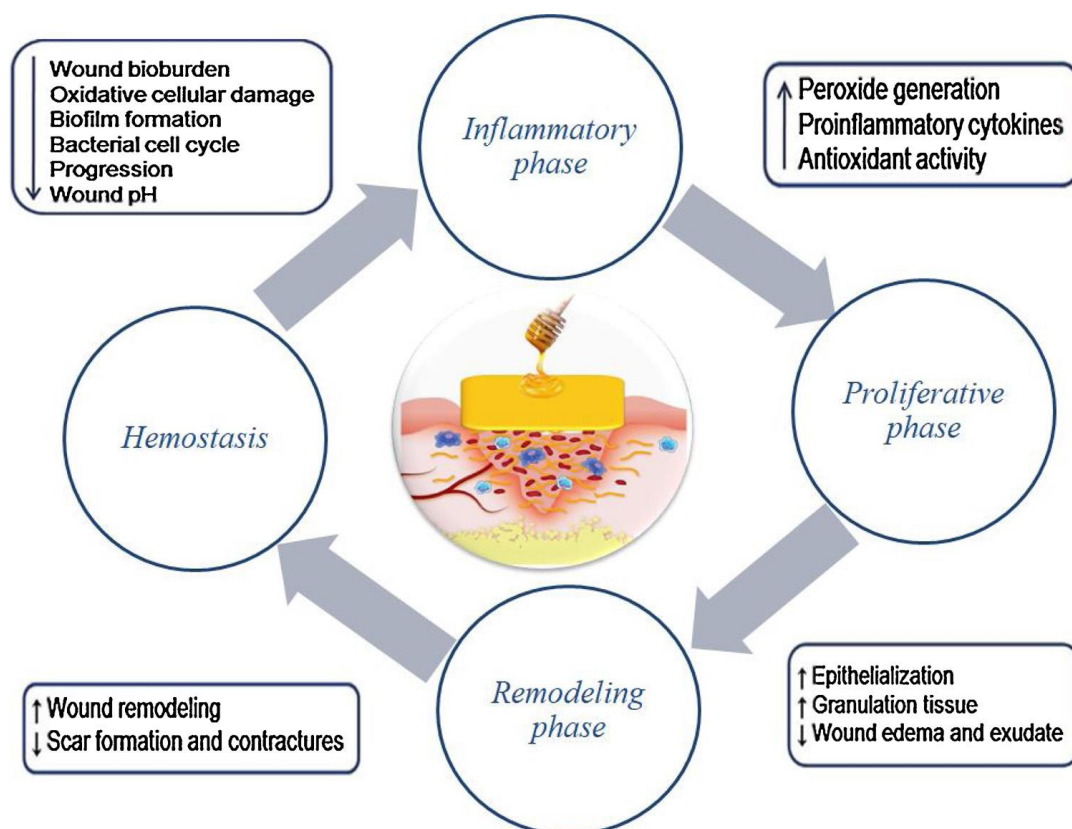


Figure N°-06 : Effets thérapeutiques du miel au niveau des quatre phases du processus cicatriciel (Krishnakumar, et al., 2020).

IV-La propolis :

La propolis est une substance résineuse recueillie de diverses plantes par les abeilles. Elle est utilisée dans la construction, et pour obturer les fissures dans la ruche, Pour cette raison, la propolis est souvent désignée comme "colle d'abeille." Il s'agit d'un mélange de résine, d'huile essentielle et de cire, et contient aussi des acides aminés, des minéraux, de l'éthanol, de la vitamine A, du complexe B, E, et des flavonoïdes (Bellik et Boukraâ, 2013).

Plusieurs recherches ont montré que la propolis pouvait avoir deux origines : interne, issue de la première phase de digestion du pollen (Hegazi, 1997) ou externe, collectée par les abeilles de différentes plantes. Ces dernières la rapportent à la ruche, et la modifient en partie par l'apport de certaines de leurs sécrétions propres (cire et sécrétions salivaires essentiellement) (Valcic et al., 1999).

Le spectre antibactérien de la propolis est large. Son action est puissante, elle agit en effet sur *Staphylococcus aureus* et SARM (Trucheva et al., 2010). Cette activité

antibactérienne serait imputable à l'acide cinnamique, aux molécules aromatiques, aux acides dit erpéniques, aux composés phénoliques et aux nombreux flavonoïdes qui composent la propolis et en font le plus actif des produits de la ruche (**Bankova et al., 1996 ; Boukraâ et Sulaiman, 2009 ; Ramanauskienè et Inkèniènè, 2011**).

La propolis accélère la régénération des tissus abîmés (pulpe dentaire, tissus hépatiques, osseux). L'action antioxydante des flavonoïdes est sans doute à l'origine de ses capacités de régénération, favorable à la restauration du système immunitaire. La présence d'acides phénoliques et de certains acides aminés (la proline entrant dans la synthèse du collagène, de l'élastine et de facteurs intervenant dans l'élasticité de la peau ; et l'arginine stimulant la division et donc le renouvellement cellulaire) sont des acteurs incontestables de la cicatrisation et de la régénération des cellules (**Gabrys, 1986 ; Pessolato et al., 2011**).

La propolis restructure les membranes capillaires cutanées et la néoformation vasculaire, améliore les processus métaboliques au niveau cellulaire et tissulaire, lutte contre l'hypoxie tissulaire, réactive les processus enzymatiques et aide à la reformation de la substance fondamentale (**Domerego et al., 2009**).

Les mécanismes moléculaires responsables de l'activité de cicatrisation de la propolis sont illustrés par Figure N°-07. La fibronectine (FN) est une glycoprotéine multifonctionnelle de haut poids moléculaire, qui influence la stabilité structurelle et les propriétés fonctionnelles de divers organes et tissus (**Stoffels et al., 2013**).

La matrice de fibronectine et son accumulation sont essentielles pour la migration, la prolifération, la différenciation, l'adhésion, l'apoptose, et la signalisation cellulaire ainsi que l'angiogenèse, la biosynthèse du collagène, la réépithélialisation, la formation de caillots et l'activité plaquettaire.

Les fibronectines sont également importantes dans les mécanismes de réparation telles que la dégradation intensifiée de la glycoprotéine, qui conduit à un micro-environnement cellulaire défectueux et à une affliction dans la structure des tissus de granulation. Ces conditions peuvent empêcher la plaie de se cicatriser ou d'inhiber le processus de réparation. L'accumulation de fibronectine dans l'espace extracellulaire module également la sécrétion d'autres composants réparateurs tels que le collagène de type I et de type III, la ténascine, la laminine et la fibrilline.

La propolis a démontré des effets favorables dans le processus de cicatrisation des plaies telles que les activités antifongiques et antibactériennes grâce aux composants suivants : les flavonoïdes, les composés phénoliques, les terpènes et les enzymes. Il réduit également l'activité des radicaux libres (ROS) dans le lit de la plaie en favorisant le processus de réparation. Elle a également démontré de grands effets sur le métabolisme du collagène en augmentant la quantité de collagènes de type I et de type III dans les tissus. La réduction des ROS et l'accumulation de collagène aident à équilibrer la matrice extracellulaire et à générer des tissus de granulation. **(Olczyk et al., 2014).**

La propolis est un agent apithérapeutique potentiel capable de modifier le métabolisme de la fibronectine en développant un réseau fibreux de matrice extracellulaire et en inhibant la désintégration de la fibronectine. Les composants actifs de la propolis tels que la quercétine et le resvératrol ont inhibé la biosynthèse et la production de fibronectine dépendante du TGF α , respectivement, dans les myoblastes en C2C12.

Les deux composants jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des fibronectines **(Olczyk et al., 2014).**

Des études ont également montré que la mobilité et la migration des cellules épithéliales dépendent de la teneur réduite en fibronectine dans la matrice extracellulaire. Des quantités réduites de cette glycoprotéine dans la propolis ont traité efficacement les plaies et produit des tissus de granulation. Par conséquent, l'influence de la propolis sur le métabolisme de la fibronectine peut modifier le mécanisme de cicatrisation des plaies **(Olczyk et al., 2014).**

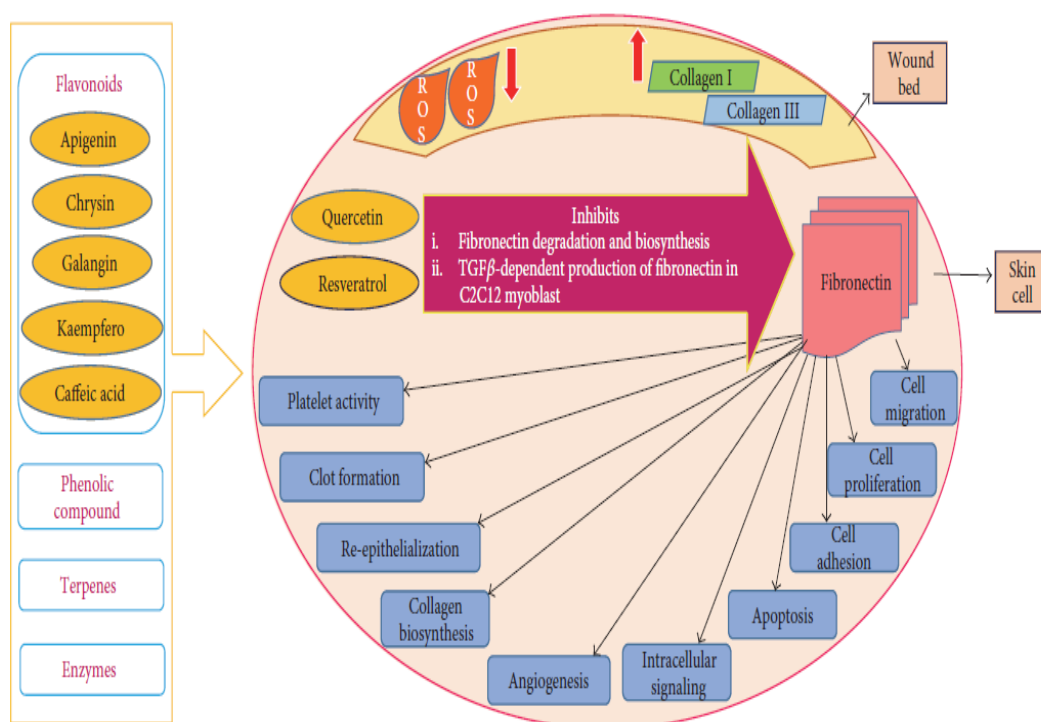


Figure N°-07 : Mécanismes moléculaire ciblant l'activité cicatrisante de la propolis (Visweswara et al., 2017).

V-La cire d'abeille :

Les glandes cirières des abeilles ouvrières âgées de 12 à 18 jours produisent une substance qui sera malaxée et mélangée à la salive pour devenir de la cire. Elle est le principal constituant des alvéoles des rayons qui se solidifie au contact de l'air. De couleur un peu jaune car mélangée à la propolis et aux grains de pollen, elle deviendra blanche une fois purifiée. Sa composition de nature lipidique varie selon l'origine géographique mais on retrouve en moyenne 72% d'esters d'alcool aliphatiques, 12% d'hydrocarbures saturés et 12% d'acides gras libres, auxquels se rajouteront des polyphénols. Bien moins en vogue qu'avant pour la fabrication de bougies, de produits cosmétiques et comme agent texturant dans l'agroalimentaire, elle a été détrônée par les cires synthétiques (Marion, 2017).

Les apiculteurs la récoltent surtout pour la création de nouveaux cadres de cire gaufrée ou pour cirer les meubles en bois. On la retrouve dans le célèbre cérat de Galien qui est un mélange de cire d'abeille blanche (13g pour 100g de produit fini), d'huile d'amande raffinée, de borax et d'eau aromatisée de rose servant à adoucir et nourrir la peau. La cire d'abeille est une substance naturelle avec une excellente tolérance cutanée (Marion, 2017).

V1. Composition :

Produit d'origine uniquement animale, elle est constituée par plus de 300 composés : la cire d'abeille est à l'image des produits de la ruche un mélange complexe. C'est un corps gras chimiquement stable, formé principalement d'hydrocarbures, d'esters, d'acides et d'alcools. Sa composition varie sensiblement selon la zone géographique de la ruche dont elle est extraite. À noter qu'elle peut contenir jusqu'à 6% de propolis (Clément *et al.*, 2011).

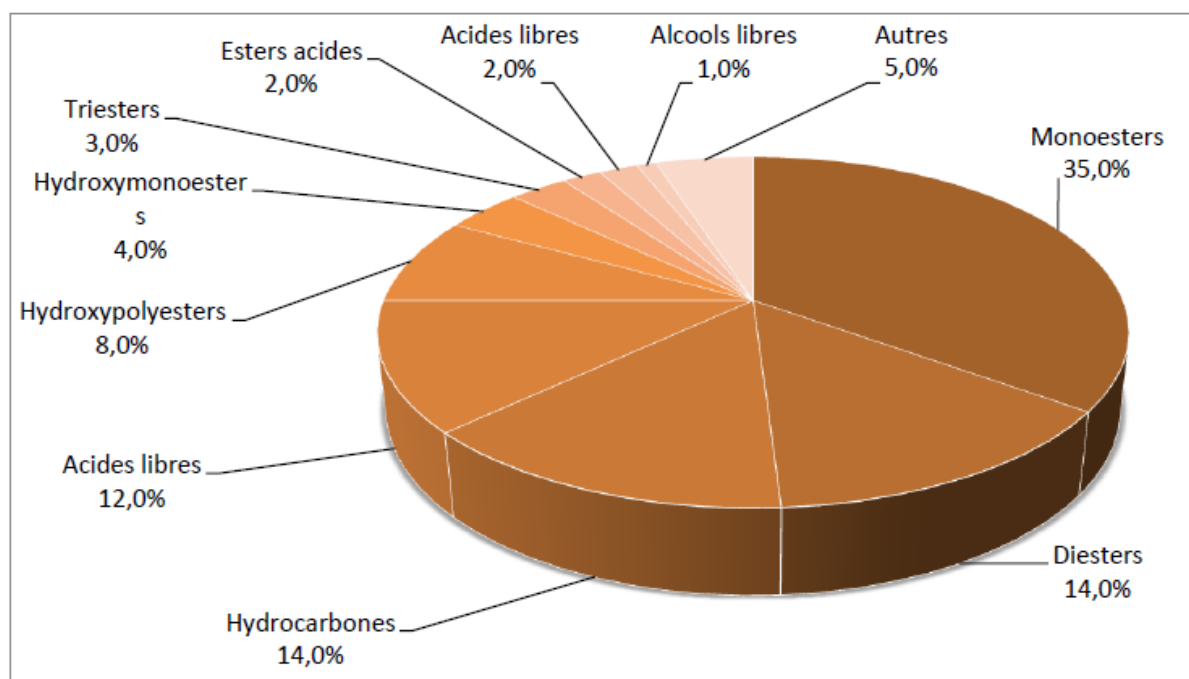


Figure N°-08 : Composition moyenne de la cire (Clément *et al.*, 2011)

V2. Propriété thérapeutiques :

La cire est employée en cosmétologie car elle est préconisée pour nettoyer l'épiderme, nourrir et adoucir le derme et prévenir le vieillissement cutané. De plus, elle a des propriétés anti-inflammatoires et cicatrisantes, utiles dans le traitement de brûlures, d'escarres, de plaies, d'abcès, de vergetures (Blanc, 2010).

Egalement, la cire possède des propriétés anti-oxydantes et antibiotiques issues de la propolis appliquée par les abeilles sur les alvéoles pour protéger la colonie des infections fongiques ou bactériennes. En cosmétologie, elle trouve de nombreuses applications car sa température de fusion est basse, elle est malléable, inoffensive, souple, insoluble dans l'eau et miscible avec plusieurs composés organiques. On la retrouve dans les laits démaquillants, les mascaras, les pommades pour le teint ou encore les crèmes anti-rides, d'autant plus que la cire d'abeille est le seul produit connu regroupant toutes ces qualités, recherchées dans l'industrie cosmétique (Blanc, 2010).

Partie expérimentale

Chapitre IV

Matériel et méthodes

I- Matériel et méthodes :

I-1- Déroulement de l'étude :

Notre expérimentation s'est déroulée au sein de l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret au service de chirurgie et d'imagerie médicale durant la période allant du mois de mars 2018 au décembre 2020.

L'objectif de notre étude est le suivi de la cicatrisation des plaies cutanées chez un animal modèle diabétique et non diabétique par l'utilisation d'un gel à base de miel comme traitement alternatif et sa comparaison à la sulfadiazine argentique comme produit conventionnel.

Cette expérimentation est composée de deux parties.

- La première partie **in-vitro** : Comportant la préparation du gel à base de miel et sa caractérisation par FTIR ainsi que l'évaluation et la comparaison de son effet antibactérien par rapport à celui de la sulfadiazine argentique sur deux souches bactériennes de référence ;
- Une deuxième partie **in-vivo** : Commencant par l'induction du diabète chez un animal modèle, suivi par la création des plaies de pleines épaisseurs et leurs gestions par les deux traitements cités ci-dessus.

I-2- Partie in-vitro :

Les combinaisons des produits naturels sont largement pratiquées en médecine traditionnelle et ont montré une activité synergique avec une efficacité accrue dans le traitement de plusieurs pathologies (**Leila et al., 2019**).

Notre préparation est composée d'un mélange de produits naturels suivants :

- Le miel d'euphorpe,
- La propolis,
- La cire d'abeille,
- Un gélifiant le carboxyméthyl cellulose sodique (**CMC-Na**) sous forme de poudre, à différentes proportions comme le montre le tableau N°01.

Tableau N°01 : Différentes proportions des produits utilisés dans la préparation du gel à base de miel.

Produits utilisés	Pourcentage
Miel d'euphorbe	80 %
Carboxymethyl cellulose sodique (CMC-Na)	10 %
Propolis	5 %
Cire d'abeille	5 %

I-2-1-Méthode de préparation du gel à base de miel:

10 gde Carboxymethyl cellulose sodique (CMC-Na) sous forme de poudre ont été mélangés à **100ml** d'eau distillée afin de le gélifier. Puis une quantité de **80g** de miel d'euphorbe, **5 g** propolis sous forme de poudre et **5 g** de cire d'abeille y ont été ajoutés. Ensuite ce mélange a été pré-chauffé dans un bain marie tout en mélangeant continuellement jusqu'à homogénéisation.

Le mélange ainsi préparé a été conservé dans des récipients hermétiquement fermés jusqu'à son utilisation. L'agitation du mélange s'effectue avant chaque application.

I-2-2 Sulfadiazine argentique à 1%(FLAMAZOLE) :

La sulfadiazine argentique est un composé blanc, fortement insoluble qui est synthétisé à partir de nitrate d'argent et de sulfadiazine de sodium. Il est disponible sous forme de crème blanche contenant 1 % p/p de sulfadiazine d'argent dans un excipient hydrosoluble(McNulty et al., 2004).

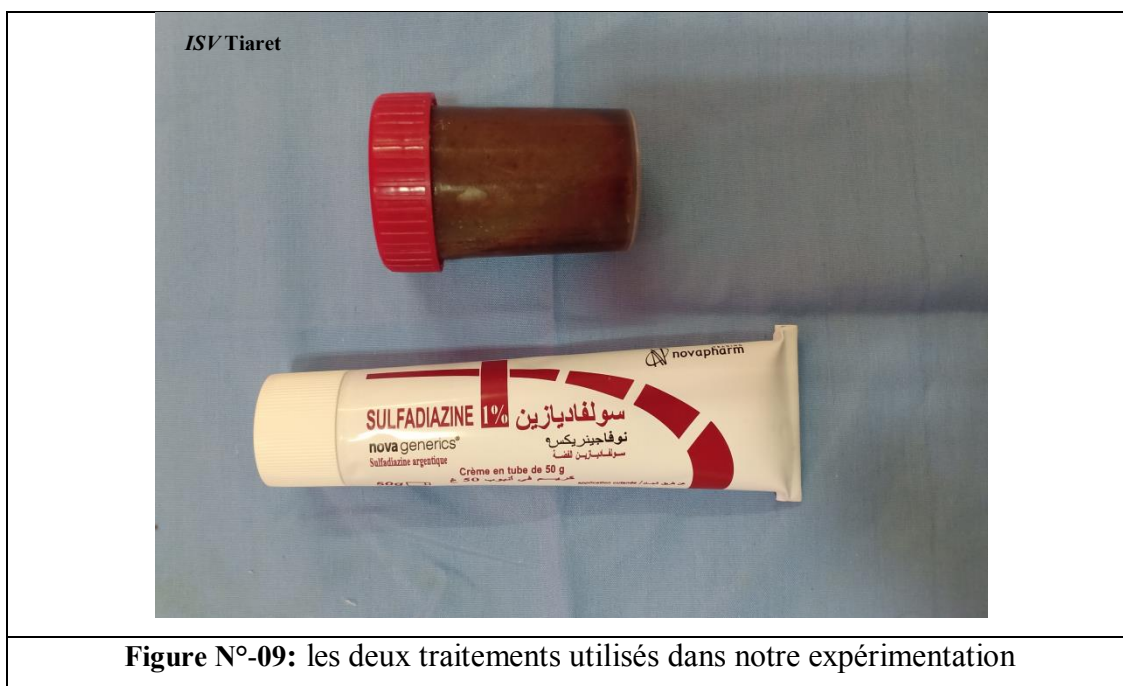


Figure N°-09: les deux traitements utilisés dans notre expérimentation

I-3- Caractérisation du gel à base de miel par FTIR :

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ou **FTIR** est une méthodologie analytique utilisée pour comprendre la structure des molécules individuelles et la composition des mélanges moléculaires dont le principe est basé sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par l'échantillon à analyser. Elle permet via l'absorption des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, de déterminer la présence de certaines fonctions chimiques présentes dans le gel (**Monika et al., 2018**). La caractérisation par **FTIR** de notre formulation est effectuée au niveau du laboratoire de chimie de l'**université d'Oran-1**.

I-4- Effet antibactérien du gel à base de miel

I-4-1-Souches bactériennes :

L'effet antibactérien a été testé contre deux souches bactérienne de références internationales ATCC qui sont : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922. Pour une évaluation, la méthode de diffusion en puits a été utilisée de manière suivante :

a-Préparation de l'inoculum bactérien :

La préparation de l'inoculum s'est faite à partir d'une culture bactérienne de 18–24 heures, cultivée sur milieu gélosé et incubée à 37 °C, mettant quelques colonies bactériennes en suspension dans une solution saline (0,9 % de NaCl) afin d'avoir un inoculum d'une densité équivalente au standard Mc Farland 0,5 ou à une D.O de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.UFC.

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, soit de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort et enfin l'ensemencement doit se faire dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

b-L'ensemencement :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

c-Techniques de diffusion en milieu solide (Méthode des puits) :

Des puits de 08 mm de diamètre ont été forés dans les boites de pétri déjà ensemencées à l'aide de pipettes Pasteur dont le fond a été obturé par une goutte de gélose Mueller Hinton pour limiter la propagation des produits utilisés. Ensuite, 0.5 ml de chaque substance y a été versée.

L'action des traitements se manifeste par la formation d'une auréole d'inhibition autour du puits. L'activité antibactérienne des produits a été déterminée en mesurant, à l'aide d'une règle transparente, le diamètre des zones d'inhibition. Les résultats sont exprimés selon trois niveaux d'activité : résistant ($D < 5$ mm), intermédiaire ($11\text{mm} \geq D \geq 6$ mm) et sensible ($D > 12$ mm) (Couquet., 2013). Les témoins négatifs sont préparés dans des puits rempli de 0,5 ml d'eau distillée stérile.

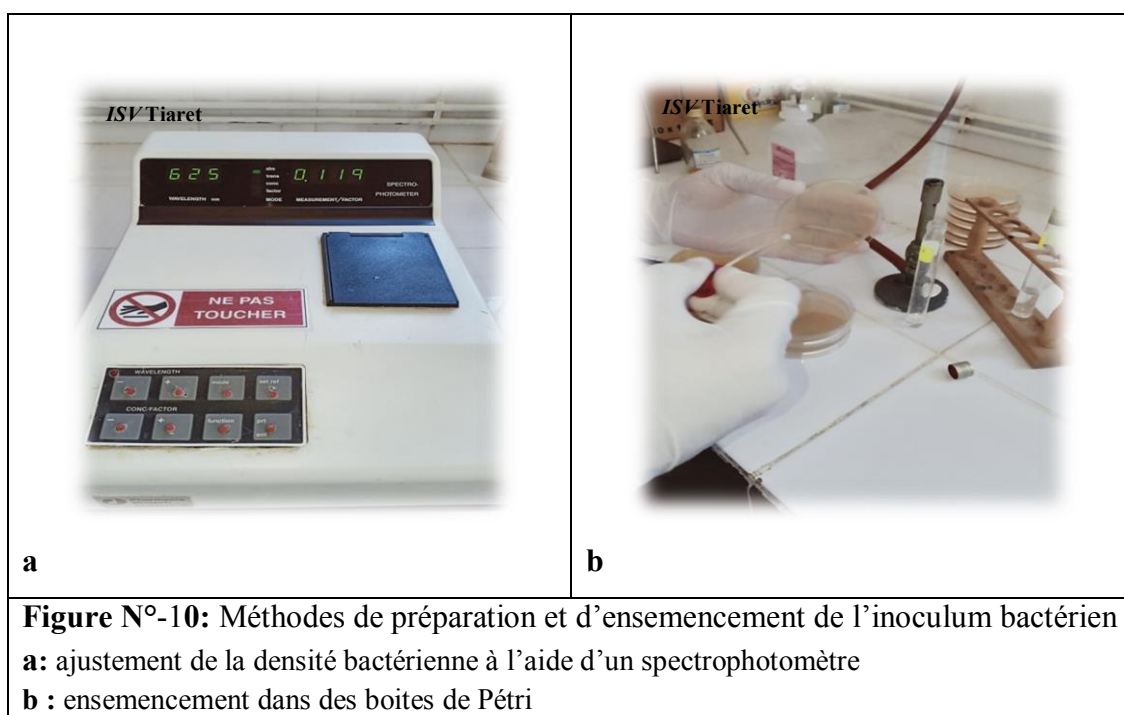


Figure N°-10: Méthodes de préparation et d'ensemencement de l'inoculum bactérien
a: ajustement de la densité bactérienne à l'aide d'un spectrophotomètre
b : ensemencement dans des boîtes de Pétri

Tous les tests ont été effectués en triple exemplaire avec les résultats exprimés sous forme de moyenne \pm écart-type. La comparaison statistique des résultats a été effectuée grâce au logiciel XLSTAT® d'Addinsoft version 2014, en utilisant le test t de Student. Le seuil de signification a été fixé à ($p < 0,05$).

I-5- Partie in-vivo :

I-5-1 Modèle expérimental animal :

Afin de tester les effets thérapeutiques de différentes formulations topiques sur les plaies diabétiques, plusieurs modèles expérimentaux d'animaux ont été développés par des chercheurs essentiellement chez les rats (**Tamara et al, 2017**), les souris (**Rabbani et al, 2017**) et les lapins (**Jianpu et al, 2010**) ; consistant à produire chez ces animaux des états comparables au diabète sucré chez l'homme.

D'après **Mir et Dazirannée (2009)** plusieurs études ont démontré que les lapins choisis possédant les caractéristiques d'un animal de laboratoire tels que :

- la taille ;
- la durée de vie ;
- le bon tempérament qui rend sa manipulation aisée ;
- le coût.

Ce qui nous a amené dans notre étude à choisir le lapin de race *cuniculus Oryctolagus* comme modèle animal pour l'induction du diabète expérimentalement et la création des plaies.

L'étude a été réalisée sur 72 lapins mâles de race néo-zélandaise (*Oryctolagus cuniculus*) afin d'éviter les variabilités inter-sexe, d'un âge compris entre 2 mois et demi et 5 mois, d'un poids moyen variant entre 1 et 2,5 kg provenant de l'élevage d'un doctorant qui mène une expérimentation sur la reproduction des lapins au niveau de la ferme expérimentale de l'université de Tiaret.

Tous les lapins ont reçu dès leurs arrivés un traitement antiparasitaire à base d'Ivermectine à raison de 0.4 mg/kg, et maintenus dans des conditions de stabulation contrôlées avec un cycle jour/nuit de 12 heures, une température constante de 25 °C.

Les lapins ont été mis dans des cages individuelles avec libre accès à l'eau et à une alimentation de 120 g/jour d'aliment (**Figure N°-11**).

Cet aliment est composé de : Luzerne, Maïs, et Tourteaux de Sodja.



Figure N°-11: les animaux utilisés dans notre étude

I-5-2-Protocole expérimental :**1-Induction du diabète :****A-Le produit utilisé :**

L'installation du diabète s'est faite d'une manière chimique par l'utilisation de monohydrate d'alloxane comme produit inducteur chez le lapin par son effet cytotoxique sélective des cellules Bêta des îlots de Langerhans du pancréas (**Etuk, 2010**).

b-Préparation du produit et d'induction du diabète :

La poudre de monohydrate d'alloxane (**Sigma Aldrich**) est diluée dans du sérum salé stérile pour l'obtention d'une concentration de 5% (W/V) (**Jianpu et al, 2010**). Puis une quantité du produit préparé est administrée immédiatement par voie intraveineuse au niveau de la veine marginale à l'aide d'un cathéter 22 G placé au paravent à raison de 100mg/kg. En raison de sa faible stabilité, de sa demi-vie relativement très courte (moins d'une minute) et de la nature acide de la solution, la voie d'administration intraveineuse est préférée (**Battell et al, 1999**).

L'alloxane est administré à des lapins à jeûn durant 16 heures, suivi d'injections sous-cutanée de 10 ml de sérum glucosé 5% (W/V) répétée trois fois à un intervalle de 4, 8 et 12h, en plus d'une solution d'eau contenant du glucose pendant une durée de deux jours afin d'éviter la mortalité due au choc hypoglycémique (**Jianpu et al, 2010**).

Trois jours après l'injection du produit diabétogène, des prélèvements sanguins ont été effectués afin de mesurer la glycémie au niveau du laboratoire de biochimie de l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret (Technique d'analyse de la glycémie voir **annexe I**). Les lapins qui ont un taux plasmatique de glucose supérieur à 180 mg/dl sont considérés comme diabétiques et inclus dans l'expérimentation tandis que ceux qui ne développent pas le diabète la réinjection d'une seconde dose d'alloxane est effectuée (**Huralikuppi, 1991**).

c-Suivi des lapins diabétiques :

Les complications de l'hyperglycémie chronique chez l'homme n'apparaissent qu'après plusieurs années ; alors que la courte durée de diabète des animaux expérimentaux induits par les produits chimiques limite considérablement les capacités de recherche dans ce domaine (**Jianpu et al., 2010**).

Nous avons tenté au cours de cette expérimentation de garder le lapin diabétique le plus longtemps possible en vie ; et cela pendant 16 semaines avant la réalisation des plaies. En effet la gestion à long terme des animaux diabétiques est coûteuse et techniquement très exigeante.

La glycémie est mesurée deux fois par semaine d'une façon directe durant une période de 16 semaines au moyen d'un glucomètre **ACCU-TCHECK**. Pour ce faire le sang est prélevé par piqure au niveau des capillaires des oreilles.

Selon **Jianpu et al., (2010)**, pour garder ces lapins diabétiques en vie durant une telle période, des injections régulières d'insuline (Novo Nordisk Production) ont été effectuées par voie sous cutané. Les doses d'insuline ont été ajustées par rapport au taux de glucose au niveau sanguin et du poids de l'animal de la manière suivante :

- Glycémie supérieure à 400 mg/dl recevant une dose de 1 U/kg ;
- glycémie entre 400 et 500 mg/dl recevant une dose de 2 U/kg ;
- glycémie entre 500–600 mg/dl recevant une dose de 3U/kg ;
- glycémie supérieure à 600 mg/dl recevant une dose de 4 U/kg.

2- Répartition des groupes :

Les soixante-douze lapins ont été répartis de façon aléatoire en deux groupes principaux de trente-six lapins, le premier formé d'animaux sains tandis que le second inclus des lapins induits par l'alloxane (diabétiques). Chacun de ces groupes est divisé en quatre sous-groupes de neuf lapins et au sein desquels les animaux ont été répartis de manière suivante :

- Trois lapins diabétiques et trois lapins non diabétiques dont les plaies ont été traitées par l'eau distillée (témoins négatif) ;
- Trois lapins diabétiques et trois lapins non diabétiques dont les plaies ont été traitées par la sulfadiazine argentique (témoins positifs) ;
- Trois lapins diabétiques et trois lapins non diabétiques dont les plaies ont été traitées par le gel à base de miel.

Pour le suivi histologique de la cicatrisation des plaies, les animaux des quatre sous-groupes seront sacrifiés respectivement à J7, à J14, à J21, à J28. Comme montre le tableau N°02.

Tableau N°02 : Répartition expérimentale des groupes d'animaux

Lapins non diabétiques (n=36)				
Groupe I	S/G 1 (n=9) sacrifice à js 7			
	S/G 2 (n=9) sacrifice à js 14	Sans traitement (n=3)	Traités par SDA (n=3)	Traités par GM (n=3)
	S/G 3 (n=9) sacrifice à js 21	(témoins négatifs)	(témoins positifs)	
	S/G 4 (n=9) sacrifice à js 28			
Lapins diabétiques (n=36)				
Groupe II	S/G 1 (n=9) sacrifice à js 7			
	S/G 2 (n=9) sacrifice à js 14	Sans traitement (n=3)	Traités par SDA (n=3)	Traités par GM (n=3)
	S/G 3 (n=9) sacrifice à js 21	(témoins négatifs)	(témoins positifs)	
	S/G 4 (n=9) sacrifice à js 28			

3-Model expérimental de la cicatrisation des plaies:

Les modèles expérimentaux de la cicatrisation des plaies, sont en développement depuis des décennies dans le but de la compréhension des processus de réparation tissulaire et l'essai de nouveaux protocoles thérapeutiques. Ces modèles sont généralement divisés en deux groupes : in vitro et in vivo (animal ou préclinique). Chacun ayant des avantages et des inconvénients (Stephens et al., 2013).

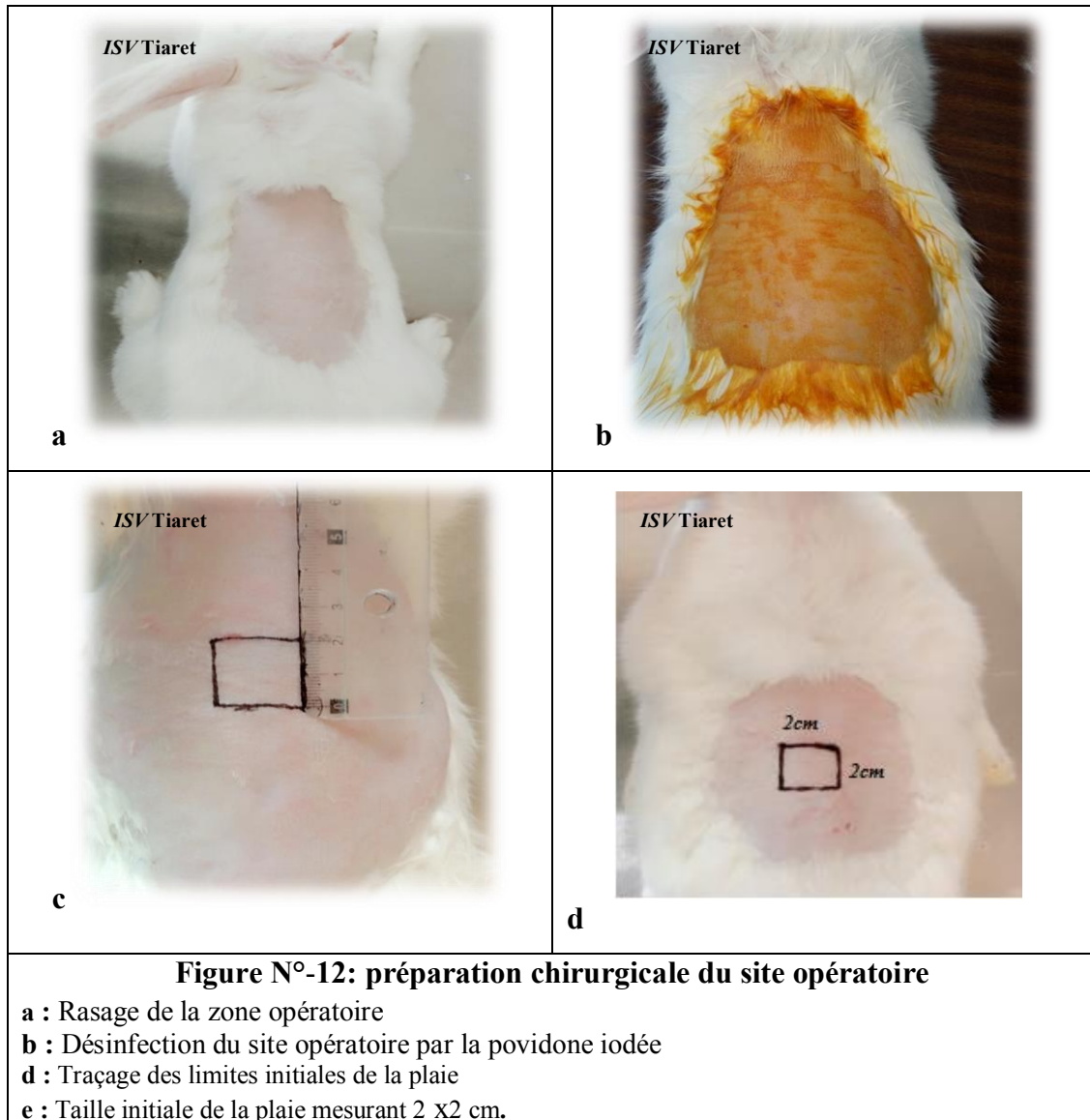
Les model in vitro, tels que les cultures cellulaires, le scratch et la culture des explants cutanés sont essentiels dans de nombreuses études, car d'importants résultats préliminaires conduiront à la conception d'enquêtes ultérieures. Alors que les modèles in vivo impliquent la création et le suivi de la cicatrisation des plaies chez les animaux de labos en tenant compte des modifications physiques, chimiques et biologiques de l'environnement de la plaie (Stephens et al., 2013 ; Nauta et al., 2013).

Différents types de plaies sont développés chez les animaux de labos afin d'étudier les processus cicatriciels aigus et chroniques. Parmi lesquelles : les plaies incisionnelles, les plaies excisionnelles et les brûlures (Diana et al., 2019).

