

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE IBN KHALDOUN TIARET
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES



MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de :

Magister

Filière :

Sciences vétérinaires

Option :

Microbiologie appliquée

Présentée par :

DERBAL Saïd

THEME

***Effets cicatrisant et antibactérien du miel et des extraits de
graines de Nigella sativa L. sur des bactéries isolées à
partir des plaies superficielles des animaux domestiques***

JURY

Président : **AMARA Karim**

Rapporteur : **NIAR Abdellatif**

Examineur : **BOUCIF Ahmed**

Examineur : **KHIATI Baghdâd**

GRADE

Professeur

Professeur

Professeur

MCA

UNIVERSITE

Université de Tiaret

Université de Tiaret

Université de Tiaret

Université de Tiaret

Année universitaire 2016/2017

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, louange à « **ALLAH** » qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long du travail et m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes. Sans sa miséricorde, ce travail n'aurait pas abouti.

Je tiens à remercier le Professeur **NIAR Abdellatif**, Doyen de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université de Tiaret, qui a bien voulu m'encadrer dans mon sujet de mémoire et qui m'a guidé dans ce travail tout au long de sa réalisation avec ses directives efficaces et ses conseils précieux, mais pas seulement. Je le remercie aussi et avant tout pour leur soutien, leur patience et leur grande disponibilité.

Mes vifs remerciements s'adressent également,

Au Professeur **AMARA Karim** de l'Institut des Sciences Vétérinaires de l'Université de Tiaret pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury de soutenance, mais pas seulement. Je le remercie aussi pour leur générosité et leur aide précieuse.

Au Professeur **BOUCIF Ahmed**, ainsi qu'au monsieur **KHIATI Baghdâd** de l'Institut des Sciences Vétérinaires de l'Université de Tiaret. Je les remercie pour avoir accepté de prendre part au jury chargé d'examiner notre travail.

DEDICACES

Ce travail est dédié :

A mes parents

A mes frères

A mes sœurs

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

PREMIERE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Etude des plaies : les infections bactériennes et la cicatrisation cutanée

I. La peau des mammifères	1
I.A. Structure	1
I.A.1. L'épiderme	1
I.A.2. La jonction dermo-épidermique	3
I.A.3. Le derme	4
I.A.4. L'hypoderme	4
I.B. Les annexes cutanées	5
I.B.1. Les follicules pileux	5
I.B.2. Les glandes cutanées	6
I.C. Vascularisation	7
I.C.1. La vascularisation segmentaire	7
I.C.2. La vascularisation perforante	7
I.C.3. La vascularisation cutanée ou dermo-épidermique	7
I.D. Vaisseaux lymphatiques	8
I.E. Innervation	8
I.G. Fonctions de la peau	9
I.G.1. Protection contre les agressions extérieures	9
I.G.2. Régulation thermique	9
I.G.3. Fonction cognitive	10
I.G.4. Activités de synthèse, stockage, sécrétion et excrétion	10
I.G.5. Rôle d'indicateur	10
II. Les infections bactériennes des plaies	10
II.A. Flore bactérienne cutanée normale, transitoire et infection	11
II.B. Mécanismes et facteurs locaux favorisant l'infection	14
II.C. Les principales bactéries responsables d'infection des plaies et leur pathogénicité	17

III. La cicatrisation cutanée chez les mammifères	18
III.A. Phase inflammatoire.....	19
III.B. Phase de migration et de prolifération.....	21
III.C. Phase de remodelage	25

Chapitre II : Etude des produits naturels cicatrisants : le miel et *Nigella sativa* L.

I. Le miel	27
I.A. Composition.....	28
I.A.1. Eau.....	28
I.A.2. Sucres	28
I.A.3. Vitamines	28
I.A.4. Oligo-éléments	29
I.A.5. Autres	29
I.B. Activités pharmacologiques du miel.....	30
I.B.1. Activité énergétique et nutritionnelle	30
I.B.2. Activité antioxydante.....	30
I.B.3. Activité anti-inflammatoire	31
I.B.4. Activité immuno-stimulatrice.....	31
I.B.5. Activité anticancéreuse.....	32
I.B.6. Activité antimicrobienne	32
I.B.7. Activité cicatrisante	34
II. <i>Nigella sativa</i> L.	35
II.A. Description botanique de <i>Nigella sativa</i> L.	36
II.B. Composition chimique.....	37
II.B.1. Lipides et stérols	37
II.B.2. Composés aromatiques.....	39
II.B.3. Saponosides.....	39
II.B.4. Polyphénols et flavonoïdes	41
II.B.5. Alcaloïdes.....	42
II.B.6. Les protéines	42
II.B.7. Les vitamines et sels minéraux	43
II.C. <i>Nigella sativa</i> L. d'après la médecine traditionnelle.....	43
II.D. Activités pharmacologiques de <i>Nigella sativa</i> L.	45
II.D.1. Activité hypoglycémiant	45
II.D.2. Activités cardio-vasculaire.....	45
II.D.3. Activités hypocholestérolémiant et hypolipémiant	46
II.D.4. Action sur la masse pondérale	47

II.D.5. Activité sur la réponse immunitaire.....	47
II.D.6. Activité anti-tumorale	47
II.D.7. Activité antimicrobienne.....	48
II.D.8. Activité cicatrisante	50
II.D.9. Autres actions biologiques.....	51

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre I : Matériels et méthodes

I. Matériels	52
I.A. Les graines de <i>Nigella sativa L.</i>	52
I.B. Le miel	52
I.C. Les milieux de culture.....	52
I.D. Les produits chimiques	53
I.E. Les médicaments	53
II. Méthodes	54
II.A. Isolement, purification, identification et conservation des bactéries.....	54
II.A.1. Isolement des bactéries	54
II.A.2. Purification et identification des souches bactériennes isolées.....	55
II.A.3. Conservation des souches bactériennes isolées	60
II.B. Procédé d'extraction	60
II.B.1. Broyage	60
II.B.2. Extraction	60
II.B.3. Calcul de rendement.....	61
II.C. Etude de l'activité antibactérienne du miel et des extraits de graines de <i>N. sativa L.</i> ..	62
II.C.1. Préparation de l'inoculum	62
II.C.2. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits de graines de <i>N. sativa L.</i>	62
II.C.3. Détermination de l'activité antibactérienne du miel	63
II.D. Etude de l'influence de l'addition de 5% (p/p) des différents extraits de graines de <i>N. sativa L.</i> sur l'activité antibactérienne et la concentration minimale bactéricide (CMB) du miel.....	65
II.D.1. Préparation des mélanges naturels	65
II.D.2. Préparation de l'inoculum.....	65
II.D.3. Détermination de la CMB du miel et des mélanges naturels.....	66
II.E. Etude de l'influence de l'addition de 5% (p/p) des différents extraits de graines de <i>Nigella sativa L.</i> sur l'activité cicatrisante du miel.....	68
II.E.1. Animaux d'expérience	68

II.E.2. Réalisation des plaies expérimentales	68
II.E.3. Application des traitements	70
II.E.4. Étude de l'évolution de la cicatrisation	71
II.F. Analyse statistique des résultats	72

Chapitre II : Résultats et discussion

I. Identification des bactéries isolées	73
I.A. Morphologie des bactéries	73
I.B. Identification biochimique des bactéries	73
II. Rendement d'extraction des différents extraits de graines de <i>Nigella sativa</i> L.	75
III. Activité antibactérienne du miel	77
IV. Activité antibactérienne des extraits de graines de <i>N. sativa</i> L.	81
V. Influence de l'addition de 5% (p/p) des différents extraits de graines de <i>N. sativa</i> L. sur l'activité antibactérienne et la concentration minimale bactéricide (CMB) du miel.	86
VI. Influence de l'addition de 5% (p/p) des différents extraits de graines de <i>N. sativa</i> L. sur l'activité cicatrisante du miel	89

Conclusion

Recommandations

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN:** Acide Désoxyribose Nucléique
- ANOVA:** Analyse de variance
- BEA:** Bile Esculine Azide
- BMH:** Bouillon Muller-Hinton
- CAT:** Catalase
- CCP:** Cicatrisation cutanée pathologique
- cm:** Centimètre
- cm²:** Centimètre carré
- CMB:** Concentration minimale bactéricide
- DMSO:** Dimethyl Sulphoxide
- EAE:** Extrait d'acétate d'éthyle
- EE:** Extrait éthanolique
- EGF:** Epidermal growth factor
- EM:** Extrait méthanolique
- ERV:** Enterococcus résistant à la vancomycine
- ESV:** Enterococcus sensible à la vancomycine
- g:** gramme
- G +:** Gram positif
- G -:** Gram négatif
- G ×100:** grossissement à l'objectif x 100
- GSH-Px:** glutathion peroxydase
- H:** heure
- H₂O:** Eau
- H₂O₂:** Eau oxygénée

HD: hydro-distillation

IGF-1: Insulin-like growth factor-1

IL: Interleukine

INF- γ : Interféron-gamma

J: jour

kg: Kilogramme

LPS: lipopolysaccharide

mg: Milligramme

min: Minute

ml: Millilitre

mm: Millimètre

mm²: Millimètre carré

MMP: Métalloprotéinase matricielle

MN: Mélange Naturel

N^{bre}: Nombre

NR: Non recherché

O₂: Dioxygène

PAF: Platelet-activating factor

PBS: Phosphate buffered saline (tampon phosphate salin)

PDEGF: Platelet-derived epidermal growth factor

PDGF: Platelet-derived growth factor

PH: Potentiel hydrogène

p/p: Poids/poids

SARM: Staphylococcus aureus résistante à la méthicilline

SARV: Staphylococcus aureus résistante à la vancomycine

SCCO₂: supercritical carbon dioxide

SD: dry steam distillation

SE-SD: steam distillation of crude oils obtained by solvent extraction

SFE-SD: supercritical fluid extraction

SOD: superoxyde dismutase

TGF- β 1, β 2: Transforming growth factor

THQ: Thymohydroquinone

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

TQ: Thymoquinone

UFC: Unités Formant Colonie

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VS: Versus

v/v: Volume/volume

μ l: Microlitre

°C: Degré Celsius

%: Pourcentage

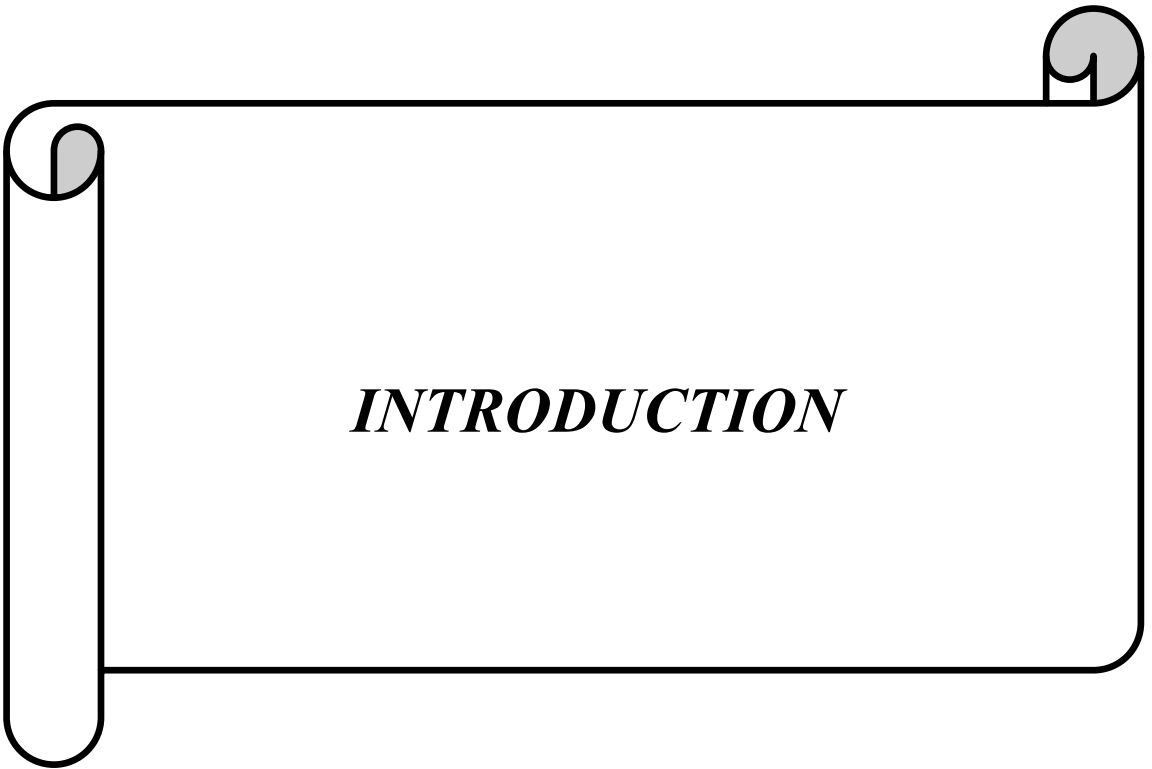
LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Principaux résultats de quelques études explorant l'activité antibactérienne et antifongique du miel in-vitro	32
Tableau 2	Composition des graines de <i>Nigella sativa L.</i>	37
Tableau 3	Composition (en pourcentage) de graines <i>N. sativa L.</i> en acides gras selon l'origine de l'échantillon par ordre décroissant	38
Tableau 4	Principaux résultats de quelques études explorant l'activité antibactérienne et antifongique des différents extraits de graines de <i>Nigella sativa L.</i>	48
Tableau 5	Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des bactéries isolées	73
Tableau 6	Caractéristiques biochimiques des bactéries isolées	73
Tableau 7	Rendement des différents extraits de graines de <i>Nigella sativa L.</i> en % (p/p)	75
Tableau 8	Diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches bactériennes isolées obtenues avec les différentes concentrations (v/v) du miel	77
Tableau 9	Diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches bactérienne isolées obtenues avec les différents extraits de graines de <i>Nigella sativa L.</i>	81
Tableau 10	Efficacité antibactérienne du miel et des mélanges naturels (MNs) sur les bactéries isolées	86
Tableau 11	La concentration minimale bactéricide (CMB) du miel et des mélanges naturels (MNs) sur les bactéries isolées	87
Tableau 12	Efficacité cicatrisante du miel et des mélanges naturels (MNs) sur les plaies expérimentales	89