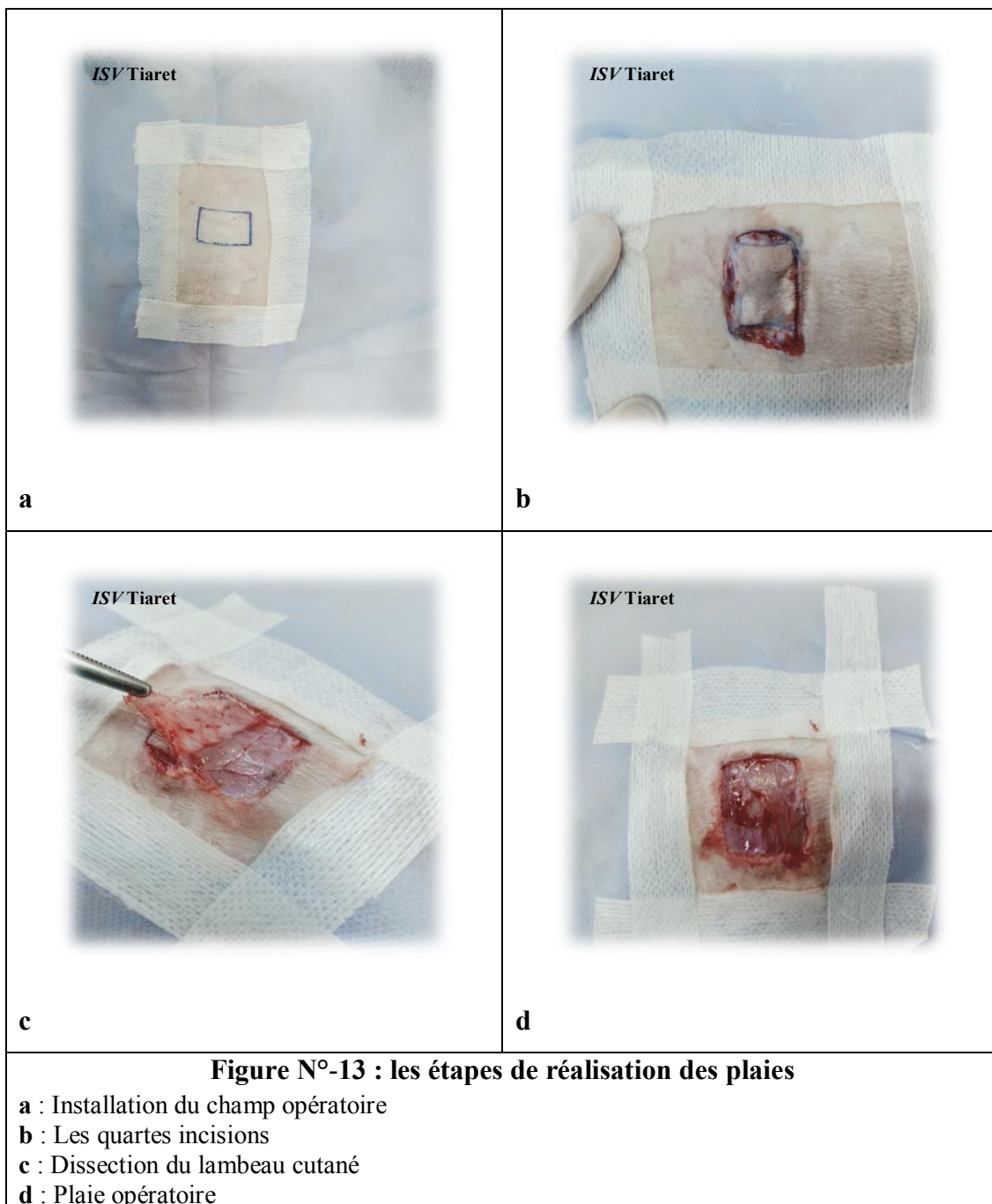
Dans notre expérimentation une plaie excisionnelle de pleine épaisseur, a été créée au niveau du dos de chaque animal en suivant le protocole suivant :

Une anesthésie générale est effectuée par l'utilisation d'une association de xylazine et de kétamine en injections intramusculaires à des doses de 5mg/kg et 50 mg/kg respectivement (Lemo et al., 2010).

Après élimination des poils par une tondeuse électrique, la peau du dos de l'animal est préparée d'une façon chirurgicale par l'utilisation de la povidone iodée. Puis avec un marqueur et une règle on délimite une plaie de forme carrée d'une superficie de 2 cmx 2cm (Figure N°-12).

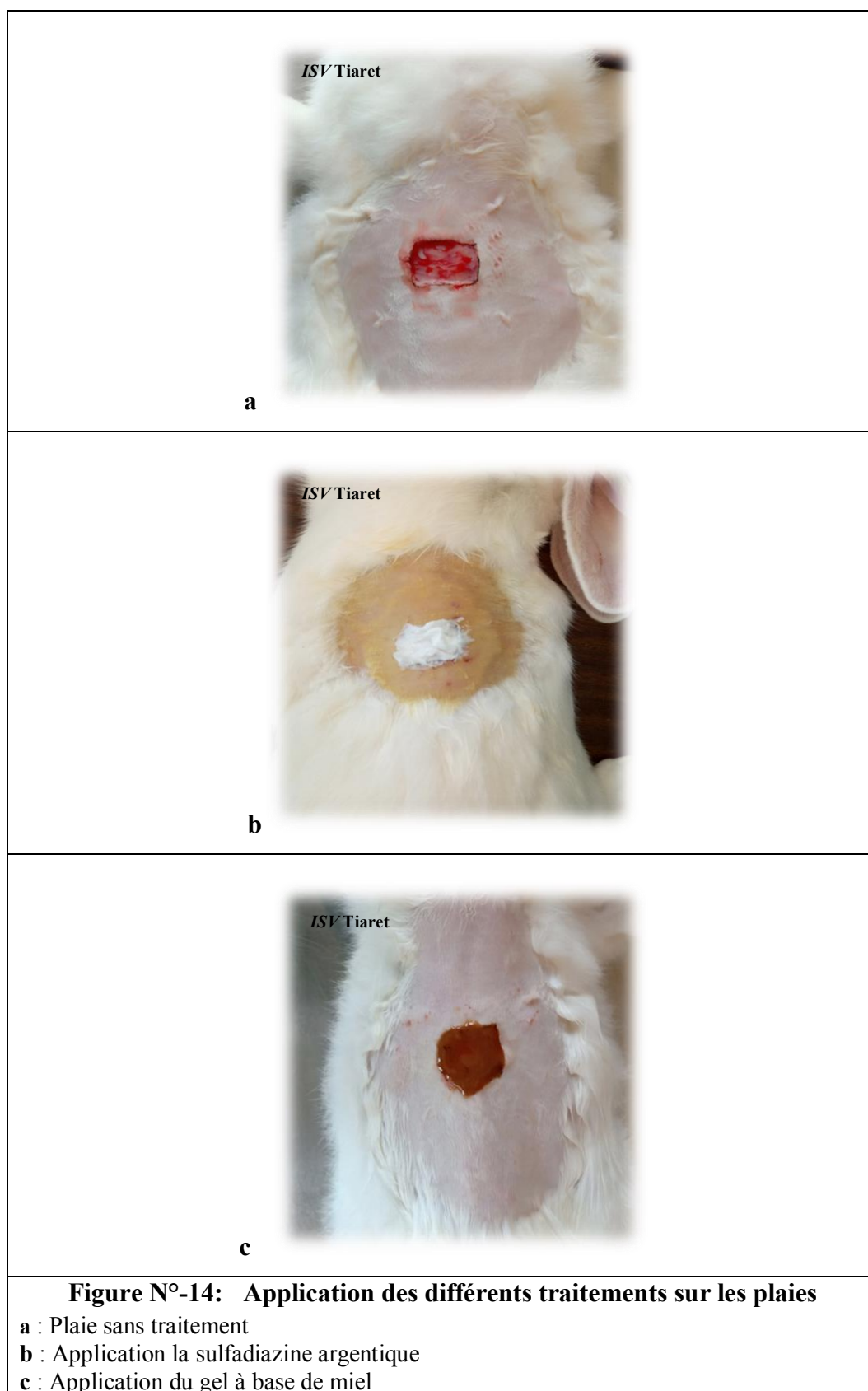


Une fois la préparation de l'animal achevée, le champ opératoire est installé (figure N°13-a). Lentement et méticuleusement, on excise le segment de peau de pleine épaisseur de façon suivante : Quatre incisions franches et suffisamment profondes pour enlever toutes les couches de la peau sont réalisées au moyen de la pointe d'une lame de bistouri N : 11 suivant les traits délimités par le marqueur comme guide (figure N°13-b). Et afin d'ôter le lambeau cutané une dissection pratiquée par l'utilisation d'une pince à préhension et un ciseau à section pointue (figure N°13-c).

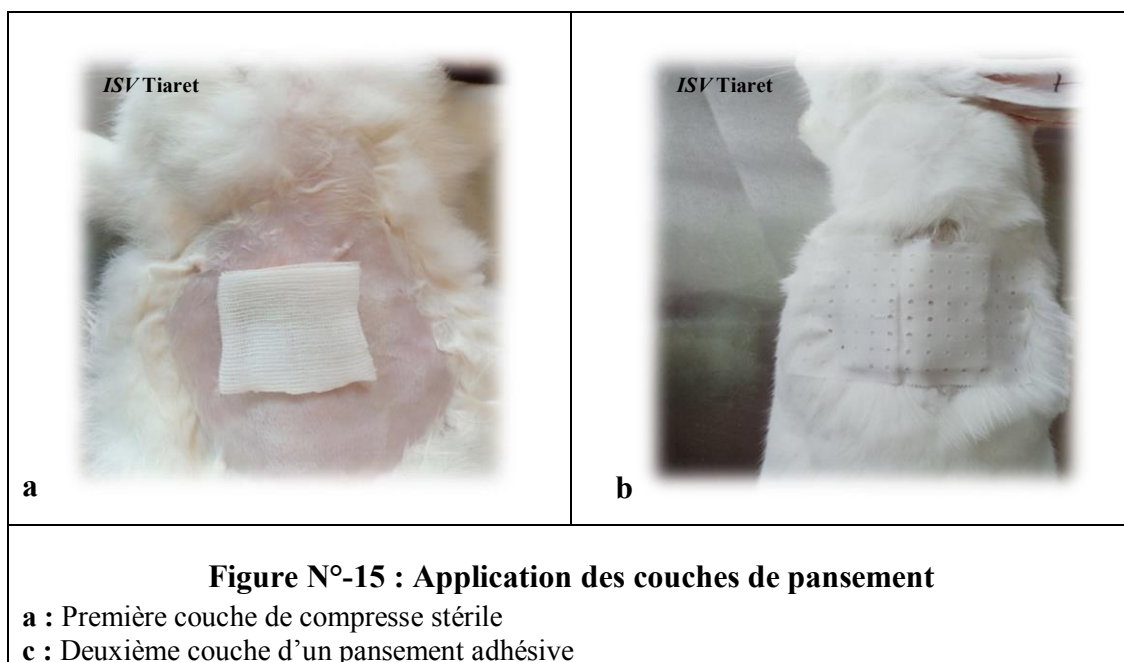


4-Suivi des plaies et modes d'application des différents traitements :

Les plaies des animaux du groupe (**SDA**) subissent une application d'une couche de 2 ou 3 mm de sulfadiazine argentique à 1%, tandis que pour celles du groupe (**GM**), le gel à base de miel est versé d'une façon homogène sur la plaie (1ml/1cm²) préalablement nettoyée à l'eau physiologique stérile. Celles du groupe témoin négatif ne subissent aucun traitement (**Figure N°-14**).



Ensuite les plaies sont recouvertes de compresses sèches et stériles et un pansement semi-imperméable est mis en place pour les protéger contre toute contamination extérieure (Figure N°-15).



Le pansement est renouvelé toutes les 24 heures, Au cours de chaque changement du pansement, une évaluation macroscopique et des photos de la plaie, sont réalisées jusqu'à l'achèvement de la cicatrisation tout en respectant les règles d'asepsie pour éviter d'éventuelles contaminations.

Aucun antibiotique n'est utilisé par voie parentérale afin d'éviter toute influence de ce dernier sur les résultats escompés.

5-Paramètres macroscopiques d'évaluation des plaies :

Une évaluation macroscopique semi-quantitative de la plaie est réalisée durant les deux premières semaines dans l'ordre des jours suivants : à J2, à J4, à J7, à J9, à J11, et à J14, en se basant sur des scores de 0-3 pour la présence d'exsudats, changement de couleur, état d'hydratation et l'odeur de la plaie.

Un score de 3 est concédé comme excellent, donnés aux conditions idéales désirées pour la cicatrisation d'une plaie (sèche, non odorante, non exsudative, et sans changement de couleur), tandis que, 0 représente le score mauvais, 1 représente le score faible et 2 représente le score modéré (Ahmad et Kok, 2003).

Le pansement est examiné en termes de flexibilité, d'accumulation des fluides et de la facilité de son retrait, en utilisant un score de 0-3. Une note maximale de 3 est attribuée aux propriétés préférées d'un pansement idéal (Flexible, retrait aisé sans arrachement des tissus nouvellement formés au niveau du lit de la plaie et n'accumulant pas de fluides (**Ahmad et Kok, 2003**). Le tableau N°-03 : Indique les paramètres d'évaluation étudiés et leurs scores.

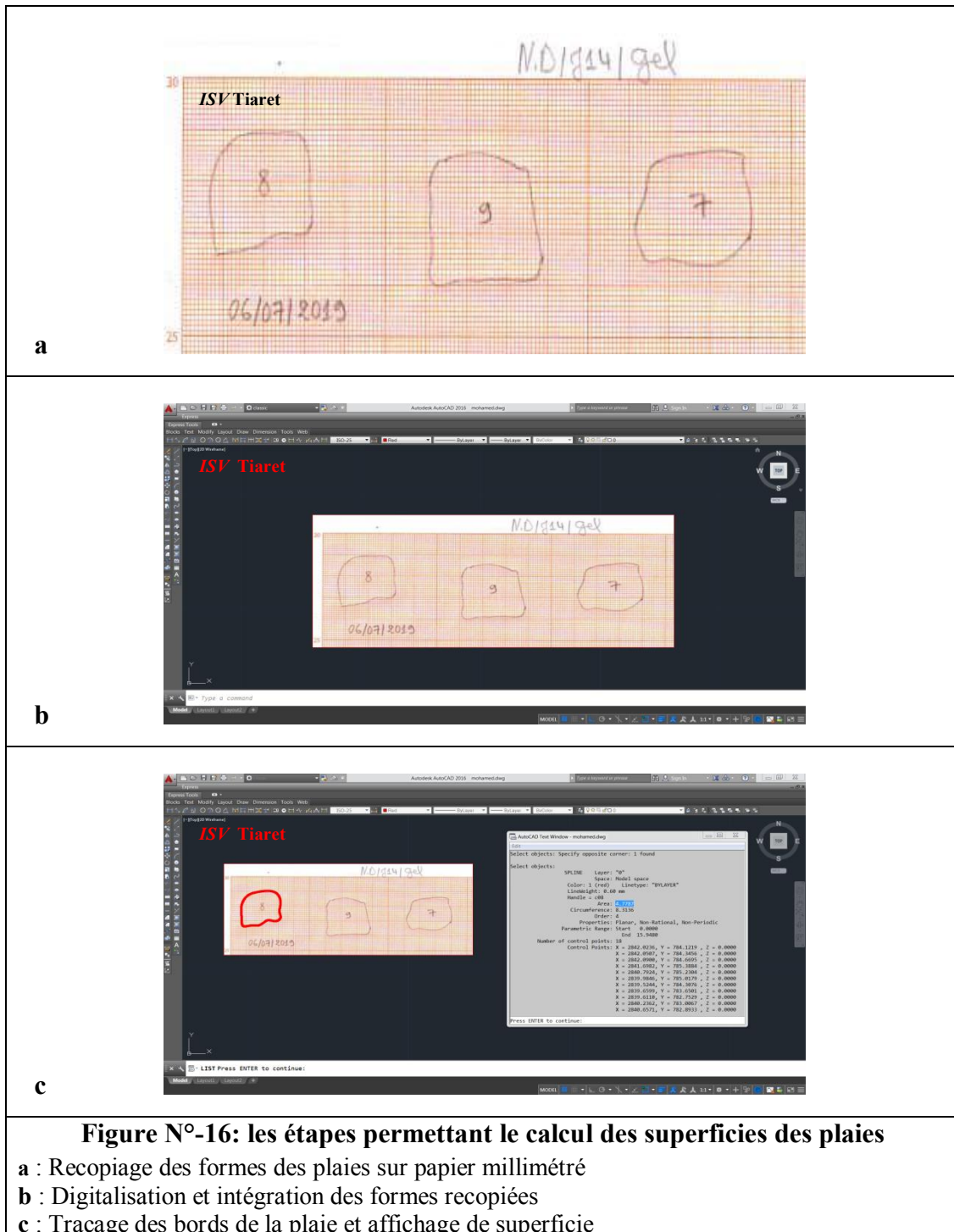
Tableau N°-03 : critères macroscopiques d'évaluation des plaies et du pansement

	Grades			
	0	1	2	3
Evaluation de la plaie				
Presence d'exudats	Exudative			Non exudative
Changement de couleur	Normal			noir
Etat d'hydratation de la plaie	humide			Sèche
Odeur de la plaie	Forte odeur			inodore
Evaluation du pansement				
Retrait du pansement	Difficile			facile
Accumulation des fluides	Oui			Non
Flexibilité	Non Flexible			Flexible

Une planimétrie des plaies est pratiquée du début de la création des lésions jusqu'à la réparation totale ; durant les jours suivants : à J4, à J7, à J9, à J11, à J14, à J17, à J21, à J25, à J28, afin de calculer le pourcentage de contraction des plaies.

La superficie des plaies est mesurée par traçage du périmètre lésionnel sur un papier d'acétate transparent à l'aide d'un crayon à pointe fine ; puis on le recopie sur du papier millimétré (**Martin et al., 2011**).

Pour apporter plus de précision dans le calcul des superficies des plaies et afin d'éviter les erreurs de comptage des carrés divisés en demi, tiers et en quart dus au passage de la ligne de traçage cités par **Martin et al. (2011)**. On a procédé à la digitalisation des circonférences dessinées par un logiciel **AUTOCAD** selon (**Amorim et al, 2006 ; Sumara et al, 2011**) comme le montre la **Figure N°-16**.



Le pourcentage de réduction des plaies durant le temps est calculé en utilisant la formule suivante selon **Subalakshmi et al, 2014**:

$$\text{Pourcentage de contraction de la plaie} = \left[\frac{(\text{taille initiale de la plaie} - \text{taille de la plaie du jour spécifique})}{\text{taille initiale de la plaie}} \right] \times 100.$$

6- Paramètres microscopiques d'évaluation des plaies :

L'étude histologique s'est déroulée au sein du laboratoire d'histopathologie de l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret.

Une fois le suivi macroscopique terminé, une évaluation histologique du déroulement de la cicatrisation à J7, à J14, à J21 et à J28 a été effectuée. Après sacrifice des lapins, la lésion et la peau saine environnante ont été prélevés à l'aide d'une lame de bistouri N : 23. Une fois coupés, les prélèvements sont mis immédiatement dans des pots contenant du formol à 10% pour les fixer.

Une fois rassemblés, les prélèvements de la totalité des différents groupes sont acheminés vers le laboratoire d'histopathologie sus-cité où sera réalisée la préparation des lames histologiques.

6-1- Préparation des lames histologiques :

Pour l'étude histologique nous avons opté pour la technique dite standard utilisée en routine dans le laboratoire d'histopathologie de l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret qui requiert les étapes suivantes:

a-Fixation et inclusion:

Cette étape a pour but de préserver la morphologie cellulaire et tissulaire afin de garder l'échantillon dans un état aussi proche que possible de l'état *in vivo* tout en renforçant la consistance du tissu.

Afin d'obtenir des pièces de petites tailles, les prélèvements initiaux ont été recoupés de façon à prendre le centre et la périphérie de la plaie en plus de la peau saine péri-lésionnelle puis placés dans des cassettes histologiques identifiées avant d'être plongées dans un récipient contenant le fixateur. Ces cassettes ont ensuite été mises dans un panier de l'appareil automate de circulation (**Figure N°-17/a**) contenant 12 cuves, qui a permis la réalisation des étapes suivant :

b-La déshydratation :

Les prélèvements ont été déshydratés par des passages successifs dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 80%, 95%, 100%) dans le but d'éliminer l'eau présente dans les tissus pour les préparer à l'inclusion.

c-La clarification :

L'objectif de cette étape est l'élimination de toute trace de déshydratant et son remplacement par une substance miscible avec la paraffine. Pour ce faire deux passages dans des bains de xylène ont été effectués.

d-L'inclusion : « dite imprégnation ».

C'est le dernier passage des cassettes dans l'automate. Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. C'est une immersion dans deux bains de paraffine fondue chauffée à une température de 56 °C (concernant la durée de chaque passage Voir annexe II).

e-L'enrobage :

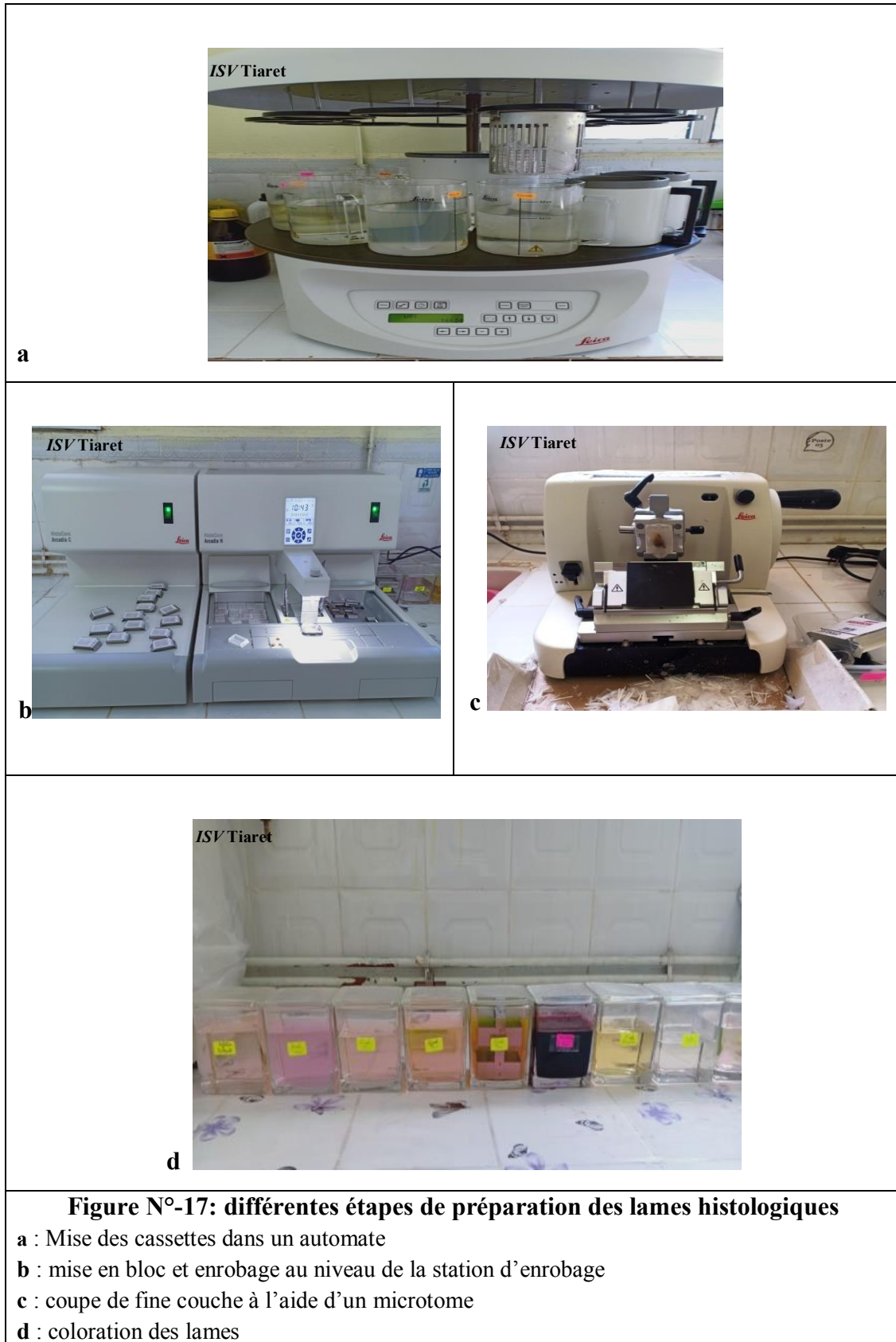
Cette étape est réalisée à l'aide d'un appareil spécial appelé station d'enrobage (**Figure N°-17/b**) afin d'effectuer manuellement le montage final et le durcissement des blocs. On coule la paraffine chauffée à 56 °C dans des moules en inox qui contiennent les spécimens bien orientés, puis on les déplace vers une surface refroidissante permettant la solidification finale du bloc de paraffine qui sera démoulé pour être placé au microtome afin de réaliser des coupes fines d'une épaisseur de 5 µm sous forme d'un ruban (**Figure N°-17/c**).

f-Confection et coloration des lames :

Ces rubans sont posés à la surface de l'eau d'un bain marie à une température de 50°C afin de les aplanir et d'en éliminer la paraffine, puis à l'aide d'une lame les coupes sont sorties du bain puis sont asséchées dans une étuve à une température de 37 °C durant 24 h. En dernier on procède à la coloration de manière standard à l'Hémalun-Eosine, puis au montage des lames, qui consiste à fixer une lamelle sur la lame à l'aide du baume de Canada (**Figure N°-17/d**).

Etapes de coloration (**voir annexe III**).

Les coupes obtenues ont été observées à l'aide d'un microscope optique (Zeiss-Axioskop20, Zeiss, GmbH, Allemagne) et photographiées au moyen d'un appareil photo numérique intégré.



6-2- Lecture de lames :

L'évaluation microscopique des lames s'est réalisée selon les critères d'évaluations histopathologiques du processus cicatriciel des plaies induites chirurgicalement chez le lapin établis par **Sagliyan et al(2012)** qui sont : la ré-épithélialisation, le tissu de granulation, l'accumulation du collagène, les cellules inflammatoires, l'angiogénèse et en fin l'ulcère. Des scores de 0-3 ont été attribués commel'indique le tableau N°-04:

Tableau N°-04 : scores des critères d'évaluation histopathologique du processus cicatriciel des plaies induites chirurgicalement chez le lapin (**Sagliyan et al, 2012**).

Processus histologique	score
Ré-épithélialisation	
Absence	0
Partielle	1
Complète avec un épithélium immature	2
Complète avec épithélium mature	3
Tissu de granulation	
Absent ou immature	0
Quantité faible	1
Degré modéré de maturation	2
Mature	3
Accumulation du collagène	
Absence	0
Quantité légère	1
Modéré	2
Quantité importante	3
Cellules inflammatoires	
Absence	3
Quantité légère	2
Modéré	1
Quantité importante	0
Angiogénèse	
Absence	0
Inférieur à 5	1
Entre 6-10	2
Plus de 10	3
Ulcère	
Large ou profond, abcès	0
large	1
petit	2
Absence	3

Etude statistique :

Les résultats de toutes les analyses (évaluation physique de la plaie et du pansement, morphométrique, histologique) sont exprimés sous forme de moyenne \pm écart-type. La comparaison statistique des résultats a été effectuée grâce au logiciel XLSTAT® d'Addinsoft version 2014 et un seuil de signification a été fixé à ($p < 0,05$).

Pour la comparaison des expansions des plaies entre les différents groupes, le test t-Student a été utilisé.

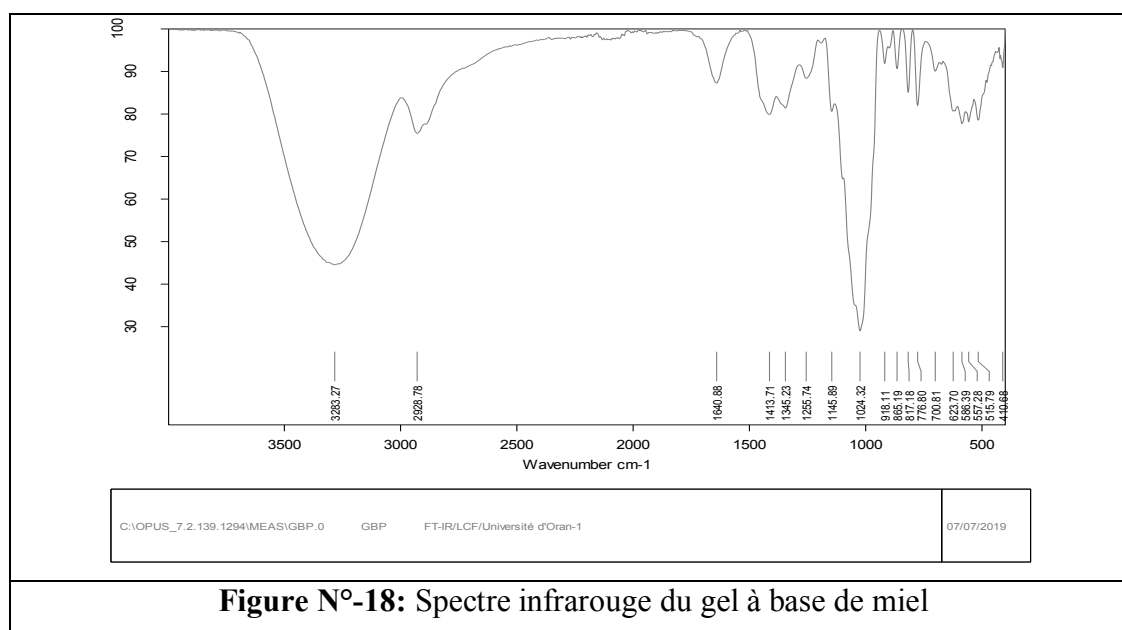
De même que pour la comparaison des taux de contraction entre les différents groupes le test F (ANOVA) one-way suivi du test Post-Hoc de Tukey a été utilisé. Enfin le test de Kruskal-Wallis *post-hoc* Dunnett a été utilisé pour l'étude histopathologique et l'évaluation physique de la plaie et du pansement pour la comparaison entre les différents groupes.

Chapitre V

Résultats

I-Partie in-vitro :

I-1- Résultats de la caractérisation par FTIR :



Les spectres FTIR de gel sont présentés dans la **Figure N°-18** tandis que l'interprétation de chaque pic est donnée dans l'**annexe IV**. Comme le montre la Figure N°-16, la présence d'une bande d'absorption à environ 3300-3400, ~ 2900, ~ 1150 et 1000-1100 cm^{-1} dans les trois spectres a indiqué que le gel possède un groupe fonctionnel OH, CH, COC et CO, respectivement. De plus, la vibration caractéristique de l'anneau C-O-C sur le gel conduit à un pic d'absorbance à environ 700-900 cm^{-1} .

I-2- Résultats de l'effet antimicrobien :

Les résultats de l'évaluation antibactérienne du gel à base de miel et de la sulfadiazine argentique sont repris ci-dessous (**Tableau N°-05**). Dans ces deux tableaux sont incluses les valeurs en (mm) des diamètres d'inhibitions, représentant la grandeur du halo formé par les microorganismes détruits ainsi que les moyennes de ces diamètres.

Tableau N°-05 : les diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne en fonctions des différents traitements

Souches Essais	Détermination de la zone d'inhibition du gel à base de miel (Ø en mm)		Détermination de la zone d'inhibition de la sulfadiazine argentique (Ø en mm)		Détermination de la zone d'inhibition chez le témoin (Ø en mm)	
	<i>Escherichia coli</i> 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	<i>Escherichia coli</i> 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	<i>Escherichia coli</i> 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> 25923
E1	20,7	20,8	10,1	8,0	-	-
E2	20,6	20,7	10,1	9,0	-	-
E3	30,1	30,0	10,0	9,0	-	-
E4	20,4	20,9	7,0	7,0	-	-

(-): indique absence

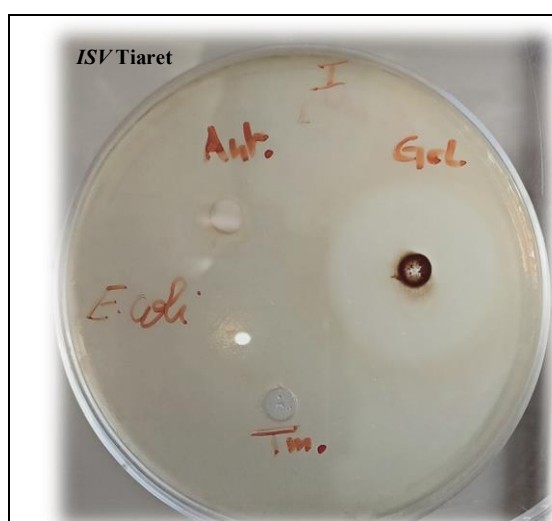


Figure N°-19 : résultats de l'effet antibactérien des deux produits contre *Escherichia coli*



Figure N°-20 : résultats de l'effet antibactérien des deux produits contre *Staphylococcus aureus*

Tableau N°-06 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibitions du gel à base de miel et de la sulfadiazine contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Moye ± Ecart	22,95± 4,76**	9,30 ±1,53	23,10 ±4,60**	8,25 ±0,95
Valeur P	P = 0,002		P = 0,001	

** : p < 0.001

L'analyse des résultats des tableaux montre que les zones d'inhibition sont plus prononcées pour le gel à base de miel que dans la sulfadiazine argentique. En fonction du diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne, les différentes bactéries ont été classées : "sensibles" si la zone d'inhibition est supérieure à 12 mm, "modérément sensibles" si elle est comprise entre 6 et 11 mm, "résistantes" si elle est inférieure à 5 mm (Couquet et al, 2013).

Ces résultats indiquent que notre gel à base de miel a une action inhibitrice modérée (sensible) contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* dont les moyennes de diamètre d'inhibition sont respectivement $22,95 \pm 4,76$ et $23,10 \pm 4,60$ par contre on note une légère activité (intermédiaire) antibactérienne de la sulfadiazine argentique contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* dont les moyennes de diamètre d'inhibition sont respectivement $9,30 \pm 1,53$ et $8,25 \pm 0,95$.

Lorsqu'on compare l'effet antimicrobien de nos deux produits, on note statistiquement une différence significative entre le gel à base de miel et la sulfadiazine argentique contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ($P = 0,002$).

II-Partie in-vivo :

II-1- Résultats de l'induction du diabète :

II-1-1-Comportement et symptômes cliniques :

On a constaté une apathie et une léthargie quelques heures après injection du produit diabétogène par rapport au groupe témoin.

La consommation globale d'eau et d'aliment durant la période de suivi de 16 semaines élevée chez les lapins diabétiques par rapport au groupe témoin.

II-1-2- Evolution de la glycémie :

Aucune différence significative ($p > 0,05$) n'est relevée en comparant la moyenne de la glycémie du groupe non diabétique $1,23 \pm 0,24$ g/dl à celle du groupe prévu pour l'induction du diabète $1,31 \pm 0,27$ g/dl.

Après injection d'alloxane la glycémie du groupe induit a connu une augmentation très hautement significative ($p < 0,0001$) car elle est passée de $1,31 \pm 0,27$ g/dl à $3,96 \pm 1,66$ g/dl.

a-Suivi de la glycémie durant le temps :

la figure N°-21 montre l'évolution comparative de la glycémie en g/dl des deux groupes de lapins avant et après induction du diabète. On remarque une installation d'une hyperglycémie chronique fluctuante au cours des seize semaines de suivi.

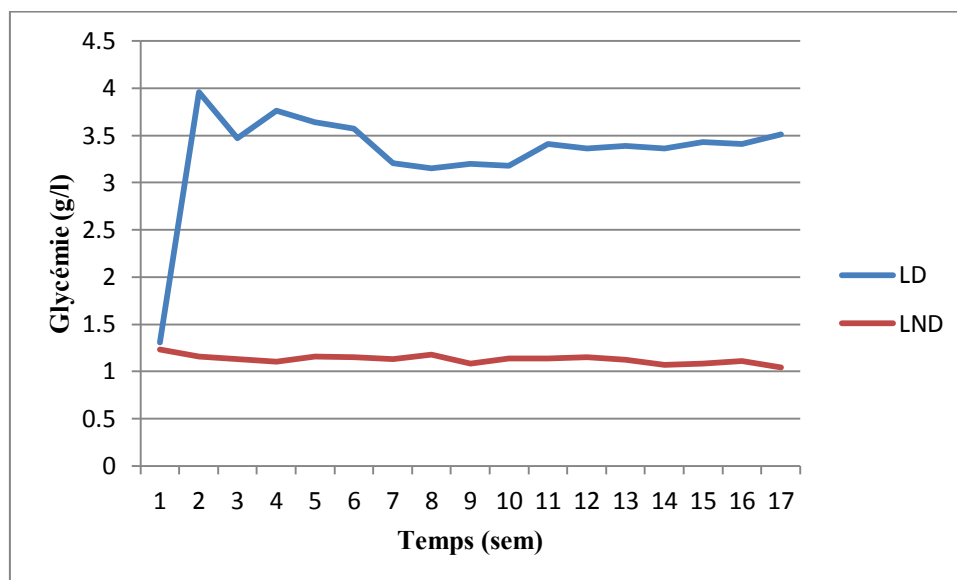


Figure N°-21 : évolution de la glycémie par rapport au temps chez les lapins diabétiques et non diabétiques.

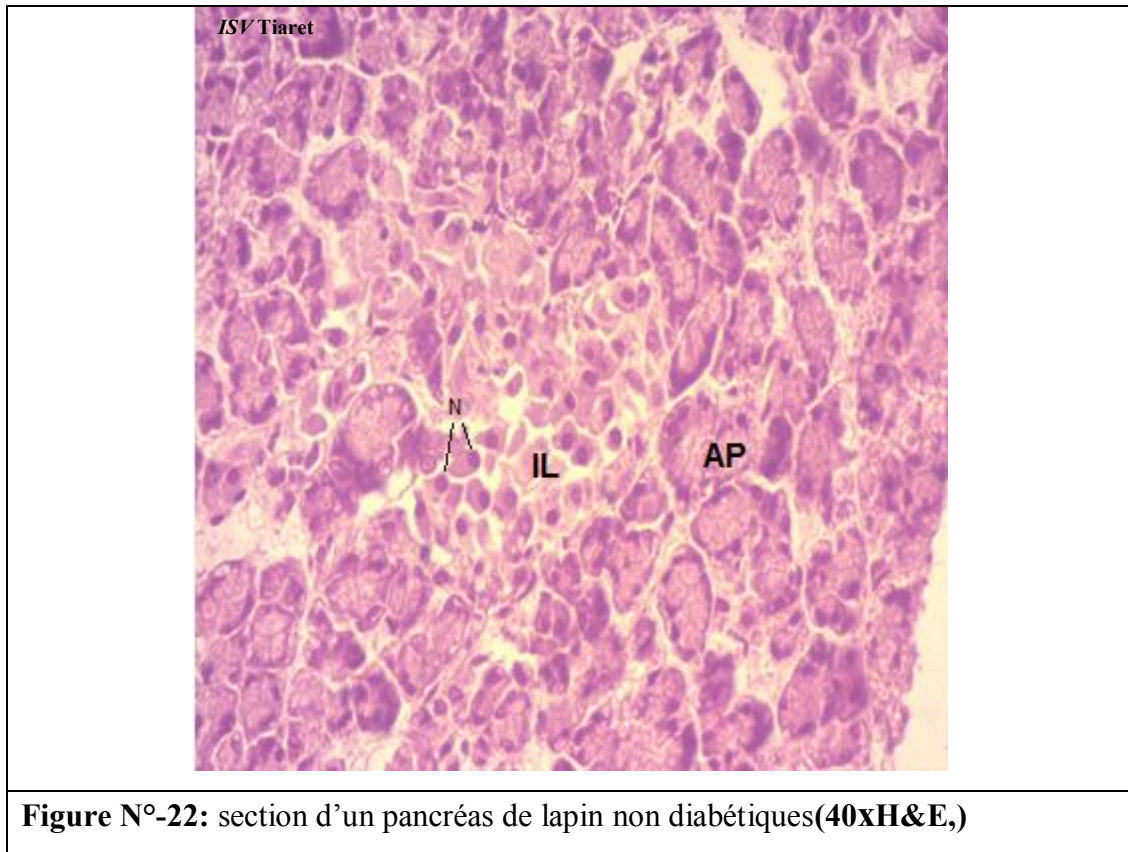
b-Résultats histologiques :

La structure du pancréas des lapins non diabétiques et des lapins induit par l'alloxane est présentée par les Figure N°-22 et Figure N°-23 respectivement.

La Figure N°-22 représente un aspect général normal du pancréas d'un lapin non diabétique montrant un îlot de Langerhans (IL) au sein d'un tissu acineux compact disposé en lobules séparés par du tissu conjonctif. L'îlot de Langerhans présente un nombre normal de noyaux (N) de cellules et uniformément répartis et espacés les uns des autres par des cytoplasmes et des bordures de cellules indistinctes, homogènes et amorphes ; les noyaux cellulaires étaient ronds et de taille moyenne. De plus les acini pancréatiques (AP) présentaient un aspect histologique normal et des espaces inter-acini normaux.

En ce qui concerne le pancréas des lapins diabétiques la figure N°-23 montre un îlot de Langerhans avec peu de cellules endocrines d'une distribution hétérogène et des noyaux cellulaires ronds et ovales dispersés avec une taille importante d'aspect clair et vacuolaire (Figure N°-23/a-b).

Tandis que l'acini pancréatique présente une infiltration cellulaire au niveau des septa interlobulaire (**Figure N°-23/d-e**) avec une réaction inflammatoire chronique (**Figure N°-23/c**).



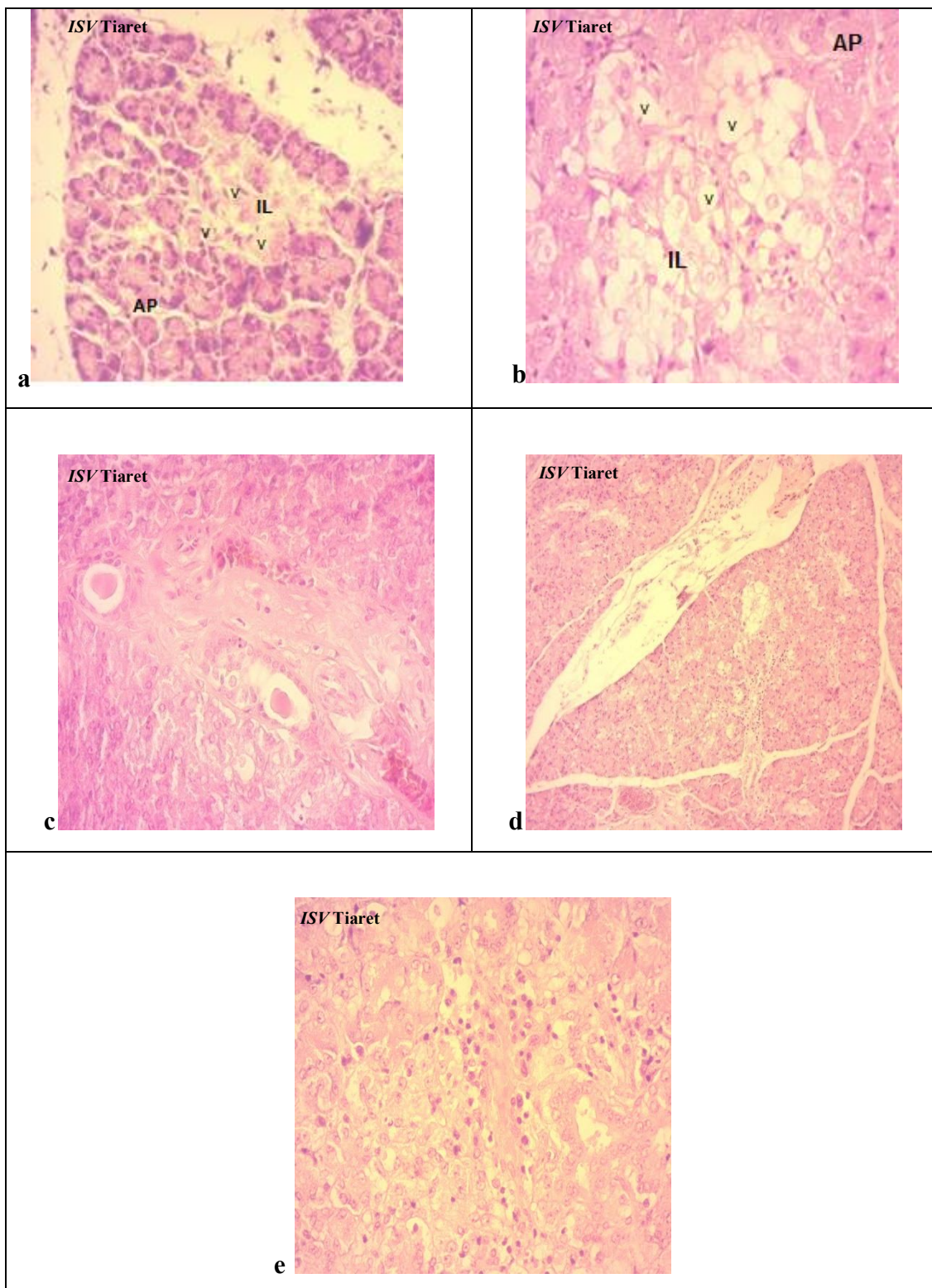


Figure N°-23 : Sections du pancréas d'un lapin diabétique

- a** : des vacuoles au niveau du cytoplasme des cellules de l'îlot de Langerhans (10xH&E)
- b** : des vacuoles au niveau du cytoplasme des cellules de l'îlot de Langerhans (40xH&E)
- c** : réaction inflammatoire chronique (40xH&E)
- d** : infiltration cellulaire dans les septa inter-lobulaire (10xH&E)
- e** : infiltration cellulaire (40xH&E)

II-2- Résultats macroscopiques des plaies :

Aucune complication n'est observée durant le déroulement de l'acte chirurgicale ni d'ordre anesthésique, ni d'ordre technique ainsi qu'aucun cas de mortalité n'a été constaté au cours du déroulement du processus cicatriciel avant le sacrifice des lapins.

II-2-1-Evaluation semi-qualitative :

1-Evaluation physique des plaies et du pansement chez les lapins diabétiques et non diabétiques.

L'évaluation physique de la plaie est réalisée durant les deux premières semaines, en se basant sur la présence d'exsudats, changement de couleur, état d'hydratation et l'odeur de la plaie ; les moyennes des scores d'évaluation des plaies non diabétiques et diabétiques sont représentées dans **Tableau N°-07**.

a- Exsudats :

L'évolution de la **quantité d'exsudats** des plaies des lapins non diabétiques contrôles et traitées montre que :

- durant les quatre premiers jours de suivi aucune différence significative n'a été relevée statistiquement ($p > 0.05$), par contre à **j7** une différence très hautement significative ($p < 0,001$) a été constatée entre les plaies traitées par le gel à base de miel et celles suivies par la sulfadiazine argentique, elle est faible à modérée pour les premières est presque absente au niveau des secondes.

- De **J 9 à J 14**, les résultats montrent que la quantité d'exsudats est faible pour les plaies suivies par le gel et non exsudatives pour les autres. Néanmoins une différence significative ($p < 0, 05$) a été constatée entre les plaies suivies par notre formule versus celles témoins et celles suivies par la sulfadiazine argentique à **J 11**.

L'évolution de la **quantité d'exsudats** des plaies des lapins diabétiques contrôles et traitées montre que :

Durant la période de suivi, les plaies traitées par le gel à base de miel par rapport aux plaies témoins montrent une différence hautement significative ($p < 0, 01$) uniquement à j4 et à j7 ; en outre une différence très hautement significative ($p < 0, 001$) et significative ($p < 0,$

05) a été remarquée à **j2, j4, j7** et à **j11, j14** respectivement ; comparativement aux plaies suivies par la sulfadiazine argentique.

Concernant les lapins diabétiques, la quantité d'exsudat présente au niveau des plaies contrôles est modérée durant les deux premiers jours d'évaluation puis elle devient faible du **4^{ème}** au **14^{ème}** jours d'évaluation. Par contre au niveau des plaies traitées par la sulfadiazine argentique le **Tableau N°-07** montre qu'elle est faible tout au long de la période d'évaluation sauf à **J 4** où elle devient modérée.

Enfin pour les plaies traitées par le gel à base de miel, du **2^{ème}** au **4^{ème}** jour ces plaies sont modérément exsudatives puis deviennent faiblement exsudatives tout au cours du reste du temps de suivi avec une différence hautement significative (**p < 0, 01**) à **j2**, à **j4**, à **j7** et significative (**p < 0, 05**) à **j11, j14** en comparaison avec les plaies suivies par la sulfadiazine argentique, ainsi on constate qu'il y a une différence hautement significative (**p < 0, 01**) à **j4** et à **j7** comparativement aux plaies témoins.

b- Hydratation :

Pour l'hydratation des plaies des lapins non diabétiques on constate qu'elle est faible au début puis elle devient complètement sèche durant la **2^{ème}** semaine de suivi sans aucune différence significative (**p >0.05**) excepté **j7** où l'on a remarqué une différence hautement significative (**p < 0, 01**) entre les plaies traitées par notre formule et celles témoins. Par contre elle est très significative hautement (**p < 0, 001**) comparativement à celles suivis par le traitement conventionnel.

On a également noté une différence hautement significative (**p < 0, 01**) entre les plaies sans traitement et celles traitées à la sulfadiazine argentique.

A propos des plaies diabétiques, on observe que:

- Durant la première semaine de suivi une différence hautement significative (**p < 0, 01**) a été enregistrée à **j4** et à **j7** entre les plaies traitées par le gel à base de miel et celles témoins.
 - Durant cette même période la comparaison des plaies traitées par le gel à base de miel à celles traitées par le produit conventionnel montre une différence hautement significative (**p < 0, 01**) à **j2** et à **j4** et significative (**p < 0, 05**) à **j7** à l'inverse aucune différence significative (**p >0.05**) n'a été relevée entre les différentes plaies pour le reste du temps de suivi.

c- La couleur :

Pour **la couleur** des plaies ; aucune différence significative ($p > 0.05$) n'a été notée entre les différents groupes, à part à j7 où on a enregistré une différence hautement significative ($p < 0,01$) entre les plaies témoins nondiabétiques et celles non diabétiques traitées par la sulfadiazine argentique, le même résultat est mentionné entre les plaies diabétiques suivies par le gel à base de miel et celles diabétiques sans traitement (**Tableau N°-07**).

d- L'odeur :

Les plaies des lapins diabétiques et non diabétiques gérées par le gel à base de miel sont inodores durant toute la période de suivi.

Des différences significatives ($p < 0,05$) à très hautement significatives ($p < 0,001$) ont été enregistrées entre les plaies non diabétiques traitées par le gel à base de miel et celles suivies par la sulfadiazine argentique de à **J2** à **J11** et une différence hautement significative ($p < 0,01$) uniquement à **j2** comparativement aux plaies témoins.

En ce qui concerne les plaies des lapins diabétiques une différence significative ($p < 0,05$) à très hautement significative ($p < 0,001$) a été rapporté entre ses dernières et celles des autres groupes durant la première semaine, comme montre le **Tableau N°-07**.

Tableau N°-07: Moyenne \pm écart-type des scores d'évaluation physique des plaies non diabétiques et des plaies diabétiques contrôlées et celles suivies par les différents traitements en fonction du temps.

Conditions de la plaie	SCORES (Moyenne \pm écart-type)					
	a 2 jours	4 jours	7 jours	9 jours	11 jours	14 jours
Exsudation						
LNDC	1,33 \pm 0,86	1,55 \pm 0,72	2,22 \pm 0,62	2,66 \pm 0,50	2,77 \pm 0,44 b*	2,77 \pm 0,44
LNSSAD	1,00 \pm 0,86	1,22 \pm 0,44	2,88 \pm 0,33 e***	2,11 \pm 0,92	2,66 \pm 0,77 e*	2,88 \pm 0,33
LNDSGM	0,55 \pm 0,52	1,77 \pm 0,97	1,66 \pm 0,50 e***	2,44 \pm 0,72	2,22 \pm 0,44 b*c*	2,66 \pm 0,50
LDC	1,88 \pm 0,33	2,44 \pm 0,52 e**	2,55 \pm 0,72 e**	2,44 \pm 0,52	2,33 \pm 0,86	2,22 \pm 0,83
LDSSAD	2,22 \pm 0,83 f**	2,44 \pm 0,88 f**	1,33 \pm 0,70 f**	2,55 \pm 0,52	2,77 \pm 0,44 f*	2,88 \pm 0,33 f*
LDSGM	1,22 \pm 0,44 f**	1,44 \pm 0,42 e**f**	2,44 \pm 0,72 e**f**	2,00 \pm 0,50	2,00 \pm 0,50 f*	2,22 \pm 0,44 f*
Hydratation						
LNDC	1,22 \pm 0,66	1,55 \pm 0,72	2,11 \pm 0,72 a**	2,66 \pm 0,70	2,66 \pm 0,50	2,77 \pm 0,44
LNSSAD	0,88 \pm 0,92	1,66 \pm 1,11	3,00 \pm 0,00 a** e***	2,66 \pm 0,70	2,55 \pm 0,72	2,88 \pm 0,33
LNDSGM	0,55 \pm 0,52	1,22 \pm 0,44	1,66 \pm 0,50 e***	2,33 \pm 0,70	2,11 \pm 0,33	2,55 \pm 0,72
LDC	1,77 \pm 0,66	2,44 \pm 0,52 e**	2,66 \pm 0,70 e**	2,44 \pm 0,52	2,55 \pm 0,72	2,77 \pm 0,44
LDSSAD	2,33 \pm 1,00 f**	2,44 \pm 0,72 f**	2,44 \pm 0,72 f*	2,55 \pm 0,72	2,66 \pm 0,70	2,88 \pm 0,33
LDSGM	1,11 \pm 0,60 f**	1,33 \pm 0,50 e**f**	1,55 \pm 0,52 e**f*	1,77 \pm 0,83	2,22 \pm 0,66	2,44 \pm 0,52
Couleur						
LNDC	0,33 \pm 0,50	0,55 \pm 0,72	1,00 \pm 0,70 b**	1,77 \pm 1,09	2,00 \pm 1,00	2,33 \pm 0,86
LNSSAD	0,66 \pm 0,86	1,22 \pm 0,66	1,66 \pm 0,50 b**	2,33 \pm 0,50	2,77 \pm 0,44	2,77 \pm 0,44
LNDSGM	0,44 \pm 0,52	1,11 \pm 0,33	1,88 \pm 0,33	2,33 \pm 0,50	2,44 \pm 0,52	2,55 \pm 0,52
LDC	0,66 \pm 0,70	1,22 \pm 0,44	1,33 \pm 0,50 e**	2,00 \pm 0,50	2,44 \pm 0,52	2,55 \pm 0,72
LDSSAD	1,00 \pm 0,86	1,22 \pm 0,66	1,66 \pm 0,70	2,33 \pm 0,86	2,88 \pm 0,33	2,88 \pm 0,33
LDSGM	1,11 \pm 0,78	1,55 \pm 0,52	2,33 \pm 0,50 e**	2,44 \pm 0,52	2,62 \pm 0,50	2,77 \pm 0,44
Odeur						
LNDC	2,88 \pm 0,33 a**	2,56 \pm 0,52	2,44 \pm 1,01	2,55 \pm 0,72	2,88 \pm 0,33	2,66 \pm 0,50
LNSSAD	2,33 \pm 0,50 a c**	2,00 \pm 0,70 e**	2,11 \pm 0,60 c**	2,00 \pm 1,00 e**	2,11 \pm 1,26 e*	2,55 \pm 0,88
LNDSGM	3,00 \pm 0,00 c**	3,00 \pm 0,00 e**	3,00 \pm 0,00 e**	3,00 \pm 0,00 c**	3,00 \pm 0,00 e*	3,00 \pm 0,00
LDC	2,77 \pm 0,44 d*	2,00 \pm 0,00 e***	2,11 \pm 0,33 e***	2,56 \pm 0,52	2,55 \pm 1,01	2,66 \pm 1,00
LDSSAD	2,22 \pm 0,44 d*f**	2,00 \pm 0,00 f***	2,11 \pm 0,33 f***	2,22 \pm 0,44 f**	2,44 \pm 0,72	2,66 \pm 0,70
LDSGM	3,00 \pm 0,00 f**	3,00 \pm 0,00 e***f***	3,00 \pm 0,00 e***f***	3,00 \pm 0,00 f**	2,88 \pm 0,33	3,00 \pm 0,00

N = 9; *, p < 0,05; significative. **, p < 0,01, hautement significative; ***, p < 0,001, très hautement significative. Test de Kruskal-Wallis *post-hoc* Dunn.

a : LNDC VS LNSSDA
b : LNDC VS LNDSGM
c : LNDSGM VS LNSSDA
d : LDC VS LDC
e : LDC VS LDC
f : LDSGM VS LDSSDA

2-Evaluation physique du pansement chez les lapins non diabétiques et diabétiques

Les pansements sont évalués en terme de flexibilité, d'accumulation des fluides et de facilité de retrait afin d'éviter l'endommagement des tissus de granulations ; le **Tableau N°-08** présente les résultats des scores d'évaluation de ces paramètres en fonction du temps.

a- Retrait du pansement :

On remarque qu'il est difficile pour les plaies contrôles et celles suivies par la sulfadiazine argentique par contre il est facile pour les plaies suivies par le gel à base de miel chez les lapins diabétiques et non diabétiques durant toute la période d'évaluation.

Statistiquement on observe une différence très hautement significative ($p < 0,001$) entre ces dernières et celles contrôles durant les deux semaines de suivi. Cependant elle est hautement significative ($p < 0,01$) comparativement à celles suivies par le produit conventionnel à **j4** et à **j14** concernant le groupe non diabétique.

Pour le groupe diabétique des différences de hautement ($p < 0,01$) à très hautement significatives ($p < 0,001$) comparativement aux plaies témoins et celles suivies par la SDA durant toute la période d'évaluation comme montre le **Tableau N°-08**.

b- Accumulation des fluides :

Les pansements des plaies contrôles diabétiques et non diabétiques sont presque secs durant les deux premières semaines de suivi par contre on voit que la quantité des fluides accumulés dans les pansements appliqués aux plaies traitées par le gel à base de miel est modérée durant les onze premiers jours de suivi puis devient faible à **j14** chez les lapins non diabétiques. Tandis que pour les lapins diabétiques au début elle est faible puis devient modérée de **J4** à **j14**.

En ce qui concerne la quantité des fluides accumulés dans les pansements utilisés pour les plaies non diabétiques traitées par la sulfadiazine argentique, on remarque qu'elle est faible à **j2**, à **j4**, à **j9** et à **j11** alors qu'à **j7** et à **j14** le pansement devient sec ; tandis qu'au niveau du groupe diabétique on constate que cette quantité est modérée à **j2** puis le pansement devient sec le reste de la période d'évaluation.

Statistiquement les plaies non diabétiques, gérées par le gel à base de miel relèvent une différence très hautement significative ($p < 0,001$) à **j4** et hautement significative ($p < 0,01$) à **j7** et **j14** et significative ($p < 0,05$) à **j11** comparativement à celles contrôles ; ainsi qu'une différence très hautement significative ($p < 0,001$) à **j7** vis-à-vis de celles suivies par la sulfadiazine argentique, par contre la comparaison de ces dernières avec celles contrôles ne présente aucune différence significative ($p > 0,05$).

A propos des plaies diabétiques, une différence très hautement significative ($p < 0,001$) à **j2** et à **j7** et hautement significative ($p < 0,01$) à **j4** apparaît entre les plaies contrôles et celles suivies par le gel à base de miel alors que pour le reste de la période d'évaluation aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été constatée.

Tandis que l'analyse statistique de ces derniers à l'égard de celles suivies par le produit conventionnel démontre qu'il y a une différence très hautement significative ($p < 0,001$) à **j4** et hautement significative ($p < 0,01$) à **j2**, **j7** et **j11** et significative ($p < 0,05$) à **j9** et **j14**. Par contre la comparaison des plaies suivies par la sulfadiazine argentique envers celles contrôles ne démontre aucune différence significative ($p > 0,05$).

c- Flexibilité :

En terme de **flexibilité** le tableau N°-08 montre que les pansements couvrant les plaies traitées par le gel à base de miel restent flexibles durant toute la période d'évaluation chez les lapins diabétiques et non diabétiques sauf à **j2** où on a remarqué qu'elles devenaient faibles. Les pansements des plaies contrôles diabétiques et non diabétiques sont non flexibles durant toute la période de suivi ; alors que ceux des plaies traitées par la sulfadiazine argentiques des lapins non diabétiques sont peu flexibles. Par contre ceux des plaies diabétiques ; ils sont flexibles à **j2** puis deviennent non flexibles le reste de la période de suivi.

Les analyses statistiques montrent que la différence entre les plaies témoins et celles suivies par le gel à base de miel des lapins non diabétiques est très hautement significative ($p < 0,001$) à **j4**, **j11** et **j14**, et hautement significative ($p < 0,01$) à **j7**, **j9**. De même qu'une différence significative ($p < 0,05$) à **j7** a été constatée entre ces dernières et celles traitées par la sulfadiazine argentiques chez le même groupe de lapins, par contre on ne constate aucune différence significative ($p > 0,05$) entre les plaies témoins et celles suivies par la sulfadiazine argentique.

Concernant les lapins diabétiques on constate que les pansements couvrant les plaies suivies par la sulfadiazine argentique sont flexibles par rapport à ceux qui couvrent les plaies contrôles et celles gérées par notre formule avec une différence très hautement significative ($p < 0,001$) comparativement avec ces derniers à **j2**.

Une différence hautement significative ($p < 0,01$) est constatée à **j4** et très hautement significative ($p < 0,001$) à **j7, j9, j11** et **j14** entre les plaies suivies par notre formule et celles témoins ainsi qu'une différence hautement significative ($p < 0,001$) est remarquée à **j9** et très hautement significative ($p < 0,001$) à **j4, j7, j11** et **j14** comparativement avec celles traitées par la sulfadiazine argentique comme montre le **Tableau N°-08**.

Tableau N°-08: Moyenne \pm écart-type des scores d'évaluation physique du pansement des plaies non diabétiques et diabétiques contrôles et celles suivies par les différents traitements en fonction du temps.

Evaluation du pansement	SCORES(Moyenne \pm écart-type)					
	2 jours	4 jours	7 jours	9 jours	11 jours	14 jours
Retrait						
LNDC	0,11 \pm 0,33 b***	0,33 \pm 0,50 b***	0,22 \pm 0,44 b***	0,22 \pm 0,44 b***	0,33 \pm 0,50 b***	0,33 \pm 0,50 b***
LNSSAD	0,66 \pm 0,70	1,22 \pm 0,44 c**	1,00 \pm 0,86	1,33 \pm 0,86	1,22 \pm 0,77	0,77 \pm 0,66 c**
LNDSGM	1,77 \pm 1,09 b***	2,77 \pm 0,44 b*** c**	2,00 \pm 2,50 b***	2,22 \pm 0,83 b***	2,22 \pm 0,66 b***	2,33 \pm 0,70 b*** c**
LDC	0,55 \pm 0,52 e**	0,55 \pm 0,52 e***	0,44 \pm 0,72 e***	0,22 \pm 0,44 e***	0,33 \pm 0,50 e***	0,55 \pm 0,52 e***
LDSSAD	0,55 \pm 0,72 f***	0,55 \pm 0,72 f***	0,88 \pm 0,60 f**	0,66 \pm 0,50 f**	0,55 \pm 0,52 f**	0,33 \pm 0,50 f**
LDSGM	2,55 \pm 0,72 e** f***	2,55 \pm 0,52 e*** f***	2,22 \pm 0,66 e*** f**	2,11 \pm 0,60 e*** f**	1,88 \pm 0,60 e*** f**	2,00 \pm 0,50 e*** f**
Accumulation des liquides						
LNDC	2,33 \pm 0,70	2,66 \pm 0,70 b***	2,77 \pm 0,44 b**	2,44 \pm 0,52	2,77 \pm 0,44 b*	3,00 \pm 0,00 b**
LNSSAD	2,00 \pm 0,70	1,77 \pm 0,44	2,88 \pm 0,33 c***	2,22 \pm 0,66	2,33 \pm 0,70	2,66 \pm 0,50
LNDSGM	1,77 \pm 0,66	1,33 \pm 0,50 b***	1,55 \pm 0,52 b** c***	1,77 \pm 0,83	1,88 \pm 0,78 b*	2,22 \pm 0,44 b**
LDC	2,66 \pm 0,50 e***	2,44 \pm 0,52 e**	2,77 \pm 0,66 e***	2,33 \pm 0,50	2,44 \pm 0,52	2,55 \pm 0,52
LDSSAD	1,11 \pm 0,60 f**	2,66 \pm 0,50 f***	2,77 \pm 0,44 f**	2,55 \pm 0,52 f*	2,66 \pm 0,50 f**	2,66 \pm 0,60 f*
LDSGM	2,55 \pm 0,52 e*** f**	1,22 \pm 0,66 e** f***	1,22 \pm 0,83 e*** f**	1,66 \pm 0,86 f*	1,77 \pm 0,66 f**	1,88 \pm 0,60 f*
Flexibilité						
LNDC	0,66 \pm 0,86	0,44 \pm 0,88 b***	0,55 \pm 0,88 b**	0,55 \pm 0,72 b**	0,33 \pm 0,50 b***	0,11 \pm 0,33 b***
LNSSAD	1,00 \pm 1,00	1,44 \pm 0,88	0,88 \pm 0,92 c*	1,44 \pm 0,88	1,22 \pm 0,66	1,00 \pm 1,11
LNDSGM	1,44 \pm 1,01	2,33 \pm 0,50 b***	2,11 \pm 0,60 b** c*	2,11 \pm 1,05 b**	1,88 \pm 0,78 b***	2,22 \pm 0,97 b***
LDC	0,44 \pm 0,52 e***	0,55 \pm 0,52 e**	0,11 \pm 0,33 e***	0,44 \pm 0,52 e***	0,22 \pm 0,44 e***	0,22 \pm 0,44 e***
LDSSAD	2,00 \pm 0,50 f***	0,33 \pm 0,50 f***	0,33 \pm 0,50 f***	0,66 \pm 0,50 f**	0,33 \pm 0,50 f***	0,22 \pm 0,44 f***
LDSGM	0,44 \pm 0,52 e*** f***	2,11 \pm 0,60 e** f***	2,00 \pm 0,50 e*** f***	1,88 \pm 0,60 e*** f**	2,00 \pm 0,50 e*** f***	2,11 \pm 0,78 e*** f***

N = 9; *, p < 0,05; significative. **, p < 0,01, hautement significative; ***, p < 0,001, très hautement significative.

Test de Kruskal-Wallis *post-hoc* Dunn.

a : LNDC VS LNDSSDA
b : LNDC VS LNDSGM
c : LNDSGM VS LNDSSDA
d : LDC VS LDC
e : LDC VS LDC
f : LDSGM VS LDSSDA

II-2-2-Evaluation quantitative :

1- Expansion des plaies à j0 des groupes diabétiques et non diabétiques:

La superficie des plaies immédiatement après création (à **J0**) est plus grande que celle dessinée sur le dos de tous les lapins utilisés au cours de notre expérimentation ; cette expansion est d'une moyenne de $5,14 \pm 0,63 \text{ cm}^2$ et $4,92 \pm 0,75 \text{ cm}^2$ respectivement chez les lapins diabétiques et non diabétiques. Statistiquement on ne constate aucune différence significative ($p > 0,05$) lorsqu'on compare ces deux moyennes (voir **Tableau N°-09**).

Tableau N°-09 : Comparaison des moyennes d'expansion des plaies des lapins diabétiques et non diabétiques A j0.

Expansion des plaies non diabétiques cm² (j 0) Moye± écart	Expansion des plaies diabétiques cm² (j 0) Moye± écart	p
4,92±0,75	5,14±0,63	0,185

N= 36 p< 0,05 significatif, test t-student

2- Evaluation macroscopique des plaies diabétiques et non diabétiques du groupe de lapins sacrifié à j7:

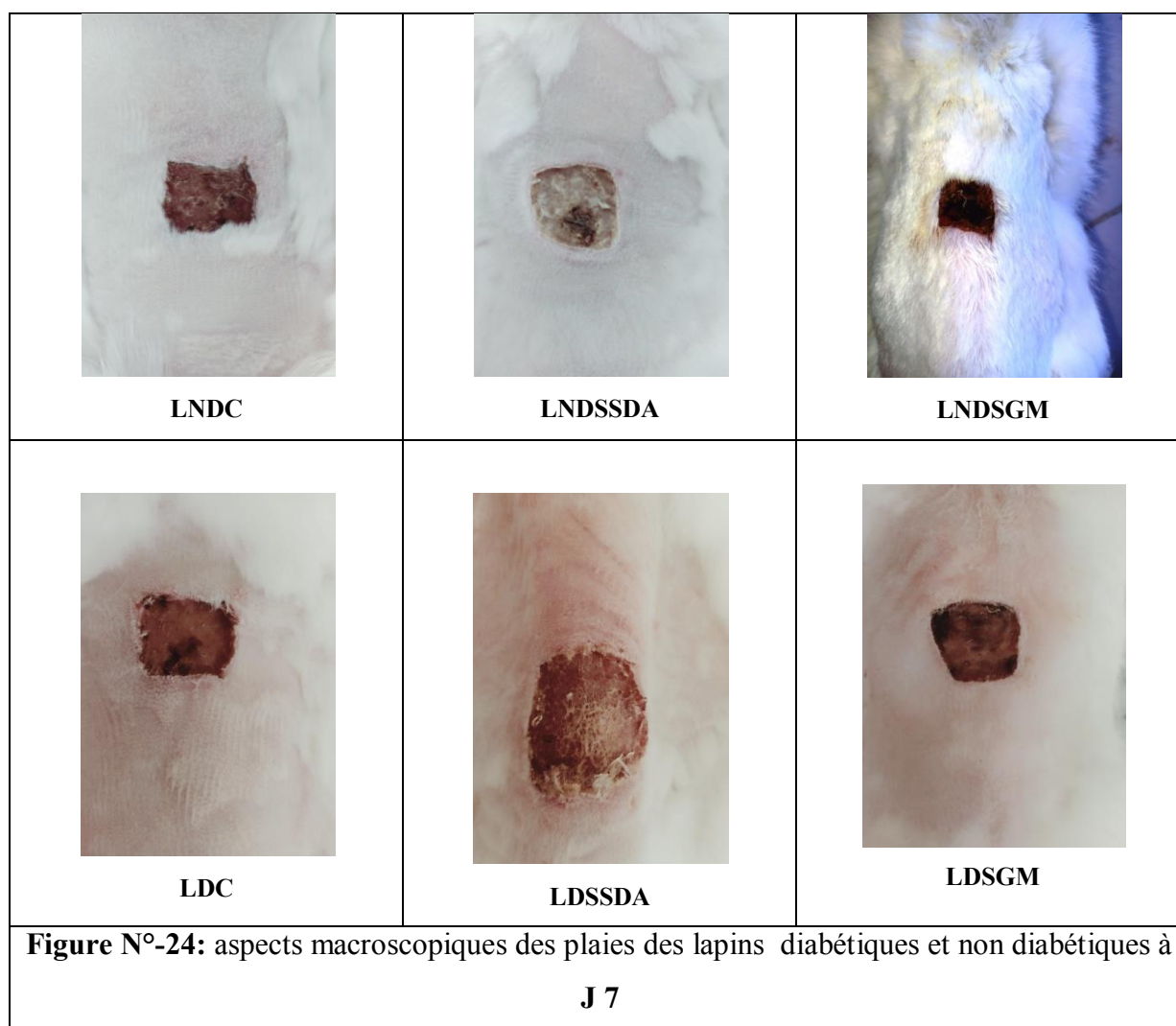
La figure N°-24 montre les aspects macroscopiques des plaies traitées et non traitées des lapins diabétiques et non diabétiques du sous groupe sacrifié à **j7**.

Les plaies témoins non diabétiques présentent des croûtes dures, sèches et épaisses alors que celles des plaies diabétiques sont fragiles et fines.

Les croûtes des plaies non diabétiques traitées par la sulfadiazine argentine apparaissent moins sèches et épaisses tandis que celles des plaies diabétiques sont fragiles et fines.

Les plaies diabétiques et non diabétiques gérées par le gel à base de miel sont recouvertes de croûtes molles et fines.

Aucun signe macroscopique d'épithélialisation n'est présent au niveau des plaies de tous les groupes et aucun signe d'une plaie infectée n'est constaté.



2-1- La contraction des plaies diabétiques et non diabétiques du groupe de lapins sacrifiés à j7:

a- Expansion des plaies à j0 des deux groupes D et ND groupe de lapins sacrifiés à j7:

La comparaison entre les moyennes d'expansion des plaies non diabétiques contrôles et traitées et celles des plaies diabétiques contrôles et traitées ne relève aucune différence significative ($p > 0,05$).

Tableau N°-10: Comparaison des moyennes d'expansion des plaies contrôles, suivies par la SDA et celles suivies par le GM à j0 des lapins D et ND du groupe S/J 7.

Groupe S/J 7	Expansion des plaies ND cm ² (j 0) Moye ± écart	Expansion des plaies D cm ² (j 0) Moye ± écart
PC	4,63 ± 0,81	4,95 ± 0,71
PSSDA	5,01 ± 0,90	5,78 ± 0,46
PSGM	5,25 ± 1,08	5,73 ± 0,10
P	NS	NS

N=3, NS : Non Significative, ANOVA test de Tukey (HSD)

b- Evaluation planimétrique des plaies à J7 :

Le pourcentage de contraction des plaies contrôlées, suivies par la sulfadiazine argentique et celles traitées par le gel à base de miel chez les lapins non diabétiques et les lapins diabétiques après sept jours de suivi est présenté sous forme d'histogramme au niveau de la **figure N°-25**.

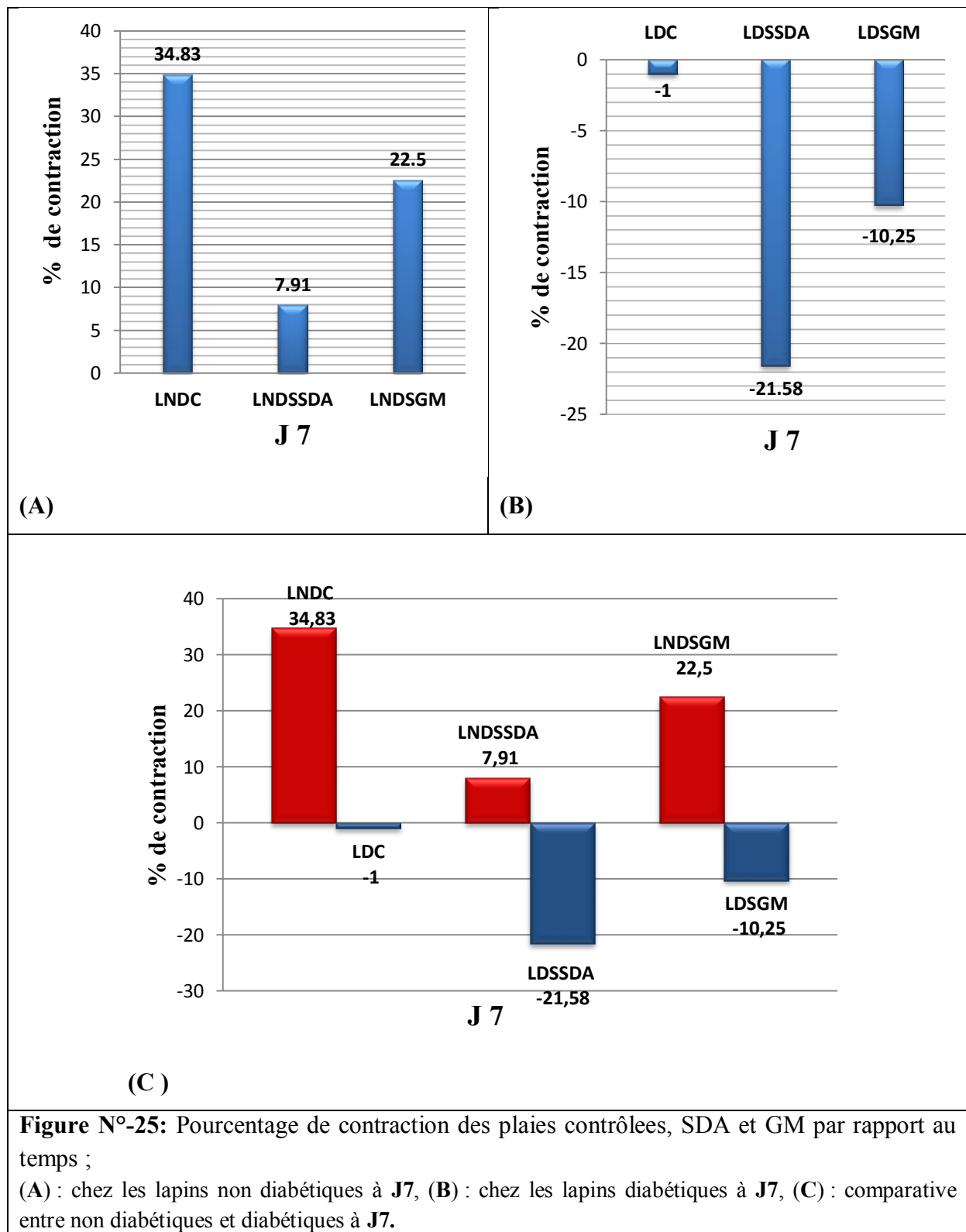
L'histogramme montre une supériorité du pourcentage de contraction des plaies contrôlées par rapport à celles traitées par le gel à base de miel ainsi que par rapport à celles suivies par la sulfadiazine argentique.

La même supériorité est constatée pour les plaies des lapins diabétiques avec enregistrement de pourcentages de contraction négatifs. Cela se traduit par une augmentation de la taille des plaies par rapport à la taille de la plaie initiale.

Durant cette période, les plaies gérées par le gel à base de miel comme celles des témoins ont enregistré chacune des performances meilleures que celles suivies par la sulfadiazine argentique ; suggérant un effet négatif de cette dernière durant la phase inflammatoire de la cicatrisation.

L'étude statistique n'a révélé aucune différence significative ($p > 0,05$) entre les pourcentages de contraction des différentes plaies des lapins diabétiques et ceux des lapins non diabétiques.

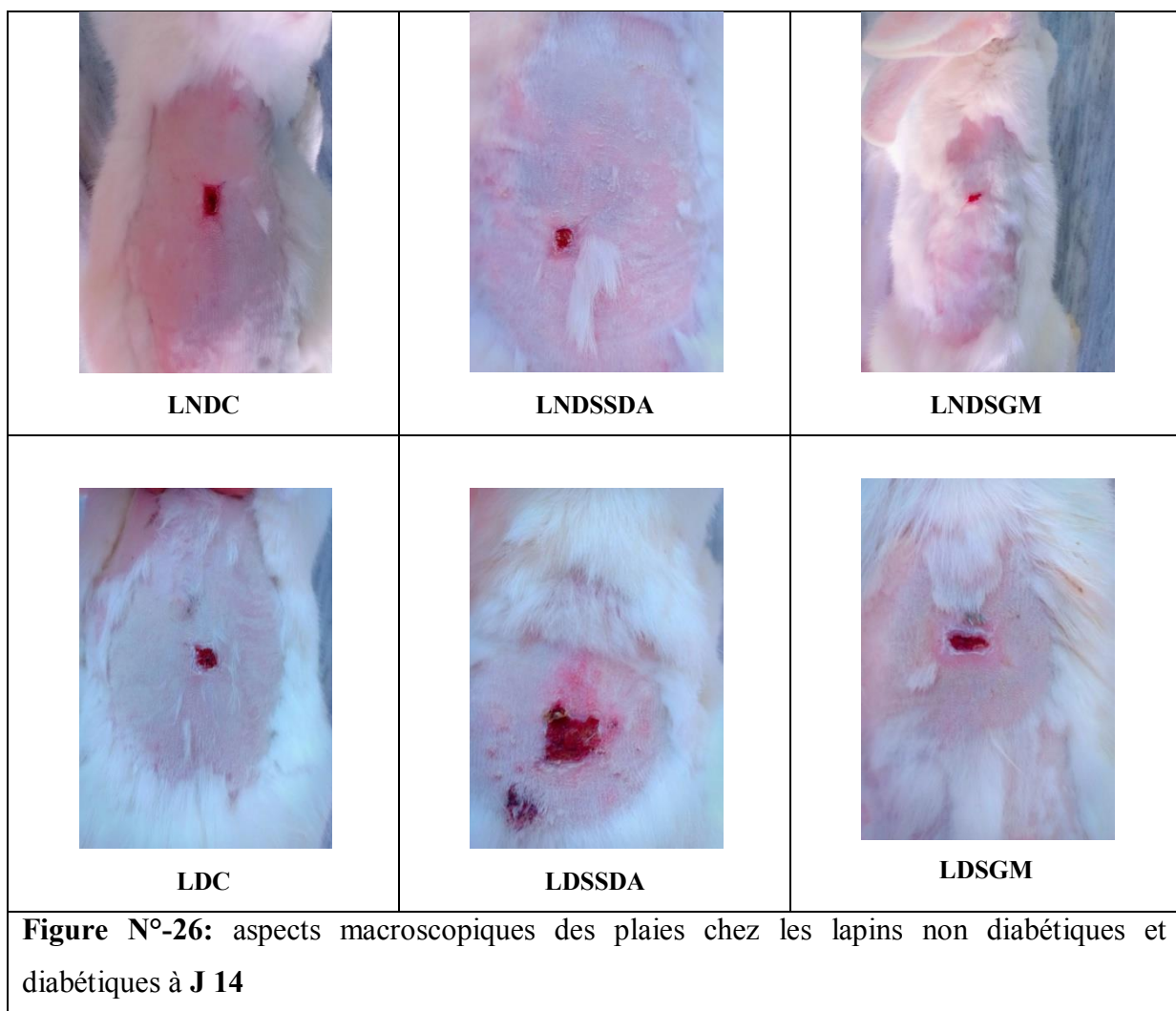
D'après l'histogramme (C), on remarque que les pourcentages de contraction des plaies non diabétiques sont plus importants que ceux des plaies diabétiques.