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
Figure 1	Structure de la peau du chien	1
Figure 2	Les facteurs intervenant dans l'inflammation	20
Figure 3	Les étapes du déplacement cellulaire	24
Figure 4	Certains types du miel	28
Figure 5	Graines de <i>Nigella sativa L.</i>	36
Figure 6	Représentation chimique de la thymoquinone et de ses dérivés retrouvés dans l'huile essentielle de <i>Nigella sativa L.</i>	39
Figure 7	Structure des saponosides à hédéragénine isolés à partir des graines de <i>Nigella sativa L.</i>	40
Figure 8	Structure chimique des trois flavonoïdes isolés de <i>Nigella sativa L.</i>	41
Figure 9	Structure chimique des principaux alcaloïdes de <i>Nigella sativa L.</i>	42
Figure 10	Usages traditionnels de <i>Nigella sativa L.</i>	44
Figure 11	Macération de la poudre de graines de <i>Nigella sativa L.</i> dans l'acétate d'éthyle, l'éthanol et le méthanol	61
Figure 12	Evaporateur rotatif de type Heidolph [®]	61
Figure 13	Représentation schématique de la méthode d'étude de l'activité antibactérienne du miel et des extraits de graines de <i>Nigella sativa L.</i>	64
Figure 14	Représentation schématique de la méthode d'étude de l'influence de l'addition de 5% (p/p) des différents extraits de graines de <i>Nigella sativa L.</i> sur l'activité antibactérienne et la concentration minimale bactéricide (CMB) du miel	67
Figure 15	Induction des 3 premières plaies expérimentales dans la région thoracolumbaire du lapin	69
Figure 16	Induction des 2 dernières plaies expérimentales dans la région thoracolumbaire du lapin	70
Figure 17	Les millimètres-carrés entiers et partiels inclus dans la forme géométrique de la plaie	71
Figure 18	Aspect des colonies des bactéries isolées sur leurs milieux sélectifs	75
Figure 19	Identification biochimique d' <i>Escherichia coli</i> par la galerie API 20E	75
Figure 20	Histogramme présentant le rendement des différents extraits de graines de <i>Nigella sativa L.</i> en % (p/p)	76
Figure 21	Histogramme présentant les diamètres des zones d'inhibition (moyenne \pm écart-type) des souches bactériennes isolées obtenues avec les différentes concentrations (v/v) du miel	77
Figure 22	Activité antibactérienne des différentes concentrations du miel sur <i>Staphylococcus aureus</i>	80
Figure 23	Zone d'inhibition de la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> obtenue avec le miel non dilué (100%)	81
Figure 24	Histogramme présentant les diamètres des zones d'inhibition (moyenne \pm écart type) des souches bactériennes isolées obtenues avec les différents extraits de graines de <i>Nigella sativa L.</i>	82
Figure 25	Activité antibactérienne des différents extraits de graine de <i>Nigella sativa L.</i> sur <i>Staphylococcus intermedius</i>	85
Figure 26	Zone d'inhibition de la croissance de <i>Staphylococcus intermedius</i> obtenue avec l'extrait d'acétate d'éthyle de graines de <i>Nigella sativa L.</i>	86

Figure 27	Histogramme présentant les pourcentages de contraction (moyenne \pm écart-type) des plaies traitées à J7 (%)	90
Figure 28	Histogramme présentant les périodes de ré-épithélialisation (moyenne \pm écart-type) des plaies traitées (N ^{bre} de jours)	90



INTRODUCTION

INTRODUCTION

La peau recouvre la surface du corps ; elle est la couche protectrice la plus externe de l'organisme. Elle est soumise à d'incessantes agressions, traumatismes à l'origine de plaies cutanées pouvant être étendues et graves.

Les plaies cutanées représentent un des premiers motifs de consultation en médecine vétérinaire dans le monde entier, et le traitement des plaies a pour objectif d'éviter les complications et d'obtenir une cicatrisation de qualité la plus rapide possible.

Le processus physiologique qui permet la restauration tissulaire est la cicatrisation ; cette dernière résulte d'une cascade d'événements cellulaires, moléculaires complexes liés qui aboutissent au comblement de la plaie par un tissu cicatriciel. Cependant, ce processus peut être entravé par de multiples facteurs.

L'infection des plaies est l'un de ces facteurs et les micro-organismes ont été fréquemment associés à la pathophysiologie des troubles dermatologiques et particulièrement l'évolution pathologique septique de la cicatrisation des plaies.

Les bactéries résistantes aux antibiotiques continuent d'être un problème de santé majeur dans le monde entier. Etant donné que l'utilisation des antibiotiques se sont répandues il y a plus de 50 ans, les bactéries ont progressivement développé une résistance (**Hsueh et al., 2005**). Par conséquent, des efforts scientifiques ont été faits pour étudier et développer de nouveaux composés pouvant être utilisés au-delà de l'antibiothérapie classique.

L'utilisation de produits naturels comme un traitement alternatif dans la guérison et le traitement des plaies a été à la hausse au cours de ces dernières décennies (**Tan et al., 2009 ; Haryanto et al., 2012 ; Kirui et al., 2004**). Le miel et *Nigella sativa L.* sont les remèdes naturels les plus importants de la médecine traditionnelle dans les pays arabes et islamiques, et ont été utilisés pour diverses maladies pour plus de 1500 ans (**Kirui et al., 2004 ; Jull et al., 2008b ; Tan et al., 2012 ; Al-Waili et al., 2011b ; Al-Mofleh et al., 2008**). En Islam, le miel et *Nigella sativa L.* sont considérés comme produits faisant partie des plus grandes formes de médicaments guérissant (**Kirui et al., 2004 ; Jull et al., 2008b ; Tan et al., 2012 ; Al-Waili et al., 2011b ; Al-Mofleh et al., 2008**).

En médecine traditionnelle, le miel a été reconnu partout dans le monde pour ses propriétés curatives pour la peau. Les anciens Grecs et Egyptiens, par exemple, ont utilisé l'application topique du miel pour traiter les plaies et les brûlures de la peau, et la médecine traditionnelle perse a documenté que le miel est efficace dans le traitement des plaies, l'eczéma et l'inflammation (**Eteraf-Oskouei et Najafi, 2013 ; Sepehr, 2010**).

Les scientifiques ont rapporté la capacité du miel à tuer des microbes causant les maladies à la fin des années 1800, mais avec l'avènement des antibiotiques au début des années 1900, l'intérêt scientifique du miel a diminué (**Molan, 2001**). Aujourd'hui, avec l'émergence de souches microbiennes résistantes aux antibiotiques, comme *S. aureus* résistants à la méthicilline (*SARM*) causant des infections des plaies difficiles à traiter et une préoccupation mondiale de la santé, le miel a de nouveau attiré l'attention de chercheurs (**Molan, 2001 ; Fry et Barie, 2011**).

Il existe de nombreux rapports publiés sur la puissance antibactérienne du miel contre des différentes bactéries pathogènes, usuellement infectant les plaies des animaux domestiques. Le miel, comme la plupart des produits naturels, peut avoir une grande variance de ses composants thérapeutiques en fonction de son origine, ainsi, la source florale du miel joue un rôle important sur ses propriétés biologiques. Comme mentionné plus tôt, le miel est connu depuis longtemps pour posséder des propriétés antibactériennes et a un usage établi comme un pansement (**Molan, 1999 ; Cooper et al., 2002a**), mais pas tous les miels sont tout aussi efficaces pour la cicatrisation des plaies (**Molan, 2002**). En médecine humaine, plusieurs rapports publiés indiquent l'efficacité du miel dans le traitement des différentes plaies connues toujours infectées, comme les ulcères veineux de la jambe (**Gethin et Cowman, 2008 ; Jull et al., 2008a**), les brûlures (**Subramaniam, 1993**), les ulcères chroniques de la jambe (**Oluwatosin et al., 2000**) et les ulcères de pression (**Weheida et al., 1991**).

Nigella sativa L. (la graine noire) est une plante herbacée annuelle de la famille de Ranunculaceae et elle a été utilisée traditionnellement depuis des siècles au Moyen-Orient, Afrique du Nord, Extrême-Orient et en Asie pour le traitement de diverses maladies (**Phillips, 1992**). Aussi, elle est la plus célèbre pour la parole du prophète Mouhammed (Paix et bénédiction de Dieu sur lui, sa famille, ses compagnons et tous ceux qui le suivent jusqu'au jour du jugement dernier) : "Tenez-vous à l'utilisation de la graine noire, car elle a un remède

pour toutes les maladies sauf la mort". Le mot «tenir à» indique une utilisation à long terme. De nombreuses études ont été réalisées au cours de ces dernières décennies sur les propriétés pharmacologiques de *Nigella sativa L.* et les progrès dans les méthodes d'analyses ont conduit à la découverte de nombreux principes actifs comme le Thymoquinone qui a plusieurs activités biologiques. En raison des propriétés caractéristiques de la nigelle, elle a été utilisée dans le traitement de nombreux types de plaies et de traumatismes (**Alsaif, 2008 ; Ahmed et al., 1995**).

Le but de la présente étude était :

- d'évaluer l'effet cicatrisant et antibactérien d'un échantillon du miel d'El-Eulma (Sétif) sur des bactéries isolées à partir des plaies superficielles des animaux domestiques ;
- de comparer l'effet antibactérien de 3 extraits différents (extraits méthanolique, éthanolique et d'acétate d'éthyle) de graines de *Nigella sativa L.* sur ces bactéries isolées ;
- de rechercher le meilleur additif parmi ces 3 extraits capable de potentialiser l'effet antibactérien et améliorer l'effet cicatrisant du miel d'El-Eulma (Sétif).



PREMIERE PARTIE :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



*Chapitre I : Etude des plaies : les
infections bactériennes et la
cicatrisation cutanée*

I. La peau des mammifères

I.A. Structure

La peau est constituée de différentes couches (figure 1) : l'épiderme et ses annexes, la membrane basale ou jonction dermo-épidermique, le derme et l'hypoderme. Son épaisseur varie entre 0,4 mm et 2 mm chez le chat, entre 0,5 mm et 5 mm chez le chien (Muller et al., 2001) et entre 1,7 et 6,3 mm chez le cheval (Scott et Miller, 2003).