3- Evaluation macroscopique des plaies diabétiques et non diabétiques du groupe de lapins sacrifié à j14:

La figure N°-26 montre les aspects macroscopiques des plaies traitées et non traitées des lapins diabétiques et non diabétiques du sous groupe sacrifié à j14.

Ces aspects montrent qu'il y a une réduction de la taille de toutes les plaies avec des différences notables au sein du même groupe et en inter-groupe dues au processus de contraction qu'on présentera sous forme de pourcentage au moment de l'évaluation morphométrique ainsi qu'un détachement des croûtes et une apparition d'un tissu de granulation rougeâtre comblant la perte de substance et d'un liséré rosâtre aux marges des plaies signe d'épithélialisation, enfin aucun signe d'infection n'apparaît au sein des plaies des deux groupes. À ce stade de suivi, la cicatrisation n'est pas achevée au niveau des plaies de tous les groupes.



3-1-La contraction des plaies diabétiques et non diabétiques du groupe de lapins sacrifiés à j14:

a- Expansion des plaies à j0 des deux groupes D et ND groupe de lapins sacrifiés à j14:

Tableau N/11: Comparaison des moyennes d'expansion des plaies contrôlées, traitées à la SDA et celles traitées au GM à j0 des lapins D et ND du groupe S /J 14.

Groupe S/J 14	Expansion des plaies ND cm ² (j 0) Moye± écart	Expansion des plaiesD cm ² (j 0) Moye± écart
PC	5,3 ± 0,70	4,62 ± 0,78
PSSDA	5,70 ± 0,28	4,89 ± 0,86
PSGM	5,40 ± 0,60	5,24 ± 0,33
P	NS	NS

N=3, NS : Non Significant, ANOVA test de Tukey (HSD)

Aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été constatée entre les moyennes d'expansion des plaies non diabétiques contrôles et traitées et celles des plaies diabétiques contrôles et traitées.

b- Evaluation planimétrique des plaies à J14 :

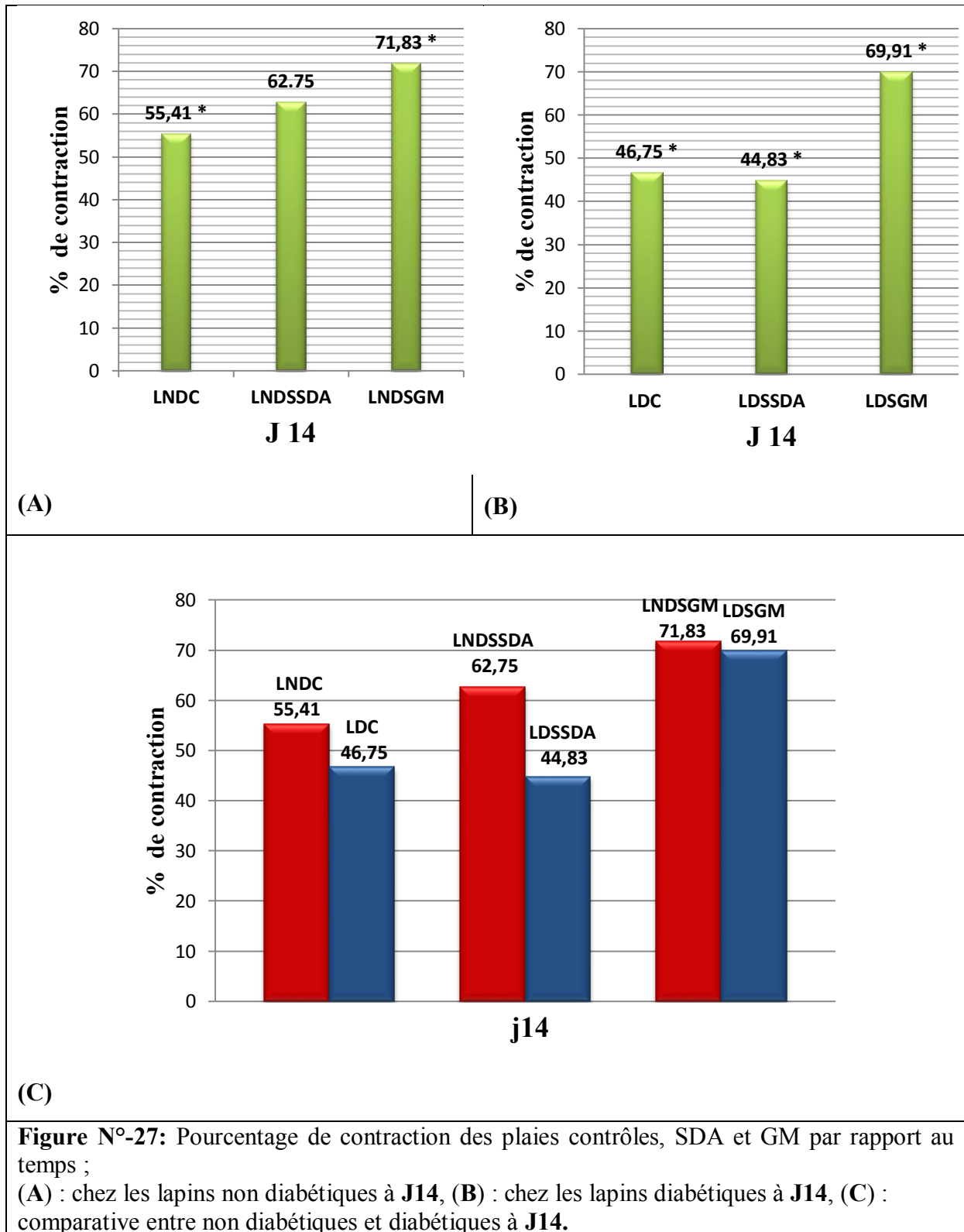
La figure N°-27 montre les pourcentages de contractions des plaies contrôles et celles traitées de chaque groupe.

Pour le groupe non diabétique on remarque que le pourcentage de contraction des plaies traitées au gel à base de miel (71,83 %) est supérieur à ceux des plaies contrôles (55,41%) et celles traitées à la sulfadiazine argentique (62.75%). L'analyse statistique a révélée une différence significative ($p < 0,05$) uniquement entre les plaies traitées par le gel à base de miel et celles contrôles.

Concernant les lapins diabétiques le pourcentage de contraction des plaies traitées au gel à base de miel est le plus élevé avec une différence significative ($p < 0,05$) comparativement aux deux autres.

D'après ces résultats on constate que le gel à base de miel exerce un effet positif sur le processus de contraction des plaies non diabétiques et diabétiques pendant cette période de suivi.

On remarque également d'après la comparaison intergroupe, que les pourcentages de contraction des plaies non diabétiques sont plus importants que ceux des plaies diabétiques.



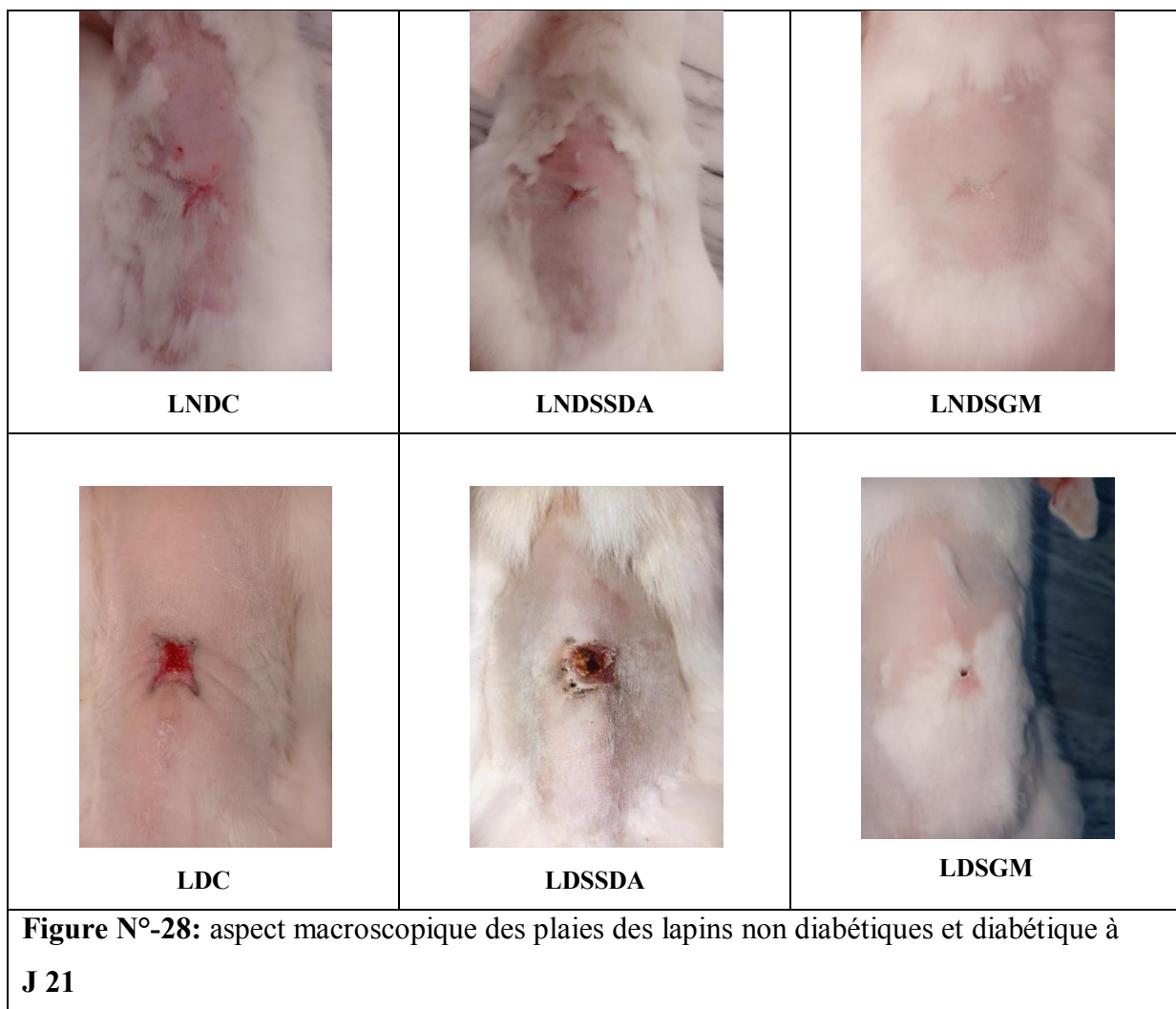
4- Evaluation macroscopique des plaies diabétiques et non diabétiques du groupe de lapins sacrifié à j21:

Après 21 jours de suivi la cicatrisation est complètement achevée pour les plaies non diabétiques traitées par le gel à base de miel tandis que de petites zones centrales de tissu de

granulation sont présentes au niveau des plaies contrôles et celles suivies par la sulfadiazine argentique chez le même groupe de lapins.

Par contre les plaies des lapins diabétiques contrôles présentent encore une superficie importante comblée de tissu de granulation non épithélialisée, alors qu'au niveau de celles traitées par la sulfadiazine argentique et celles gérées par le gel à base de miel une croûte persiste, importante pour les premières et petite pour les dernières. Tous ces aspects indiquent que ces plaies ne sont pas complètement cicatrisées comme le montre la **figure N°-28**.

D'après les résultats macroscopiques de la cicatrisation des plaies non diabétiques et diabétiques on constate que le diabète a un effet négatif sur le processus cicatriciel.



4-1 La contraction des plaies diabétiques et non diabétiques du groupe de lapins sacrifiés à j21:

a-Expansion des plaies à j0 des deux groupes D et ND groupe de lapins sacrifiés à j21 :

D'après le **tableau N°-12**, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été constatée entre les moyennes d'expansion des plaies non diabétiques contrôles et traitées et celles des plaies diabétiques contrôles et traitées.

Tableau N°-12: Comparaison des moyennes d'expansion des plaies contrôles, suivies par la SDA et ceux suivies par le GM à j0 des lapins D et ND du groupe S /J 21.

Groupe S/J 21	Expansion des plaies ND cm ² (j 0) Moye± écart	Expansion des plaiesD cm ² (j 0) Moye± écart
PC	4,72 ± 0,62	4,83 ± 0,81
PSSDA	4,66 ± 0,11	5,42 ± 0,55
PSGM	5,36 ± 0,74	5,16 ± 0,36
P	NS	NS

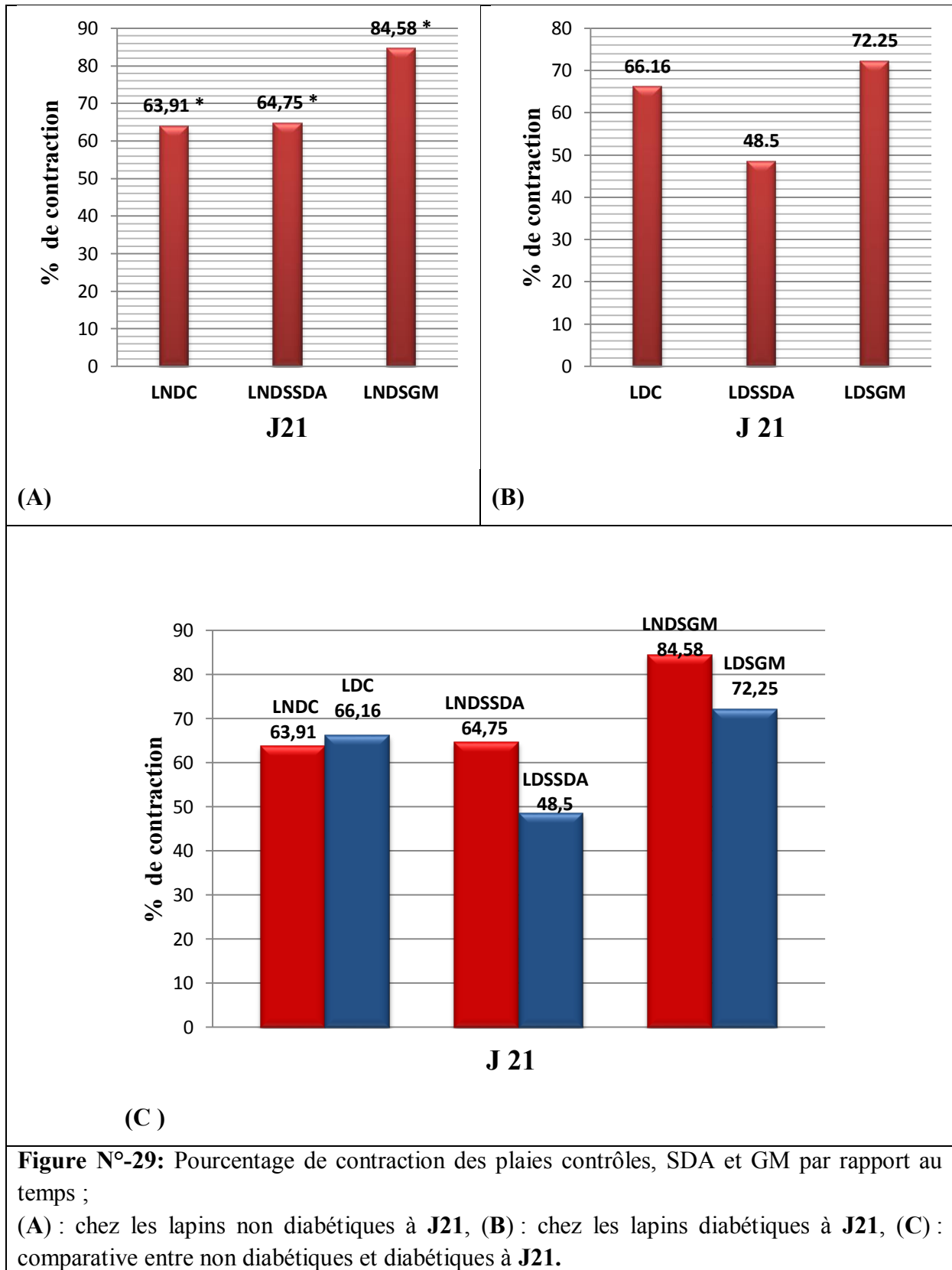
N=3, NS : Non Significant, ANOVA test de Tukey (HSD)

b-Evaluation planimétrique des plaies à J 21 :

A j21, les performances des plaies des deux groupes traitées par notre préparation sont meilleures que celles des groupes témoins ainsi que celles suivies par la sulfadiazine argentique car leur pourcentage de contraction a atteint 84,58 % pour les plaies non diabétiques et 72,25 % pour celles diabétiques (**figure N°-29**). L'analyse statistique indique une différence significative ($p < 0,05$) entre les plaies gérées par notre préparation et celles contrôles ainsi que celles suivies par la sulfadiazine argentique uniquement au niveau du groupe de lapin non diabétiques.

L'analyse comparative des pourcentages de contraction des plaies diabétiques et non diabétiques à j21 reflète :

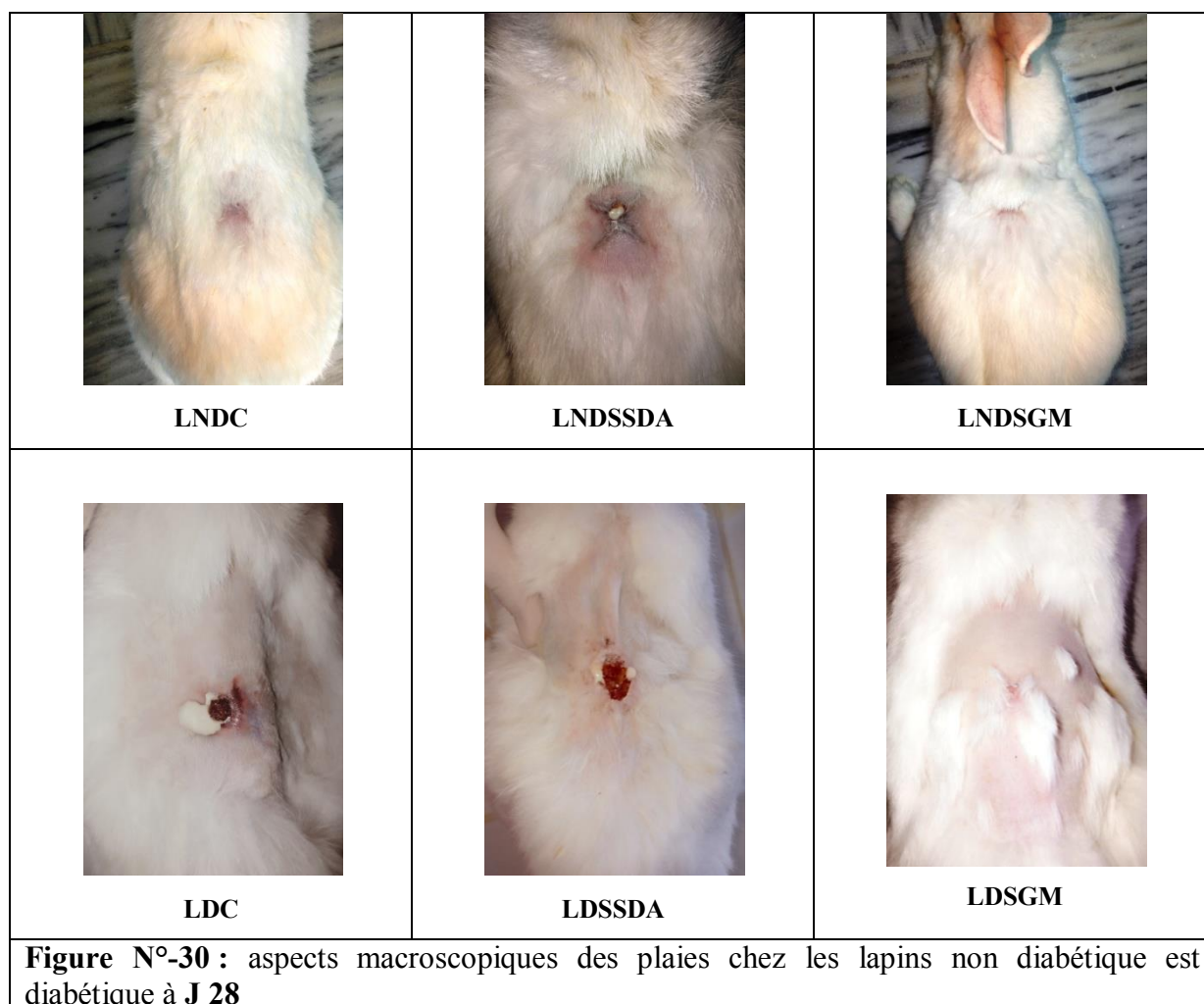
- Une différence négligeable entre les plaies diabétiques et non diabétiques contrôles soit **66,16 %** contre **63,91%** ;
- Une différence évidente entre les plaies diabétiques et non diabétiques suivies par la sulfadiazine argentique soit **48,5 %** contre **64,75%** ;
- Une différence insignifiante entre les plaies diabétiques et non diabétiques gérées par le gel à base de miel soit **72,25 %** contre **84,58%**.



5- Evaluation macroscopique des plaies diabétiques et non diabétiques du groupe de lapins sacrifié à j28:

Les aspects macroscopiques des différentes plaies à j28 sont représentés par **la figure N°-30**.

A j28, les plaies diabétiques et non diabétiques gérées par notre préparation ainsi que celles non diabétiques contrôles se sont totalement cicatrisées ; par contre des signes de suppuration apparaissent au niveau des plaies d'un seul lapin diabétique et d'un autre non diabétique traités par la sulfadiazine argentique ainsi qu'un troisième lapin diabétique contrôle ; engendrant ainsi un retard de cicatrisation par contre le reste des plaies des lapins des deux groupes s'est totalement cicatrisé.



5-1-La contraction des plaies diabétiques et non diabétiques du groupe de lapins sacrifiés à j28:

a-Expansion des plaies à j0 des deux groupes D et ND groupe de lapins sacrifiés à j28 :

Aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été constatée entre les moyennes d'expansion des plaies non diabétiques contrôles et traitées et celles des plaies diabétiques contrôles et traitées pour le sous groupe dont les lapins sont sacrifiés à j28.

Tableau N°-13: Comparaison des moyennes d'expansion des plaies contrôles suivies par la SDA et celles suivies par le GM à j0 des lapins D et ND du groupe S/J 28.

Groupe S/J 28	Expansion des plaies ND cm ² (j 0) Moye± écart	Expansion des plaiesD cm ² (j 0) Moye± écart
PC	4,11 ± 0,22	4,91 ± 0,82
PSSDA	4,85 ± 1,01	5,38 ± 0,43
PSGM	4,06 ± 0,38	5,09 ± 0,61
P	NS	NS

N=3, NS : Non Significant, ANOVA test de Tukey (HSD)

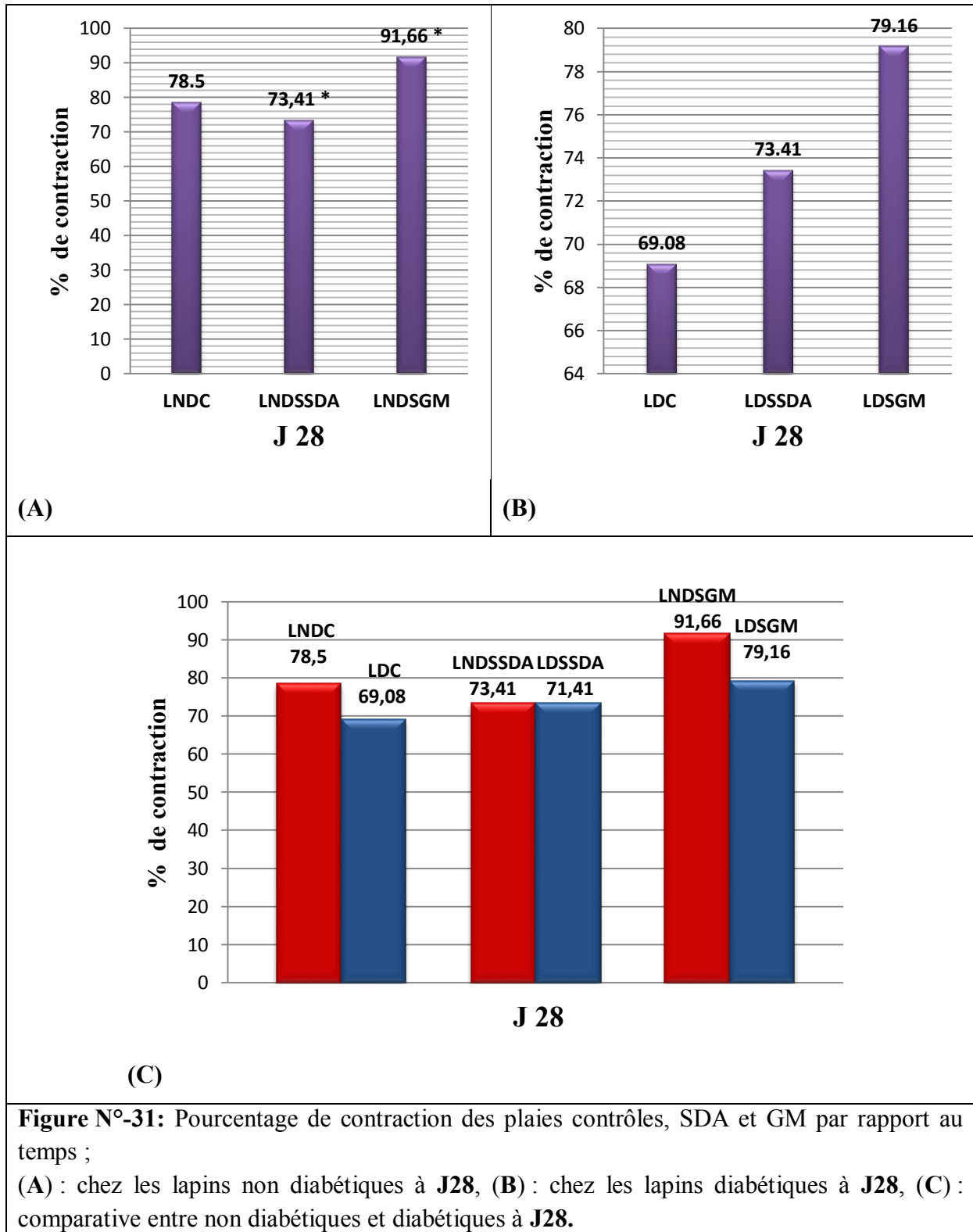
b-Evaluation planimétrique des plaies à J 28 :

Le pourcentage de contraction des plaies non diabétiques après 28 jours de suivi est de 91.66 %, 73,41% et 78,5% respectivement pour les plaies traitées par le gel à base de miel, par la sulfadiazine argentiques et les plaies témoins comme le montre la figure N°-31(A).

D'après ces résultats, le processus de contraction des plaies gérées au gel à base de miel est important avec une différence significative ($p < 0,05$) comparativement aux plaies traitées par la sulfadiazine argentique et non significative ($p > 0,05$) par rapport aux plaies témoins. Par contre, la contraction des plaies suivies par la sulfadiazine argentique est moins importante à l'égard de celle du groupe témoin.

Concernant les plaies du groupe diabétique, les plaies traitées par notre préparation présentent un taux élevé de contraction soit 79.18% contre respectivement 73.41% pour les plaies suivies par la sulfadiazine et 69.08% pour celles du groupe témoin. La comparaison entre les différents pourcentages de contraction des différents groupes ne relève aucune différence significative ($p > 0,05$).

Lors de la comparaison entre les pourcentages de contraction des plaies des deux groupes, on remarque que le processus de contraction est important au niveau des plaies non diabétiques, il est similaire a celui du j21.



II-2-3- Durée de cicatrisation totale des plaies :

La progression de la cicatrisation des plaies chez les animaux diabétiques était plus lente que chez les animaux normaux.

La durée moyenne de la cicatrisation totale des plaies non diabétiques gérées par le gel à base de miel comparées à celles témoins et celles suivies par la sulfadiazine argentique, montre une différence, ces dernières ont enregistré des durées moyennes de cicatrisation de $18.33 \pm 2,05$ jours contre $21,66 \pm 2.49$ jours pour le groupe traité par la sulfadiazine argentique et $23 \pm 1,41$ jours pour le groupe témoin.

Alors que pour les plaies des animaux diabétiques on a enregistré une durée moyenne de cicatrisation complète de 24.66 ± 0.94 jours pour les plaies gérées par le gel à base de miel contre 27.66 ± 2.35 et 27.33 ± 0.94 jours pour les plaies suivies par la sulfadiazine argentique et celles témoins respectivement (Tableau N°-14).

Tableau N°-14 : Durées moyennes de cicatrisation complète des plaies des animaux diabétiques et non diabétiques (moyenne (js) \pm ET)

Période de cicatrisation complète (moyenne (j) \pm ET)					
Lapins non diabétiques			Lapins diabétiques		
Contrôles	SDA	GM	Contrôles	SDA	GM
$23 \pm 1,41$	$21,66 \pm 2.49$	18.33 ± 2.05	27.33 ± 0.94	27.66 ± 2.35	24.66 ± 0.94

II-3- Evaluation microscopique des plaies diabétiques et non diabétiques:**II-3-1- Suivi histologique de la cicatrisation des plaies :**

L'évaluation histo-pathologique des plaies des différents groupes est basée sur les paramètres suivant : la ré-épithélialisations, le tissu de granulation, l'accumulation du collagène, les cellules inflammatoires, l'angiogénèse et l'ulcère. Les moyennes \pm écart-types des scores de ces paramètres par rapport au temps sont représentées dans le tableau N°-15.

Tableau N°-15 : Moyennes des scores des paramètres d'évaluation histopathologiques des plaies diabétiques et non diabétiques par rapport au temps

Périodes	Groupes	Processus histologique (Moyenne ± écart-type)						
		Ré-épithélialisation	Tissu de granulation	Accumulation du collagène	Cellules inflammatoires	Angiogénèse	Ulcère	Total
J7	LNDC	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,33 ± 0,57	1,00 ± 0,00	0,33 ± 0,57	4,66 ± 0,55b*
	LNDSDDA	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00±0,00	1,33±0,57	1,00±0,00	1,00 ± 0,00	5,66 ± 0,57
	LNDSGM	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,66 ± 0,55	1,66 ± 0,57	1,66 ± 0,57	1,33 ± 0,57	7,00 ± 1,00 b*
	LDC	0,33±0,57	0,33±0,57	1,00±1,00	0,66±1,15	1,00±0,00	1,33±1,15	4,66 ± 3,21 e*
	LDSSDA	0,00±0,00	0,00±0,00	0,66±0,57	1,00±1,00	1,00±0,00	0,00±0,00	2,66 ± 1,52f*
	LDSGM	0,33±0,57	1,00±0,00	1,66±0,57	1,33±0,57	1,00±0,00	2,00±0,00	7,33 ± 1,52e*f*
J14	LNDC	1,33±0,00 b*	2,00±0,00	2,66±0,57	1,66±1,52	2,66±0,57	1,66±1,15	12,00 ± 4,34
	LNDSDDA	1,33±0,00c*	1,66±1,15	2,66±0,57	1,00±1,00	2,66±0,57	1,33±1,52	10,66 ± 4,61
	LNDSGM	2,33±0,57 bc*	2,66±0,57	3,00±0,00	1,33±0,57	2,66±0,57	2,00±0,00	14,33 ± 0,57
	LDC	1,00 ± 0,00	0,66 ± 0,57	3,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00 d*	1,33 ± 0,57	1,66 ± 0,57	9,66 ± 0,57
	LDSSDA	1,66± 1,15	1,66 ± 1,15	3,00±0,00	0,33±0,57 d*	2,00±1,00	2,00 ± 1,00	10,66 ± 4,04
	LDSGM	1,66 ± 1,15	1,66 ± 1,52	2,33 ± 1,15	1,33 ± 0,57	1,33 ± 0,57	2,00 ± 1,00	10,33 ± 3,51
J21	LNDC	1,00 ± 0,00	0,33 ± 0,57	3,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	1,66 ± 0,57	2,33 ± 0,57	10,33 ± 1,52
	LNDSDDA	2,33± 0,57	1,00 ± 1,73	3,00±0,00	3,00±0,00	1,33±0,57	3,00 ± 0,00	13,66 ± 2,88
	LNDSGM	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	2,66 ± 0,57	1,66 ± 0,57	3,00 ± 0,00	16,33 ± 0,57
	LDC	0,66±0,57	1,33±0,57	2,00±0,00	1,00±0,00	2,00±0,00	0,66±0,57	7,66 ± 1,15
	LDSSDA	1,00±0,00	1,00±0,00 f*	1,33±0,57f*	0,00±0,00 f*	2,00±0,00	0,66±0,57	6,00 ± 1,00 f*
	LDSGM	2,33±1,15	2,66±0,57 f*	3,00±0,00 f*	2,33±0,57 f*	1,66±0,57	2,33±0,57	14,33 ± 2,08 f*
J28	LNDC	2,33 ± 1,15	2,66 ± 0,57	3,00 ± 0,00	2,33 ± 1,15	1,33 ± 0,57	2,66 ± 0,57	14,33 ± 2,82
	LNDSDDA	2,33 ± 0,57	3,00 ± 0,00	3,00±0,00	1,33±0,57	1,33±0,57	3,00 ± 0,00	14,00 ± 1,73
	LNDSGM	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	2,66 ± 0,57	1,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	15,33 ± 0,57
	LDC	1,33±0,57 e*	2,00± 0,00de*	2,33±0,57	1,33±1,15	2,00±0,00	1,33±1,15e*	10,33 ± 2,82 e*
	LDSSDA	2,66±0,57	3,00±0,00 d*	3,00±0,00	0,66±0,57	2,00±0,00	2,33±0,00	13,66 ± 0,57
	LDSGM	3,00±0,00 e*	3,00±0,00 e*	3,00±0,00	1,00±0,00	2,00±0,00	3,00±0,00e*	15,00 ± 0,00 e*

N = 3; *: p < 0, 05; significative. Test de Kruskal-Wallis *post-hoc* Dunn.

a : LNDC VS LNDSDDA
b : LNDC VS LNDSGM
c : LNDSGM VS LNDSDDA
d : LDC VS LDC
e : LDC VS LDC
f : LDSGM VS LDSSDA

Après 7 jours de suivi, aucune régénération épithéliale n'a été observée au niveau des marges des plaies du groupe diabétique et non diabétique hormis deux plaies diabétiques: l'une témoin et l'autre traitée par le gel à base de miel où un début d'épithélialisation apparaît au niveau de leurs marges caractérisées par la formation d'une mince couche de cellules épithéliales non différenciées (**Figure N°-32.(F)**).

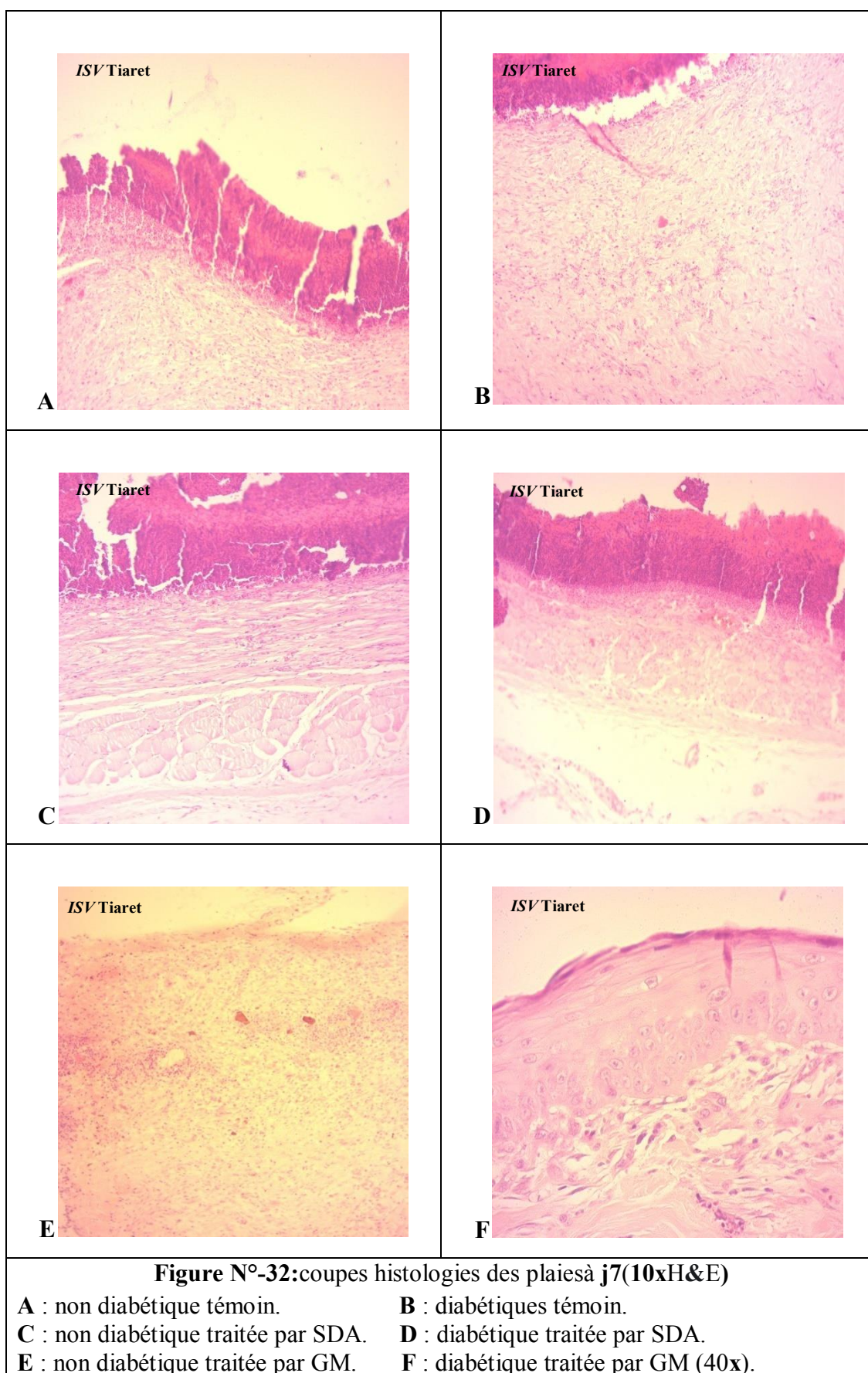
Au niveau des plaies témoins et celles traitées du groupe non diabétique on remarque une faible quantité de tissu de granulation et de collagène accumulé et peu de néo vaisseaux, associées à une réaction inflammatoire modérée ; alors que l'extension de l'ulcère est large.

Pour le groupe de lapins diabétiques, le tissu de granulation est absent chez les plaies contrôles et chez celles suivies par la sulfadiazine argentique avec une légère accumulation de collagène associé à une angiogénèse peu importante et une réaction inflammatoire modérée avec un ulcère large et profond au niveau des plaies suivies par la sulfadiazine argentique et large pour les plaies témoins.

L'évolution des plaies traitées par le gel à base de miel est presque similaire à leurs homologues non diabétiques mais avec un avantage de plus ; l'extension de l'ulcère est petite.