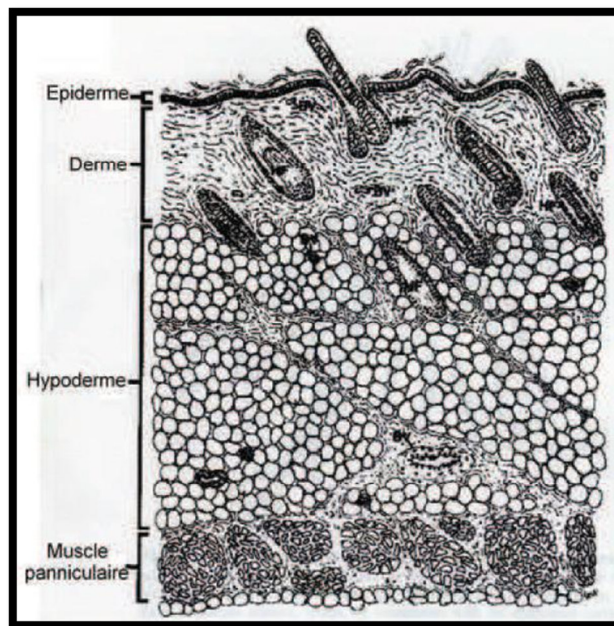


Figure 1 : Structure de la peau du chien (Pavletic, 2003).

I.A.1. L'épiderme

Il s'agit de la couche la plus superficielle, fine au niveau des zones poilues (de 0,1 à 0,5 mm d'épaisseur chez le chien et le chat (Muller et al., 2001) et de 0,3 à 0,95 mm d'épaisseur chez le cheval (Scott et Miller, 2003) et plus épaisse au niveau des zones glabres (jusqu'à 1,5 mm) (Muller et al., 2001). L'épiderme est un épithélium stratifié et avasculaire constitué des 5 couches suivantes (Muller et al., 2001 ; Pavletic, 2003 ; Viguiet et Degorce, 1992) :

- La couche basale (stratum basale) ;
- La couche épineuse (stratum spinosum) ;
- La couche granuleuse (stratum granulosum) ;
- La couche claire (stratum lucidum) ;

- La couche cornée (stratum corneum).

Au sein de l'épiderme se déroule le processus de kératinisation ou cornéogenèse. Il s'agit d'un processus de différenciation particulier des cellules épithéliales qui aboutit à la formation de cornéocytes, cellules mortes, anucléées et aplaties qui desquament à la surface épidermique (Noli, 2006). Au cours de cette différenciation, les kératinocytes de la couche basale, petites cellules rondes et nucléées, passent par toutes les couches de l'épiderme pour finir en cellules de grande taille polyédriques et anucléées dans la couche cornée. Cette différenciation se déroule sur 3 semaines environ chez le chien (Noli, 2006).

I.A.1.1. La couche basale

Elle est constituée d'une unique assise de cellules cubiques reposant sur la membrane basale qui sépare l'épiderme du derme. La plupart de ces cellules (85 à 90%) (Noli, 2006) sont des kératinocytes qui se multiplient constamment afin de compenser la perte par desquamation des cellules de la couche cornée (Muller et al., 2001 ; Noli, 2006 ; Viguier et Degorce, 1992). On y trouve également des mélanocytes, présents également dans la matrice et la gaine épithéliale des follicules pileux et dans les canaux des glandes sébacées et sudoripares, et qui sont responsables de la pigmentation de la peau et des phanères (Viguier et Degorce, 1992). Les autres cellules présentes dans cette couche sont les cellules de Merckel, mécano réceptrices et les cellules de Langherans, cellules présentatrices d'antigènes (Noli, 2006 ; Viguier et Degorce, 1992). Cette couche basale est indispensable à la cicatrisation car c'est elle qui assure le processus d'épithélialisation (Muller et al., 2001 ; Viguier et Degorce, 1992).

I.A.1.2. La couche épineuse

Elle est composée de cellules filles de la couche basale sous-jacente qui débutent le processus de kératogenèse (Muller et al., 2001 ; Viguier et Degorce, 1992). Il s'agit de cellules polyédriques unies par des desmosomes et appelées acanthocytes (Viguier et Degorce, 1992). Alors qu'elle n'est constituée que d'1 ou 2 couches de cellules dans les zones poilues, elle est beaucoup plus épaisse (jusqu'à 20 couches cellulaires) dans les zones glabres telles que les coussinets, la truffe, les jonctions cutané-muqueuses (Muller et al., 2001) ou encore le bourrelet coronaire chez le cheval (Scott et Miller, 2003).

I.A.1.3. La couche granuleuse

Peu épaisse chez les carnivores domestiques, elle est même souvent absente dans les zones poilues. Chez le cheval elle reste fine dans les zones poilues : 1 à 2 couches cellulaires (**Scott et Miller, 2003**). Elle peut par contre compter de 4 à 8 couches cellulaires dans les zones de peau glabre ou au niveau de l'infundibulum des follicules pileux (**Muller et al., 2001 ; Viguier et Degorce, 1992**).

I.A.1.4. La couche claire

Il s'agit d'une fine assise de cellules mortes totalement kératinisées. Chez les carnivores domestiques, elle est très développée au niveau de la truffe, moins au niveau des coussinets et totalement absente dans les autres régions (**Muller et al., 2001**). Chez les bovins, elle est présente au niveau du bourrelet coronaire et de la zone périnéale tandis qu'elle est inexistante chez le cheval (**Scott et Miller, 2003**).

I.A.1.5. La couche cornée

C'est la couche la plus externe, totalement kératinisée. La desquamation des cornéocytes qui la constitue est compensée par la prolifération des cellules basales, ce qui permet de maintenir une épaisseur épidermique constante (**Muller et al., 2001**). Comme la plupart des couches précédentes, elle est plus épaisse au niveau des zones glabres.

I.A.2. La jonction dermo-épidermique

Constituée du pôle basal des kératinocytes de la couche basale, de la membrane basale épidermique et de la zone sous-basale du derme, elle assure la cohésion entre le derme et l'épiderme (**Noli, 2006**). Elle est nécessaire au renouvellement de l'épiderme (**Viguier et Degorce, 1992**), car elle intervient dans la répartition tissulaire et la transmission de signaux moléculaires capables de moduler certaines fonctions des kératinocytes (**Noli, 2006**).

I.A.3. Le derme

Il s'agit d'un tissu conjonctif de soutien compressible et élastique constitué d'un réseau dense de fibres, de substance fondamentale riche en protéoglycanes et de diverses cellules (Noli, 2006 ; Viguier et Degorce, 1992). Il supporte l'épiderme sus-jacent et enrobe les annexes épidermiques, les muscles arrecteurs des poils ainsi que les vaisseaux sanguins et lymphatiques et les nerfs qui le traversent (Muller et al., 2001 ; Noli, 2006 ; Viguier et Degorce, 1992). Les fibres rencontrées dans le derme sont des fibres de collagènes, dont 90% de type I et III très résistantes à la traction, des fibres de réticuline (composées de fines fibres de collage de type I et III et de fibronectine) et des fibres élastiques (Muller et al., 2001 ; Noli, 2006).

Chez les mammifères domestiques, le derme est divisé en 2 parties : le derme superficiel et le derme profond (Muller et al., 2001 ; Pavletic, 2003 ; Scott et Miller W.H., 2003 ; Viguier E. et Degorce F., 1992). Dans le derme superficiel, les fibres de collagène sont fines, agencées de façon lâche et irrégulière et associées à de fines fibres élastiques et réticulaires. Au contraire, dans le derme profond, les fibres de collagène sont épaisses, agencées de façon dense parallèlement à la surface cutanée et associées à des fibres élastiques plus épaisses mais moins nombreuses que dans le derme superficiel (Muller et al., 2001 ; Viguier et Degorce, 1992). Les cellules rencontrées dans le derme sont principalement des fibroblastes qui synthétisent toutes les fibres, ainsi que la substance fondamentale du derme et jouent un rôle important dans la cicatrisation. Mais on peut également y trouver des mélanocytes et des cellules inflammatoires telles que des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, des macrophages, des lymphocytes et des plasmocytes (Noli, 2006 ; Viguier et Degorce, 1992).

I.A.4. L'hypoderme

Appelé également tissu sous-cutané, il s'agit de la couche la plus profonde et la plus épaisse de la peau (Viguier et Degorce, 1992). Il est constitué d'un tissu conjonctif riche en adipocytes qui participe à la protection contre les traumatismes, le stockage des lipides et l'isolation thermique (Muller et al., 2001 ; Noli, 2006 ; Viguier et Degorce, 1992) mais permet également l'adhérence aux structures sous-jacentes (périoste et aponévroses musculaires) (Muller et al., 2001). Au sein de l'hypoderme se trouve également les muscles

panniculaires qui peuvent même atteindre le derme et dont les vaisseaux participent à l'irrigation de la peau. Ils doivent donc être manipulés avec précaution lors de décollement cutané (**Pavletic, 2003 ; Viguier et Degorce, 1992**). Associée à l'importance des fibres de collagène du derme et à la couche cornée de l'épiderme, l'épaisseur de l'hypoderme est responsable de son adhérence aux plans sous-jacents (**Pavletic, 2003 ; Viguier et Degorce, 1992**). Ainsi, plus l'épaisseur de l'hypoderme augmente, moins la peau est adhérente aux plans sous-jacents. Quant à l'élasticité cutanée, elle dépend d'une tension statique d'autant plus importante que la peau est adhérente. C'est cette tension statique qui définit les lignes de tension qu'il faut éviter de traverser lors d'une incision sous peine d'entraîner une béance de la plaie et des tensions sur la suture (**Viguier et Degorce, 1992**).

I.B. Les annexes cutanées

Il s'agit des follicules pileux, des glandes annexes et des glandes spécialisées.

I.B.1. Les follicules pileux

Ce sont des invaginations épidermiques au sein du derme qui synthétisent et supportent le poil (**Noli, 2006**). Ils sont accompagnés des muscles arrecteurs et des glandes sébacées (**Viguier et Degorce, 1992**). Le follicule pileux est divisé en 3 zones (**Noli, 2006**) :

- L'infundibulum, de la surface à l'abouchement des glandes sébacées ;
- L'isthme, de l'abouchement des glandes sébacées à l'insertion des muscles arrecteurs ;
- Le bulbe, de l'insertion des muscles arrecteurs à la papille dermique.

Chaque follicule pileux produit un poil principal (le plus long, en position centrale), jusqu'à 4 poils intermédiaires et 15 à 20 poils secondaires (**Noli, 2006**). Chez le chien, la densité pileuse est de 1000 à 9000 poils /cm².

Chaque poil est lui-même constitué de 3 couches : la cuticule externe, le cortex et la médulla centrale (**Muller et al., 2001**). Le cycle pileux peut être divisé en 3 phases (**Noli, 2006 ; Viguier et Degorce, 1992**) :

- La phase anagène de croissance ;
- La phase catagène durant laquelle la croissance subit un ralentissement ;
- La phase télogène de repos.

Ce cycle se réalisant en mosaïque, le renouvellement des poils peut avoir lieu toute l'année. Mais chez les carnivores domestiques on note toutefois 2 mues, au printemps et à l'automne, correspondant au maximum de renouvellement (**Viguiet et Degorce, 1992**). Il existe également des poils spécialisés, comme les vibrisses à fonction sensorielle, qui ne subissent pas de cycle pilaire.

I.B.2. Les glandes cutanées

I.B.2.1. Les glandes sébacées

Leurs canaux excréteurs débouchent dans l'isthme folliculaire. Elles sécrètent du sébum qui contribue à la souplesse et l'hydratation de la surface cutanée et donne aux poils un aspect brillant (**Muller et al., 2001**). Elles sont plus nombreuses dans les zones de faible densité pilaire mais absentes au niveau des zones glabres (**Muller et al., 2001 ; Noli, 2006 ; Viguiet et Degorce, 1992**).

I.B.2.2. Les glandes sudoripares

Il en existe 2 types :

- Les glandes sudoripares épitrichiales sont présentes sur toute la surface poilue du corps et leurs canaux s'abouchent dans l'isthme folliculaire, au dessus de celui des glandes sébacées (**Noli, 2006**). Leur sécrétion aqueuse aux propriétés antibactériennes forme avec le sébum présent à la surface de la peau une émulsion qui constitue le film hydrolipidique de surface (**Muller et al., 2001 ; Noli, 2006**) ;
- Les glandes sudoripares atrichiales sont situées exclusivement au niveau des coussinets et leurs canaux s'abouchent directement à la surface cutanée (**Noli, 2006**).

I.B.2.3. Les glandes spécialisées

Il s'agit de glandes sébacées spécialisées telles que (**Noli, 2006 ; Viguiet et Degorce, 1992**) :

- Les glandes hépatoïdes circumanales et supracaudales ;
- Les glandes de Meibomius et les glandes de Zeiss en région palpébrale.

Mais également de glandes sudoripares spécialisées telle que (**Viguiet et Degorce, 1992**) :

- Les glandes mammaires ;
- Les glandes cérumineuses du conduit auriculaire ;
- Les glandes des sacs anaux.

I.C. Vascularisation

Son organisation est caractéristique, avec l'existence de vaisseaux segmentaires, perforants et cutanés ou dermo-épidermiques. L'épiderme est dénué de vascularisation, sa nutrition se fait par diffusion depuis la circulation sanguine dermique (**Noli, 2006**).

I.C.1. La vascularisation segmentaire

Chez les mammifères, les principaux vaisseaux des membres accompagnent les nerfs puis cheminent le long des muscles squelettiques (**Viguiet et Degorce, 1992**).

I.C.2. La vascularisation perforante

Ses vaisseaux dérivent des vaisseaux segmentaires, ils cheminent dans ou le long des muscles puis se terminent dans le plexus sous-dermique, donnant naissance à la vascularisation cutanée (**He, 2006 ; Viguiet et Degorc, 1992**).

Il existe chez les carnivores deux types d'artères cutanées, cheminant toujours de façon parallèle à la surface :

- Les artères cutanées mixtes traversent les muscles, y distribuent des rameaux de grande taille avant d'irriguer la peau ;
- Les artères cutanées simples cheminent entre les muscles sans les traverser et n'y distribuent que quelques petits rameaux avant d'irriguer la peau.

I.C.3. La vascularisation cutanée ou dermo-épidermique

Cette vascularisation est alimentée par les vaisseaux perforants et peut être divisée en 3 niveaux présentant des anastomoses entre eux (**Pavletic, 2003 ; Viguiet et Degorce, 1992**) :

- Le plexus profond, principal réseau vasculaire de la peau, se situe à la jonction du derme et de l'hypoderme. Il distribue des rameaux qui irriguent la base des follicules pileux, les glandes sébacées et les muscles arrecteurs des poils ;
- Le plexus moyen est situé sous le derme et irrigue les glandes sébacées et sudoripares, les follicules pileux et les muscles arrecteurs des poils ;
- Le plexus superficiel est situé dans les couches les plus externes du derme. Il envoie des arcades papillaires dans les papilles dermiques situées exclusivement au niveau de la truffe et des coussinets. Il est peu développé chez les carnivores.

I.D. Vaisseaux lymphatiques

Ils prennent naissance dans le réseau capillaire de la partie superficielle du derme et transportent le transsudat produit par les capillaires (**Viguiet et Degorce, 1992**).

I.E. Innervation

La peau est un organe bien innervé et donc particulièrement sensible à la douleur (**He, 2006 ; Viguiet et Degorc, 1992**). On y trouve aussi bien des fibres sensibles que des fibres motrices :

- Les fibres nerveuses motrices du système sympathique ont un rôle vasomoteur sur les artères du derme et de l'hypoderme, un rôle excito-sécrétoire sur les glandes sudoripares ainsi qu'un rôle moteur sur les muscles arrecteurs des poils (**He, 2006 ; Viguiet et Degorce, 1992**) ;
- Les fibres sensibles somatiques dérivent des nerfs spinaux, elles possèdent soit des terminaisons libres, soit des terminaisons nerveuses encapsulées. Les terminaisons nerveuses libres sont rencontrées au niveau de l'épiderme où elles s'immiscent entre les cellules épithéliales ou forment des disques de contact avec les cellules de Merkel. Les terminaisons nerveuses encapsulées se trouvent dans le derme, il s'agit des corpuscules de Pacini et de Meissner (**He, 2006 ; Viguiet et Degorce, 1992**). Les sensations perçues par ces fibres afférentes sont très variées : toucher, chaleur, froid, pression, douleur ou encore prurit (**Viguiet et Degorce, 1992**).

I.G. Fonctions de la peau

La peau est le plus grand organe du corps (**Muller et al., 2001 ; Pavletic, 2003**), elle constitue une barrière anatomique et physiologique entre l'animal et son environnement (**Muller et al., 2001 ; Viguier et Degorce, 1992**). Grâce à sa structure complexe, une vascularisation artériovoineuse et lymphatique et une innervation spécifique, la peau assure de nombreuses fonctions (**Viguier et Degorce, 1992**).

I.G.1. Protection contre les agressions extérieures

Ces agressions peuvent être :

- Physiques : coups, traumatismes pénétrants, chaleur, dessèchement, rayonnement. Ces agressions sont limitées par le pelage, le film hydrolipidique de surface, l'épaisseur de la couche cornée, les fibres de collagène du derme ou encore la pigmentation de la peau et/ou des poils (**Noli, 2006 ; Viguier et Degorce, 1992**) ;
- Chimiques : caustiques, solvants... Leur action est limitée par la présence de poils imperméables et la couche cornée ;
- Biologiques : bactéries, virus, champignons, parasites... Le pH de la peau (entre 5,9 et 6,9 chez un chien sain et 4,8 et 6,8 chez un cheval sain (**Scott et Miller, 2003**) a des propriétés bactéricides et bactériostatiques. Le film hydrolipidique de surface, imperméabilisant la peau et le pelage, prévient la macération et la colonisation de la surface cutanée par des micro-organismes pathogènes. De plus, la couche cornée ne peut, dans des conditions physiologiques, être franchie par des micro-organismes pathogènes. Si toutefois un micro-organisme ou un parasite atteint le derme, il est confronté à l'action du système immunitaire cutané (**Noli, 2006**).

I.G.2. Régulation thermique

Le pelage, le tissu adipeux sous-cutané et la vasoconstriction du territoire cutané participent à la lutte contre le froid (**Noli, 2006**). En cas de température élevée, la régulation se fait d'abord par action vasomotrice et pilomotrice puis par évaporation à partir de la peau mais surtout des poumons (**Viguier et Degorce, 1992**). Chez le chat, l'humidification du pelage via le léchage permet également de rafraîchir l'animal (**Viguier et Degorce, 1992**).

I.G.3. Fonction cognitive

De nombreuses sensations sont ressenties au niveau cutané grâce aux terminaisons nerveuses libres au sein de l'épiderme (Noli, 2006) : douleur, prurit, chaleur, froid ou toucher (Muller et al., 2001 ; Pavletic, 2003). En outre, des structures spécialisées comme les corpuscules de Pacini ou de Meissner ou les vibrisses ont des fonctions mécano réceptrices (Noli, 2006).

I.G.4. Activités de synthèse, stockage, sécrétion et excrétion

La peau participe à la synthèse de la vitamine D sous l'effet des rayons solaires. Mais de nombreuses autres voies métaboliques siégeant dans la peau ont été récemment décrites comme l'aromatisation des œstrogènes et des androgènes (Noli, 2006). La peau a également un rôle de stockage. Ainsi elle constitue un réservoir d'électrolytes, d'eau, de vitamines, de lipides, de glucides et de protéines (Muller et al., 2001 ; Viguiet et Degorce, 1992). D'autre part, les glandes sébacées, sudoripares ou les glandes spécialisées font de la peau un organe sécrétoire. D'autres glandes excrètent certains déchets du métabolisme (Viguiet et Degorce, 1992).

Enfin la peau produit des phanères : poils, vibrisses, griffes et couche cornée (Muller et al., 2001 ; Viguiet et Degorce, 1992).

I.G.5. Rôle d'indicateur

La peau constitue un indicateur de santé générale, elle peut être le reflet d'une maladie interne ou révéler les effets secondaires d'une substance administrée par voie générale ou topique (Muller et al., 2001).

II. Les infections bactériennes des plaies

Les infections des plaies ont le plus souvent une origine bactérienne. Les infections marquées (purulentes, nécrotiques...) sont facilement diagnostiquées ; cependant, certaines infections sont plus difficiles à mettre en évidence. En effet, la limite entre une infection et

une colonisation bactérienne normale, contrôlée par les défenses immunitaires et présente dans toutes les plaies traumatiques, est plus délicate à définir.

II.A. Flore bactérienne cutanée normale, transitoire et infection

La surface de la peau et les couches superficielles de l'épiderme sont naturellement colonisées par une flore cutanée bactérienne résidente, stable et non pathogène. Sa présence joue un rôle dans l'équilibre de l'écosystème cutané en inhibant par compétition la croissance d'autres bactéries pathogènes. L'équilibre de cette flore est permis par les conditions créées par la peau. Cette dernière joue le rôle d'une barrière et contrôle la prolifération bactérienne excessive. Même lors de la préparation chirurgicale, cette flore ne peut être complètement éliminée. Cette flore est composée de bactéries aérobies. Lors de plaies, ces bactéries se retrouvent naturellement au niveau de la plaie et vont se multiplier. Ces bactéries sont en général peu pathogènes et leur prolifération est normalement contrôlée par la phase de détersion. Cependant, des conditions particulières pourront conduire à une prolifération importante et à une infection de la plaie, même avec des bactéries initialement non pathogènes.

La flore bactérienne cutanée résidente du chien est principalement composée :

- de cocci Gram positif : *Staphylococcus sp.* (coagulase négative : *Staph. epidermidis*, *Staph. xylosus*), *Micrococcus sp.*, *Streptococcus sp.* β -hémolytiques (*Strepto. canis*) ;
- de bacilles Gram négatifs : *Acinetobacter sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Propionibacterium sp.* (Ythier, 1992).

Chez le chat, elle est légèrement différente, on rencontre le plus souvent *Micrococcus sp.*, puis *Streptococcus* β -hémolytique et *Acinetobacter sp.* (Ythier, 1992). Chez le cheval, les micro-organismes isolés sur la peau et dans les poils d'un cheval sain sont nombreux. Parmi les bactéries isolées, on rencontre des staphylocoques coagulase négative (surtout *Staphylococcus sciuri* et *Staphylococcus xylosus*), des streptocoques non hémolytiques, mais également *Acinetobacter sp.*, *Corynebacterium sp.* ou *Bacillus sp.*. De nombreux champignons sont également isolés, dont *Alternaria spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cladosporium spp.* ou *Fusarium sp.* (Scott et Miller, 2003).

La composition de cette flore suit un équilibre qui peut facilement être rompu par des traitements antiseptiques, antibiotiques, par des lésions ou des désordres cutanés. Par exemple, la flore cutanée est beaucoup plus dense lorsque la peau est très grasse (état kérato-séborrhéique gras). Ainsi, chez un animal à peau normale, la population bactérienne aérobie a une densité de 0 à 10^3 bactéries par cm^2 alors que chez un animal séborrhéique, elle est de 10^3 à 10^7 germes. La population bactérienne est plus importante au niveau des zones humides (espaces interdigités, babines...) (Ythier, 1992). Avant même que la plaie ne se soit constituée, la peau peut donc être colonisée par un nombre important de bactéries, sans que l'on puisse pour autant parler d'infection. L'importance du nombre de bactéries pourra cependant être un facteur favorisant l'infection. Les déséquilibres de cette flore et notamment la multiplication de bactéries à fort potentiel pathogène auront une influence sur le développement ou non des complications infectieuses.

La flore transitoire est apportée par une contamination endogène ou extérieure. Elle est normalement inhibée par la flore physiologique et ne se multiplie pas sur la peau. Les espèces transitoires sont rencontrées occasionnellement sur une courte période et en quantité limitée à la surface de l'épiderme. Lorsqu'elle se multiplie, cette flore transitoire peut présenter un aspect pathogène comme envahisseur secondaire ou agent surinfectant. La nature de cette flore est très variée, car elle dépend des différentes sources de contamination (sol, morsures, végétaux, matières fécales...). Les principales bactéries rencontrées au niveau de cette flore cutanée transitoire sont, chez le chien, *Staph. intermedius*, *Staph. aureus*, *Enterococcus sp.*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Clostridium sp.*, *Pasteurella sp.*, *Pseudomonas sp.* et *Bacillus sp.* (Ythier, 1992). Chez le chat, on retrouve le plus souvent *Streptococcus sp.* β -hémolytiques, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus mirabilis*, *Alcaligenes sp.*, et *Bacillus sp.* (Ythier, 1992). Le principal germe cutané pathogène rencontré chez le chien est *Staphylococcus sp.* à coagulase positive (*Staph. intermedius* et *Staph. aureus*). Contrairement à l'homme, chez les carnivores domestiques, *Staph. intermedius* est beaucoup plus répandu que *Staph. aureus*. *Staph. intermedius* est présent sur la peau des chiens sains et est responsable de plus de 90% des pyodermites bactériennes.