Statistiquement, aucune différence significative ($p > 0.05$) n'a été constatée lors de la comparaison des moyennes des scores de tous les paramètres histologiques étudiés entre les différents groupes diabétiques et non diabétiques.

De manière générale, le score histo-pathologique total est nettement plus important chez les groupes diabétiques et non diabétiques gérés par le gel à base de miel contrairement à leurs homologues témoins et ceux suivis par la sulfadiazine argentique. La comparaison des scores totaux des différents groupes a révélé une différence significative ($P < 0,05$) entre les groupes diabétiques et non diabétiques gérés par le gel à base de miel et ceux témoins diabétiques et non diabétiques ainsi qu'entre les groupes diabétiques gérés par le gel à base de miel et ceux diabétiques suivis par la sulfadiazine argentique.



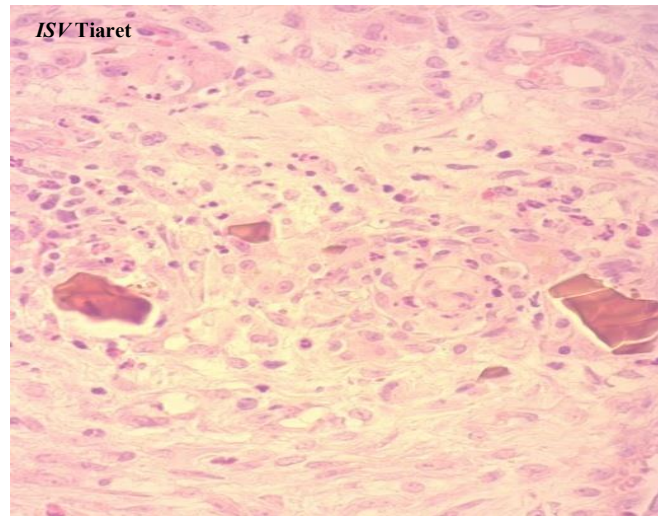


Figure N°-33: coupes histologiques d'une plaie traitée par le gel à base de miel à j7 de lapin non diabétique (40x H&E).

A j14, les plaies non diabétiques traitées au gel à base de miel présentent une épithélialisation partielle avec un épithélium mature recouvrant un tissu de granulation vascularisé doté d'une quantité de collagène ainsi qu'une petite ulcération centrale (**figure N°-34**). Statistiquement, une différence significative ($p < 0.05$) a été constatée lors de la comparaison entre les moyennes des scores d'épithélialisation du groupe non diabétique géré par le gel à base de miel avec celui témoin ainsi qu'avec celui suivi par la sulfadiazine argentique.

Les plaies diabétiques présentent une évolution histologique presque identique à leurs homologues non diabétiques ; excepté le nombre important de cellules inflammatoires au niveau des plaies traitées par la sulfadiazine argentique témoignant d'une réaction inflammatoire intense.

L'étude statistique révèle une différence significative ($p < 0.05$) lors de la comparaison des moyennes des scores des cellules inflammatoires entre le groupe diabétique témoin et celui suivi par la sulfadiazine argentique.

La comparaison des scores totaux des différents groupes n'a révélé aucune différence significative entre ($p > 0.05$) les groupes diabétiques et non diabétiques gérés par le gel à base de miel et ceux témoins diabétiques et non diabétiques.

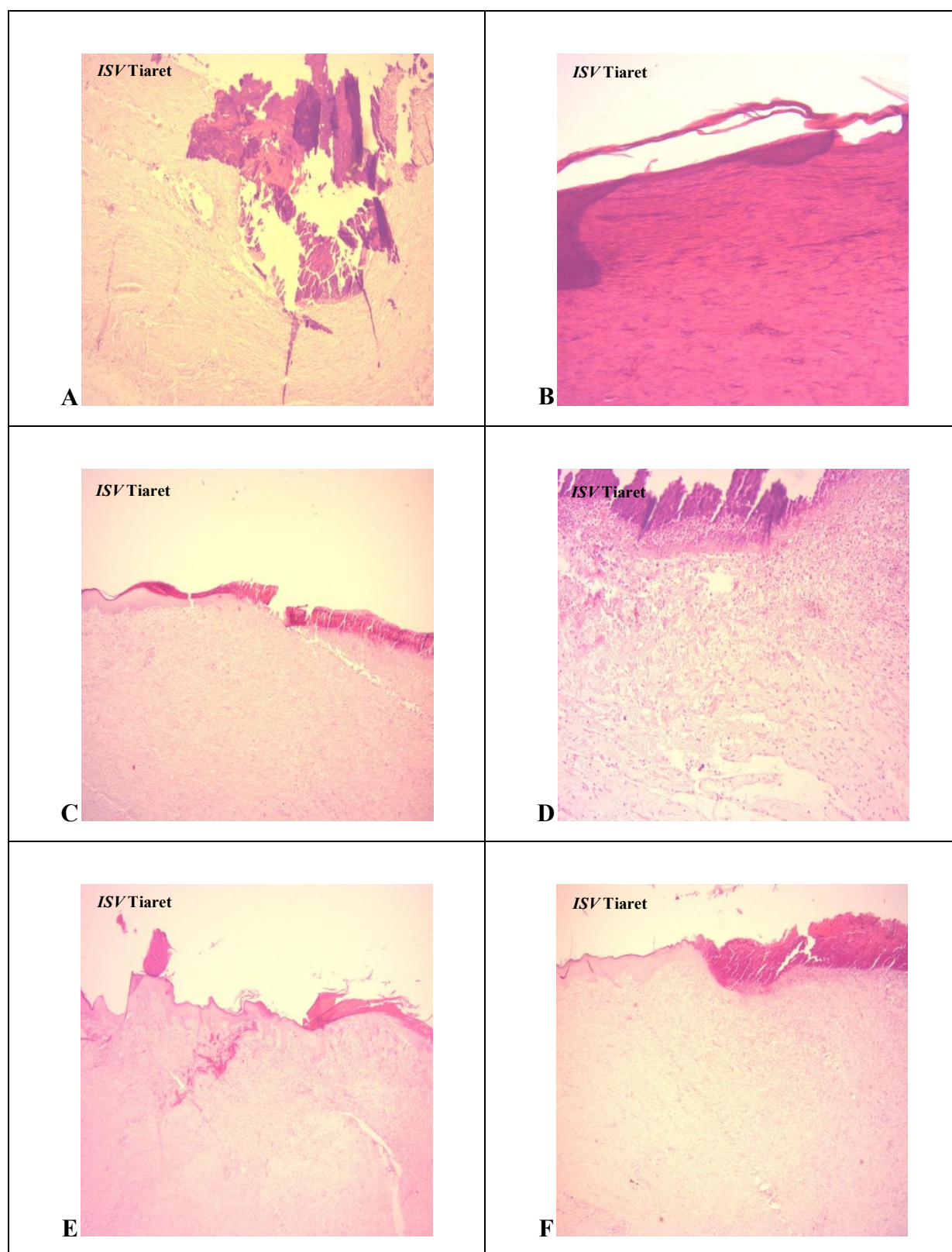


Figure N°-34 : coupes histologies des plaies à j14(10xH&E)

A : non diabétique témoin.

B : diabétiques témoin.

C : non diabétique traitée par SDA.

D : diabétique traitée par SDA.

E : non diabétique traitée par GM.

F : diabétique traitée par GM.

A **j21**, une régénération épithéliale apparaît au niveau des plaies gérées par le gel à base de miel avec un degré de différenciation épidermique bien marqué ainsi que la présence d'invaginations caractéristiques d'un épithélium épidermique mature (**figure N°-35/e**) témoignant d'une ré-épithélialisation complète recouvrant un tissu de granulation mature peu vascularisé riche en collagène d'orientation horizontale et sans ulcération alors que, la réaction inflammatoire localisée reste modérée à légère due à des petits fragments de notre préparation comme le montre **la figure N°-33**.

Par contre l'épithélialisation est partielle avec un tissu épithélial immature au niveau des plaies contrôles et celles suivies par la sulfadiazine argentique recouvrant un tissu de granulation immature peu vascularisé avec des fibres de collagène d'orientation mixte ne comblant pas toute la profondeur de la plaie.

Ainsi que la présence d'un faible infiltrat inflammatoire et d'une petite ulcération dans les plaies témoins par contre on note leurs absences dans celles suivies par la sulfadiazine argentique (**Figure N°-35/c**).

Par conséquent les plaies non diabétiques traitées par le gel à base de miel se sont totalement cicatrisées à **j 21** par contre le processus cicatriciel au niveau des plaies témoins et celles suivies par la sulfadiazine argentique n'est pas encore achevé après cette période de suivi.

Statistiquement, aucune différence significative ($p > 0.05$) n'a été constatée lors de la comparaison des moyennes des scores de tous les paramètres histologiques étudiés entre les différents groupes non diabétique. De même que la comparaison des scores totaux ne montre aucune différence significative ($p > 0.05$).

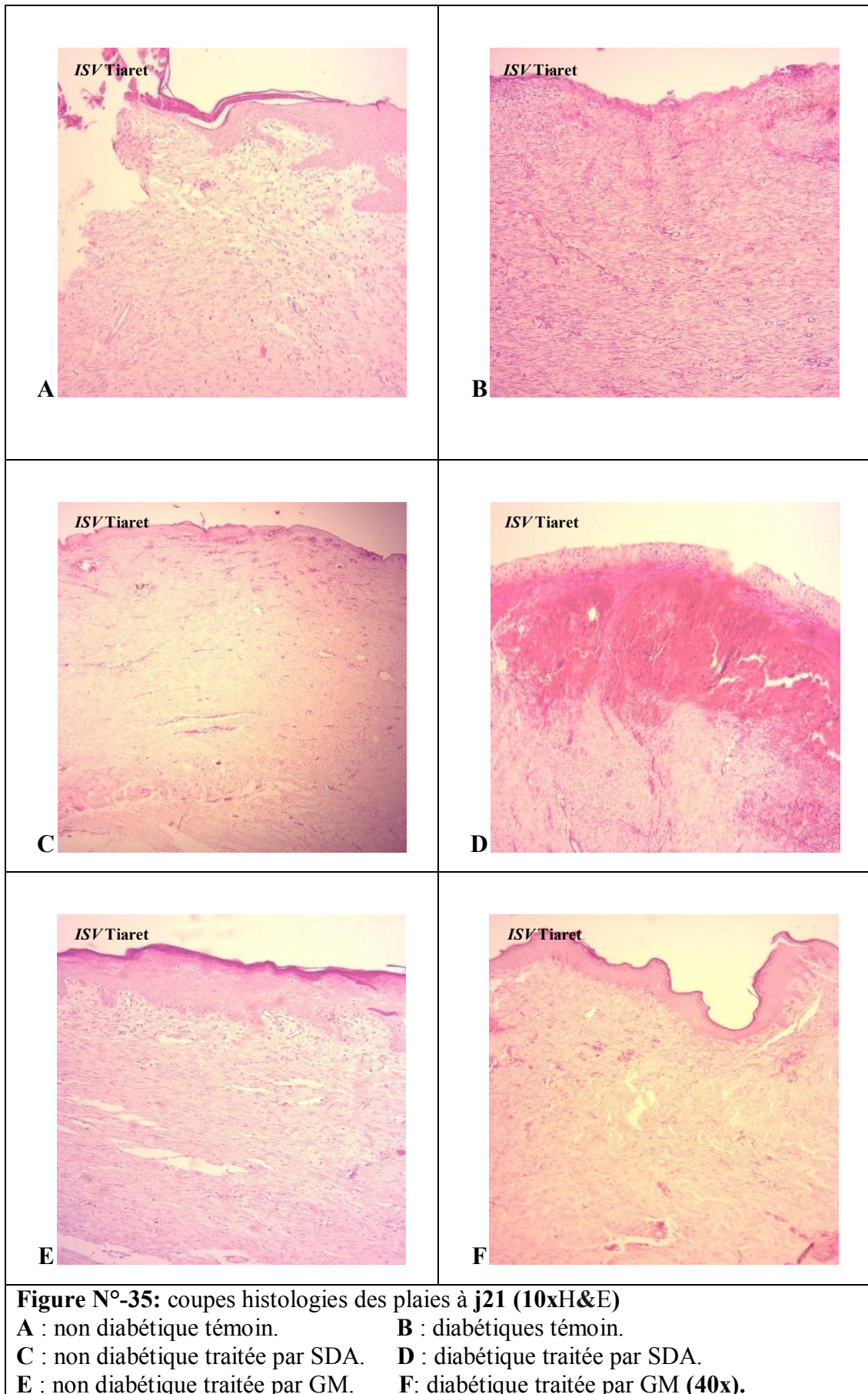
L'évaluation histologique des plaies des lapins diabétiques gérées par le gel à base de miel révèle une épithélialisation complète avec la présence d'un épithélium immature non différencié, par contre au niveau des plaies contrôles et celles suivies par le produit conventionnel elle est partielle.

Pour le tissu de granulation et l'accumulation du collagène on constate qu'il y a présence d'un tissu de granulation mature et peu vascularisé avec dépôt d'une quantité importante de fibres de collagène d'orientation mixte, une petite ulcération et une légère réaction inflammatoire au niveau des plaies traitées par le gel à base de miel tandis que les

plaies témoins et celles traitées par la sulfadiazine argentiques présentent un tissu de granulation immature peu vascularisé avec dépôt d'une légère quantité de fibre de collagène, une ulcération large et profonde en plus d'une réaction inflammatoire d'intensité modérée à sévère signifiant un début de processus cicatriciel (**Figure N°-35**).

Une différence significative ($p < 0,05$) est constatée lors de la comparaison des moyennes des scores du tissu de granulation, de l'accumulation du collagène et des cellules inflammatoires entre le groupe diabétique géré par le gel à base de miel et celui suivi par la sulfadiazine.

La comparaison des scores totaux des différents groupes diabétiques a révélé une différence significative ($p < 0,05$) entre ceux gérés par le gel à base de miel et ceux suivis par la sulfadiazine argentique.



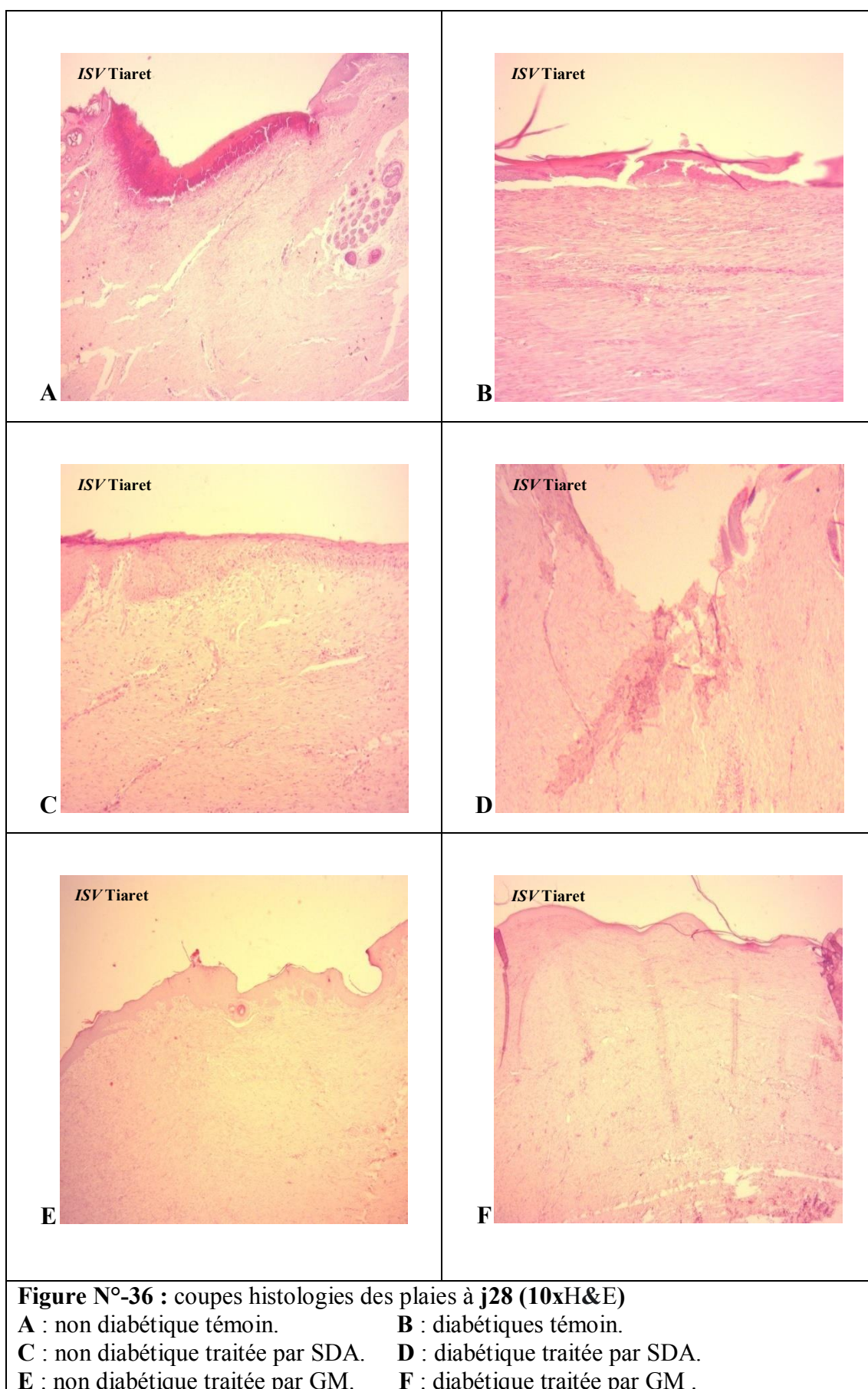
A j28, l'examen histo-pathologique a montré, une cicatrisation totale de toutes les plaies diabétiques et non diabétiques gérées par le gel à base de miel avec un tissu cicatriciel d'une parfaite qualité ; caractérisé par un épiderme mature et kératinisé comportant des couches cellulaires bien différenciées ainsi que la présence d'invaginations épidermiques tapissant un tissu de granulation bien organisé doté de fibres de collagènes d'orientation horizontale avec une réaction inflammatoire localisée d'intensité modérée au niveau des plaies diabétiques et légère au niveau de celles non diabétiques due aux petits fragments de notre préparation (figure N°-36/(e, f)) .

En revanche les plaies non diabétiques contrôles et celles suivies par la sulfadiazine argentique cicatrisées présentent un tissu épithélial immature recouvrant la totalité des surfaces des plaies ainsi qu'un dépôt important de fibre de collagènes (aspect de fibrose) d'orientation mixte et une réaction inflammatoire légère ; tandis que celles diabétiques présentent une réaction inflammatoire modérée à intense avec des foyers de suppuration retardant leur cicatrisation.

L'étude statistique montre une différence significative ($p < 0,05$) lors de la comparaison des moyennes des scores d'épithélialisation, du tissu de granulation et d'ulcération entre les groupes diabétiques gérés par le gel à base de miel et ceux contrôles. Ainsi qu'une différence significative ($p < 0,05$) a été également relevée lors de comparaison des moyennes des scores du tissu de granulation et d'ulcération entre les groupes diabétiques témoins et ceux suivis par la sulfadiazine argentique.

Pour les groupes non diabétiques aucune différence significative ($p > 0.05$) n'a été observée lors de la comparaison entre les moyennes des scores des différents paramètres histo-pathologiques.

La comparaison des scores totaux des plaies diabétiques gérées par le gel à base de miel et celles contrôles montre une différence significative ($p < 0, 05$).



Chapitre VI

Discussion

I-Partie in vitro :

Le traitement des plaies cutanées chroniques causées par une infection bactérienne grave est plus difficile à la clinique avec un degré croissant de résistance multiple aux antibiotiques (**Howell-Jones, 2005**).

La résistance aux médicaments antimicrobiens est un problème de santé publique majeur pour lequel il est urgent de trouver de nouveaux médicaments antimicrobiens ou des interventions thérapeutiques novatrices. À l'échelle mondiale, les blessures causées par des infections microbiennes résistantes aux antibiotiques constituent un fardeau important pour les systèmes de soins de santé (**Frykberg et Banks, 2015 ; Man et Hoskins, 2020**).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) est devenue l'une des principales causes de colonisation et d'infection dans diverses plaies des tissus mous, y compris les ulcères veineux des jambes, les ulcères de pression et les ulcères du pied diabétique, ce qui a entraîné l'apparition de plaies chroniques non cicatrisantes (**Kim et al., 2012**) ; de plus le traitement des infections à *S. aureus* a été compliqué par l'émergence généralisée de souches de *S. aureus* (SARM) résistantes à la méthicilline et multirésistantes dans la communauté (**Ortines et al., 2018**). En plus de nouvelles bactéries Gram-négatives multirésistantes (MDR) suscitent une inquiétude excessive, car actuellement, aucun antibiotique commercialisé n'est disponible pour les combattre (**Zgurskaya et al., 2015**).

Il a été rapporté que 46%, 25% et 21% des isolats d' *E. Coli* qui causent des infections des plaies sont respectivement résistants à l'ampicilline, à la tétracycline et aux fluoroquinolones. Les isolats d' *E. Coli* présentent de nombreux facteurs de virulence, notamment la protéase de la membrane externe, le facteur nécrosant cytotoxique 1 (**Welch, 2016**).

En raison de la nécessité de nouvelles thérapies, on a constaté un regain d'intérêt pour d'autres approches de traitement comme l'utilisation du miel dans la gestion des infections des plaies. En effet, le miel de qualité médicale est actuellement inclus dans les protocoles cliniques pour la gestion des plaies (**NHS, 2019**) et il a été démontré qu'il a une activité antimicrobienne à large spectre contre les microorganismes infectant les plaies communes, notamment *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* (**McLoone et al., 2016**).

Egalement la propolis a été décrite dans divers scripts anciens comme un agent de traitement des plaies seul ou en mélange avec d'autres substances (**Martinotti et Ranzato, 2015**), en raison de ces diverses propriétés naturelles, notamment le piégeage des radicaux libres, la cytotoxicité et l'activité antimicrobienne (**Pasupuleti et al., 2017, Oryan et al., 2018, Elkhenany et al., 2019**).

Le spectre antibactérien de la propolis est large. Son action est puissante, elle agit en effet sur *Staphylococcus aureus* et SARM (**Trucheva et al., 2010**). Une étude menée par **Bonvehi et Gutiérrez (2012)** sur l'activité antibactérienne des échantillons des propolis collectées des différentes régions du North d'Espagne et ont observé des zones d'inhibition de 10 à 16 mm pour *S. aureus* toute en considérant qu'ils ont obtenues une bonne activité antibactérienne de leur propolis ainsi que des zones d'inhibitions moyennes contre *S. pyogenes* (4 à 12 mm), et (4 à 10mm) contre *C. albicans* par contre aucune activité envers *O. coli*. Citons également **Gonsales et al, (2006)** qui ont relevés des zones d'inhibition entre 8-13 mm contre *S.aureus* après l'utilisation des propolis d'origine brésilienne

Cette activité antibactérienne serait imputable à l'acide cinnamique, aux molécules aromatiques, aux acides dit erpéniques, aux composés phénoliques et aux nombreux flavonoïdes qui composent la propolis et en font le plus actif des produits de la ruche (**Ramanauskienè et Inkèniènè, 2011**).

Tout comme le miel, la cire d'abeille se caractérise également par plusieurs propriétés thérapeutiques d'un grand intérêt pour nous; on pense qu'il est particulièrement efficace pour guérir les échymoses, les inflammations et les brûlures. Récemment, l'intérêt des chercheurs s'est déplacé même sur les propriétés antimicrobiennes de la cire d'abeille bien qu'il y ait encore peu d'études dans la littérature centrée uniquement sur l'action de la cire d'abeille ; quelques études ont montré une efficacité antimicrobienne de la cire d'abeille contre *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Candida albicans* et *Aspergillus niger*; ces effets inhibiteurs sont renforcés en synergie avec d'autres produits naturels tels que le miel ou l'huile d'olive (**Filippo et al., 2016**).

La cire d'abeille brute est efficace contre les bactéries Gram-positives , en particulier *S.aureus* ATCC25923 (**S. aureus** ATCC25923) (7mm), *Streptococcus epidermidis* ATCC12228 (6,5 mm) et *Streptococcuspyogenes*ATCC19615 (6,5 mm), et contre

les bactéries Gram-négatives, en particulier de *Bacillus* ATCC27853 (**B. de** la ATCC27853) (7 mm), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (4 mm), *Escherichia coli* ATCC25922 (*E. coli* ATCC25922), et en particulier un effet inhibiteur a été trouvé contre *C. albicans* NCTC2708 (20 mm); aucun effet n'a été trouvé contre *Salmonella typhimurium* ATCC14028 et *Proteus mirabilis* ATCC14153 (**Ghanem,2011**).

En outre l'activité antimicrobienne de la propolis et de la cire d'abeille en synergie (1:1, v/v) a également été étudié par **Castaldo et Capasso, (2002)** afin d'inhiber la croissance de *S. aureus* ATCC25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *B. subtilis* ATCC27853 et *C. albicans* NCTC2708 et ont constaté que *S. aureus* et *C. albicans* étaient les microorganismes les plus sensibles à cette préparation avec une zone d'inhibition respectivement de 20 et de 22 mm.

L'effet antibactérien de notre préparation est testé sur deux souches de bactéries de références responsables des infections et des retards de cicatrisation par rapport aux auteurs cités ci-dessus ainsi qu'une comparaison de cette activité inhibitrice avec celle de la sulfadiazine argentique, produit considéré comme l'agent antimicrobien idéal grâce à leur large spectre et sa double action sur les bactéries et les champignons (**Li et al., 2016**).

D'après nos résultats notre préparation à base de miel a un effet antibactérien modéré contre *S. aureus* et *E. coli* avec des moyennes de diamètre des zones d'inhibitions **23,10 ± 4,60** et **22,95 ± 4,76** respectivement; par contre la sulfadiazine montre une légère activité antimicrobienne avec des moyennes de diamètre des zones d'inhibitions **9,30 ± 1,53** pour *E. coli* et **8,25 ± 0,95** pour *S. aureus*. Statistiquement on a constaté qu'il y avait une différence hautement significative ($p < 0.01$); Cela signifie que l'effet antibactérien du gel à base de miel est plus important que celui de la sulfadiazine argentique.

L'activité antibactérienne du miel algérien est en particulier d'Euphorbe (miel du Sahara) seul a été démontré par plusieurs chercheurs. On peut citer **Moussa et al, (2012)** qui ont démontré que le miel du Sahara avait une activité inhibitrice sur la croissance des souches suivantes: *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. De même que **Haderbache et al, (2013)** qui ont également testé l'effet inhibiteur d'Euphorbe sur des souches similaires aux nôtres (*S. aureus* et *E. coli*), et ont trouvé des diamètres des zones d'inhibitions moyens 21.4 ± 5.6 et 20.5 ± 6.0 respectivement.

Nos résultats apparaissent supérieurs, cela peut être dû à l'effet combiné des différents produits utilisés dans notre gel à base de miel. Ainsi les travaux **Abdellah et al (2020)** qui ont prouvé l'effet antibactérien de deux miels de la steppe Algérienne sur les mêmes souches de bactéries.

D'autres auteurs testent l'effet antibactérien des préparations à base de miel ; on cite encore **Saad Aissat et al, (2016)** qui ont testé le miel d'Euphorbe seul et combiné avec la propolis sur les souches *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* responsable des infections urinaires et ont trouvé que les zones d'inhibition sont : 11–20 mm (*S. aureus*), 9–19 mm (*Pseudomonas aeruginosa*) et 11–19 mm (*E. coli*) de même que l'association de ce dernier à la propolis a une excellente activité antibactérienne et antiadhésive contre ces souches.

Enfin les résultats de **Leila, et al (2019)** qui utilisent le miel d'Euphorbe seul et en combinaison à l'ail sur les bactéries suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ont prouvé que le miel utilisé avait une action antimicrobienne effective seul et en combinaison avec l'ail.

Bourabah et al, (2020) ont testé l'effet synergique de l'association du miel d'euphorbe à la caséine sur les souches *E. coli* et ont trouvé que la CMI du miel d'Euphorbe est 20 % en plus de l'effet additif de la combinaison.

D'autres auteurs ont étudié l'effet synergique antimicrobien du miel propolis et miel cire d'abeille, on cite parmi eux **Al-wali et al, (2012)** qui ont prouvé que la propolis recueillie auprès de l'Arabie Saoudite ou de l'Égypte testée sur des cultures simples et polymicrobienne avait une activité antimicrobienne puissante contre *S. aureus* résistante aux antibiotiques, *E. coli* et *C. albicans*, et avaient montré des propriétés synergiques quand elle était mélangée au miel.

De même que **Al-waili et al., (2005)** ont mis en évidence l'efficacité d'une préparation à base de miel, cire d'abeille et huile d'olive sur *S. aureus*. Ils ont démontré que la croissance des *S. aureus* était inhibée à une concentration de 50 et 60 % de la préparation.

Nos résultats sont supérieurs à ceux de **Haderbache et al, (2013)** qui ont utilisé le miel seul et supérieur à ceux trouvés par **Gonsales et al (2006)**, et **Bonvehi et Gutiérrez(2012)** qui ont utilisé la propolis seule.

Pour *E. coli* plusieurs publications prouvent que la propolis a une faible activité inhibitrice vis-à-vis de ce pathogène (**Kujumgiev et al, 1999 ; Nieva Moreno et al., 1999; Bonvehì et Coll, 2000**) par contre notre préparation exerce une activité inhibitrice vis-à-vis de ce dernier.

En comparaison avec ces études on constate que la combinaison miel, propolis et cire d'abeille donne un effet antibactérien supérieur à celui de ces derniers utilisés séparément.

Des études antérieures ont affirmé que les activités antioxydantes et antibactériennes des produits de l'abeille pourraient être associées à leurs composés bioactifs spécifiques obtenus à partir de différentes origines botaniques (**Alnaimat et al., 2012**). Les activités biologiques du miel et de la propolis sont principalement attribuées aux composés phénoliques tels que les flavonoïdes (**Viuda-Martos et al., 2008**).

II-Partie in-vivo :

Le diabète sucré a été considéré comme l'un des problèmes de santé majeurs dans le monde contemporain (**Kruger et al, 2012**). Au fil des années, plusieurs modèles d'animaux ont été développés pour étudier le diabète sucré ou tester des agents antidiabétiques (**Thatte, 2009**) ou d'établir un modèle de cicatrisation diabétiques (**Velandar et al., 2008**).

Ces derniers offrent une opportunité appropriée d'étudier les effets d'un agent thérapeutique sur la cicatrisation des plaies diabétiques (**Hirapara et al, 2017**).

Ces modèles subissent des manipulations chimiques, chirurgicales (pancréatectomie) et génétiques chez plusieurs espèces animales pour induire le diabète sucré (**Thatte, 2009**).

Une des méthodes les plus efficaces pour induire le diabète sucré expérimental est l'induction chimique par Alloxan (**Etuk, 2010**). L'alloxane est un dérivé de l'urée qui provoque une nécrose sélective des cellules β - des îlots pancréatiques. En outre, il a été largement utilisé pour produire un diabète expérimental chez des animaux tels que des lapins, des rats, des souris et des chiens présentant différents degrés de gravité de la maladie en faisant varier la dose d'alloxane utilisée (**Iranloye et al, 2011**).

Les résultats obtenus, ont révélé que l'injection d'alloxane (100mg/kg) provoque une augmentation très hautement significative ($p < 0,0001$) de la glycémie des lapins lorsqu'on compare les valeurs de la glycémie avant et après induction ; cela est due à la destruction

partielle à totale des cellules β - des îlots pancréatiques comme le montre les coupes histologiques des pancréas des lapins diabétiques.

Le même résultat a été obtenu par **Jianpu et al, (2010)** et **Masood et al (2019)** après l'utilisation respectivement d'une dose de 100 mg/kg et de 90mg/kg d'alloxane d'afin d'induire le diabète chez le lapin.

Selon **Jianpu et al (2010)** l'avantage de ces doses est qu'elles sont moins toxiques et diabétogènes mais le diabète produit n'est pas stable et nécessite des réinjections d'autres doses d'alloxane. Ce que nous avons remarqué pour un faible pourcentage d'animaux durant cette expérimentation.

D'après **Bacevic et al, (2020)** ces lapins sont nommés animaux récupérés d'alloxane, cette récupération peut être la conséquence d'une régénération spontanée pouvant inclure la multiplication de cellules qui ont survécu ou de nouvelles cellules β qui se sont formées à partir d'épithélium canalaire ou du pancréas exocrine (**Lazarow, 1952 ; Cheta, 1998 ; Srinivasan et Ramarao, 2007**).

La superficie initiale tracée de la plaie prévue dont les dimensions étaient de (4 cm^2) a subi une expansion de $5,14 \pm 0,63 \text{ cm}^2$ pour les lapins diabétiques et de $4,92 \pm 0,75 \text{ cm}^2$ pour les lapins non diabétiques après création.

La même constatation a été noté par **Abercrombie et al, (1960)** et **Billingham et russell(1956)**, qui étaient respectivement de $6,31 \pm 0,15 \text{ cm}^2$ contre la taille initiale $4,20 \pm 0,08 \text{ cm}^2$ et 35 à 40 cm^2 contre la taille initiale 30 cm^2 ; Cela serait du à l'élasticité naturelle de la peau pour les premiers et à la tension normale présente dans la peau pour les seconds.

Le processus de cicatrisation peut être facilité par des produits naturels aux propriétés médicinales. Beaucoup d'études sur les propriétés cicatrisantes des produits naturels avec anti-inflammatoire, antioxydant, des actions de synthèse antibactérienne et pro-collagène ont été menées. Leurs propriétés médicinales pourraient être contribuées par les constituants phytochimiques bioactifs des différentes familles chimiques comme alcaloïdes, huiles essentielles, flavonoïdes, tanins, terpénoïdes, saponines et composés phénoliques (**Ibrahim et al, 2018**).

Les produits de la ruche, quand ils sont associés, voient leurs propriétés devenir encore plus efficaces. Par exemple, le miel et la propolis sont très efficaces dans les cas d'affections

cutanées comme les brûlures et les escarres, dans la sclérothérapie de l'hydrocèle et du kyste épидидymaire ou encore dans l'urétrite non spécifique (**Ibrahim et al, 2018**).

La cicatrisation des plaies est un processus physiopathologique compliqué qui nécessite un microenvironnement favorable, dans lequel l'humidité est l'un des facteurs les plus importants (**Xu R. et al, 2016**). Il est maintenant communément admis qu'un environnement de plaie humide accélère la cicatrisation des plaies aiguës et chroniques et favorise la croissance de nouveaux tissus. Un environnement humide et équilibré de la plaie facilite la croissance cellulaire et la prolifération du collagène dans une matrice non cellulaire saine (**Schultz et al, 2003**).

Le concept de guérison des plaies humides a été examiné et progressivement accepté par les cliniciens en soins des plaies, et a mené au développement d'un pansement hydrogel qui soutient un environnement de plaie humide. Les hydrogels peuvent donner de l'humidité aux tissus déshydratés, absorber une partie de l'humidité d'une plaie exsudative et agir comme agents de débridement dans la gestion de diverses plaies (**Brassinne et Thirion, 2006 ; Lim et al., 2009**).

Les hydrogels à base de carboxyméthylcellulose (CMC) aident à guérir les plaies car ils maintiennent un environnement humide dans la zone environnante de la plaie, ce qui contribue à la prolifération et à la migration des fibroblastes et des kératinocytes. De plus, l'humidité pourrait servir à accentuer la croissance cellulaire, les enzymes, les facteurs de croissance et les hormones. De plus, ces hydrogels offrent des caractéristiques supérieures qui sont le débridement autolytique des tissus mouillants et nécrotiques et ils ne permettent pas la croissance des bactéries (**Vimala et al, 2020**).

D'après nos résultats, les plaies non diabétiques et diabétiques suivies par notre préparation ont évolué dans un milieu humide durant les deux premières semaines de suivi avec des différences significatives ($P < 0.05$) comparativement aux plaies témoins et celles suivies par la sulfadiazine argentique d'un point de vue quantité d'exsudat et d'hydratation.

En plus, le retrait des pansements couvrant les plaies gérées par le gel à base de miel se fait d'une façon facile et sans saignement ; cela prouve qu'il n'adhère pas fortement au lit de la plaie par contre le retrait de ceux couvrant les plaies contrôles et celles suivies par la sulfadiazine argentique entraînent des cries de plaintes des lapins et beaucoup de saignement à

cause d'une adhérence très solide au lit de ces dernières et par conséquent l'endommagement des tissus fragiles nouvellement formés entraînant un retard de cicatrisation.

Le miel a également une action d'élimination des mauvaises odeurs ; ceci peut être dû à son approvisionnement riche en glucose qui est métabolisé par les bactéries à la place des acides aminés (dont la métabolisation engendre des composés malodorants) (**Molan, 1999 ; Lusby *et al*, 2002 ; Matthews et Binnington, 2002**).

Aucune odeur n'a été ressentie durant toute la période d'évolution des plaies diabétiques et non diabétiques gérées par le gel à base de miel avec des différences significative ($p < 0,05$) à hautement significative ($p < 0,01$) comparativement à leurs homologues témoins et celles suivies par la sulfadiazine argentique.

La contraction de la plaie est un processus essentiel de la cicatrisation qui conduit à la fermeture de la plaie. Ainsi, les aspects cliniques et les mesures de contraction de la plaie deviennent des paramètres fiables dans l'évaluation macroscopique de la cicatrisation des plaies (**Gal *et al*, 2008**).

Dans la présente étude, les plaies non diabétiques gérées par le gel à base de miel ont présenté un meilleur taux de contraction par rapport à leurs homologues témoins et celles suivies par la sulfadiazine argentique avec des différences significatives ($P < 0.05$) à **j14** à **j21** et à **j28** ; Pour le groupe diabétique gérées par le gel à base de miel, une différence significative ($P < 0.05$) a été remarquée à **j14**.

Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par **Khiati et Moussa** en **2015** qui ont utilisé le miel d'euphorbe pour la cicatrisation des plaies de pleines épaisseurs chez des lapins non diabétiques et ont constaté que ce dernier accélérât la cicatrisation en augmentant le taux de contraction.

Ainsi que **Khiati *et al*, 2013** et en **2014** ont utilisé le miel d'euphorbe dans des cas cliniques ; l'énucléation chez une vache et une plaie traumatique étendue chez une jument et ont prouvé qu'il y avait une diminution considérable de la surface de la plaie.

En plus, **Young *et al*, (2014)** ont utilisé un hydrogel à base de carboxyméthylcellulose, miel de chine et la propolis pour la gestion des plaies chez des rats diabétiques et ont prouvé que cette préparation accélère la cicatrisation par augmentation de leurs taux de contraction.

Gill et al, (2019), ont comparé l'effet cicatrisant des miels de manuka et d'acacia incorporé au gel d'alginate de sodium avec celui de la sulfadiazine argentique comme traitement standard sur des plaies excisionnelles circulaires mesurant **500 mm²** chez des rats non diabétiques et diabétiques induit par la streptozotocine ; après 21 jours de suivi ces auteurs ont conclu que les miels de Manuka et d'acacia favorisaient la contraction et accélèrent l'épithélialisation des plaies diabétiques et non diabétiques d'une manière significative par rapport aux plaies contrôles et celles suivies par la sulfadiazine argentique.

Ces résultats montrent que notre préparation à base de miel est un agent contractant efficace capable de réduire les zones de plaie aussi efficacement que la sulfadiazine argentique, utilisée comme médicament topique de référence.

La contraction de la plaie joue un rôle important dans la fermeture des plaies de pleine épaisseur, où la peau environnante est attirée par des forces qui se développent à l'intérieur du tissu de granulation (**Ganeshkumar et al, 2012**).

Nos résultats ont montré un meilleur effet cicatrisant du gel à base de miel par rapport à la sulfadiazine argentique sur les plaies diabétiques et non diabétiques. En effet, le gel à base de miel réduit la durée d'épithélialisation de 3 jours en moyenne dans les deux groupes de lapins par rapport aux plaies suivies par le traitement conventionnel.

L'effet cicatrisant de notre préparation est attribuable aux divers constituants du miel, de la propolis et de la cire d'abeille.