Les germes Gram négatifs sont localisés préférentiellement au niveau des zones humides et chaudes et prédominent surtout lorsque la flore Gram positive est réduite par l'utilisation d'antibactériens (Ythier, 1992). La flore buccale des carnivores domestiques est

extrêmement riche, elle présente des germes qui peuvent devenir particulièrement pathogènes. Les plus fréquents sont les streptocoques β -hémolytiques (*Streptococcus canis* et *Streptococcus* du groupe C), les pasteurelles mais aussi *Bacillus fusiformis*, *Bacteroides sp.* et de nombreuses bactéries anaérobies (**Ythier, 1992**). L'espèce bactérienne en cause influence grandement les risques d'infection. Chez le chien, les plaies n'impliquant pas le tube digestif sont généralement associées à des staphylocoques. Cependant, *Escherichia coli* et les bactéries anaérobies comme *Bacteroides* et *Clostridium* contaminent fréquemment les plaies proches de la gueule ou de l'anus. Chez le chat, *Pasteurella* est l'espèce la plus courante lors d'infection des plaies (**Remedios, 1999**).

Dans la classification des plaies selon leur évolution bactériologique, on parle de plaies contaminées pour les plaies de moins de 6 heures post-traumatiques, de plaies infectées pour celles de 6 à 12 heures post-traumatiques et de plaies largement infectées pour celles de plus de 12 heures. Ces intervalles de temps correspondent à différentes étapes dans l'évolution de la population bactérienne de la plaie et ont pour but d'orienter la prise en charge de la plaie (suture primaire ou non). Cependant, même si on parle de plaies infectées ou largement infectées, ce n'est pas pour autant que la plaie présentera des complications infectieuses cliniques. Sans traitement, une plaie traumatique de plus de 12 heures sera effectivement colonisée par un grand nombre de bactéries. Si elle est refermée ou si les conditions sont favorables aux bactéries (ischémie, nécroses, contamination importante...), elle aura de fortes chances de développer une infection clinique très néfaste à la cicatrisation. En revanche, si elle reste ouverte, l'organisme réagit au cours de la phase de détersion pour contrôler la multiplication bactérienne, les défenses de l'hôte permettent alors de lutter contre l'infection et la plaie évolue « normalement » sans qu'une réelle infection clinique ne vienne perturber la cicatrisation. La contamination et la colonisation bactérienne de la plaie font donc partie de l'évolution physiologique d'une plaie. Lorsque cette colonisation devient pathologique, on parle alors d'une infection clinique. La colonisation bactérienne devient critique lorsque les défenses de l'hôte sont dépassées ou inefficaces, les bactéries envahissent alors les tissus cutanés et sous-cutanés voisins de la plaie. La survenue de l'infection dépend du nombre de bactéries, de leur virulence, des facteurs de pathogénicité et des résistances de l'hôte. Tous les facteurs pouvant influencer ces 3 paramètres pourront contribuer au développement d'une infection (**Sibbald et al., 2003**).

Selon des critères strictement bactériologiques, on parle d'infection lorsque le nombre de bactéries dépasse 10^6 bactéries par gramme de tissu (**Remedios, 1999 ; Waldron et Trevor, 1993**). Cependant, le diagnostic de l'infection d'une plaie est plutôt fondé sur des critères cliniques comme la présence de pus, l'exacerbation de l'inflammation ou la présence de nécrose (**Bello et al., 2001**). Les conséquences de l'infection d'une plaie sont nombreuses et peuvent, dans le pire des cas, mettre la vie de l'animal en danger.

II.B. Mécanismes et facteurs locaux favorisant l'infection

La phase de détersion permet d'éliminer les débris, les germes et les tissus nécrotiques dans la majorité des cas. Sa durée et son intensité varient en fonction de l'importance des matériaux à éliminer : plus la quantité de matériel à éliminer est importante, plus l'intensité et la durée de la phase de détersion sont importantes. Les complications infectieuses modifient la durée et l'intensité de la phase de détersion conduisant ainsi à un état pathologique.

Les granulocytes neutrophiles, qui sont les 1^{ères} cellules à prédominer au niveau de la plaie, dégènèrent en libérant leur contenu enzymatique lysosomal qui va contribuer à la lyse des débris cellulaires nécrotiques. Le liquide qui sort des vaisseaux, avec les leucocytes qui ont migré et dégénéré forment avec les tissus nécrosés, un exsudat inflammatoire qui a les mêmes caractéristiques que le pus. Si les bactéries ou les débris nécrotiques ne sont pas détruits, la migration des granulocytes neutrophiles continue et le volume d'exsudat augmente. Il n'y a pas vraiment de différence entre un exsudat inflammatoire normal et du pus ; la distinction entre infection et évolution physiologique se fait selon le volume d'exsudat et les caractéristiques cliniques (**Johnston, 1992**). Lors d'infection, les bactéries élaborent des toxines et des protéases, notamment des collagénases, qui augmentent les dégâts tissulaires. Elles consomment l'oxygène et les nutriments et entrent donc en compétition avec les cellules de l'organisme, et en particulier avec les fibroblastes. L'acide lactique produit dans ces conditions d'hypoxie diminue le pH local de la plaie et stimule la libération d'enzymes protéolytiques (**Deodhar et Rana, 1997**).

Habituellement, l'infection se traduit cliniquement 2 à 3 jours après le traumatisme ou l'intervention chirurgicale. Localement, les signes classiques de l'inflammation aiguë sont les suivants : douleur, érythème, œdème, chaleur et exsudat, sont intenses et associés à une extension des nécroses ou à une suppuration. Les signes systémiques principaux sont un

abattement, une anorexie, une hyperthermie ou syndrome fébrile (**Remedios, 1999**). Pour les plaies chroniques, ces signes peuvent être atténués et d'autres signes doivent être pris en compte : un retard de cicatrisation, une augmentation de l'exsudation, même non purulente, une coloration rouge vif, une friabilité importante ou une prolifération excessive du tissu de granulation, l'extension des zones de nécrose, l'extension de la plaie et l'apparition de zones de décollement des tissus (**Sibbald et al., 2003**). Le tissu de granulation sain est rose à rouge, ferme et a une apparence humide translucide. La formation du tissu de granulation n'a lieu que sur du tissu sain où la détersion a déjà eu lieu ; cependant, elle peut débuter alors que des zones voisines sont encore en phase de détersion. Bien que le tissu de granulation soit très résistant à l'infection, il peut quand même être affecté. En effet, si une infection se développe à proximité, elle peut se propager et toucher le tissu de granulation néoformé.

De nombreux facteurs locaux peuvent favoriser le développement d'une infection soit en favorisant la prolifération bactérienne soit en diminuant l'efficacité des défenses de l'hôte (**Waldron et Trevor, 1993**). Un volume important de tissus dévitalisés ou nécrosés favorise la prolifération bactérienne en constituant un milieu de croissance pour les bactéries. Au sein des tissus nécrosés, les bactéries sont protégées de l'action des leucocytes (**Remedios, 1999 ; Deodhar et Rana, 1997 ; Pavletic, 1993**). Elles trouvent les nutriments nécessaires à leur croissance grâce à la lyse des tissus. Les conditions deviennent rapidement hypoxiques et permettent alors la multiplication des bactéries anaérobies. La présence de caillots volumineux, d'hématomes et de corps étrangers agissent de la même façon en constituant des supports pour la prolifération bactérienne et en augmentant la quantité de matériel à éliminer par les neutrophiles et les macrophages (**Deodhar et Rana, 1997**).

Les plaies contaminées par des corps étrangers sont caractérisées par une inflammation importante, un pH bas et une très faible pression partielle en oxygène (proche de 5 mmHg) (**Deodhar et Rana, 1997**). Les facteurs qui augmentent la quantité de tissus nécrosés sont nombreux. Des techniques chirurgicales inadaptées (manipulations agressives, tensions excessives...), l'infection et l'inflammation exacerbée entraînent des dommages tissulaires importants. L'ischémie, favorisée par les lésions vasculaires ou les compressions (œdème, sutures trop serrées...) est une cause fréquente de la nécrose tissulaire. L'ischémie locale inhibe fortement la prolifération cellulaire et les synthèses protéiques (collagène), elle diminue aussi la résistance à l'infection et permet la croissance des bactéries anaérobies (**Deodhar et Rana, 1997**). Lors de l'établissement de l'infection, un cercle vicieux se met en

place, les bactéries entraînent directement des nécroses tissulaires par les protéases et les toxines qu'elles peuvent sécréter et indirectement par l'inflammation exacerbée qu'elles entretiennent. L'extension des nécroses favorise alors l'infection (**Remedios, 1999**).

La fermeture d'une plaie contaminée, la création d'espaces morts, les plaies profondes à faible ouverture, comme les morsures, créent des conditions particulièrement propices à l'infection en empêchant l'évacuation des fluides et sérosités de la plaie et en formant un milieu pauvre en oxygène (**Mason, 1993 ; Remedios, 1999**).

Même en faible nombre, les bactéries très pathogènes peuvent provoquer une infection clinique. Les streptocoques β -hémolytiques libèrent plusieurs exotoxines qui vont causer des dommages tissulaires importants (**Dow et al., 1999 ; Sibbald et al., 2003**). D'autres bactéries comme *Escherichia coli* produisent des endotoxines cytotoxiques et empêchent la phagocytose par les leucocytes. Les clostridies, quant à elles, produisent des exotoxines ayant une forte toxicité qui se traduit par des symptômes généraux parfois graves (toxine tétanique) même si le nombre de bactéries est restreint (**Remedios, 1999**).

Le concept de biofilm s'applique à l'environnement de la plaie. Les bactéries développent des capacités à s'attacher au substrat et forment alors un biofilm où plusieurs souches de bactéries peuvent coexister et se protéger mutuellement. La résistance des bactéries du biofilm aux agents antibactériens et aux défenses de l'hôte s'expliquent en partie par un effet de barrière mécanique (**Bello et al., 2001 ; Costerton et al., 1999**). La présence de biofilms serait impliquée dans de nombreuses infections chroniques.

Les infections ont des conséquences variées sur la cicatrisation des plaies. Une infection minimale ne fera que retarder la cicatrisation en prolongeant la phase de détersion. En revanche, une infection plus importante pourra entraîner d'autres complications. Elle pourra conduire à une extension des foyers de nécrose et une importante prolongation de la phase de détersion retardant considérablement la cicatrisation. Une infection chronique peut s'installer et arrêter la cicatrisation au stade d'inflammation chronique. Une déhiscence de la plaie, des suppurations chroniques ou la formation d'abcès sont des conséquences fréquentes de l'infection. Si cette dernière n'est pas contrôlée, elle peut conduire dans le pire des cas à une septicémie qui peut s'avérer mortelle.

II.C. Les principales bactéries responsables des infections des plaies et leur pathogénicité

Les bactéries responsables d'infection des plaies chez les animaux domestiques sont nombreuses. Les plus fréquemment rencontrées sont des coques Gram positifs (Staphylocoques et Streptocoques), des *Clostridium*, des *Pseudomonas*, et des *Corynebacterium*. On retrouve ces germes au niveau de la flore buccale, mais aussi au niveau du sol et de nombreuses autres sources de contamination. Les bactéries anaérobies sont fréquemment rencontrées lors de contamination par la cavité buccale (morsures) ou le tractus digestif (Bowler et al., 2001 ; Rosin et al., 1993 ; Sibbald et al., 2003).

Parmi les staphylocoques, ceux à coagulase positive sont les plus pathogènes. Ils sont aéro-anaérobies. *Staphylococcus intermedius* est présent sur la peau et les muqueuses des carnivores, *Staphylococcus aureus* est présent chez tous les mammifères. Ils sécrètent plusieurs hémolysines, échappent à la phagocytose et à l'opsonisation grâce à une coagulase et à une protéine A qui inhibe le complément. Leur ubiquité et leur grande résistance dans le milieu extérieur expliquent la fréquence des infections à staphylocoques.

Moins ubiquitaires, les streptocoques sont proches des staphylocoques. Les espèces pyogènes sont les streptocoques β -hémolytiques (*Streptococcus canis*). Ils résistent à la phagocytose et échappent à l'opsonisation grâce à leur capsule et à la C3 protéase qui inhibe le complément. Ils sécrètent également des toxines cytolytiques comme la streptolysine O.

Les *Pasteurella*, dont la plus fréquente lors d'infection des plaies est *Pasteurella multocida*, sont des germes aéro-anaérobies qui peuvent sécréter des leucotoxines. Ces leucotoxines sont à l'origine d'une cytolysse des leucocytes, d'un entretien de la réaction inflammatoire et d'une hémolyse. Comme toutes les bactéries Gram négatif, elles présentent à leur surface un constituant, le LPS ou lipopolysaccharide. Ce LPS est libéré à la mort des bactéries, c'est un des plus puissants pyrogènes et aussi un des plus puissants inducteurs de la réaction inflammatoire. Il a également des effets vasodilatateurs et favorise les hémorragies. Ses effets sont d'autant plus intenses qu'un grand nombre de bactéries sont tuées en même temps (lors d'antibiothérapie par exemple), et peut alors entraîner un choc important (choc endotoxinique).

La principale représentante du genre *Pseudomonas* lors d'infection des plaies est *Pseudomonas aeruginosa* ; elle est aussi appelée bacille pyocyanique en raison des pigments qu'elle produit et qui donnent une teinte bleuâtre au pus. Sa capsule contribue à sa résistance à la phagocytose. Elle développe fréquemment des multi résistances aux antibiotiques. Elle est fréquemment associée aux infections lors de brûlures.

Les bactéries anaérobies (*Bacteroides*, *Fusobacterium*...) sont particulièrement pathogènes (**Dow et Jones, 1987 ; Rosin et al., 1993**). Elles produisent de nombreuses toxines et développent des moyens d'échappement aux défenses immunitaires de l'hôte comme la résistance à la phagocytose, l'inhibition de l'opsonisation et du chimiotactisme des leucocytes (**Rosin et al., 1993 ; Styrt et Gorbach, 1989**). Leur croissance est inhibée dans les tissus sains bien oxygénés. Elle est favorisée lors de nécroses et de plaies anfractueuses ou refermées. Les infections anaérobies sont associées à des nécroses étendues et des répercussions générales induites par les toxines, notamment avec les clostridies (**Rosin et al., 1993**). Les infections peuvent être d'abord aéro-anaérobies puis strictement anaérobies (**Rosin et al., 1993**). En présence de pus, de gaz, de putréfaction, de nécroses étendues, de plaies contaminées refermées avec contamination par la cavité buccale, le tractus digestif ou le sol, une infection anaérobie est très probable (**Dow et Jones, 1987**).

Les infections des plaies par des mycobactéries sont très rares, elles sont par exemple transmises lors de morsures par des reptiles. Elles entraînent des suppurations chroniques (**Greene, 1998 ; Moriello, 1994**). Les infections fongiques comme la sporotrichose ou la phycomycose peuvent mimer des infections bactériennes avec la formation d'abcès ou de pyogranulomes chroniques (**Moriello, 1994 ; Pavletic, 1993 ; Scott, 1987**).

III. La cicatrisation cutanée chez les mammifères

Une perturbation de l'intégrité de la peau peut survenir dans plusieurs contextes. La peau peut subir des dommages lors de chirurgies, de brûlures, de radiations, de coupures, de déchirures, d'éraflures, d'abrasions, de frottements, de pincements et de pressions. Le degré de gravité de la blessure varie selon certains facteurs comme l'étendue, la profondeur et la nature. Afin de maintenir les fonctions essentielles de la peau, il est très important de la réparer lorsqu'un tel événement survient. La guérison de plaies cutanées est un événement dynamique coordonné qui implique la multiplication cellulaire, la migration cellulaire active

et la production de matrice extracellulaire (**Smith et al., 1998**). Elle implique donc différents processus qui doivent être respectés pour assurer la réparation. Chez un animal en santé, toutes les étapes sont franchies, ce qui permet une guérison adéquate. Une plaie normale est définie comme une interruption dans la continuité d'un tissu du corps. Il existe aussi des plaies qui sont dites chroniques, qui sont définies comme étant une interruption de la continuité d'un tissu du corps qui nécessite plus de temps pour guérir, qui ne guérit pas ou qui est récurrente. Ce dernier type de plaie est souvent associé à un âge avancé ou à des pathologies comme le diabète, l'anémie et la malnutrition (**Smith et al., 1998**).

Il existe deux sortes de plaies principales, les plaies superficielles et les plaies profondes. Les plaies superficielles atteignent seulement les cellules de l'épiderme, ce qui rend la guérison très facile et rapide. En réaction au traumatisme, les kératinocytes basaux répondent à des signaux d'alarme et brisent leurs liens avec la membrane basilaire, ce qui les rend capables de migrer pour couvrir la surface de la plaie. Leur trajectoire sera arrêtée lorsqu'ils rencontreront les cellules provenant de l'autre côté de la plaie. Il surviendra alors une inhibition de contact. Pendant la migration des cellules activées, les cellules stationnaires de la couche basale se divisent afin de combler les espaces créés par les kératinocytes migrants. Une fois la plaie refermée, les cellules migratoires se divisent à leur tour et forment de nouvelles couches selon le processus de différenciation. La guérison d'une plaie superficielle peut prendre de 24 à 48 heures (**Tortora et al., 1994**).

La réparation de plaies profondes demande beaucoup plus de temps et nécessite la mise en jeu de plus de tissus. La lésion s'étend souvent profondément dans le derme, ce qui rend la guérison plus complexe et laisse une cicatrice. Ce type de guérison comprend trois phases essentielles qui devront s'effectuer pour assurer la cicatrisation complète : la phase inflammatoire, la phase de migration et de prolifération et la phase de remodelage (**Wysocki, 1999**).

III.A. Phase inflammatoire

L'inflammation est une réaction vasculaire et cellulaire qui permet d'éliminer les substances étrangères qui pourraient infecter la plaie (**figure 2**). Cette phase est aussi responsable de la présence de cicatrice dans la guérison de la peau adulte. Une étude effectuée chez des fœtus a en effet démontré que la guérison cutanée chez les fœtus n'induisait pas la

formation de cicatrice en raison de l'absence de la phase inflammatoire (Colwell et al., 2003). Pendant cette étape, il y a formation d'un caillot de sang qui réunit lâchement les bords de la plaie. Ce caillot est formé lorsque des vaisseaux sanguins sont endommagés. Des plaquettes entrent alors en contact avec le collagène subendothélial, ce qui déclenche la cascade de coagulation (Witte et al., 1997). Ces mêmes plaquettes activées relâchent des médiateurs biochimiques qui causent une vasoconstriction afin de réduire la perte sanguine. L'activation de la thrombine par le tissu blessé transforme un composé soluble, le fibrinogène, en fibrine qui s'agglutine avec les plaquettes pour former le caillot sanguin (Hunt et al., 2000). Ce dernier servira de matrice sur laquelle les cellules pourront migrer durant les phases subséquentes (Witte et al., 1997). Une fois le caillot bien en place, des neutrophiles et des monocytes envahissent la plaie grâce à la vasodilatation et à la perméabilité accrue des vaisseaux sanguins. Ce phénomène est contrôlé par la sécrétion par les plaquettes d'une variété de cytokines et de facteurs de croissance qui sont hautement mitogènes pour les fibroblastes et les cellules endothéliales et chimioattractants pour les cellules inflammatoires. Le PDGF (platelet-derived growth factor), les TGF- β 1 et β 2 (transforming growth factor), le PDEGF (platelet-derived epidermal growth factor), le PAF (platelet-activating factor) et l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) sont des exemples des cytokines et facteurs de croissance sécrétés par les plaquettes (Yamaguchi et al., 2001).

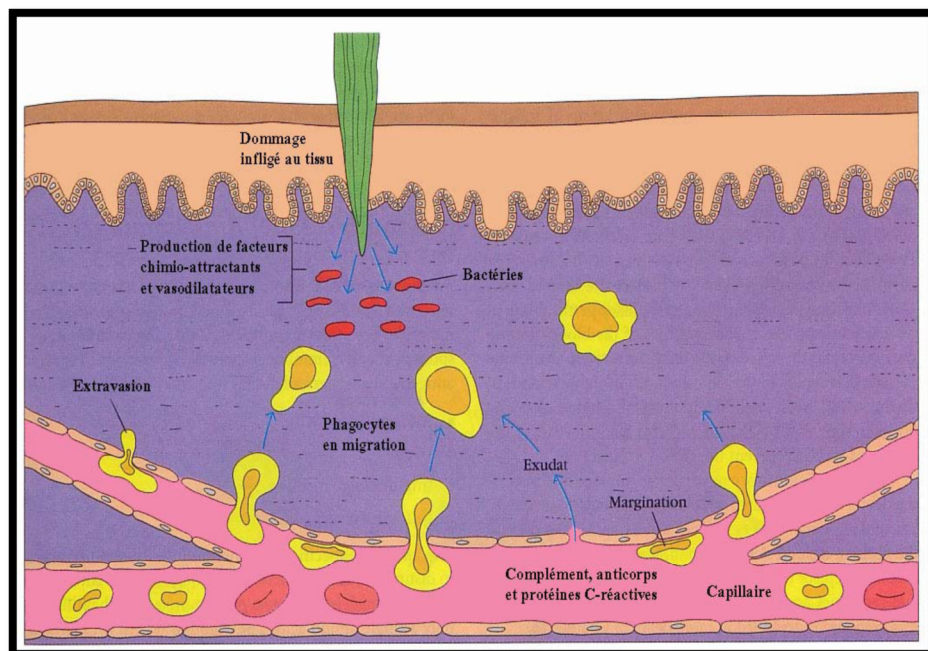


Figure 2 : Les facteurs intervenant dans l'inflammation (Goldsby, 2000)

La phase inflammatoire commence dans les minutes qui suivent l'induction de la plaie et peut durer quelques jours. Les neutrophiles sont les premiers arrivés sur le site lésé afin de le décontaminer (**Goldsby, 2000**). Ils phagocytent les bactéries et digèrent la matrice de fibrine en préparation pour la fabrication de nouveaux tissus. Ils sécrètent aussi des médiateurs vasodilatateurs et des cytokines qui activent les fibroblastes et les kératinocytes en plus d'attirer les macrophages. Ces derniers ont aussi comme rôle de phagocyter les pathogènes envahissant la plaie, de débrider la plaie et de sécréter des cytokines et des facteurs de croissance comme le FGF (fibroblast growth factor), l'EGF (epidermal growth factor), le VEGF (vascular endothelial growth factor), le TNF- α (tumor necrosis factor alpha), l'interleukine-1 et l'INF- γ (interféron-gamma) (**Yamaguchi et al., 2001**). Ces messagers chimiques stimulent l'infiltration, la prolifération et la migration des fibroblastes et des cellules endothéliales (**Witte et al., 1997**). En somme, la phase inflammatoire constitue la phase de défense contre les infections et le début de la croissance des nouvelles cellules.

III.B. Phase de migration et de prolifération

Durant cette étape, qui commence dans les quelques heures suivant la blessure, il se produit une organisation de l'exsudat inflammatoire où les cellules recrutées au site lésé entrent en mitose puis s'activent afin de définir grossièrement la structure de la cicatrice. Il survient alors un équilibre entre la production de matrice et la destruction des tissus endommagés et irréparables. Le tissu temporaire alors formé s'appelle le tissu de granulation (**Tortora et al., 1994**). Des myofibroblastes participent à la réparation en rapprochant les bords de la plaie, facilitant ainsi la fermeture (**Serini et al., 1999**). Toutefois, la cicatrisation est meilleure lorsque la matrice continue de s'accumuler sans se contracter davantage (**Hunt et al., 2000**) puisque des contractures sévères de la peau, empêchant une bonne mobilité, peuvent survenir (**Smith et al., 1998**). Même si les lymphocytes et les macrophages sont impliqués dans le processus, ce sont les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales qui vont proliférer et migrer afin d'assurer une guérison complète des tissus. Les fibroblastes vont agir en premier en synthétisant des fibres de collagène et des polysides en suivant les filaments de fibrine, ce qui constituera le tissu de granulation. Les cellules endothéliales vont être responsables de la réparation des vaisseaux sanguins endommagés et de la croissance de ceux-ci afin de nourrir les nouveaux tissus formés. Les kératinocytes commencent à migrer vers le centre de la plaie, et à se différencier afin de reconstituer la barrière que constituait l'épiderme avant la blessure (**Smith et al., 1998**). Ils migrent alors

entre le caillot sanguin et la matrice de collagène du derme. La production de la collagénase-1 et l'activation de la plasmine par des activateurs plasminogènes sécrétés par les kératinocytes sont nécessaires à la dégradation de la fibrine et du collagène-1 qui forment le caillot sanguin (**Yamaguchi et al., 2001**). Le processus par lequel les kératinocytes migrent pour couvrir la plaie est appelé ré-épithélialisation et provoque la production de matrice extracellulaire, de facteurs de croissance et de cytokines en plus de favoriser l'angiogenèse. Les facteurs stimulants sécrétés par les kératinocytes sont le FGF, le PDGF, le VEGF et le TGF- α (**Hunt et al., 2000**). Les kératinocytes basaux produisent aussi un haut niveau d'intégrines $\alpha_5\beta_1$ et d'intégrines contenant la chaîne α_v . L'induction de celles-ci serait nécessaire à la migration des kératinocytes grâce à leur activité liante qui favorise la formation de nouveaux points d'adhérence (**Gailit et al., 1994**). Les constituants de la membrane basilaire sont aussi sécrétés par les kératinocytes et par les fibroblastes durant cette phase pour restaurer la continuité et la solidité de la jonction dermo-épidermique.