Selon **Bahramsoltani et al,(2014)**, les produits naturels cicatrisants manifestent leurs effets grâce à l'un des mécanismes suivant: effet antimicrobien, anti-inflammatoire, antioxydant, stimulation de la synthèse du collagène, de la prolifération cellulaire et effets angiogéniques.

Dans notre expérimentation, nous avons observé un retard de fermeture des plaies des animaux diabétiques par rapport à ceux non diabétiques. Ce retard de cicatrisation macroscopique peut être expliqué, par un retard de la réépithélialisation et une contraction du tissu lésé moins importante chez les lapins diabétiques que chez les lapins non diabétiques.

La plupart des échantillons de propolis du monde entier contiennent des flavonoïdes (**Viuda-Martos et al, 2008**). Les flavonoïdes provenant de diverses sources se sont avérés

utiles pour la cicatrisation des plaies. **Geethalakshmi et al, 2013**, ont rapporté que la fraction flavonoïde de *Sphaeranthus amaranthoides* augmentait fortement le taux de contraction et d'épithélialisation de la plaie par rapport à la sulfadiazine d'argent.

Ainsi, on pourrait déduire que les flavonoïdes du miel et de la propolis sont responsables des effets cicatrisant de notre préparation sur les plaies diabétiques et non diabétiques.

Une étude réalisée par **Li-Wu et al, 2017** afin d'évaluer les effets de l'utilisation topique de la crème de sulfadiazine argentique sur la cicatrisation des plaies de pleines épaisseurs et les cicatrices hyper-trophiant chez le lapin.

Les résultats de cette étude démontrent que la sulfadiazine argentique contribue non seulement à une réépithélialisation altérée, mais également à une plus grande formation de cicatrices hypertrophiques.

Cho Lee et Hee Kyung (2003) Ont suggéré que l'altération de la régénération cutanée et la diminution de la résistance mécanique du tissu cutané résultent de l'effet cytotoxique de la sulfadiazine argentique sur les cellules dermiques.

Les plaies diabétiques et non diabétiques traitées à la sulfadiazine argentique présentent des taux de contraction inférieurs à leurs homologues gérées par le gel à base de miel et celles témoins cela pourrait être dû à leurs effets cytotoxiques cités par plusieurs auteurs (**Cho Lee et Hee Kyung , 2003 ; Li-Wu et al, 2017**) sur les fibroblastes.

Selon **Aljady et al (2000)** et **Yusof et al (2007)**, le miel accélère la cicatrisation des plaies en augmentant les contractions de la plaie en fournissant l'énergie nécessaire à l'activité contractile. En plus de cela, il améliore le dépôt de fibroblastes et de collagène qui est le principal facteur de guérison (**2000**).

Les prélèvements histologiques ont été effectués à j7, j14, j21 et j28 afin de suivre le déroulement des différentes phases du processus cicatriciel des plaies qui sont l'inflammation, la prolifération, la formation du tissu de granulation et l'épithélialisation.

Bien que l'inflammation soit un élément essentiel des réponses normales à une infection ou à une plaie excessive ou prolongée, elle peut entraver la cicatrisation des plaies

diabétiques ou même causer des dommages supplémentaires aux tissus de la plaie (**Molan, 2002**).

Les plaies diabétiques chez l'homme et chez l'animal sont caractérisées par une dérégulation des phases normales de la cicatrisation, avec un retard dans leur séquence habituelle. Alors qu'une phase inflammatoire initiale est temporairement présente dans les plaies non diabétiques ; par contre une persistance de l'inflammation est généralement observée dans les ulcères diabétiques (**Pierce, 2001**).

Nos résultats histologiques montrent une importante quantité de cellules inflammatoires au niveau des plaies diabétiques suivies par la sulfadiazine argentique à j 14 et j21, j28 et uniquement à j21 pour les plaies contrôles, ce qui démontre la persistance de l'inflammation.

Par contre le gel à base de miel a complètement normalisé la quantité des cellules inflammatoires au niveau des plaies diabétiques durant la même période de suivi avec des différences significative ($P < 0,05$) comparativement au traitement conventionnel. Le miel et la propolis sont connus pour avoir une activité anti-oxydante puissante et il est probable que grâce à ce mécanisme, ils normalisent la quantité de cellules inflammatoires.

La propolis favorise la cicatrisation des plaies cutanées en facilitant la formation de tissu de granulation, en stimulant la régénération épithéliale et en modulant le dépôt de la matrice extracellulaire (**Olczyk et al., 2013**).

La granulation et le dépôt de collagène augmentent graduellement par rapport au temps au niveau des plaies diabétiques et non diabétiques gérées par le gel à base de miel avec de faibles écarts par rapport à leurs homologues contrôles et celles suivies par la sulfadiazine argentique ; le gel à base de miel entraîne la formation d'un tissu de granulation bien organisé doté de fibres de collagènes d'orientation horizontale par contre un dépôt important de collagène est constaté au niveau des plaies cicatrisées traitées par la sulfadiazine argentique avec une différence significative ($P < 0,05$) à **j21** et à **j28**.

Cela est confirmé par **Qing, (2017)** qui a rapporté que la prolifération, la migration et la différenciation des kératinocytes sont essentielles pour la réépithélialisation de la plaie et la restauration de la barrière épidermique.

Les examens histopathologiques ont montré l'installation précoce d'un épithélium mature au niveau des plaies non diabétiques gérées par le gel à base de miel avec une différence significative ($P < 0,05$) à **j14** ; pour les plaies diabétiques, on a observé la formation d'un épithélium kératinisé bien régénéré et différencié et sans ulcération à **j28** avec une différence significative ($P < 0,05$).

Selon **Patrycja et al (2017)** qui ont montré que la propolis ou un mélange de diverses substances d'abeilles peut donc accélérer considérablement le processus de guérison des plaies diabétiques difficiles à cicatriser chez différentes espèces animales

A partir de ces résultats on peut suggérer que l'association du miel d'euphorbe, de la propolis et de la cire d'abeille sous forme de gel est bénéfique pour stimuler l'épithélialisation, la granulation, la régénération tissulaire et la revascularisation des plaies diabétiques et non diabétiques.

Conclusion

Différentes approches ont été adoptées dans le traitement des plaies diabétiques et non diabétiques, et les produits de la ruche sont certainement l'une de ces approches qui ont attiré l'attention des chercheurs.

Dans notre étude, nous avons essayé de démontrer l'efficacité d'une préparation à base de miel dans la gestion des plaies diabétiques sur un animal modèle.

L'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de notre gel à base de miel a suggéré la formation de fortes actions intermoléculaires sous forme d'attraction d'hydrogène, d'oxygène et de carbone entre le polymère, la propolis, le miel et la cire d'abeille.

L'exploration de l'effet antibactérien a montré une activité d'inhibition du gel à base de miel contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia. Coli* supérieure à celle de la sulfadiazine argentique avec une différence significative.

Notre gel à base de miel favorise la non adhérence du pansement à la surface des plaies, ce qui permet un retrait indolore et sans risque de lésion du néo-épithélium en formation.

Nos résultats planimétriques et histologiques ont révélé un effet cicatrisant réel de la combinaison des trois produits de la ruche à savoir : le miel, la propolis et la cire d'abeille, cet effet cicatrisant était significativement meilleur que celui de la sulfadiazine argentique.

Notre étude a démontré que l'application topique d'un gel à base de miel sur des plaies d'excision de pleine épaisseur chez des lapins diabétiques et non diabétiques favorise leur cicatrisation en réduisant leur période d'épithélialisation par une contraction importante.

La combinaison des trois produits de la ruche sous forme de gel pourrait être envisagée comme alternative à l'utilisation de la sulfadiazine argentique dans la gestion des plaies diabétiques et non diabétiques.

Par conséquent, le gel à base de miel est potentiellement utile pour la gestion des plaies, mais des études supplémentaires sont nécessaires afin de détailler les mécanismes spécifiques du miel, de la propolis et de la cire d'abeille.

Il est également nécessaire d'entreprendre d'autres études pour élucider les mécanismes d'action derrière cet effet cicatrisant de notre gel à base de miel ; plusieurs démarches expérimentales sont envisageables parmi lesquelles:

- La confirmation de l'effet synergétique des trois composants de notre préparation ;
- L'évaluation de la viabilité et prolifération des fibroblastes et kératinocytes ;
- Une étude immunohistochimique.

Références Bibliographiques

A

- **Abdellah F, C. Makhloufi, L.Boukraa, SM.Hammoudi, A.Safa, N.Dellel, A. Benamara, M.Benhadiri, N Marouf, R, Benaraba (2020).** Physico-chemical Properties and Antibacterial and Antioxidant Activity of Two Varieties of Honey from Algerian Steppe. *Journal of Apitherapy and Nature/Apiterapive Doğa Dergisi*, 3(2), 59-74.
- **Abercrombie. M , DW James et JF Newcombe(1960).**Wound contraction in rabbit skin, studied by splinting the wound margins. *J Anat.* ; 94 (Pt 2): 170–182.
- **Ahmad, J., Zubair, M., Malik, A., Siddiqui, M.A., and Wangnoo, S.K. (2012)** Cathepsin D, adiponectin, TNF-alpha, IL-6 and hsCRP plasma levels in subjects with diabetic foot and possible correlation with clinical variables: a multicentric study. *Foot (Edinb)* ; 22, 194-199.
- **Ahmad Tanveer Khan, Kok Khiang Peh (2003).** A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats. *J Pharm Pharmaceut Sci*; 6(1):20-26, 2003.
- **Aiken, A., Karuri, D., Wanyoro, A., Macleod, J (2012).** Interventional studies for preventing surgical site infections in sub-Saharan Africa—a systematic review. *Int. J. Surg.* 10, 242–249.
- **Aljady. A.M., M. Y. Kamaruddin, A. M. Jamal, andM. Y.Mohd Yassim (2000)**“Biochemical study on the efficacy ofMalaysian honey on inflicted wounds: an animal model,” *Medical Journal ofIslamic Academy of Science*, vol. 13, no. 3, pp. 125–132.
- **Alnaimat S, Wainwright M, Al'Abri K (2012)** Antibacterial potential of honey fromdifferent origins: A comparsion with Manuka Honey. *J Microb Biotech Food Sci.* ;1:1328-38.
- **Al-waili N.S., Salom K. And Al-Ghambi A.A. (2011)**Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice.The. *Scientific. World. J.*, 11; p 766-787.
- **AL-Waili Noori, Ahmad Al-Ghamdi, Mohammad Javed Ansari, Y. Al-Attal, KhelodSalom (2012)** ; Synergistic Effects of Honey and Propolis toward Drug Multi-Resistant Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli and Candida Albicans Isolates in Single and Polymicrobial Cultures. *Int. J. Med. Sci.* 2012, 9(9):793-800.
- **Al-Waili NS, Akmal M, Al-Waili FS, Saloom KY, Ali A. (2005)** The antimicrobial potential of honey from United Arab Emirates on some microbial isolates. *Med Sci Monit.* ;11(12):BR433-438.
- **Alzahrani H.A., Alsabehi R., Boukraâ L., Abdellah F., Bellik Y. And Bakhotmah B.A. (2012)** Antibacterial and Antioxidant Potency of Floral Honeys from Different Botanical and Geographical Origins.*Molecules.*, 17 ; p 10540-10549.
- **Amorim E, Matias JE, Coelho JC (2006).**Topic use of aqueous extract of *Orbignya phalerata* (babassu) in rats: analysis of its healing effect. *Acta Cir Bras.*;21(Suppl. 2):67-76.
- **Amy E. J., Carlos M. And Echazarreta. (1996)**Medical uses of honey. *Rev Biomed.*, 7; p 43-49.and 9th Egypt.
- **Anderson, T., Schein, P.S., McMenamin, M.G., Cooney, D.A (1974)** Streptozotocin diabetes: correlation with extent of depression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Clin. Invest.* 54, 672–677
- **Ankur Rohilla and Shahjad Ali (2012).** Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects ;*ijrpbs* ; Vol. 3 (2) Apr – Jun.

- **Apimondia-standing commission of apitherapy(2001)**Traité d'Apithérapie, La médecine par les abeilles [cédérom] v.1.01 PC-Mac Produit par Api-Ar International SA R Brussels. ISBN : 29600270-0-0.
- **Archer H.G., Barneti S., Irving S., Middleton K.R. And Seal D.V. (1990)** A controlled model of moist wound healing: comparison between semi permeable film, antiseptics an sugar paste. *Exp. path.*, 0471; p155-170.
- **Arnold F, West DC (1991)** Angiogenesis in wound healing, *Pharmac*, 52:407-422.
- **Arvy L., More J. (1975)** Histological atlas of the rabbit Paris, Maloine, 308 pp, 13-23.
- **Ashcroft, F.M., Rorsman, P (2012)**. Diabetes mellitus and the β cell: The last ten years. *Cell* 148, 1160–1171.
- **Asrafuzzaman, M., Cao, Y., Afroz, R., Kamato, D., Gray, S., Little, P.J (2017)**. Animal models for assessing the impact of natural products on the aetiology and metabolic pathophysiology of Type 2 diabetes. *Biomed. Pharmacother.* 89, 1242–1251.
- **Assie B.(2004)** In : Thèse d'Etat de Médecine : « Le miel comme agent cicatrisant ». Université Toulouse III Paul Sabatier. Faculté de Médecine.
- **Atrott J., Haberlau S., Henle T. (2012)**.Studies on the formation of methylglyoxal from dihydroxyacetone in Manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res.* 1;361:7-11.
- **Attia W.Y., Gabrys M.S., El-Shaikh K.A. And Othman G.A. (2008)** The anti-tumor effect of bee honey in Ehrlich ascite tumor model of mice is coincided with stimulation of the immune cells. *Egypt J. Immunol.* 15(2); p 169-183.

B

- **Bacevic .M, Eric .R, Regis .R, Pierre .D, France .L (2020)**. Practical considerations for reducing mortality rates in alloxan-induced diabetic rabbits. *Heliyon* 6. e04103.
- **Bahramsoltani .R, Mohammad .H .F, Roja .R (2014)** Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review.*Arch Dermatol Res.* Sep;306(7):601-17.
- **Ballot F. C. (2009)** Miels et gelée royale : leur origine, leur nature, leur composition et leurs propriétés reconnues. *Phytotes.*, 7(2); p 87-90.
- **Bandyopadhyay, B., Fan, J., Guan, S., Li, Y., Chen, M., Woodley, D.T., and Li, W.(2006)** A "traffic control" role for TGFbeta3: orchestrating dermal and epidermal cell motility during wound healing. *J Cell Biol* ;172, 1093-1105.
- **Bankova V., Marcucci M.C., Simova S., Nikolova N., Kujumgiev A. And Popov S.(1996)**Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Z Naturforsch C.*, 51(5-6) ; p 277-280.
- **Bannon, P., Wood, S., Restivo, T., Campbell, L., Hardman, M.J., and Mace, K.A. (2013)** Diabetes induces stable intrinsic changes to myeloid cells that contribute to chronic inflammation during wound healing in mice. *Disease models & mechanisms* ;6, 1434-1447.
- **Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2008)** Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*

:official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society ;16, 585-601.

- **Battell ML, Yuen VG, Verma S, McNeil JH.(1999)** Other models of type 1 diabetes. In: McNeil JH, editor. *Experimental models of diabetes*. Florida, USA: CRC Press LLC; p. 219-29.
- **Bayat, A., McGrouther, D.A., and Ferguson, M.W. (2003).** Skin scarring. *Bmj* 326, 88-92.
- **Bellik Y etBoukraâ L. (2013)** Antimicrobial Properties of Propolis In : Tahira F and Akhlak F. Beneficial Effects of Propolis for Health and Chronic Diseases. Nova Sciences, USA., p 189-208.
- **Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M. And Facino R.M. (2005)** Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta.*, 533; p 185–191.
- **Betts J.A. And Molan P.C. (2001)**A pilot trial of honey as a wound dressing has shown the importance of the way that honey is applied to wounds. Paper of the European Wound Management Association Conference, Dublin, Eire.
- **Bilal, S., Hussain, I., Bhat, S. A., Ahmad, S. P., Parrah, J .D., Brahm K. Tiwari and Abidi, A .B (2014).** wound healing parameters at different time intervals in excision wounds of rabbit. *I J R S R*, vol. 5, issue, 3, pp.590-592.
- **Billingham. R. E, Russell P.S (1956).**studies on wound healing, with special reference to the phenomenon of contracture in experimental wounds in rabbits' skin.*ann surg.* dec; 144 (6): 961–981.
- **Bilsel Y., Bugra D., Yamaner S., Bulut T., Cevikbas U. And Turkoglu U. (2002)**Could honey have a place in colitis therapy? Effects of honey, prednisolone, an disulfiram on inflammation, nitric oxide, and free radical formation. *Dig. Surg.*, 19; p 306-311.
- **Biri M, (1999).** Le grand livre des abeilles. L'apiculture moderne. Edition vecchi S. A paris.
- **Bishop, A. (2008)** Role of oxygen in wound healing. *Journal of wound care* ;17, 399-402.
- **Bitar, M.S (1997)** Insulin-like growth factor 1 reverses diabetes-induced wound healing impairment in rats. *Horm Metab Res.* 1997, **29**, 383-386.
- **Bitar, M.S (2000)**Insulin and glucocorticoid-dependent supression of the IGF-1 (Insulin-Like Growth Factor-1) system in the diabetic wounds. *Surgery*, **127** (6), 687-695.
- **Bitar, M.S. Farook, T. Wahid, S. et al (1999).** Glucocorticoid-dependent impairment of wound healing in experimental diabetes : amelioration by adrenalectomy and RU 486. *J Surg Res*, **82**, 234-243.
- **Bitar, M.S. Labbad, Z.N (1996)** Transforming growth factor b and insulin-like growth factor 1 in relation to diabetes-induced impairment of wound healing. *J Surg Res.* 1996, **61**, 113-119.
- **Blakytny, R., and Jude, E. (2006)** The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med* ;23, 594-608.
- **Blanc M.(2010)** In : Thèse de doctorat : Propriétés et usage médical des produits de la ruche. Pharmacie. Limoges : Université de Limoges.

- **Blanc Mickaël (2010).** Propriétés et usage médical des produits de la ruche. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie .UNIVERSITE DE LIMOGES, p : 36-37.
- **Bogdanov S. (1997)** Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebens. Wiss. Technol.*, 30; p 748-753.
- **Boitard C (1995).** Le diabète insulino-dépendant. *Médecine thérapeutique.*, 1: 123-37.
- **Bonvehì, J. S., & Coll, F. V. (2000)** Study on propolis quality from China and Uruguay. *Z Naturforsch C J. Biosci.*, 55(9-10): 778-784.
- **Bonvehì, J. S., Gutiérrez, A. L. (2012)** The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World J. Microb. Biot.*, 28: 1351-1358.
- **Boukraâ L.(2013)** Healing Properties of Honey In :Honey in Traditional and Modern Medicine.CRC Press., P 37-57.
- **Boukraâ L. (2008)** Additive Activity of Royal Jelly and Honey Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Altern Med Rev.*, 13(4) ; p 330-333.
- **Boukraâ L.(2013)** Honey in Burn and Wound Management In : Honey in Traditional and Modern Medicine.CRC Press., P 124-156.
- **Boukraâ L. And Bouchegrane (2007)** Additive action of honey and starch against *Candida albicans* and *Aspergillus Niger*. *Rev. Iberoam. Micol.*, 24(04); p 309-311.
- **Boukraâ L. And Sulaiman S.A.(2010)** Honey Use in Burn Management: Potentials and Limitations. *Forsch Komplementmed*; 17:74–80.
- **Boukraâ L. And Sulaiman SA.(2009)** Rediscovering the antibiotics of the hive. *Recent. Pat. Antiinfect. Drug. Discov.*, 4(3) ; p 206-213.
- **Boukraâ L., Meslem A., Benhanifia M. And Hammoudi S.M.(2009)** Synergistic effect of starch and royal jelly against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Altern. Complement. Med.*, 15(7) ; p 755-757.
- **Boukraâ L., Fatiha Abdellah And Leïla Ait-Abderrahim. (2013)** Antimicrobial Properties of Bee Products and Medicinal Plants. *Microbial pathogens and strategies for combating them. Microscopy: science, technology and education (A. Méndez-Vilas, Ed.)*, p 960-970.
- **Boulton, A.J., Vileikyte, L., Ragnarson-Tennvall, G., and Apelqvist, J. (2005).** The global burden of diabetic foot disease. *Lancet* 366, 1719-1724.
- **Bourabah A, A. Titri, K. Heni, M. Ahmad, A. Aissa (2020)** evaluation of antibacterial activity and additive effect between casein and two types of algerian honey. *Advances in Biology & Earth Sciences* Vol.5, No.2, pp.128-134.
- **Braun, J.P.(2001)** Biochimie du collagène. *Biochimie des Protides, II. Protides et Acides Nucleiques*. 2eme edition. 174-184 *Cours de Biochimie Vétérinaire*, ENVT.
- **Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2007)** Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of clinical investigation* ;117, 1219-1222.
- **Bruneau E.(2009)** Les produits de la ruche In : Clément H. et al. *Le Traité Rustica del'apiculture*. Editions Rustica., Paris ; p 354-387.

C

- **Caillas A. (1974).** La propolis, in L'Abeille de France et l'Apiculteur, Mars, 1974. P : 97-98.
- **Campos, D (1998)** Utilisation des nouveaux pansements occlusifs dans le traitement des plaies. Th. : Med. Vet. : Toulouse :TOU 3, 4068.
- **Castaldo S, Capasso F. (2002).** Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*; 73(Suppl 1): S1-S6.
- **Chant. A (1999).** "The biomechanics of leg ulceration," *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, vol. 81, no. 2, p : 80–85.
- **Chauvin R. (1968).** Traité de la biologie de l'abeille, Masson et Cie, éditeurs, Paris. PP : 66-
- **Cheta, D (1998)** Animal models of type I (insulin-dependant) diabetes mellitus. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*11: 11-19.
- **Cheta. D (1998).** Animal models of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus, *J. Pediatr.*
- **Cho LeeAe-Ri etHee Kyung Moon (2003).** Effect of topically applied silver sulfadiazine on fibroblast cell proliferation and biomechanical properties of the wound. *Archives of Pharmacal Research.* 26, pages855–860.
- **Clark, R. A. F (1993)** Biology of dermal wound repair. *Dermatol. Clin.* 11:647-666.
- **Clément M.C. (2002).** Melissopalynologie en Nouvelle-Caledonie, importance des spectres
- **Clément, H., Conte, Y. L., Barbancon, J.-M., Vaissière, B. & Collectif. (2011).** Le traité rustica de l'apiculture. (Rustica éditions).
- **Cohen, I. K., Diegelmann, R. F., and Crossland, M. C (1994)** Wound care and wound healing. In Principles of Surgery (Schwartz, S. I., Shires, G. T., Spencer, F. C., and Cowles Husser, W., eds). *McGraw-Hill, New-York.*1994 pp. 279-303.
- **Colwell, A.S., Longaker, M.T., and Lorenz, H.P. (2003).** Fetal wound healing. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8, s1240-1248.
- **Cooper R. (2007)** Honey in wound care: antibacterial properties.GMS. *Krankenhaushyg. Interdiszip.*, 2(2); p 51.
- **Cooper R.A. And Molan P.C. (1999)**Honey in wound care. *J. Wound. Care.*, 8(8); p 340.
- **Cooper R.A., Molan P.C. And Harding K.G.(1999)** Antibacterial activity of honey against strains of *staphylococcus aureus* from infected wounds. *J. R. Soc. Med.*, 92(6) ; p 283-285.
- **Cooper R.A.,Molan P.C. And Harding K.G. (2002)** The sensitivity to honey of gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *J. Appl. Microbiol.*, 93(5), p 857-863.
- **Cooper, D.M., Yu, E.Z., Hennessey, P., Ko, F., and Robson, M.C. (1994)** Determination of endogenous cytokines in chronic wounds. *Ann Surg* ; 219, 688-691.
- **Couquet Y (2013).** Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel. *Actualités pharmaceutiques.* dossier n° 531.10.005.
- **Crane, S.W(1989)** Nutritional aspects of wound healing. *Sem Vet Med*, 4, 263-267.

D

- Danaei, G., Finucane, M.M., Lu, Y., Singh, G.M., Cowan, M.J., Paciorek, C.J., Lin, J.K., Diana G. Sami, Hana H. Heiba, Ahmed Abdellatif (2019) Wound healing models: A systematic review of animal and non-animal models. *Wound Medicine* ; 24 ; 8–17.
- DelaBrassinne, M., Thirion, L. (2006) A novel method of comparing the healing properties of two hydrogels in chronic leg ulcers. *European Academy of Dermatology and Venereology* 20, 131–135.
- Delagoutte C. (1977) Maladies et affections de la peau chez le lapin domestique Thèse de doctorat vétérinaire, Université Paul Sabatier, Toulouse, 64 p.
- Delverdier M, Bret L. Raymond I, Magnol JP (1993) La réaction inflammatoire : II Dynamique et signification biologique. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*; 28 : 589-603.
- Delverdier M. (2002) Aspects morphologiques et chronologiques de la réaction inflammatoire. Dans Cours d'anatomie pathologique de deuxième année du deuxième cycle. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
- Delverdier, M (2002) La dynamique de la réaction inflammatoire. *Cours d'anatomie pathologie générale*. ENVT.
- Deodhar, A.K. Rana, R.E (1997) Surgical physiology of wound healing : a review. *J Postgrad Med.* ,43, 52-56.
- Dereure O (2001) Dynamique de la cicatrisation normale. In : *Plaie et cicatrisations au quotidien*. Montpellier : Saurampus médical , 15-21.
- Descottes B. (2009) Cicatrisation par le miel, l'expérience de 25 années. *Phytothérapie.*, 7(2) ; p 112-116.
- Dinh, T., Tecilazich, F., Kafanas, A., Doupis, J., Gnardellis, C., Leal, E., Tellechea, A., Pradhan, L., Lyons, T.E., Giurini, J.M., and Veves, A. (2012) Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration. *Diabetes* ;61, 2937-2947.
- Domerego R., Imbert G. Et Blanchard C. (2009) Les remèdes de la ruche. Editions. Alpens., Monaco ; p 95.
- Dyson, M., and Bannister, L. H (1995) Integumental system: skin and breasts. In Gray's anatomy (Williams, P. L., ed). *Churchill Livingstone, New-York*. pp. 412-417.

E

- Efem S .E. (1988) Clinical observations on the wound healing properties of honey 183. *Br. J. Surg.*, 75; p 679-681.
- Efem S.E (1993) Recent advances. In: The management of Fournier's gangrene: preliminary observations. *Surgery.*, 113(2); p 200-204.
- Efem S.E., Udoh K.T. and Iwara C.I. (1992) The antibacterial spectrum of honey and its clinical significance. *Infect.*, 20; p 227-229.
- Elkhenany, H., N. El-Badri et M. Dhar (2019). «L'extrait de propolis verte favorise la prolifération, la différenciation et la migration in vitro des cellules stromales de la moelle osseuse.» *Biomédecine et pharmacothérapie ; Biomédecine et pharmacothérapie* 115.

- **Etuk EU (2010).** Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric Biol J N Am*;1:130-4.

F

- **Fadini, G.P., Sartore, S., Agostini, C., and Avogaro, A. (2007)** Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes. *Diabetes Care* ; 30, 1305-1313.
- **Falanga, V. (1993)** Growth factors and wound healing. *J Dermatol Surg Oncol* ;19, 711-714.
- **Falanga, V. (2005).** Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*366, 1736-1743.
- **Farzadfar, F., Khang, Y.H., Stevens, G.A., (2011).** National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 378, 31-40.
- **Fenichel P., Hieronimus S., Gillet J.Y., Harter M. (1998).** Diabète et grossesse, In : Encyclopédie Médico-Chirurgicale : Endocrino-Nutrition, Paris : Editions scientifiques et médicales Elsevier Masson SAS, p : 7.
- **Ferraq M.Y (2007)**Développement d'un modèle de cicatrisation épidermique après une désépidermisation laser.thèse de doctorat ; p13.
- **Filippo Fratini, Giovanni Cilia, Barbara Turchi, Antonio Felicioli (2016)** Beeswax: A mini review of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*; 9(9):839–843.
- **Fong, G.H. (2008)** Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis* ;11, 121-140.
- **Fowler, D (1993)** Principles of wound healing. In HARARI, J : Surgical complications and wound healing in the small animal practice.*Philadelphia, Saunders, W.B.*, 1-31.
- **Frykberg RG, Banks J.(2015).**Challenges in the treatment of chronic wounds. *Adv Wound Care(New Rochelle).*;4(9):560–582.

G

- **Gabrys J., Konecki J., Krol W., Scheller S. And Shani J.(1986)**Free amino acids in bee hive product (propolis) as identified and quantified gas-liquid chromatography.*Pharmacol. Res. Commun.*, 18(6) ; p 513-518.
- **Gal. P, R. Kilik, M. Mokry (2008)** “Simple method of open skin wound healing model in corticosteroid-treated and diabetic rats: standardization of semi-quantitative and quantitative histological assessments,” *Veterinarni Medicina*, vol. 53, no. 12, pp. 652–659.
- **Ganeshkumar M, Ponrasu T, Krithika R, Iyappan K, Gayathri VS, Suguna L (2012)** L'application topique d'*Acalypha indica* accélère la cicatrisation cutanée du rat en régulant à la hausse l'expression du collagène de type I et III. *J Ethnopharmacol.* 142 (1): 14-22.

- **Gartener, M.H. Benson, J.D. Caldwell, M.D.(1992)** Insulin-like growth factor 1 and 2 expression in the healing wounds. *J Surg Res.* **52**, 389-384.
- **Geethalakshmi R, Sakravarthi C, Kritika T, Arul Kirubakaran M, Sarada DV(2013)** Évaluation des potentiels antioxydants et cicatrisants de *Sphaeranthus amaranthoides* Burm.f. *Biomed Res Int.* 607109.
- **Ghanem. N (2011)**, Étude sur l'activité antimicrobienne des produits du miel et de certaines substances folkloriques saoudiennes ,*Res J Biotech* , 6 , pp. 38 – 43.
- **Giacco, F., and Brownlee, M. (2010)** Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research* ;107, 1058-1070.
- **Gill R, Basavaraj P, Laxminarayana K. Bairy, Kumar S. E. Praveen (2019)** Comparative Evaluation of Wound Healing Potential of Manuka and Acacia Honey in Diabetic and Nondiabetic Rats,*Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* · 27 April ;11 : 116-126.
- **Giugliano, D., Ceriello, A., and Paolisso, G. (1996)** Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* ;19, 257-267.
- **Gonnet M.(1982)** Le miel. Composition, propriétés, conservation. O.P.I.D.A. France, p 31.
- **Gonsales, G. Z., Orsi, R. O., Fernandes Júnior, A., Rodrigues, P., &Funari, S. R. C. (2006)** Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins*, 12(2): 276-284.
- **Gopal Shankar Krishnakumara, Balaji Mahendirana, Subiksha Gopalakrishnanb, Shalini Muthusamy, Sinduja Malarkodi Elangovanb(2020)** Honey based treatment strategies for infected wounds and burns: A systematic review of recent pre-clinical research ;*Wound Medicine* 30, 100188.
- **Goren, I., Kampfer, H., Podda, M., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2003)** Leptin and wound inflammation in diabetic ob/ob mice: differential regulation of neutrophil and macrophage influx and a potential role for the scab as a sink for inflammatory cells and mediators. *Diabetes* ;52, 2821-2832.
- **Goren, I., Muller, E., Schiefelbein, D., Christen, U., Pfeilschifter, J., Muhl, H., and Frank, S. (2007)** Systemic anti-TNFalpha treatment restores diabetes-impaired skin repair in ob/ob mice by inactivation of macrophages. *J Invest Dermatol* :127, 2259-2267.
- **Gosain, A., and DiPietro, L.A. (2004)**. Aging and wound healing. *World journal of surgery* 28, 321-326.
- **Gout J. & Jardel C. (1998)**. Le monde du miel et des abeilles, Delachaux et Niestlé, 160p.
- **Greenhalgh, D.G., Sprugel, K.H., Murray, M.J., and Ross, R. (1990)** PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *The American journal of pathology* ;136, 1235-1246.
- **Gregory C.R. (1999)**Wound healing and influencing facteurs. In: Fowler D, John M. Manual of canine and feline wound management and Reconstruction. B.S.A.V.A (Ed); p 13-23.
- **Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., and Longaker, M.T. (2008)**. Wound repair and regeneration. *Nature*453, 314-321.

- **Guvakova, M.A. (2007)** Insulin-like growth factors control cell migration in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* ;39, 890-909.

H

- **Hakim, F.S. Shetty, S. Sidway, A. (1993)** Increased specific binding of insulin-like growth factor 1 in healing cutaneous wounds. *Wound Repair Regen.* **3**, 492-499.
- **Haderbache Latifa, Bousdira Mouna and Mohammedi Arezki (2013)** Ziziphus Lotus and Euphorbia bupleuroides Algerian Honey. *World Applied Sciences Journal* 24 (11): 1536-1543.
- **Hedlund C.S. (2007)** Surgery of the integumentary system. In: Fossum T.W. Small animal surgery. 3th Ed., Mosby. Elsevier (Ed); p 159-192.
- **Hegazi A.G. And El-hady F.K.A. (2009)** Influence of honey on the suppression of human low density lipoprotein (LDL) peroxidation (in vitro). *Evid. Based. Complement. Altern. Med.*, 6 (1); p 113-121.
- **Hegazi, A. G (1997)**. Propolis an overview. International Symposium on Apitherapy Cairo 8.
- **Herszage L., Montenegro JR. And Joseph AL. (1980)** Tratamiento de las heridas supuradas con acúcar granulado comercial. *Bol. Trab. Soc. Argent. Or.*, 41(21-22); p 315-330.
- **Hickey, M.M., and Simon, M.C. (2006)** Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Curr Top Dev Biol* ;76, 217-257.
- **Hirapara H, Ghori V, Anovadiya A, Baxi S, Tripathi C. (2017)** Effects of ethanolic Extract of *Jasminum grandiflorum* Linn. Flowers on Wound Healing in Diabetic *Wistar* Albino Rats. *Avicenna J Phytomed.*; 7 (5): 401-408.
- **Hiren Hirapara, Vishal Ghori, Ashish Anovadiya, Seema Baxi, Chandrabhanu Tripathi (2017)** Effects of ethanolic extract of *Jasminum grandiflorum* Linn. flowers on wound healing in diabetic *Wistar* albino rats. *AJP*, Vol. 7, No. 5, Sep-Oct.
- **Howell-Jones, R.; Wilson, M.; Hill, K.; Howard, A.; Price, P.; Thomas, D. (2005)** A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *J. Antimicrob. Chemother.* 55 (2), 143–149.
- **Hosgood G. (1993)** Wound healing. The role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Vet. Surg.*, 22(6); p 490-495.
- **Hosgood, G. (2006)**. Stages of wound healing and their clinical relevance. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 36, 667-685.
- **Howell-Jones, R.; Wilson, M.; Hill, K.; Howard, A.; Price, P.; Thomas, D (2005)** A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *J. Antimicrob. Chemother.* 55 (2), 143–149.
- **Huchet Julie C, Laurent G. (1996)** : Les constituants chimiques du miel. Ecole nationale
- **Huralikuppi J.C. (1991)**. Antidiabetic effect of *Nelumbo nucifera* extract: Part 2. *Phytother. Res.*, 5. 217-223.

I

- **Ibrahim N.I, Sok Kuan Wong , Isa Naina Mohamed, Norazlina Mohamed , Kok-Yong Chin , Soelaiman Ima-Nirwana and Ahmad Nazrun Shuid (2018)** Wound Healing Properties of Selected Natural Products , *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 15, 2360.
- **Iftikhar F., Arshad M., Rasheed F., Amraiz D., Anwar P. And gulfraz M. (2010)** Effects of acacia honey on wound healing in various rat models. *Phytother. Res.*, 24(4); p 583-586.
- **Ingber DE, Folkman J (1989)** How does extracellular matrix control capillary morphogenesis., *Cell*, 1989. 58: 803-805;
- **Iranloye BO, Arikawe AP, Rotimi G, Sogbade AO (2011)** Anti-diabetic and antioxidant effects of Zingiber Officinale on alloxan-induced and insulin-resistant diabetic male rats. *Niger J Physiol Sci* ;26:89-96.

J

- **Jeffrey A.E. and Echazarreta C.M. (1996)** Medical uses of honey. *Rev. Biomed.*, 7(1); p: 43-49.
- **Jianpu Wang, Rongwan, Yiqun Mo, Qunwei Zhang, Leslie C. Sherwood, and Sufan Chien. Creating a Long-Term Diabetic Rabbit Model (2010).** *Experimental Diabetes Research*. pages 10.
- **Johnston D.E. (1992)** Cicatrisation des plaies cutanées. *Point vétérinaire*, 24(numéro spécial "chirurgie plastique et reconstructrice") ; p 21-34.
- **Jude, E.B., Blakytyn, R., Bulmer, J., Boulton, A.J., and Ferguson, M.W. (2002)** Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabet Med* ; 19, 440-447.

K

- **Khiati Baghdad and Moussa Ahmed (2015)** .Comparison of efficacy of unheated and heat-treated Sahara honey on wound healing in rabbits. *Journal of Coastal Life Medicine*; 3(2):162-165.
- **Khiati Baghdad, Salima Bacha, Saad Aissat, Moussa Ahmed (2014).** The use of Algerian honey on cutaneous wound healing: a case report and review of the literature. *Asian Pac J Trop Dis*; 4(Suppl 2): S867-S869.
- **Khiati B, Bacha S, Ahmed M, Aissat S, Meslem A, Djebli N (2013).** Wound care with Euphorbia honey after nucleation: a case report. *Clin Microbiol* ;2: 129.
- **Kishi, K., Okabe, K., Shimizu, R., and Kubota, Y. (2012)** Fetal skin possesses the ability to regenerate completely: complete regeneration of skin. *The Keio journal of medicine* 61, 101-108.
- **Kimmel, B., Inzucchi, S.E (2005)** Oral Agents for Type 2 Diabetes: An Update. *Clin. Diabetes* 23, 64–76.
- **Kim .Min-HO, Itsukyo Yamayoshi, Steven Mathew, Hubert Lin, Joseph Nayfach, and Scott I. Simon(2012)** Magnetic Nanoparticle Targeted Hyperthermia of Cutaneous *Staphylococcus aureus* Infection ; *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 41, No. 3, March pp. 598–609.

- **Kim, K.A., Shin, Y.J., Kim, J.H., Lee, H., Noh, S.Y., Jang, S.H., and Bae, O.N. (2012).** Dysfunction of endothelial progenitor cells under diabetic conditions and its underlying mechanisms. *Arch Pharm Res* ;35, 223-234.
- **Koechler .S (2015)** Le miel dans la cicatrisation des plaies : Un nouveau médicament : thèse Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie : p 10.
- **Kruger DF, Lorenzi GM, Dokken BB, Sadler CE, Mann K, Valentine V. (2012).**Managing diabetes with integrated teams: maximizing your efforts with limited time. *Postgrad Med* ;124:64-76.
- **Kumar A., Sharma V.K., Singh H.P., Prakash P. And Singh S.P. (1993)** Efficacy of some indigenous drugs in tissue repair in buffaloes. *Indian Vet J.*, 70 (1); p 42-44.
- **Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999)**Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.*, 64(3): 235-240.
- **Kwakman P.H.S., Veldete A.A., de Boer L., Speijer D., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E. And Zaat S.A.J. (2010)**How honey kills bacteria. *F.A.S.E.B. J.*, 24(7); p 2576-2582.