La migration des cellules épithéliales a lieu dans la plaie par un processus appelé épibolie (**Martin et al., 1992**). Si les follicules pileux sont intacts, leurs kératinocytes vont migrer et ainsi contribuer à la régénération du nouvel épiderme. Les cellules basales de l'épiderme répondent généralement au traumatisme par activation. En effet, grâce aux « signaux de détresse » envoyés par les cellules endommagées, les cellules basales s'aplatissent, s'allongent et brisent leurs liens avec les cellules adjacentes et avec la membrane basilaire. Les cellules épithéliales sont alors libres et en bonne position pour refermer la plaie en migrant sur la structure de fibrine et de collagène qui se trouve en son centre. La migration cesse lorsque les kératinocytes d'un côté de la plaie rencontrent ceux de l'autre côté. Il survient alors une inhibition de contact. La population cellulaire est augmentée par les nombreuses mitoses des kératinocytes et la structure et l'épaisseur originale de l'épiderme sont restaurées par la différenciation de ces cellules (**Smith et al., 1998**).

La migration cellulaire peut être influencée par plusieurs molécules tels des facteurs de croissance ou des protéines sécrétés par les cellules. Par exemple, le TGF- β_1 induit la migration des kératinocytes et diminue leur adhésion à la laminine 5. Il joue aussi un rôle important dans le contrôle du remodelage de la matrice en régulant la transcription d'un grand nombre de protéines de la matrice extracellulaire (**Decline et al., 2000**). De plus, dans la guérison de plaie, certains constituants de la membrane basilaire et de la matrice extracellulaire orientent les mouvements des kératinocytes et favorisent ainsi leur migration

(Utani et al., 2001). C'est pourquoi l'interaction cellule-matrice est importante pour la migration lors de la guérison de plaie. En effet, la matrice extracellulaire contient des substances adhésives et des fibres qui guident les cellules migratrices. De la même façon, des molécules présentes dans le sang peuvent contribuer à la migration cellulaire. Par exemple, la fibrine et la fibronectine, toutes deux présentes dans le sang, sont connues pour augmenter la migration cellulaire durant la guérison : elles s'attachent à la matrice provisoire et forment une structure sur laquelle les kératinocytes peuvent migrer (Yamaguchi et al., 2001). De plus, le collagène, qui fait partie intégrante de la matrice, favorise la migration des kératinocytes lors de la guérison (O'Toole et al., 1997).

Le mouvement cellulaire fait intervenir trois propriétés des cellules : l'extension, l'adhérence et la contraction (**figure 3**). Ces déformations morphologiques impliquent un réarrangement du cytosquelette et des molécules faisant partie des complexes d'adhésion de la cellule (Lodish et al., 1997). Ces molécules sont souvent des intégrines et interagissent avec d'autres molécules de la matrice qui sont présentes sous les cellules en migration. La plupart de ces molécules sont en fait des constituants de la membrane basilaire. Le processus de migration implique des changements dans l'adhésion cellulaire. De la structure stable d'ancrage basée principalement sur le complexe laminine 5/intégrine $\alpha_6\beta_4$, la cellule doit transiter vers un système d'adhésion dynamique impliquant les intégrines contenant la sous-unité β_1 pour permettre la migration (Nguyen et al., 2001). Dans la guérison d'une plaie, les kératinocytes des bords migrent sur la matrice riche en fibronectine et en laminine 5. Il survient alors une perte de la polarisation des intégrines et les kératinocytes augmentent leur répertoire d'intégrines et modifient leur distribution : les intégrines $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_2\beta_1$ changent leur localisation latérale à basale pour être en contact avec la matrice extracellulaire. De plus, l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ devient distribuée de façon plus uniforme et apparaît tout le long de la surface des kératinocytes en migration qui ne présentent aucun hémidesmosome (Larjava et al., 1993).

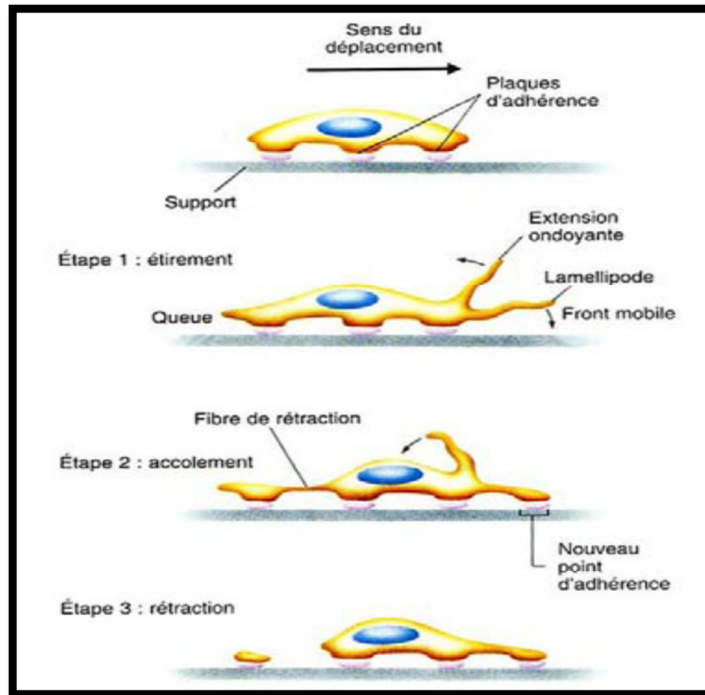


Figure 3 : Les étapes du déplacement cellulaire (Lodish et al., 1997)

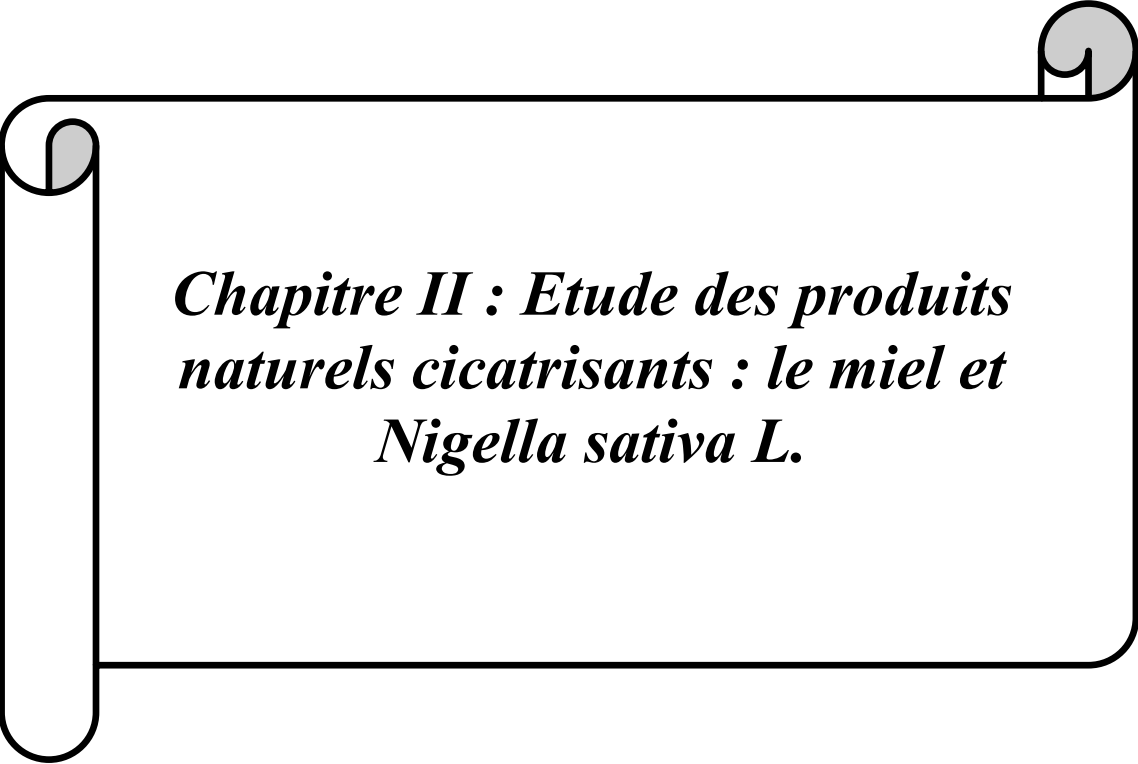
La laminine 5 et les intégrines ont en effet un rôle très important dans la régulation de la migration des kératinocytes. Il est connu depuis quelques années que la laminine 5 subit des clivages extracellulaires et que ceux-ci ont une incidence sur ses fonctions. Ces coupures représentent un régulateur important de l'adhésion et de la mobilité des cellules dans la guérison de plaie (Utani et al., 2001). Selon sa forme, la laminine 5 n'interagit pas avec les mêmes molécules, ce qui a une incidence sur la migration cellulaire. Par exemple, la forme longue est réputée pour permettre la migration cellulaire et joue donc un rôle dans le processus de fermeture d'une plaie. Les kératinocytes en migration sécrètent d'ailleurs cette forme en grande quantité (Larjava et al., 1993). Il est aussi à remarquer que dans la peau normale, il n'y a peu ou pas de marquage de la laminine 5 dans le cytoplasme des kératinocytes basaux tandis que dans une plaie en guérison, la laminine 5 est détectée dans les cellules basales (Kainulainen et al., 1998). La forme longue de la laminine 5 interagit avec les intégrines $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_2\beta_1$ qui sont deux récepteurs retrouvés dans les plaques d'adhésion focale utiles pour le mouvement cellulaire (Nguyen et al., 2001). L'association de la laminine 5 et de l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ améliore aussi la communication intercellulaire en facilitant l'assemblage des jonctions Gap. Ces jonctions participent à une communication bidirectionnelle pour réguler la réponse pré et post-migratoire dans la plaie (Nguyen et al., 2000). Le clivage de la laminine 5 le plus important est celui de la chaîne α_3 et il survient

entre les domaines G3 et G4, comme expliqué dans la section 1.1.4.1.1. Il a été suggéré que le domaine G5, qui est retrouvé à l'extrémité de la chaîne α_3 , stimulerait la migration alors que le domaine G3, qui est mis à nu par le clivage, serait responsable des propriétés d'adhésion de la laminine 5, tout en permettant la migration dans certains cas (**Hirosaki et al., 2000**). Une fois clivée, la laminine 5 interagit avec l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ par le biais du domaine G3 pour former les hémidesmosomes et ainsi assurer la solidité de la jonction dermo-épidermique (**Nguyen et al., 2001**). Une expérimentation a démontré que des souris ayant une délétion dans le gène de la chaîne α_3 de la laminine 5 développaient des épidermolyses bulleuses sévères et des hémidesmosomes rudimentaires. Les kératinocytes de ces souris présentaient également une habileté réduite pour la migration (**Ryan et al., 1999**). La régulation de l'expression de la laminine 5 est médiée par le TGF- β et l'INF- γ . Il a été suggéré que la production de laminine 5 pourrait être activée par ces deux molécules présentes dans les fluides délivrés lors de l'induction de la plaie (**Kainulainen et al., 1998**). Les hémidesmosomes jouent aussi un rôle dans la régulation de l'adhésion cellulaire puisqu'ils y participent activement (**Moll et al., 1998**). Il importe donc de réguler leur assemblage pour permettre la migration. Cette régulation est principalement contrôlée par des protéines de la matrice extracellulaire et par des facteurs de croissance (**Borradori et al., 1999**). Il en est de même pour l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ qui est un transmetteur important de messages pour la cellule. Elle interagit aussi avec des éléments du cytosquelette pour promouvoir la migration cellulaire (**Mercurio et al., 2001**). Une étude a d'ailleurs démontré qu'un anticorps dirigé contre la chaîne α_6 inhibait la motilité de cellules intestinales et leur potentiel à former des lamellipodes (**Rabinovitz et al., 1997**).