L

- **LachmanJ., HejtmánkováA., Sýkora J., KarbanJ., Orsák M. AndRygerová B. (2010)** Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *LWT-Food Sci Technol.*, 43(1) ; p 52-58.
- **Lazarow.A (1952).** Spontaneous recovery from alloxan diabetes in the rat, *Diabetes* 1 (5) 363–372.
- **Lemo Niksa , Geneviève Marignac , Edouard Reyes-Gomez, Thomas Lilin, Odile Crosaz, and David M. Dohan Ehrenfest (2010).** Cutaneous reepithelialization and wound contraction after utaneous reepithelialization and wound contraction after skin biopsies in rabbits: a mathematical model for healing and kin biopsies in rabbits: a mathematical model for healing and remodelling index. *Vet. arhiv* 80 (5), 637-652.
- **LE Roith, D (1997)** Insulin-like growth factors. *New Engl J Med.*, **336**, 633-640.
- **Le Roith, D. Clemmons, D. Nissley, P. et al (1992)** Insulin-like growth factor 1 in health and disease. *Ann Intern Med.* **116**, 854-862.
- **Leila Ait Abderrahim , Khaled Taïbi , Nawel Ait Abderrahim, Mohamed Boussaid , Cesar Rios-Navarro , Amparo Ruiz-Saurí. (2019)** Euphorbia honey and garlic: Biological activity and burn wound recovery. *burns* 45 1695 – 1706.
- **Lenzen, S., Freytag, S., Panten, U.W.E (1988)** Inhibition of Glucokinase by Alloxan through Interaction Groups in the Sugar-Binding Site of the Enzyme. *Mol Pharmacol* 34, 395–400.
- **Leroy J.(1999)** Diabète sucré, In : Encyclopédie vétérinaire, Paris, Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Endocrinologie : 0900.
- **Lim,Y.M.,An,S.J.,Kim,H.K.,Kim,Y.H.,Youn,M.H.,Gwon,H.J.,Shin,J.H.,Nho,Y.C (2009)**Preparationofhydrogelsforatopicdermatitiscontainingnaturalherbalextractsbygamma-ray irradiation.*RadiationPhysicsandChemistry*78, 441–444.

- **Linder K, Nicolau D, Nailor M (2016)** Predicting and preventing antimicrobial resistance utilizing pharmacodynamics: Part I Gram positive bacteria. *Expert Opin Drug Met* 12: 267–280.
- **Li P, Wu LL, Li BJ, Zhao YB, Qu P (2016)** Highly water-dispersible silver sulfadiazine decorated with polyvinylpyrrolidone and its antibacterial activities. *Mater Sci Eng C-Mater BiolAppl*60:54-59.
- **Li-Wu Qian, Andrea B Fourcaudot , Kai P Leung (2017).** Silver Sulfadiazine Retards Wound Healing and Increases Hypertrophic Scarring in a Rabbit Ear Excisional Wound Model. *J Burn Care Res.* Jan / Fév; 38 (1): e418-e422.
- **Lobmann, R., Ambrosch, A., Schultz, G., Waldmann, K., Schiweck, S., and Lehnert, H. (2002)** Expression of matrixmetalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia* ;45, 1011-1016.
- **Lobmann, R., Schultz, G., and Lehnert, H. (2005)** Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications. *Diabetes Care* ;28, 461-471.
- **Lotfy, M., Badra, G., Burham, W., Alenzi, F.Q., (2006).** Combined use of honey, bee propolis and myrrh in healing a deep, infected wound in a patient with diabetes mellitus. *Brit. J. Biomed. Sci.* 63, 171-173.
- **Lusby P.E., Coombes A. And Wilkinson J.M. (2002)** Honey: a potent agent for wound healing. *WOCN.*, 29(6); p 295-300.

M

- **Madri J, Marx M (1992)** Matrix composition, organization and soluble factors : modulators of micro vascular cell differentiation in vitro, *kidney Intern*, 41:560-565.
- **Maione TE, Gray GS, Petro J, Hunt AJ, Donner AL, Bauer SI, Carson HF, Sharpe RJ (1990)** Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor and related peptides, *Science*, 247: 77-79.
- **Majack RA, Majesky MW, Goodman LV (1990)** Role of PDGF-A expression in the control of vascular smooth muscle cell growth by TGF β , *J Cell Biol*, 111:239-247.
- **Malnoux. B. (1991)** Troubles endocriniens et hyperpigmentation de la peau chez le chien (étude de 478 cascliniques)Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine, Nantes, 94 p.
- **Man E, Hoskins C.(2020)** Towards advanced wound regeneration. *Eur J Pharm Sci.* ;149:105360.
- **Marchenay P, Berard L. (2007)**L’homme, l’abeille et le miel. Editions De Borée, Romagnant, 224 p.
- **Marion Marcet (2017).** La cicatrisation des brûlures par le miel. Sciences pharmaceutiques. 2017. ffdumas01657277f.p : 84-85.
- **Martin E. Wendelken,;William T. Berg, ;Philip Lichtenstein, BS;Lee Markowitz;Christopher Comfort ;Oscar M. Alvarez (2011)**Wounds Measured From Digital Photographs Using Photodigital Planimetry Software: Validation and Rater Reliability. *WOUNDS* ;23(9):267–275.
- **Martin, P. (1997).** Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75-81.

- **Martinotti, S. et E. Ranzato (2015)** «Propolis: une nouvelle frontière pour la cicatrisation des plaies?» Brûlures et traumatismes 3.
- **Masood .N, Rashid Ahmed , Muhammad Tariq, Zahoor Ahmed , Muhammad Shareef Masoud , Imran Ali , Rehana Asghar , Anisa Andleeb , Anwarul Hasan (2019)** Silver nanoparticle impregnated chitosan-PEG hydrogel enhances wound healing in diabetes induced rabbits. *International Journal of Pharmaceutics*559 . 23–36.
- **Mast, B. A (1992)**The skin. In Wound healing, biochemical & clinical aspects (Cohen, K. I., Diegelmann, R. F., and Lindblad, W. J., eds); *W. B. Saunders, Philadelphia*. pp. 344-355.
- **Mathews K.A. And Binnington A.G. (2002)** Wound management using honey. *Compend Con Edu.*, 24; p 53-59.
- **Mathews, L.S. Norstedt, G. Palmiter, R.D (1986)** Regulation of insulin-like growth factor 1 gene expression by growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*. **83**, 9343-9347.
- **Maugendre D., Yaouanq J., Guilhem I., Campion L., Lorcy Y., Leguerrier A.M., Allannic H (2007)** Etiologie et physiopathologie des diabètes secondaires, In : Encyclopédie Médico-Chirurgicale : Endocrinologie-Nutrition, Paris : *Editions scientifiques et médicalesElsevier Masson SAS*, p : 6.
- **Mc Curray, J.F (1984)**Wound healing with diabetes mellitus. *Surg Clin North Am*. 1984, **4**, 769-777.
- **Mcewan Jenkinson D. (1970)** The distribution of nerves, monoamine-oxydase and cholinesterase in the skin of the guineapig, hamster, mouse, rabbit and rat *Res Vet Sc II*, 60-70.
- **McLoone P, Warnock M, Fyfe L(2016)** Honey: a realistic antimicrobial for disorders of the skin. *J Microbiol Immunol Infect*;49 (2):161–167.
- **McNulty, C., Rodgers, G. L., Mortensen, J. E. (2004)** An Overview of the Topical Antimicrobial Agents Used in the Treatment of Burn Wounds. *Continuing Education Topics & Issues*. Article 273, 0.1 CEC,74-78.
- **Medzhitov, R. (2008)**Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*454, 428-435.
- **Menghini, R., Uccioli, L., Vainieri, E., Pecchioli, C., Casagrande, V., Stoehr, R., Cardellini, M., Porzio, O., Rizza, S., and Federici, M. (2013)** Expression of tissue inhibitor of metalloprotease 3 is reduced in ischemic but not neuropathic ulcers from patients with type 2diabetes mellitus. *Acta Diabetol* ;50, 907-910.
- **Mialot, M (1993)** Histologie de la peau normale. Encyclopédie Vétérinaire, Paris. , *Dermatologie* 0100, 8p.
- **Mialot, M.(1993)** Histologie de la peau normale. Encyclopédie Vétérinaire, Paris., *Dermatologie* 0100, 8p.
- **Michiels, C., Arnould, T., and Remacle, J. (2000)** Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. *Biochim Biophys Acta* .1497, 1-10.
- **Miller, E. J., and Gay, S (1992)** Collagen structure and function. In Wound healing, biochemical & clinical aspects (Cohen, K. I., Diegelmann, R. F., and Lindblad, W. J., eds). *W. B. Saunders, Philadelphia*. pp. 130-151.
- **Mir S.Hand Darzi M.M (2009)** Histopathological abnormalities of prolonged alloxan-induced diabetes mellitus in rabbits. *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 90, no. 1, pp. 66–73.

- **Miraglio A.M., Beuchat L.R., Coulston A.M., Carl L.K., Nataro J.P. And Speckmann E.W. (2003)** Honey–Health and Therapeutic Qualities. Provided by the National Honey Board; P 1-28.
- **Mirza, R.E., Fang, M.M., Ennis, W.J., and Koh, T.J. (2013)** Blocking interleukin-1beta induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. *Diabetes* : 62, 2579-2587.
- **Mizuta, M. (2005)** Oxidative stress in diabetes. *Nihon Yakurigaku Zasshi* ;125, 125-128.
- **Moissonier P.(2002)** la cicatrisation des plaies. *Action. Vet.*, Edition spéciale chirurgie ; p 3-6.
- **Molan P C (2001)**Honey as a topical antibacterial agent for treatment of infected wounds. *Wide Wounds. com. Report*; p 1-13.
- **Molan P C (2002)**“Re-introducing honey in the management of wounds and ulcers-theory and practice,” *Ostomy/Wound management*, vol. 48, no. 11, p : 28–40.
- **Molan P.C (1992)**The antimicrobial activity of honey. *Bee. World.*, 73(1); p 5-28.
- **Molan P.C (2006)**Using honey in wound care. *Int. J. Clin. Aromather.*, 3(2); p 21-24.
- **Molan P.C. (1999)**The role of honey in the management of wounds. *J. Wound. Care.*, 8(8); p 415-418.
- **Molan P.C. (2009)**Why honey works.In: Cooper R, Molan P.C, White R. *Honey in modern wound management. Wounds UK (Ed)*; p 7-20.
- **Molan P.C. And Allen K.L (1996)**the effect of gamma-irradiation on the antibacterial activity of honey. *J.Pharm. Pharmacol.*, 48; p 1206-1209.
- **Monika Kędzińska-Matysek, Arkadiusz Matwijczuk, Mariusz Florek, Joanna Barłowska, Anna Wolanciuk, Alicja Matwijczuk, Edyta Chruściel, Radosław Walkowiak, Dariusz Karcz, and Bożena Gładyszewska (2018)** Application of FTIR spectroscopy for analysis of the quality of honey. *Contemporary Research Trends in Agricultural Engineering*.10, 02008.
- **Moumbe, F.G.P., Zambou, F., Kaktcham, M (2013).** Antimicrobial activity of probiotic strain *Lactobacillus plantarum* isolated from “SHA0A” and assessment of its viability in local honey. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 3, 226–231.
- **Moussa Ahmed , Djebli Noureddine, Hammoudi Si Mohamed, Meslem Abdelmelek, Aissat Saad (2012)**Antibacterial activity of various honey types of Algeria against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*.*Asian Pac J Trop Med* ; Oct;5(10):773-6
- **Muguet Audey. (2002)** Contribution à l’étude de la cicatrisation cutanée – développement d’un modèle expérimental de cicatrisation retardée par ischémie chez le lapin. Thèse présentée à l’université de Claude-Bernard- Lyon I (Médecine – Pharmacie) pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, 101p.
- **Mui Koon Tan, Durriyyah Sharifah Hasan Adli, Mohd Amzari Tumiran, Mahmood Ameen Abdulla and KamaruddinMohd Yusoff (2014)**The Efficacy of Gelam Honey Dressing towards Excisional Wound Healing ; Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2012, Article ID 805932, 6 pages.
- **Muller, G.H. Kirk, R.W. Scott, D.W (1989)** Structure and function of the skin.In :*Small animal dermatology*. 4th ed., Philadelphia, W.B. Saunders, 1989, 1-48.

- **Murase, H., Shimazawa, M., Kakino, M., Ichihara, K., Tsuruma, K., Hara, H., (2013)**The effects of brazilian green propolis against excessive light-induced cell damage in retina and fibroblast cells. *Evid-Based Compl. Alt.*
- **Murawala, P., Tanaka, E.M., and Currie, J.D. (2012)**Regeneration: the ultimate example of wound healing. *Seminars in cell & developmental biology*23, 954-962.

N

- **Namias N. (2003)** Honey in managment of infections. *Surg. Inf.* 4(2); p 219-226.
- **Nauta AC, Gurtner GC, Longaker MT (2013).** Adult stem cells in small animal wound healing models. In: Gourdie RG, Myers TA, eds. *Wound Regeneration and Repair Methods and Protocols*. New York, NY: Humana Press; 81-98.
- **NHS (2019)**Wound dressings and bandages. 2019. Available from: [https://www.ljf.scot.nhs.uk/LothianJointFormularies/Adult/Wound% 20Section/Pages/default.aspx](https://www.ljf.scot.nhs.uk/LothianJointFormularies/Adult/Wound%20Section/Pages/default.aspx). Accessed October 20.
- **Nieva Moreno, M. I., Isla, M. I., Cudmani, N. G., Vattuone, M. A., &Sampietro, A. R. (1999)** Screening of antibacterialactivity of Amaichadel Valle (Tucumán, Argentina) propolis. *J. Ethnopharmacol.*, 68(1-3): 97-102.
- **Nilsson J, Fsiazek T, Heldin CH, Thyberg J (1983)** Demonstration of stimulatory effects of PDGF on cultivated rat arterial smooth muscle cells, *Exp Cell Res*, 145:231-237.
- **Nusgens B.V., Humbert P., Rougier A., Colige A.C., Haftek M., Lambert C.A., Richard A., Creidi P. And Lapière C.M.(2001)** Topically applied vitamin C enhances the mRNA level of collagens I and III, their processing enzymes and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in the human dermis. *J. Invest. Dermatol.*, 116 (6); p 853-859.
- **Nzeako B.C. And Hamdi, J. (2000)** Antimicrobial potential of honey on some microbial isolates. *Med Sc.*, 2; p 75-79.

O

- **Ochoa, O., Torres, F.M., and Shireman, P.K. (2007)** Chemokines and diabetic wound healing. *Vascular* :15, 350-355.
- **Olczyk, P., Wisowski, G., Komosinska-Vassev, K., Stojko, J., Klimek, K., Olczyk, M., Kozma, E.M., (2013).** Propolis modifies collagen types I and III accumulation in the matrix of burnt tissue. *Evid-Based Compl.*1-10.
- **Olczyk. P, K. Komosinska-Vassev, G. Wisowski, L. Mencner, J. Stojko, and E. M. Kozma (2014)** “Propolis modulates fibronectin expression in the matrix of thermal injury,” *BioMed Research International*.p10 pages.
- **Olaitan P.B., Adelek O.E. And Ola I.O. (2007)** Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *Afr. Health. Sci.*, 7(3); p 159-165.
- **Olivry, T. Muller, R.S. Walder, E.J. Atlee, B.A (1993)** Anatomie et physiologie microscopiques de la peau. *Encyclopédie Vétérinaire*, Paris., *Dermatologie* 0200, 13p.
- **OMS (2013).** Diabète. In Aide-mémoire N°312, C.d. Médias, ed.
- **OMS (2016)** Rapport mondial sur le diabete.

- **Ordman, L. J., and Gillman, T(1998)** Studies in the healing of cutaneous wounds. I. The healing of incisions through the skin of pigs. *Arch. Surg.* 1966; 93, 857-882.107.
- **Calvin, M.** Cutaneous wound repair. *Wounds.* 10:12-32.
- **Ortines Roger V., Haiyun Liu, Lily I. Cheng, Taylor S. Cohen, Heather Lawlor, AbhishekGami, Yu Wang, Carly A. Dillen, Nathan K. Archer, Robert J. Miller, Alyssa G. Ashbaugh, Bret L. Pinsker, Mark C. Marchitto, Christine Tkaczyk, C. Kendall Stover, Bret R. Sellman, Lloyd S. Miller (2018),** Neutralizing Alpha-ToxinAccelerates Healing of Staphylococcus aureus-InfectedWounds in Nondiabetic and DiabeticMice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, March 2018 Volume 62 Issue 3 e02288-17.
- **Oryan, A., E. Alemzadeh et A. Moshiri (2018)** «Rôle potentiel de la propolis dans la cicatrisation des plaies: propriétés biologiques et activités thérapeutiques.» *Biomédecine et pharmacothérapie* ; *Biomédecine et pharmacothérapie* 98.
- **Oryan A. And Zaker SR. (1998)**Effects of topical application of honey on cutaneous wound healing in rabbits. *J. Vet. Med.*, 45(3); p 181-188.
- **Oscar Castaño, Soledad Pérez-Amodio, Claudia Navarro-Requena, Miguel Ángel Mateos-Timoneda, Elisabeth Engel(2018)**Instructive microenvironments in skin wound healing: Biomaterials assignal releasing platforms, *Advanced Drug Delivery Reviews* 129 (2018) 95–117.

P

- **Palazzi x. (2002)** Sémiologie macroscopique et microscopique de la peau.Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, 76 p.
- **Paralkar VM, VukiceviC S, Reddi AH (1991)** TGFβ type 1 binds to collagen of basement membrane matrix, *Dev Biol*, 143:303-308.
- **Park,J.S.,Kim,H.Y.,Choi,J.B.,Gwon,J.B.,Shin,Y.M.,Lim,Y.M.,Khil,M.S.,Nho,Y.C., (2012)** EffectsofannealingandtheadditionofPEGonthePVAbasedhydrogel by gammaray. *Radiation Physics and Chemistry* 81,857–860.
- **Pasupuleti VR, L. Sammugam , N. Ramesh , SH Gan (2017)**Miel, propolis et gelée royale: un examen complet de leurs actions biologiques et de leurs bienfaits pour la santé. *Médecine oxydative et longévité cellulaire* .
- **Patrycja Chylińska-Wrzos , Marta Lis-Sochocka , Barbara Jodłowska-Jędrych (2017).**Use of propolis in difficult to heal diabetic wounds. Short review. *Pol J Public Health* ;127(4): 173-175
- **Peplow PV, Chung TY, Baxter GD (2010)** Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg.* ;28:S3-S40.
- **Peppia, M., and Raptis, S.A. (2008)** Advanced glycation end products and cardiovascular disease. *Curr Diabetes Rev* ;4, 92-100.
- **Peppia, M., and Vlassara, H. (2005)** Advanced glycation end products and diabetic complications: a general overview. *Hormones (Athens)* ;4, 28-37.
- **Pereira, R.F. and Bartolo, P.J.(2016)** Traditional therapies for skin wound healing. *Advances in wound care*, 5(5): 208-229.

- **Pessolato A.G., Martins D.D., Ambrósio C.E., Mançanares C.A. And de Carvalho A.F. (2011)** Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. *Burns.*,37(7) ; p 1192-1201.
- **Pieper. B (2009)** “Honey-based dressings and wound care,” *Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing*, vol. 36, no. 6, article589.
- **Pierce G.F., Mustoe T.A., Lingelbach J., Masakowski V.R., Griffin G.L., Senior R.M. And Deuel T.F.(1989)** Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J. Cell. Biol.*, 109 (1); p 429-440.
- **Pierce GF (2001).** Inflammation in non healing diabetic wounds: the space-time continuum does matter. *Am J Pathol* ; 159: 399–403.
- **Pinget, M (2002).** Les bases physiologiques des troubles de l’insulinosécrétion. *Diabetes Metab* 26, 21–32.
- **Piul S. Rabbani , Anna Zhou , Zachary M. Borab , Joseph A. Frezzo ,Nikita Srivastava , Haresh T. More , William J. Rifkin , Joshua A. David , Samuel J. Berens , Raymond Chen , Sophia Hameedi , Muhammad H. Junejo , Camille Kim , Rita A. Sartor , Che F. Liu , Pierre B. Saadeh , Jin K. Montclare , Daniel J. Ceradini (2017)** Novel lipoproteoplex delivers Keap1 siRNA based gene therapy to accelerate diabetic wound healing. *Biomaterials* 132,1e15.
- **Pradhan Nabzdyk, L., Kuchibhotla, S., Guthrie, P., Chun, M., Auster, M.E., Nabzdyk, C., Deso, S., Andersen, N., Gnardellis, C., LoGerfo, F.W., and Veves, A. (2013)** Expression of neuropeptides and cytokines in a rabbit model of diabetic neuroischemic wound healing. *J Vasc Surg* ;58, 766-775 e712.

Q

- **Qing, C. (2017)** The molecular biology in wound healing & non-healing wound. *Chinese Journal of Traumatology*, 20 (4), 189–193.

R

- **Rabbani Piul .S, Anna Zhou, Zachary M. Borab , Joseph A. Frezzo , Nikita Srivastava , Haresh T. More , William J. Rifkin , Joshua A. David , Samuel J. Berens , Raymond Chen , Sophia Hameedi , Muhammad H. Junejo , Camille Kim , Rita A. Sartor , Che F. Liu , Pierre B. Saadeh , Jin K. MontclareDaniel J. Ceradini (2017)** Novel lipoproteoplex delivers Keap1 siRNA based gene therapy to accelerate diabetic wound healing ; *Biomaterials* 132,1e15.
- **polliniques dans la typification des miels. Mém. E.P.H.E., p : 77.**
- **Ramanauskienè K. And Inkèniene A.M.(2011)** Propolis oil extract: quality analysis and evaluation of its antimicrobial activity. *Nat. Prod. Res.*, 25(15) ; p 1463-1468.
- **Redondo M.J, Eisenbarth G.S (2002).** Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes and associated disorders. *Diabetologia.*,45: 605-22.
- **Reham F. El-Kased, Reham I. Amer, Dalia Attia and M. M. Elmazar. (2017).** Honey-based hydrogel: *In vitro* and comparative *In vivo* evaluation for burn wound healing. *scientific reports* | 7: 9692.

- **Renard, A. Fredenrich, E. van Obberghen (2004)** L'athérosclérose accélérée chez les patients diabétiques. *Métabolisme, hormones, diabète et nutrition.* 964, 131-136.
- **Rigalleau V., Lang J., Gin H (2007)** Etiologie et physiopathologie du diabète de type 2, In : *Encyclopédie Médico-Chirurgicale : Endocrinologie-Nutrition*, Paris : Editions scientifiques et médicales Elsevier Masson SAS, p :16.
- **Robbins, S. L., Cotran, R. S., and Kumar, V (1994)** Robbins pathologic basis of disease, *W.B. Saunders, Philadelphia.*
- **Robert barone (2010)** Système nerveux périphérique Glandes endocrines Esthésiologie : Tome 7 Neurologie II, 477-586.
- **Rodriguez, P.G., Felix, F.N., Woodley, D.T., and Shim, E.K. (2008)** The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatol Surg* :34, 1159-1169.
- **Rohilla, A., Ali, S (2012)** Alloxan Induced Diabetes : Mechanisms and Effects. *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* 3, 819–823.
- **Rossant A. And Desmouliere A. (2011)** Le miel, un composé complexe aux propriétés surprenantes. Thèse de doctorat ; Université de Limoges ; p 132.
- **Roy S., Khanna S., Nallu K., Hunt T.K. And Sen C.K. (2006)** Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol. Ther.*, 13(1); p 211-220.

S

- **Saad Aissat, Moussa Ahmed, Nouredine Djebli (2016)** Propolis-Sahara honeys preparation exhibits antibacterial and anti-biofilm activity against bacterial biofilms formed on urinary catheters. *Asian Pac J Trop Dis* ; 6(11): 873-877.
- **Sagliyan.A, F. Benzer, F.M. Kandemir, C. Gunay, M.C. Han, M. Ozkaraca (2012)** Beneficial effects of oral administrations of grape seed extract on healing of surgically induced skin wounds in rabbits. *Revue Méd. Vét.*, 163, 1, 11-17.
- **Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F (2017)** Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research. *Apr-Jun; 9(2):121-127.*
- **Sayed S.M., Abou El-Ella G.A., Wahba N.M., El Nisr N.A., Raddad K., Abd El Rahman M.F., Abd El Hafeez M.M. And Abd El Fattah A.A. (2009)** Immune defense of rats immunized with fennel honey, propolis and bee venom against induced staphylococcal infection. *J. Med. Food.*, 12(3); p 569-575.
- **Schreck R, Rieber P. And Baeuerle P.A. (1991)** Reactive oxygen species as apparently widely used messengers in the activation of the Nf-Kb transcription factor and HIV-1. *EMBO J.*, 10(8); p 2247-2258.
- **Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V (2003)** Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair Regen*;11(2):1-28.
- **Scott D. , Miller W. , Griffin C. (1995)** Small Animal Dermatology, In: MULLER G. , KIRK R. (ed). 5th edition WB SAUNDERS Co, Philadelphia, 2-54 et 1127-1173.
- **Sevestre J. (1981)** Eléments de chirurgie animale. Chirurgie esthétique et plastique. Le Point Vétérinaire., 3 ; p 84.

- **Shimaski, S. Ling, N (1991)** Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGF BP 1, 2, 3, 4, 5, 6). *Prog Growth Factor Res.* **3**, 343-346.
- **Siddiqui A A, Siddiqui S A, Ahmad S, Siddiqui S, Ahsan I , Sahu K. (2013)** .Diabetes: Mechanism, Pathophysiology and Management-A Review. *International Journal of Drug Development & Research* .5(2): 1-23.
- **Sidky YA, Borden EC (1987)** Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor and lymphocyte induced vascular responses, *Cancer Res*, 47:5155-5161.
- **Singer, A. J. et R. A. Clark (1999)** Cutaneous wound healing." *N Engl J Med.* 341(10):738-46.
- **Skalli O. And Gabbiani G. (1988)**The biology of myofibroblast relationship to wound contraction and fibrocontractive diseases. In: Clark RAF, Henson PM.The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. New York, Plenum Press; p 373-404.
- **Srinivasan.k, P. Ramarao (2007)** Animal models in type 2 diabetes research: an overview,
- **Stadelmann, W.K., Digenis, A.G., and Tobin, G.R. (1998)**Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg*176, 26S-38S.
- **Steenfos, H.H. Janssen, J.O (1992)** Gene expression of insulin-like growth factor 1 and receptor during wound healing in rats. *Eur J Surg.* 158, 327-331.
- **Stephens P, Caley M, Peake M (2013)** Alternatives for animal wound model systems. In: Gourdie RG, Myers TA, eds. *WoundRegeneration and Repair Methods and Protocols*. New York, NY: Humana Press;177-201.
- **Stocker A., Schramel P., kettrup A. And Bengsch E. (2005)**Trace and minerals elements in royal jelly and homeostatic effects. *J. Trace. Elem. Med. Biol.*, 19(2-3); p 183-189.
- **Stoffels, J. M. Zhao. C, and W. Baron (2013)** “Fibronectin in tissue regeneration: timely disassembly of the scaffold is necessary to complete the build,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 70, no. 22,p :4243–4253.
- **Stojadinovic, O., Brem, H., Vouthounis, C., Lee, B., Fallon, J., Stallcup, M., Merchant, A., Galiano, R.D., and Tomic-Canic, M. (2005)** Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization andwound healing. *The American journal of pathology* :167, 59-69.
- **Subalakshmi, M.; Saranya, A.; Maheswari, M.U.; Jarina, A. and Kaviman, S. (2014)**An overview of the current methodologies used for the evaluation of drugs having wound healing activity. *International Journal of Experimental Pharmacology*, 4(2): 127-131.
- supérieure des industries agricoles et alimentaires. *Cedex France* : 01-09.
- **Swaim S.F., And Henderson R.A. (1997)** Wound healing. In: Small animal wound management. Williams and Wilkins Company; P 1-8.
- **Swaim S.F., Hinckle S.H., And Bradley D.M. (2001)** Wound contraction: basic and clinical factors. *Compend. Contin. Educ. Small. Animal. Pract.*, 23(1); p 20-31.
- **Swaim S.F. (1990)** Small animal wound management. Malvern: Lea & Febiger; p 250.
- **Szkudelski, T (2001)** The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50, 537–546.
- **Szkudelski. T (2001)** The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50, 537–546.

- **Sumara Marques Barral, Ivana Duval Araujo, Paula Vieira Teixeira Vidigal, Cláudio Alvarenga Campos Mayrink, Adriana, Duval Araujo V, Paulo Roberto da Costa ; (2011)** Effects of sildenafil on the viability of random skin flaps; *Acta Cirúrgica Brasileira - Vol. 26 (4) 2011.*

T

- **Takehara K, Leroy EC, Grotendorst GR (1987)** TGF β inhibition of endothelial cell proliferation: alteration of EGF binding and EGF-induced growth regulatory (competence) gene expression, *Cell*, 49:415-422.
- **Tamara Hoppenbrouwers , Bastiaan Tuk , Esther M.G. Fijneman, Moniek P.M. de Maat , Johan W. van Neck (2017)** Fibrin improves skin wound perfusion in a diabetic rat model. *Thrombosis Research* 151.36–40.
- **Tan Woan Sean, Palanisamy Arulselvan, Shioh-Fern Ng, Che Norma Mat Taib, Murni Nazira Sarian and Sharida Fakurazi (2019)** Improvement of diabetic wound healing by topical application of Vicenin-2 hydrocolloid film on Sprague Dawley rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. p8.
- **Tandara, A.A., and Mustoe, T.A. (2004)** Oxygen in wound healing--more than a nutrient. *World journal of surgery* ;28, 294-300.
- **Taormina P.J., Niemira B.A. And Beuchat L.R. (2001)** Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int. J. Food. Microbiol.*, 69(3); p 217-225.
- **Terkeltaub R.A. And Ginsberg M.H. (1988)** Platelets and response to injury. In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. New York, Plenum Press; p 35-55.
- **Thangarajah, H., Vial, I.N., Grogan, R.H., Yao, D., Shi, Y., Januszyk, M., Galiano, R.D., Chang, E.I., Galvez, M.G., Glotzbach, J.P., (2010)** HIF-1 α dysfunction in diabetes. *Cell Cycle* ;9, 75-79.
- **Thangarajah, H., Yao, D., Chang, E.I., Shi, Y., Jazayeri, L., Vial, I.N., Galiano, R.D., Du, X.L., Grogan, R., Galvez, M.G., (2009)** The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* :106, 13505-13510.
- **Thatte U, (2009)** Still in search of herbal medicine. *Indian journal of Pharmacology*. 41 :1-3.
- **Tomczak C. (2010)** Utilisation du miel dans le traitement des plaies. revue bibliographique. Thèse de doctorat, ENVL., p 97.
- **Tong, Q., Zheng, L., Li, B., Wang, D., Huang, C., Matuschak, G.M., and Li, D. (2006)** Hypoxia-induced mitogenic factor enhances angiogenesis by promoting proliferation and migration of endothelial cells. *Experimental cell research* :312, 3559-3569.
- **Tonks A., Cooper R.A., Price A.J., Molan P.C. And Jones K.P. (2001)** Stimulation of TNF- α release in monocytes by honey. *Cytokine.*, 14(4) ; p 240-242.
- **Topham J.D. (1988)** Sugar paste in the treatment of pressure sores. burns and wounds. *Pharm. J.*, 241; p 118-119.

- **Truceva B., Todorov I., Ninova M., Najdenski H., Daneshmand A. And Bankova V.(2010)**Antibacterial mono- and sesquiterpene esters of benzoic acids from Iranian propolis.*Chem. Cent. J.* ; P 4-8.

U

- **Ud-Din, S., Volk, S.W., and Bayat, A. (2014).** Regenerative healing, scar-free healing and scar formation across the species: current concepts and future perspectives. *Exp Dermatol*.
- **Usui, M.L., Mansbridge, J.N., Carter, W.G., Fujita, M., and Olerud, J.E. (2008)** Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds. *J Histochem Cytochem* ; 56, 687-696.

V

- **Valcic, S., Montenegro, G., Mujica, A. M., Avila, G., Franzblan, S., Singh, M., Maiese, W. M., Timmerman, B. N (1999)** Phytochemical, Morphological and Biological investigation of propolis from Central Chile. *Z.Naturforsch* **54c**, 406-416.
- **Velander P, Theopold C, Hirsch T, Bleiziffer O, Zuhaili B, Fossum M (2008).** Impaired wound healing in an acute diabetic pig model and the effects of local hyperglycemia. *Wound Repair Regen* ;16: 288e93.
- **Vimala Kanikireddy, Kokkarachedu Varapasadb, Tippabattini Jayaramuduc, Chandrasekaran Karthikeyanb, Rotimi Sadiku (2020)** Carboxymethyl cellulose-based materials for infection control and wound healing: A review.*Int. J. Biol. Macromol.* Volume 164, décembre, Pages 963-975
- **Visweswara Rao Pasupuleti, Lakshmi Sammugam, Nagesvari Ramesh, and Siew Hua Gan (2017).** Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity* , 21 pages.
- **Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J (2008)** Propriétés fonctionnelles du miel, de la propolis et de la gelée royale. *J Food Sci.* 73 (9): R117–24.
- **Yager, D.R., Zhang, L.Y., Liang, H.X., Diegelmann, R.F., and Cohen, I.K. (1996)** Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Invest Dermatol* ; 107, 743-748.

W

- **Welch.Rodney A. (2016)** Urinary Tract Infections: MolecularPathogenesis and Clinical Management, Second Edition ; Chapite 13 :Uropathogenic *Escherichia coli*-Associated Exotoxins , *WELY,American Society for Microbiology*.
- **Whadan H.A.L. (1998)** Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection.*, 26(1); p 26-31.
- **White J.W. And Subers M.H. (1964)** Studies of honey inhibine. 4. Destruction of the peroxide accumulation system by light. *J. Food. Sci.*, 29(6); p 819-828.

- **White J.W., Subers M.H. And Schepartz A.I.(1963)** The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochim. Biophys. Acta.*, 73 ; p 57-70.
- **White. R (2005)** “The benefits of honey in wound management,” *Nursing Standard*, vol. 20, no. 10, p : 57–66.
- **WHO (1999)** Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.99.2
- **Wijesinghe M, Weatherall M, Perrin K, Beasley R, (2009)** miel dans le traitement des brûlures: revue systématique et méta-analyse de son efficacité.*NZ Med J. 22 mai; 122 (1295): 47-60.*
- **Williams J.M (1999)** Open wound management. In: Fowler D, John M.Manual of canine and feline wound management and reconstruction. 1st Ed, *Cheltenham*; p 37-46.
- **Witte, M.B. Barbul, A (2003)** Arginine physiology and its implication for wound healing. *Wound Repair Regen.* 11(6), 419-423.
- **Witte, M.B. Thornton, F.J. Tantry, U. Barbul, A (2002)** L-Arginine supplementation enhances diabetic wound healing : involvement of the nitric oxide synthase and arginase pathways. *Metabolism.* 51(10), 1269-1273.
- **Wondisford, F.E., Wolfe, A (2010)** Rescue of obesity-induced infertility in female mice due to a pituitary-specific knockout of the insulin receptor. *Cell Metab.* 12, 295– 305.
- **Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC (2011)**Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol*; 969618.
- **Wright S., Keele CA., Neil E. (1980)** Physiologie appliquée à la médecine. 2ème Edition *Flammarion-Sciences*, Paris.
- **Wu N.L., Fang J.Y., Chen M., Wu C.J., Huang C.C.And Hung C.F. (2011)** Chrysin protects epidermal keratinocytes from UVA- and UVB- induced damage. *J. Agric. Food. Chem.*, 59(15) ; p 8391-8400.

Y

- **Yatsunami K. And Echigo T. (1984)**Antibacterial action of honey and royal jelly. *Honey bee Science.*,5(3); p 125-130.
- **Yusof. N, A. H. Ainul Hafiza, R. M. Zohdi, and M. Z. A. Bakar (2007)** “Development of honey hydrogel dressing for enhanced wound healing,” *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 76, no. 11-12, pp. 1767–1770.
- **Yutaka Ueda , Motoyasu Miyazaki , Kota Mashima , Satoshi Takagi , Shuuji Hara , Hidetoshi Kamimura and Shiro Jimi(2020)** The Effects of Silver Sulfadiazine on Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Biofilms. *Microorganisms* ,8, 1551.

X

- **Xu.Rui, HeshengXia, Weifeng He, Zhichao Li , JianZhao, Bo Liu, YuzhenWang, Qiang Lei, Yi Kong, Yang Bai, ZhihuiYao, RongshuaiYan, Haisheng Li, Rixing Zhan,**

SisiYang, Gaoxing Luo & JunWu (2016) Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement. *Sci. Rep.* 6, 24596.

Z


- **Zeina B., Othman O. And al-Assad S. (1996)** Effect of honey versus thyme on Rubella virus survival in vitro. *J. Altern. Complement. Med.*, 2(3); p 345-348.
- **Zgurskaya, H. I.; Lopez, C. A.; Gnanakaran, S (2015)** Permeability barrier of Gram-negative cell envelopes and approaches to by pass it. *ACS Infect. Dis.* 1 (11), 512–522.
- **Zucker, M.B. (1947)** Platelet agglutination and vasoconstriction as factors in spontaneous hemostasis in normal, thrombocytopenic, heparinized and hypoprothrombinemic rats. *The American journal of physiology* 148, 275-288.

Annexes

I-Technique d'analyse de la glycémie

II-Fiche de travail pour la programmation de l'automate

Leica TP1020 - Fiche de travail pour la programmation

Programme N°	01	Date	13/10/2018	
		Auteur	Dr HEMIDA. H	
Poste	Réactif		Durée	Remarque
1	Formaline		1 hr.	
2	Formaline		1 hr.	
3	Ethanol 70%		1 ½ hr.	
4	Ethanol 80%		1 ½ hr.	
5	Ethanol 95%		1 ½ hr.	
6	Ethanol 100%		1 hr.	
7	Ethanol 100%		1 hr.	
8	Ethanol 100%		1 hr	
9	Xylène		1 ½ hr	
10	Xylène		1 ½ hr	
11	Paraffine		2 hr	
12	Paraffine		2 hr	

III-Etapes de coloration à l'hématoxyline et à l'éosine

	Réactif	Durée
1- Enlèvement de la cire	Xylène/Toluène	2-4 minutes avec agitation occasionnelle
	Xylène/Toluène	2-4 minutes avec agitation occasionnelle
2- Réhydratation	Éthanol 100%	2 minutes
	Éthanol 100%	2 minutes
	Éthanol 85%	2 minutes
	Éthanol 70%	2 minutes
	Lavage à l'eau sous faible débit	5 minutes
3- Coloration	Hématoxyline de Harris	4 minutes
	Lavage à l'eau sous faible débit	5 minutes
	Acide-alcool (HCL 1% dans éthanol 95%) (décoloration)	1-5 bains
	Lavage à l'eau sous faible débit	8 minutes
	Lavage à l'ammoniaque	2 minutes
	Lavage à l'eau sous faible débit	5 minutes
	Éosine	2 minutes
4- Déshydratation	Éthanol 70%	5-10 bains
	Éthanol 85-95%	10 bains
	Éthanol 100%	2 minutes
	Nettoyer dans du xylène/toluène	2 minutes
	Nettoyer dans du xylène/toluène	2 minutes
	Nettoyer dans du xylène/toluène	2 minutes

IV-Table de correspondance en spectroscopie infrarouge

الملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التأثير العلاجي والمضاد للبكتيريا لخليط يعتمد على العسل ، العكبر ، شمع النحل و محلول كربوميثيل الصوديوم لعلاج الجروح الجلدية ذات السماكة الكاملة لدى الأرناب المصابة والغير مصابة بداء السكري ومقارنته بالعلاج التقليدي سلفاديازين الفضة بنسبة 1٪. هذه التجربة مقسمة إلى جزئين: الأول في المختبر مخصص لتحضير الهلام المعتمد على العسل وتوصيفه بواسطة التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء وكذلك تقييم ومقارنة تأثيره المضاد للبكتيريا مع سلفاديازين الفضة بنسبة 1 ٪ على سلالتين بكتيريتين مرجعيتين المكورات العنقودية الذهبية والإشريكية القولونية أما بالنسبة للجزء الثاني يتم على الجسم الحي؛ مخصص للمتابعة المجهريّة، المورفومترية والنسجية لعينات الجروح الجلدية الاستنصالية ذات السماكة الكاملة بقياس 2 سم x 2 سم. استخدم اثنان وسبعون أرناب ذكر من الفصيلة النيوزيلندية مقسمة إلى مجموعتين متساويتين. حقنت المجموعة الأولى بجرعة 100ملغ / كلغ من الألوكسان لإثارة مرض السكري بينما تركت المجموعة الثانية على حالتها الطبيعية.

قسمت كل مجموعة إلى أربع مجموعات فرعية من تسعة أرناب مقسمة إلى ثلاث مجموعات ذات ثلاثة أرناب. المجموعة الأولى تعتبر ضابطاً سلبياً تترك الجروح دون علاج ؛ والثانية تعتبر ضابطاً إيجابياً حيث تعالج الجروح بالسلفاديازين الفضية بنسبة 1٪ والثالثة تعالج الجروح بالهلام المعتمد على العسل. من أجل المتابعة النسيجية لشفاء الجروح ، تمت التضحية بحيوانات المجموعات الفرعية الأربع لأخذ عينات نسيجية على التوالي في اليوم 7 ، اليوم 14 ، اليوم 21 و اليوم 28 بعد الإصابة بالجروح، أثبت تحليل فورييه للتحويل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء تكوين تفاعلات قوية بين الجزيئات في شكل جذب الهيدروجين والأكسجين والكربون بين البوليمر الكعبر والعسل وشمع النحل.

أظهر استكشاف التأثير المضاد للبكتيريا نشاطاً مثبطاً للهلام الذي يحتوي على العسل ضد المكورات العنقودية الذهبية (23.10 ± 4.60 مم) والإشريكية القولونية (22.95 ± 4.76 مم). أما بالنسبة لتأثير سلفاديازين الفضة كان أقل على المكورات العنقودية الذهبية (8.25 ± 0.95) والإشريكية القولونية (9.30 ± 1.53) . مع وجود فروق ذات دلالة احصائية (p<05)

من الناحية المورفومترية، جروح الأرناب الغير مصابة بالسكري التي تم علاجها بواسطة الهلام المعتمد على العسل أظهرت معدل تقلص جلدي أفضل مقارنة بنظيراتها الضابطة وتلك التي تليها سلفاديازين الفضة مع وجود اختلافات كبيرة في اليوم 14 ، 21 ، و 28 ؛ أما بالنسبة للذين يعانون من مرض السكري المعالجون بالهلام المعتمد على العسل لم يلاحظ اختلاف إلا يوم 14. أظهرت هذه النتائج أن التطبيق الموضعي للهلام الذي يحتوي على العسل المستعمل على الجروح الجلدية الاستنصالية ذات السماكة الكاملة على الأرناب المصابة بالسكري و غير المصابة بالسكري يعزز الشفاء عن طريق تقليل فترة الالتئام الظهاري من خلال الانقباض الجلدي، في الختام، سمحت لنا هذه الدراسة بأن الجمع بين العسل، العكبر، شمع النحل و محلول كربوميثيل الصوديوم يمكن اعتباره بديلاً لعلاج الجروح المصابة بالسكري و غير السكري.

الكلمات المفتاحية: هلام العسل، سلفاديازين الفضية ،إلتئام الجرح السكري، التأثير المضاد للبكتيريا.

Résumé :

La mauvaise cicatrisation des plaies et les ulcères du pied sont problématiques pour les patients diabétiques, cependant peu d'études ont été réalisées sur l'utilisation des produits de la ruche malgré leurs efficacités prouvées sur l'amélioration du processus cicatriciel normal. La présente étude a pour objectif l'évaluation de l'effet cicatrisant et antibactérien d'un mélange à base de miel d'euphorbe, de propolis, de cire d'abeille et de carboxyméthylcellulose sodique (CMC-Na) (gel à base de miel) pour le traitement des plaies de pleines épaisseurs chez des lapins diabétiques et non diabétiques et leur comparaison avec un traitement conventionnel à base de sulfadiazine argentique à 1 %.

Cette expérimentation est divisée en deux parties. L'une in-vitro réservée à la préparation du gel à base du miel et sa caractérisation par FTIR ainsi que l'évaluation et la comparaison de son effet antibactérien par rapport à celui de la sulfadiazine argentique à 1 % sur deux souches bactériennes de référence *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* par uneméthode de diffusion en puits; et l'autre in-vivo ; réservée au suivi macroscopique, morphométrique et histo-pathologique de la cicatrisation des plaies excisionnelles de pleines épaisseurs mesurant 2cm x 2cm.

Soixante douze (72) lapins mâles Néo-Zélandais répartis en deux groupes égaux. Un groupe a été induit par une dose de 100mg/kg d'alloxane afin de provoquer un diabète sucré et l'autre a été laissé en son état naturel. Chaque groupe a été divisé en quatre sous groupe de neuf lapins répartis en trois lots de trois lapins ; le premier est considéré comme témoin négatif dont les plaies sont laissées sans traitement ; le second est considéré comme témoin positif dont les plaies sont traitées par la sulfadiazine argentique à 1 % et le troisième dont les plaies sont gérées par le gel à base de miel. Pour le suivi histologique de la cicatrisation des plaies, les animaux des quatre sous-groupes vont être sacrifiés respectivement à J7, J14, J21, et à J28.

L'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a suggéré la formation de fortes interactions intermoléculaires sous forme d'attraction d'hydrogène, d'oxygène et de carbone entre le polymère, la propolis, le miel et la cire d'abeille.

L'exploration de l'effet antibactérien a montré une activité d'inhibition du gel à base de miel contre *Staphylococcus aureus* ($23,10 \pm 4,60$ mm) et *Escherichia. Coli* ($22,95 \pm 4,76$ mm).

Par contre, pour le contrôle positif (sulfadiazine d'argent) elle était moindre par rapport à *Staphylococcus aureus* ($8,25 \pm 0,95$) et *Escherichia coli* ($9,30 \pm 1,53$) avec une différence significative ($p < 0,05$).

Morphométriquement, les plaies non diabétiques gérées par le gel à base de miel ont présenté un meilleur taux de contraction par rapport à leurs homologues témoins et celles suivies par la sulfadiazine argentique avec des différences significatives ($P < 0.05$) à **j 14** à **j 21** à **j28** ; Pour celles diabétiques gérées par le gel à base de miel, une différence significative ($P < 0.05$) n'a été remarquée qu'à **j14**.

Ces résultats ont révélé que l'application topique d'un gel à base de miel sur des plaies d'excision de pleine épaisseur chez des lapins diabétiques et non diabétiques favorise leur cicatrisation en réduisant leur période d'épithélialisation par une contraction importante.

En conclusion, notre étude nous a permis que l'association miel propolis cire d'abeille avec un gélifiant qui est le CMC-Na pourrait être considéré comme une alternative pour le traitement des plaies diabétiques et non diabétiques.

Mots clés : Gel à base de miel, Sulfadiazine Argentique à 1 %, cicatrisation des plaies diabétiques, effet antibactérien.

Abstract:

Foot ulcers and poor wound healing are problematic for diabetic patients ; however, inspite of their proven effectiveness in improving normal healing process, few studies have been conducted to evaluate the effects of the bee products in wound healing process among diabetics.

The objective of this study was to evaluate the healing and antibacterial effects of a mixture made of spurge honey, propolis, beeswax and sodium carboxymethylcellulose (CMC-Na) (honey-based gel) in the treatment of full thickness wounds in diabetic and non-diabetic rabbits and their comparison with conventional 1% silver sulfadiazine therapy.

This experiment was divided into two parts. The *invitro* part (part 1) was reserved for the preparation of the honey-based gel and its characterization by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) as well as the evaluation and comparison of its antibacterial effect compared to that of silver sulfadiazine at 1% on two reference bacterial strains: *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by well diffusion method; and the *in-vivo* part (part 2) was reserved for macroscopic, morphometric and histopathological follow-up of the healing of excisional wounds of full thickness measuring 2cm × 2cm.

Seventy-two male New Zealand rabbits divided into two equal groups were used for the *in vivo* part of the present study. One group was treated with a 100mg / kg dose of *alloxan* to induce diabetes mellitus and the other was left in its natural state. Each group was divided into four subgroups of nine rabbits divided into three groups of three rabbits; the first served as a negative control whose wounds are left untreated; the second served as a positive control whose wounds were treated with 1% silver sulfadiazine, and the third group whose wounds were managed by the honey-based gel. For the histological follow-up of the wounds healing, the animals of the four subgroups had been sacrificed respectively on day 7, day 14, day 21, and day 28 of the experiment.

FTIR analysis suggested the formation of strong intermolecular interactions by attraction of hydrogen, oxygen and carbon components between the polymer, the propolis, the honey and the beeswax.

Exploration of the antibacterial effect showed inhibitory activity of the honey-based gel against *Staphylococcus aureus* (23.10 ± 4.60 mm) and *Escherichia coli* (22.95 ± 4.76 mm). On the other hand, for the positive control (silver sulfadiazine) the antibacterial effect was less

effective against *Staphylococcus aureus* (8.25 ± 0.95) and *Escherichiacoli* (9.30 ± 1.53) with a significant difference ($p < 0, 05$).

Morphometrically, non-diabetic wounds managed by the honey-based gel exhibited a better contraction rate compared to control group and the group of rabbits treated by silver sulfadiazine with significant differences ($P < 0.05$) at day 14, day 21, and day 28 of the experiment. For diabetes, the diabetic group managed by the honey-based gel, a significant difference ($P < 0.05$) was not noticed until day 14. Likewise, the honey-based gel reduced the duration of epithelialization by 3 days on average in the two groups of rabbits compared to wounds followed by conventional treatment. These results revealed that topical application of a honey-based gel to full-thickness excisional wounds in diabetic and non-diabetic rabbits promotes healing by reducing their epithelialization period through extensive contraction.

In conclusion, our study allowed us to demonstrate that the combination of honey, propolis, and beeswax with a gelling agent which is CMC-Na could be considered as an alternative solution for the treatment of diabetic and non-diabetic wounds.

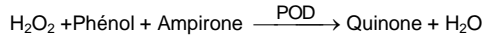
Keywords: Honey based gel, silver sulfadiazine à 1 %, diabéticos wounds healing, antibacterial effect.

Détermination quantitative du glucose IVD

Conserver à 2-8°C

PRINCIPE DE LA METHODE

Le glucose oxydase (GOD) catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit, se détache au moyen d'un accepteur chromo génique d'oxygène, de phénol-ampirone en présence de peroxydase (POD):



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de glucose présent dans l'échantillon testé^{1,2}.

SIGNIFICATION CLINIQUE

Le glucose est la meilleure source d'énergie pour les cellules de l'organisme; l'insuline facilite l'entrée de glucose dans les cellules.

Le diabète mellitus est une maladie qui se produit en cas d'hyperglycémie, provoquée par un déficit d'insuline^{1,5,6}.

La diagnostique clinique doit tenir compte de données cliniques et de laboratoire.

REACTIFS

R 1	TRIS pH 7,4	92 mmol/L
Tampon	Phénol	0,3 mmol/L
R 2	Glucose oxydase (GOD)	15000 U/L
Enzymes	Peroxydase (POD)	1000 U/L
	4 - Aminophénazone (4-AF)	2,6 mmol/L
GLUCOSE CAL	Patron primaire de détection du glucose	100 mg/dL

PREPARATION

Réactif de travail (RT): Dissoudre (→) le contenu d'une capsule d'enzymes R 2 dans un flacon de tampon R 1.

Fermer et mélanger doucement jusqu'à dissoudre le contenu. Stabilité: 1 mois au réfrigérateur (2-8°C) ou 7 jours à température ambiante (15-25°C).

CONSERVATION ET STABILITE

Tous les composants du kit sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon, et si les flacons sont maintenus hermétiquement fermés à 2-8°C, à l'abri de la lumière et des sources de contamination.

Ne pas utiliser les réactifs en dehors de la date indiquée.

Indices de détérioration des réactifs:

- Présence de particules et turbidité.
- Absorption du blanc à 505 nm \geq 0,10.

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE

- Spectrophotomètre ou analyseur pour lectures à 505 nm.
- Cuvettes de 1,0 cm d'éclairage.
- Equipement classique de laboratoire

ECHANTILLONS

Sérum ou plasma, sans hémolyse¹ ni LCR.

Le sérum doit être séparé dès que possible du caillot.

Stabilité: Le glucose dans le sérum ou le plasma est stable 3 jours à 2-8°C.

PROCEDURE

- Conditions de test:
Longueur d'ondes: 505 nm (490 – 550)
Cuvette: 1 cm d'éclairage
Température 37°C
- Régler le spectrophotomètre sur zéro en fonction de l'eau distillée
- Pipetter dans une cuvette:

	Blanc	Modèle	Echantillon
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Modèle (Remarque1,2) (μL)	--	10	--
Echantillon (μL)	--	--	10

- Mélanger et incuber pendant exactement 5 minutes à 37°C or 20 minutes à température ambiante (15-25°C).
- Lire l'absorption (A) du patron et l'échantillon, en comparaison avec le blanc du réactif. La couleur reste stable pendant au moins 30 minutes.

CALCULS

$$\frac{(A)\text{Echantillon}}{(A)\text{Modèle}} \times 100 (\text{modèle conc.}) = \text{mg/dL de glucose dans l'échantillon}$$

Facteur de conversion: mg/dL x 0,0555= mmol/L.

CONTROLE DE QUALITE

Il est conseillé d'analyser conjointement les échantillons de sérum dont les valeurs ont été contrôlées: SPINTROL H Normal et pathologique (Réf. 1002120 et 1002210).

Si les valeurs se trouvent en dehors des valeurs tolérées, analyser l'instrument, les réactifs et le calibreur.

Chaque laboratoire doit disposer de son propre contrôle de qualité et déterminer les mesures correctives à mettre en place dans le cas où les vérifications ne correspondraient pas aux attentes.

VALEURS DE REFERENCE¹

Sérum ou plasma:

$$60 - 110 \text{ mg/dL} \cong 3,33 - 6,10 \text{ mmol/L}$$

LCR:

$$60 - 80 \% \text{ de la valeur en sang}$$

Ces valeurs sont données à titre d'information. Il est conseillé à chaque laboratoire de définir ses propres valeurs de référence.

CARACTERISTIQUES DE LA METHODE

Gamme de mesures: Depuis la limite de détection 0,04 mg/dL jusqu'à la limite de linéarité 500 mg/dL.

Si la concentration de l'échantillon est supérieure à la limite de linéarité, diluer 1/2 avec du ClNa 9 g/L et multiplier le résultat final par 2.

Précision:

	Intra-série (n=20)		Inter-série (n=20)	
Moyenne (mg/dL)	96,8	241	98,4	248
SD	0,81	1,43	1,55	3,73
CV (%)	0,83	0,59	1,58	1,50

Sensibilité analytique: 1 mg/dL = 0,0036 A.

Exactitude: Les réactifs SPINREACT (y) ne montrent pas de différences systématiques significatives lorsqu'on les compare à d'autres réactifs commerciaux (x).

Les résultats obtenus avec 50 échantillons ont été les suivants:

Coefficient de corrélation (r): 0,99.

Equation de la Courbe de régression: $y=1,0x + 0,12$.

Les caractéristiques de la méthode peuvent varier suivant l'analyseur employé.

INTERFERENCES

Aucune interférence n'a été relevée avec: l'hémoglobine jusqu'à 4 g/L, la bilirubine jusqu'à 20 mg/L, la créatinine jusqu'à 100 mg/L, la galactose jusqu'à 1 g/L.

Différentes drogues ont été décrites, ainsi que des substances pouvant interférer dans la détermination de la glucose^{3,4}.

REMARQUES

- GLUCOSE CAL: Etant donné la nature du produit, il est conseillé de le manipuler avec une extrême précaution. En effet, il peut être contaminé très facilement.
- Le calibrage au moyen du patron de détection peut donner lieu à des erreurs systématiques lors de méthodes automatiques. Dans de tels cas, il est conseillé d'utiliser des calibrages sériques
- Utiliser des embouts de pipettes jetables propres pour diffuser le produit.
- SPINREACT dispose de consignes détaillées pour l'application de ce réactif dans différents analyseurs.**

BIBLIOGRAPHIE

- Kaplan A. Glucose. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1032-1036.
- Trinder P. Ann Clin Biochem 1969; 6: 24-33.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PRESENTATION

Ref:1001190

R1: 4 x 125 mL, R2: 4 → 125 mL, CAL: 1 x 5 mL

Ref:1001191

Cont.

R1: 4 x 250 mL, R2: 4 → 250 mL, CAL: 1 x 5 mL

Ref:1001192

R1: 10 x 50 mL, R2: 10 → 50 mL, CAL: 1 x 5 mL

Table of Characteristic IR Absorptions

<i>frequency, cm⁻¹</i>	<i>bond</i>	<i>functional group</i>
3640–3610 (s, sh)	O–H stretch, free hydroxyl	alcohols, phenols
3500–3200 (s,b)	O–H stretch, H-bonded	alcohols, phenols
3400–3250 (m)	N–H stretch	1°, 2° amines, amides
3300–2500 (m)	O–H stretch	carboxylic acids
3330–3270 (n, s)	–C≡C–H: C–H stretch	alkynes (terminal)
3100–3000 (s)	C–H stretch	aromatics
3100–3000 (m)	=C–H stretch	alkenes
3000–2850 (m)	C–H stretch	alkanes
2830–2695 (m)	H–C=O: C–H stretch	aldehydes
2260–2210 (v)	C≡N stretch	nitriles
2260–2100 (w)	–C≡C– stretch	alkynes
1760–1665 (s)	C=O stretch	carbonyls (general)
1760–1690 (s)	C=O stretch	carboxylic acids
1750–1735 (s)	C=O stretch	esters, saturated aliphatic
1740–1720 (s)	C=O stretch	aldehydes, saturated aliphatic
1730–1715 (s)	C=O stretch	α, β-unsaturated esters
1715 (s)	C=O stretch	ketones, saturated aliphatic
1710–1665 (s)	C=O stretch	α, β-unsaturated aldehydes, ketones
1680–1640 (m)	–C=C– stretch	alkenes
1650–1580 (m)	N–H bend	1° amines
1600–1585 (m)	C–C stretch (in-ring)	aromatics
1550–1475 (s)	N–O asymmetric stretch	nitro compounds
1500–1400 (m)	C–C stretch (in-ring)	aromatics
1470–1450 (m)	C–H bend	alkanes
1370–1350 (m)	C–H rock	alkanes
1360–1290 (m)	N–O symmetric stretch	nitro compounds
1335–1250 (s)	C–N stretch	aromatic amines
1320–1000 (s)	C–O stretch	alcohols, carboxylic acids, esters, ethers
1300–1150 (m)	C–H wag (–CH ₂ X)	alkyl halides
1250–1020 (m)	C–N stretch	aliphatic amines
1000–650 (s)	=C–H bend	alkenes
950–910 (m)	O–H bend	carboxylic acids
910–665 (s, b)	N–H wag	1°, 2° amines
900–675 (s)	C–H “oop”	aromatics
850–550 (m)	C–Cl stretch	alkyl halides
725–720 (m)	C–H rock	alkanes
700–610 (b, s)	–C≡C–H: C–H bend	alkynes
690–515 (m)	C–Br stretch	alkyl halides

m=medium, w=weak, s=strong, n=narrow, b=broad, sh=sharp



Research Article

Improved Antibacterial Activity of Honey, Propolis and Beeswax-Sodium Carboxymethyl Cellulose Composite HydrogelMOHAMED HAMDI^{1,2}, BAGHDAD KHIATI^{1,2}, MOUSSA AHMED^{1*}¹ Institute of Veterinary Sciences University Ibn-Khaldoun of Tiaret, Algeria.² Laboratory of Research on Local Animal Products, University of Tiaret, Tiaret, Algeria**ARTICLE DETAILS***Article history:*

Received on 11 December 2020

Modified on 23 December 2020

Accepted on 29 December 2020

Keywords:

NaCMC,

Honey,

Propolis,

Beeswax,

Antibacterial Activity.

ABSTRACT

Honey, propolis, and beeswax are natural products that have been used in alternative medicine and traditional practices. This study aimed to develop an antibiotic hydrogel containing propolis, honey, and beeswax and evaluation of its antibacterial potentials. Fourier transform infrared (FTIR) analysis was employed to characterise the NaCMC-H-P-BW hydrogel. Besides, the antibacterial activity of composite hydrogel was determined by using agar well diffusion assay against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, and the zone of inhibition was measured in terms of millimeters. A topical cream containing 1% silver sulfadiazine was used as a positive control and distilled water will be used as the negative control. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis suggested the formation of strong intermolecular interactions as hydrogen, oxygen, and carbon attractions between polymer and propolis, honey and beeswax. The antibacterial properties showed the inhibition activity against *Staphylococcus aureus* (23.10±4.60 mm) and *E. coli* (22.95±4.76 mm). Moreover, the inhibition activity observed for the positive control (silver sulfadiazine) was comparatively less compared to NaCMC-H-P-BW hydrogel *Staphylococcus aureus* (8.25±0.95) and *Escherichia coli* (9.30±1.53). These studies suggest that the topical formulation could be used as an antibacterial topical apitherapeutic product.

© KESS All rights reserved

INTRODUCTION

Several natural products have been used in wound care since they contain, antimicrobial properties, and anti-inflammatory substances [1]. Honey, propolis, and beeswax present and promotes wound healing with minimal scarring [2]. However, to control chronic wounds, several biomaterials have been developed for clinical applications. Several studies have investigated the properties of gels formed from blends of Na-CMC with natural products, frequently for biomedical applications such as wound healing [3].

In addition, CMC wound dressings are recognized for being flexible, capable of absorbing exudate, low-cost, biocompatibility, biodegradability, low toxicity, non-immunogenicity, promoting angiogenesis, autolytic debridement good film-forming and activate macrophages, and increase

cytokine levels in wounds [3]. In recent times, Lately, Park et al. prepared chestnut honey impregnated CMC hydrogel for diabetic ulcer wound healing [4]. In this study, they used CMC for the increase of moisture and viscosity of the hydrogels Also, in the same *in vitro* studies the materials, however, exhibited vital antibacterial activity towards *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Some topical antibiotics and antiseptics are not recommended in infected chronic wound therapy [5]. A rich source of many substances exhibiting antibacterial activity is apitherapy. In this study, we investigated three bee-derived products from Algeria, Sahara honey, propolis, and beeswax. Euphorbia honey is a well-known natural material from Algeria, considered to has been demonstrated to have positive effects on wound healing [6]. However, it is difficult to apply honey directly to the wound bed, because, with time, it flows out of the wound bed and causes inconvenience for the patient. Consequently, the incorporation of honey in a hydrogel system seems to be more beneficial and applicable [7]. Based on the positive healing

***Author for Correspondence:**

Email: mahmed7014@gmail.com

moussa7014@yahoo.fr

properties of honey, alone or in combination with other products, we hypothesized that a new dressing based on honey, propolis, and bee wax could be used to improve the regeneration process of wounds.

MATERIALS AND METHODS

Honey, Propolis, and Beeswax Samples

All the Bee products samples who were selected in the southern Algerian region during the year 2020.

Topical Formulation Preparation of NaCMC/HPW Hydrogel

The composition of NaCMC-H-P-BW hydrogel (10 g Na CMC, 80 g honey (H), 5 g propolis (P), and 5 g beeswax (BW) added to 100 mL water). A topical cream containing 1% silver sulfadiazine (SSD) (FLAMAZOLE®1%) was used as a positive control and distilled water will be used as the negative control.

FTIR Spectroscopy Measurements of the NaCMC-H-P-BW Mixture

Chemical characterization of scaffolds was performed using a Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectrometer. The FTIR spectra of samples were founded at the scanning range of 4000–550 cm⁻¹.

Antibacterial Activity

The clinical reference strains included *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

These reference strains were used to study the antibacterial efficacy of NaCMC-H-P-BW as they are well-known biofilm producers in burns and wounds.

Determination of Antibacterial Activity

Agar well-diffusion bioassay technique described earlier Ahmed et al., [8] was used to evaluate the antibacterial efficacy of Na CMC-H-P-BW. Briefly, agar plates (90 mm) were containing 20 mL of nutrient agar at 37°C for 24 h and adjusted by diluting fresh cultures to a turbidity equivalent to 0.5McFarland scale (approximately 2×10^8 colony-forming unit/ mL). An 8 mm diameter well was cut into the agar and 100 μ L of was aliquoted into the well. A topical cream containing 1% SSD was used as a positive control and distilled water will be used as the negative control.

The plates were placed in an incubator at 37°C for 24 hours. After incubation, the diameters of zones of inhibition of Na CMC-H-P-BW and silver sulfadiazine(1%) were measured. Each experiment was performed in triplicates.

RESULTS

A visual inspection of the FTIR spectra (Fig. 1). between 1300 and 1000 cm⁻¹ represent C–O stretching and C–OH bending originated from ethers alcohols, esters, and carboxylic acids, which are functions present mainly in phenolic acids and flavonoids [9-10].

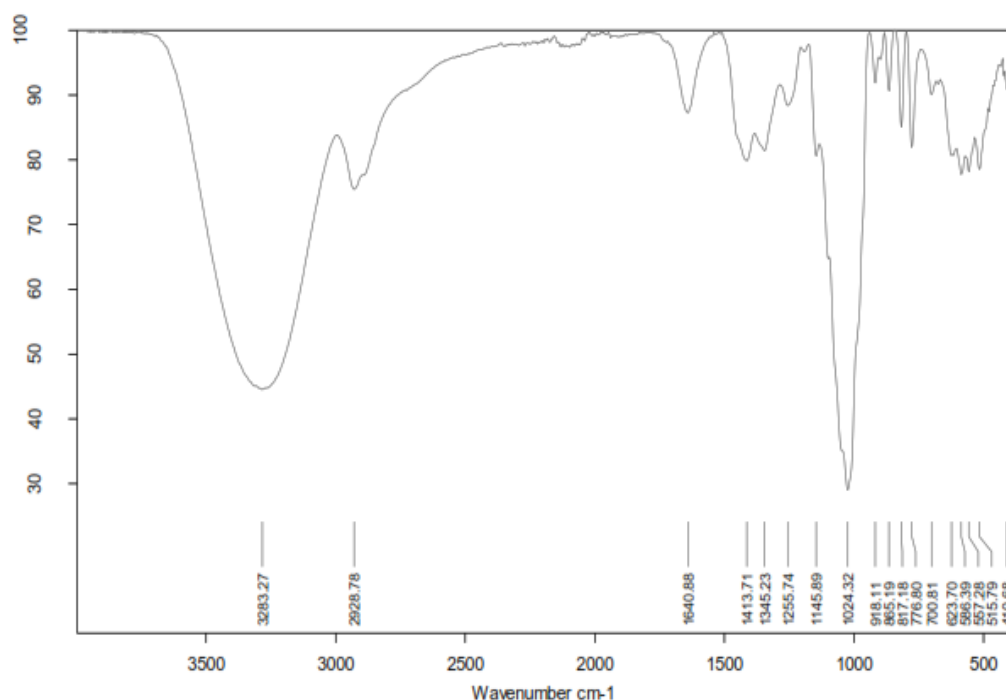


Figure 1: Fourier Transform Infrared (FTIR) spectrum of NaCMC-H-P-BW Hydrogel

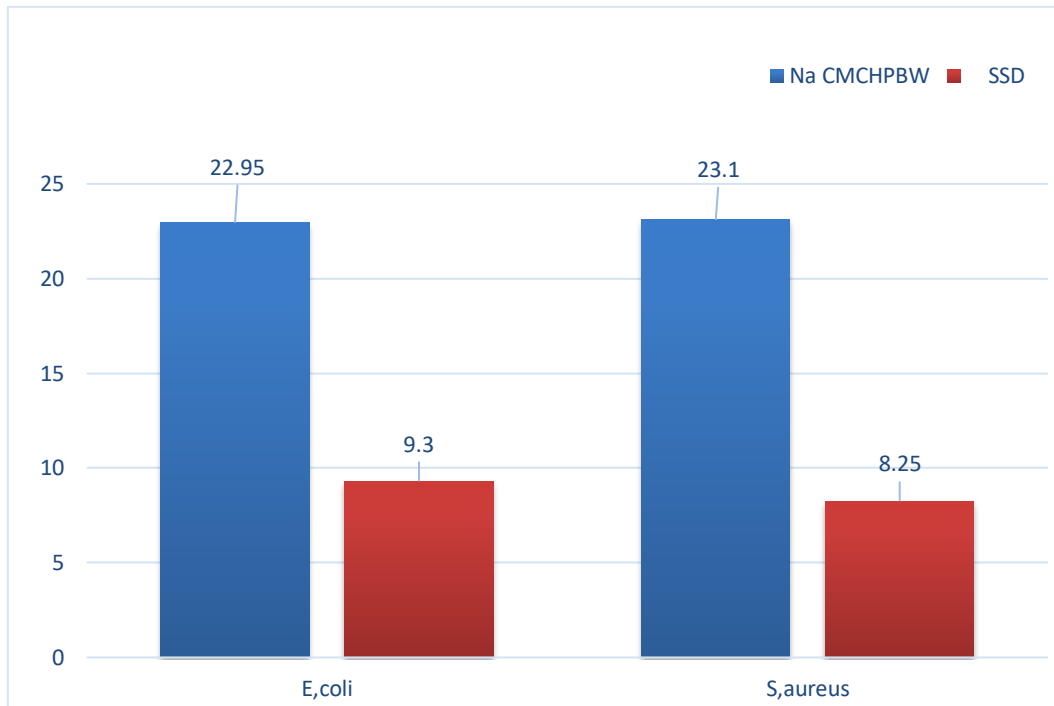


Figure 2: Effect of NaCMC-H-P-BW and SSD on the growth of pathogenic bacteria by agar well diffusion method.

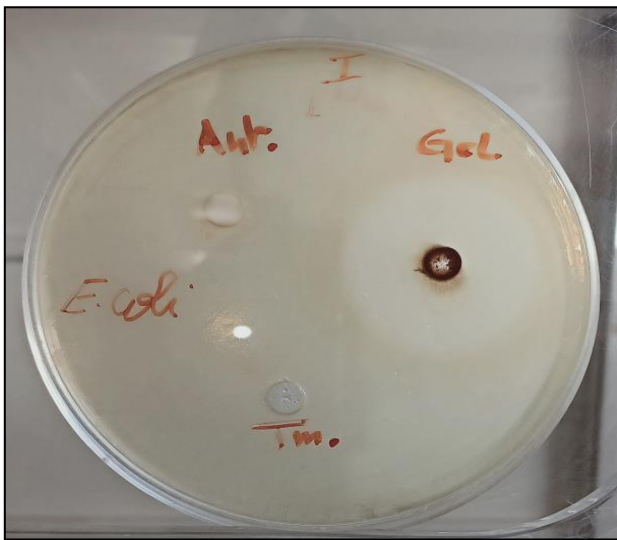


Figure 3a: Effect of NaCMC-H-P-BW and SSD on the growth of *Escherichia coli* by agar well diffusion.



Figure 3b: Effect of NaCMC-H-P-BW and SSD on the growth of *Staphylococcus aureus* by agar well diffusion method.

The region between 1700–1600 cm^{-1} shows the vibrational modes from carbohydrates [11] and the amide I band [12] water [13] and amino acids [14].

In the present study, using the agar well diffusion method, the diameters of zones of inhibition of *E. coli* and *S. aureus* in confronting NaCMC-H-P-BW were measured. The highest zone of inhibition of the NaCMC-H-P-BW was 23.10 ± 4.60 mm for *Staphylococcus aureus* followed by *E. coli* (22.95 ± 4.76 mm). Moreover,

the inhibition activity observed for the positive control (SSD) was comparatively less compared to NaCMC-H-P-BW hydrogel *Staphylococcus aureus* (8.25 ± 0.95) and *E. coli* (9.30 ± 1.53) (Fig. 2 and 3).

DISCUSSION

In recent years, Carboxymethyl cellulose (CMC) hydrogel has been used in drug carriers for wound care due to its ability to absorb a significant amount of water and good biocompatibility while retaining gel integrity for

longer, low cost, and non-toxic and are useful as occlusive dressings [3]. Some cellulosic membranes incorporating natural products have been developed recently.

Since the last decade, Bee products: honey, propolis, pollen, Beeswax, and others have become very popular for many different applications. However, bee products are known as possible sources of natural antibiotics [15]. Several researchers have explored the effects of combining honey with other products of the hive on antimicrobial activity *in vitro*.

In Algeria, Sahara honey (SH) has attracted the attention of the Algerian scientific community for its antimicrobial, anti-inflammatory, and healing properties [16]. Besides, the use of SH has been previously shown in animal experiments [17]. Also, Algerian researchers used a well diffusion assay to demonstrate a synergistic effect of Algerian honey and propolis against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* [9].

Later in 2019, Bacha et al. prepared -Na CMC hydrogels for bee pollen drug delivery to wounds [18].

Since the last decade, many researchers have invented several new wound dressing materials. Oliveira et al. prepared PVA-Na CMC hydrogels for propolis drug delivery to wounds [19].

Additionally, other researchers support the occurrence of enhanced effects of propolis and honey. Nho et al. developed CMC hydrogels, which were crosslinked with antibacterial Propolis and honey via radiation method for diabetic ulcer [20].

Similarly, Lately, Park et al. prepared chestnut honey impregnated CMC hydrogel for diabetic ulcer wound healing [4]. In this study, they used CMC for the increase of moisture and viscosity of the hydrogels.

About beeswax, a little more has been studied and tested regarding the antimicrobial action of beeswax in synergy with the other products of the hive products.

For example, Honey, beeswax and olive oil mixture (1:1:1, v/v) are useful to inhibit the growth of *S.aureus* and *C. Albicans*, isolated by human patients [21]. Similarly, the antimicrobial activity of propolis and beeswax in synergy (1:1, v/v) has also been investigated to inhibit the growth of *S. aureus* ATCC25923, *Staphylococcus*

epidermidis ATCC12228, *B. subtilis* ATCC27853 and *C. albicans* NCTC270 [22].

Regarding our study, so far there is no study investigating the effect of Na CMC hydrogels for propolis, honey and beeswax on the growth of *S. aureus* and *E.coli*. In addition, to our knowledge, there is no study investigating the synergism between propolis, honey and beeswax.

The mechanism of honey, beeswax and propolis antimicrobial activity is complex and might be attributed to the synergistic activity between its various potent biological ingredients such as phenolic and flavonoids. Other factors are involved in the antibacterial activity of bee products: nitric-oxide, phagocytic and lymphocytic activity increase, and prostaglandins' reduction [23].

Based on the results for the antibacterial effects, we can state that NaCMC-H-P-BW gel is a good candidate for the prevention and treatment of skin wound healing. Our findings showed that the NaCMC-H-P-BW gel had significant antiseptic effectiveness against *E.coli* and *S.aureus*. and were in agreement with those of previous studies. In conclusion, The present study concludes that honey alone and in combination with various bee products show great promise as natural antibiotic agents against *E.coli* and *S.aureus* could lead to increase in their combined effects and consequently they can be used to treat various skins infections caused by these organisms.

CONCLUSION

Further clinical studies in animals and humans are needed to fully understand the effectiveness of this mixture for the treatment of skin and wound infections.

REFERENCES

- [1] Sivamani R.K., Ma B.R., Wehrli L.N., Maverakis E. Phytochemicals and Naturally Derived Substances for Wound Healing. *Adv. Wound Care*. 2012;1:213–217. doi: 10.1089/wound.2011.0330.
- [2] Zbucnea A. Up-to-date use of honey for burns treatment. *Ann. Burns Fire Disasters*. 2014;27:22–30.
- [3] Kanikireddy V., Varaprasad K., Jayaramudu T., Karthikeyan C., Sadiku R. Carboxymethyl cellulose-based materials for infection control and wound healing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020; 164: 963–975.

- [4] Park JS., An SJ., Jeong SI., Gwon HJ., Lim YM., Nho YC. Chestnut honey impregnated carboxymethyl cellulose hydrogel for diabetic ulcer healing. *Polymers*. 2017;9:7. doi:10.3390/polym9070248.
- [5] Kwiecińska-Piróg J., Przekwas J., Majkut, M., Skowron K., Gospodarek-Komkowska E. Biofilm Formation Reducing Properties of Manuka Honey and Propolis in *Proteus mirabilis* Rods Isolated from Chronic Wounds. *Microorganisms* 2020, 8, 1823.
- [6] Khiati B., Bacha S., Aissat S., Ahmed M. The use of Algerian honey on cutaneous wound healing: a case report and review of the literature. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2014 ;(4:2): S867-S869.
- [7] El-Kased RF., Amer RI., Attia D., and Elmazar MM. Honey-based hydrogel: *In vitro* and comparative *In vivo* evaluation for burn wound healing. *Scientific reports* 2020 | 7: 9692.
- [8] Moussa A, Nouredine D, Abdelmelek M, Saad A. Antibacterial activity of various honey types of Algeria against pathogenic Gramnegative bacilli: *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Dis* 2012; 2: 211-4.
- [9] Cao J, Peng LQ., Du LJ., Zhang QD., Xu JJ. Ultrasound-assisted ionic liquid-based micellar extraction combined with microcrystalline cellulose as sorbent in dispersive microextraction for the determination of phenolic compounds in propolis. *Anal Chim Acta* 2017: 963:24-32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.063>
- [10] Cardoso EDO., Conti BJ., Santiago KB., Conte FL., Oliveira LPG., Sforcin JM., et al. Phenolic compounds alone or in combination may be involved in propolis effects on human monocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2017; 69(1):99-108.
- [11] Gallardo-Velázquez T., Osorio-Revilla G., Zuñiga-de Loa M., Rivera-Espinoza Y. Application of FTIR-HATR Spectroscopy and Multivariate Analysis to the Quantification of Adulterants in Mexican Honeys. *Food Res. Int.* 2009, 42, 313-318.
- [12] Philip D. Honey mediated green synthesis of gold nanoparticles. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2009, 73, 650-653.
- [13] Bureau S, Ruiz D, Reich M, Gouble B, Bertrand D, Audergon JM. Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit. *Food Chem* 2009: 115:1133-1140.
- [14] Sivakesava S., Irudayaraj J. Detection of inverted beet sugar adulteration of honey by FTIR spectroscopy. *J. Sci. Food. Agric.* 2001, 81, 683-690.
- [15] Lavigne J.-P., Ranfaing J., Dunyach-Rémy C., Sotto A. Synergistic Effect of Propolis and Antibiotics on Uropathogenic *Escherichia coli*. *Antibiotics* 2020, 9, 739.
- [16] Ahmed M., Aissat S., Djebli N. Preliminary comparative study of anti-inflammatory effect of unheated and heat-treated Sahara honey: *in vivo* approach. *J Coastal Life Med* 2015:3:366-369.
- [17] Khiati B., Ahmed M. Comparison of efficacy of unheated and heat-treated Sahara honey on wound healing in rabbits: *Journal of Coastal Life Medicine* 2015 : (3:2), pp. 162-165(4).
- [18] Bacha S., Benhebal H., Hamdi M, Ahmed M., KHIATI B. A New Topical Application for Hydrogel Composite Based on Sodium Carboxymethyl Cellulose with Bee Pollen for Second Degree Burns in Adult Rabbits. *Indian Journal of Novel Drug Delivery* 2019: 11(4), 235-239.
- [19] Oliveira RN., McGuinness GB., Rouze R., Quilty B., Cahill P., Soares GDA., Thiré RMSM. PVA hydrogels loaded with a Brazilian propolis for burn wound healing applications. *J. Appl. Polym. Sci.* 2015, 132, 42129.
- [20] Nho Y.C., Park J.S., Lim Y.M. Preparation of hydrogel by radiation for the healing of diabetic ulcer. *Radiat. Phys. Chem.* 2014, 94, 176-180.
- [21] Al-Waili NS., Mixture of Honey, Beeswax and Olive Oil Inhibits Growth of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Arch Med Res.* Jan-Feb 2005;36(1):10-3. doi: 10.1016/j.arcmed.2004.10.002.
- [22] S. Castaldo F. Capasso Propolis, an old remedy used in modern medicine *Fitoterapia*, 2002 : 73 (Suppl 1) , pp. S1-S6.
- [23] Syam Y., Natsir R., Rahardjo S. P., Usman A. N., Dwiyantri R., Hatta M. Effect of Trigona honey to mRNA expression of Interleukin-6 on *Salmonella Typhi* induced of BALB/c mice. *American Journal of Microbiological Research*. 2016;4(3):77-80.