III.C. Phase de remodelage

Le remodelage des tissus cicatriciels peut durer jusqu'à un an et parfois plus. Les facteurs qui influencent la durée de la phase de remodelage sont l'âge, les antécédents génétiques, la localisation de la plaie, la longueur et l'intensité de la phase inflammatoire et la gravité de la plaie. Au début de cette phase, l'épiderme a retrouvé son épaisseur normale et la croûte formée à partir du caillot sanguin tombe. Les fibres de collagène commencent à être mieux organisées : initialement fines et désordonnées, elles deviennent plus épaisses et alignées avec les autres fibres des marges de la plaie (**Smith et al., 1998**). En plus des fibres de collagène, d'autres composants comme des glycosaminoglycans et des protéoglycans viennent s'ajouter à la matrice extracellulaire. Avec le temps, la quantité de fibroblastes

diminue et les vaisseaux sanguins reprennent leur taille normale. L'apoptose des fibroblastes et des cellules endothéliales marque la transition entre le tissu de granulation et la cicatrice proprement dite. L'excès de matrice est aussi éliminé par l'activation de collagénases comme les MMP (métalloprotéinase matricielle) (**Yamaguchi et al., 2001**). Malgré toutes les modifications et le remodelage que subit le derme durant cette phase, la peau ne retrouvera jamais ni sa fonction ni sa force ou résistance originale (**Tortora et al., 1994**). En effet, la force de tension de la peau cicatrisée ne dépassera pas 80% de sa force antérieure (**Clark, 1985**). De la même façon, l'élasticité de la cicatrice sera moindre qu'avant la blessure (**Doillon et al., 1985**).



***Chapitre II : Etude des produits
naturels cicatrisants : le miel et
Nigella sativa L.***

I. Le miel

Le miel est produit par les abeilles mellifères à partir du nectar floral ou du miellat (produit sucré, reliquat de la digestion des insectes piqueurs parasites des végétaux) qu'elles récoltent. Le miel de miellat est un type important de miel dans les zones de forêts de conifères (**Bradbear, 2010**).

La définition légale du miel est énoncée dans le décret n°2003-587 du 30 juin 2003, qui a transcrit en droit français la directive européenne n°2011/110/CE du Conseil du 20 décembre 2011 : c'est une « substance sucrée naturelle produite par les abeilles de l'espèce *Apis mellifera* à partir du nectar de plantes ou des sécrétions provenant de parties vivantes des plantes ou des excréments laissés sur celles-ci par des insectes suceurs, qu'elles butinent, transforment, en les combinant avec des matières spécifiques propres, déposent, déshydratent, entreposent et laissent mûrir dans les rayons de la ruche ».

A partir de cette matière première sucrée (nectar ou miellat), les abeilles obtiennent du miel grâce à une transformation des sucres et à une réduction de la teneur en eau d'approximativement 80% à environ 18% (**Lequet, 2010**).

Lorsque les abeilles butinent les fleurs, elles aspirent le nectar et le stockent dans leur jabot. Cette « poche à miel » contient des enzymes, dont l'invertase ou saccharase qui réalise l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose. Une fois rentrées à la ruche, elles l'échangent avec de nombreuses autres abeilles. Ce comportement de trophallaxie continue le processus d'hydrolyse (par ajout d'enzymes) et contribue à la déshydratation du liquide. Lorsque le miel atteint un certain seuil de teneur en eau (aux alentours de 40 à 50%), il est déposé dans une alvéole (**Jean-Prost, 2005**). La température élevée de la ruche (aux alentours de 35°C), son faible degré d'humidité et la ventilation assurée par des ventileuses terminent le processus d'évaporation. Le miel fin prêt est alors recouvert d'un opercule de cire, ce qui assure une conservation plus longue.

Le miel représente la principale réserve énergétique des abeilles pour l'hiver. Dans les pays tropicaux, c'est une ressource utilisée par les abeilles lors des périodes défavorables (sécheresse, pluie, absence de ressource mellifère...) (**Bradbear, 2010**).

			
Miel de châtaignier du Comtat Venaissin.	Miel de lavande du pays d'Apt.	Miel de sapin du Jura.	Miel béton de Saint- Denis.

Figure 4 : Certains types du miel.

I.A. Composition

I.A.1. Eau

L'eau est un des composants les plus importants du miel et provient du nectar butiné par les abeilles. On la trouve compris entre 17 et 19%. Au-delà de 19%, le miel va fermenter et ne sera pas consommable. Le miel de bruyère callune en contient toutefois 23% exceptionnellement (**Laurent, 2005 ; Fournier, 2009 ; Domerego et al, 2007**)

I.A.2. Sucres

Les sucres comptent le miel de 75 à 80% et viennent du nectar des fleurs. Il existe une quinzaine de sucres, mais ils ne sont pas tous présents en même temps. On trouve le glucose, le lévulose et le fructose, qui sont des sucres simples ou monosaccharides, principalement et en moindre proportion, le maltose et le saccharose, sucres composés ou polysaccharides. Les sucres simples sont directement assimilables par l'organisme (**Laurent, 2005 ; Darrigol, 1979**).

I.A.3. Vitamines

Les vitamines présentes dans le miel sont relativement peu nombreuses en proportion: la vitamine B1 ou thiamine, qui assure l'assimilation des glucides ; la vitamine B2 ou riboflavine, qui joue un rôle dans les phénomènes de croissance et de régénération tissulaire ; la vitamine B3 ou vitamine PP ou nicotinamide; la vitamine B5 ou acide

pantothénique, qui influence le métabolisme des lipides, des glucides et des protides ; la vitamine B6 ou pyridoxine, qui prévient les troubles de la croissance et qui protège la peau ; la vitamine B8 ou biotine ; la vitamine B9 ou acide folique, qui influe sur les mécanismes de croissance ; et la vitamine C ou acide ascorbique ainsi que la provitamine A et les vitamines D et K (Laurent, 2005 ; Fournier, 2009 ; Cousin, 2010).

I.A.4. Oligo-éléments

Dans la plupart des miels, on trouve du calcium, du cuivre, du fer, du manganèse, du magnésium, du phosphore, du potassium, du silicium et du sodium. Il y a aussi du chlore et du soufre. Ces matières minérales dépendent du type de sol. Elles sont plus abondantes dans les miels foncés. Le potassium et le calcium représentent les deux plus importants minéraux du miel. Les autres sont présents à l'état de traces (Laurent, 2005 ; Domerego et al, 2007).

I.A.5. Autres

On trouve aussi du pollen à environ 1%, et ce pollen amène des vitamines de B1 à B9. Les grains de pollen donnent l'origine géobotanique du miel. Les acides aminés provenant des sécrétions salivaires des abeilles, les acides organiques, les substances aromatiques, les pigments végétaux que sont les caroténoïdes et flavonoïdes, dont les teneurs dépendent de l'origine florale, et qui donnent la couleur au miel, les vitamines et les oligo-éléments représentent 3%. Le miel contient un acide aminé appelé acétylcholine qui va favoriser le péristaltisme intestinal.

Il y aussi des acides gras dans le miel ainsi que des enzymes comme les amylases, la gluco- invertase et la gluco-oxydase qui facilitent la digestion. Ces enzymes sont fragiles et la chaleur peut les détruire. Celles-ci sont apportées par les abeilles. Les lipides viennent de microparticules de cire provenant d'un défaut de filtration sans conséquence. Le miel est pauvre en lipides. Il existe aussi une substance antibiotique appelée inhibine (Laurent, 2005 ; Cousin, 2010 ; Domerego et al, 2007 ; Darrigol, 1979).

Le miel n'est pas un produit stérile, il contient toujours des germes inhibés comme des bactéries et des levures. C'est pour ça que la teneur en eau doit être inférieure à 19% pour

éviter la fermentation, et aussi que les conditions d'extraction et de traitement du miel sont encadrées par des règles d'hygiène, d'aération et de stockage. Tous ces pourcentages sont variables d'un miel à l'autre (**Cherbuliez et Domerego, 2003**).

I.B. Activités pharmacologiques du miel

I.B.1. Activité énergétique et nutritionnelle

Le miel possède premièrement une richesse nutritionnelle, il représente un apport en sucres simples directement assimilables et en acides aminés essentiels et semi-essentiels. Sa valeur énergétique haute, 350 kcal pour 100 g en fait un excellent complément alimentaire pour les personnes affaiblies et les sportifs recherchant une amélioration de l'endurance et un meilleur rendement énergétique. La présence dans sa composition de vitamines et minéraux en font un complément alimentaire pour les personnes en carences. Il peut aisément remplacer le sucre de cuisine, le saccharose, avec une valeur énergétique certes plus élevée : 400 kcal pour 100 g, mais nécessitant une hydrolyse pour libérer du glucose et du fructose et qui n'est donc pas directement assimilable. La présence de vitamines et de minéraux dans le miel lui confèrent une réelle plus value par rapport à l'utilisation du sucre de cuisine (**Gharbi M., 2011**).

I.B.2. Activité antioxydante

Le stress oxydant, 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.

Le miel est une source importante d'antioxydants naturels. Une étude tchèque réalisée en 2006 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 antiradicalaires 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**). Les flavonoïdes comme la quercétine, la lutéoline et le kaempférol, qui sont des pigments présents dans de nombreux végétaux, jouent un rôle majeur dans la neutralisation des radicaux libres.

Certaines vitamines et oligoéléments sont également impliqués dans l'activité antioxydante du miel. La vitamine C est piègeur de radicaux libres. Elle se transforme en radical ascorbyle au contact des radicaux libres, stoppant ainsi la réaction radicalaire en chaîne. En application topique, elle diminue considérablement les dommages causés par les rayons UV. Les oligoéléments tels que le sélénium (Se) et le zinc (Zn) jouent eux aussi un rôle important dans l'équilibre proxydant-antioxydant. Ils ont un fort pouvoir anti-radicalaire et interviennent au niveau du fonctionnement des enzymes qui préviennent le photo-vieillessement.

Il existe une majoration des processus oxydants dans de nombreux évènements cutanés comme l'affaiblissement de la fonction barrière ou le vieillissement photo-induit, qui sont notamment responsables de modifications inesthétiques de l'aspect de la peau. Les propriétés antioxydantes du miel sont donc largement utilisées en cosmétologie dans les soins anti-âge, en complément des propriétés régénératrices (**Martini et Seiller, 2006**).

I.B.3. Activité anti-inflammatoire

Il a été observé que le miel diminue l'inflammation. Ce mécanisme est très intéressant dans la cicatrisation des plaies en plus de l'activité antibiotique. Il diminue le taux plasmatique des molécules pro-inflammatoires IL-6, TNF- α , PGE2 et NO. L'expression de IL-6, TNF- α , iNOS et COX-2 est aussi diminuée (**Erejuwa et al., 2014**).

I.B.4. Activité immuno-stimulatrice

Certains composés comme le méthylglyoxal, la présence de LPS (lipopolysaccharides), l'apalbumine 1 (une glycoprotéine présente dans la gelée royale mais également retrouvée dans le miel), ainsi que deux composés respectivement de 5,8 kDa et 261 kDa vont augmenter la production de cytokines telles que le TNF α , l'IL-6 et l'IL-1 β :

- Le TNF α a pour rôle de stimuler la mitose des kératinocytes, et active la libération de facteurs de croissances.
- L'IL-6 active l' et la prolifération des fibroblastes.
- L'IL-1 β active comme le TNF α la libération de facteurs de croissance (**Gharbi M., 2011**).

I.B.5. Activité anticancéreuse

Chez des souris et des rats, l'administration orale et quotidienne de miel durant les 10 jours avant l'inoculation de cellules cancéreuses de carcinome mammaire et colique a permis d'inhiber la formation de métastases avec des doses de 2 g/kg pour les souris et 1 g/kg pour les rats (**Orsolíć et al. 2003**).

Chez la souris, une administration orale de miel (10 ; 100 ou 1000 mg/100g de poids vif) a montré une action préventive in-vitro et in-vivo sur le développement de la tumeur « Ehrlich ascites tumor », injectée en intra-péritonéal. La prolifération tumorale et la viabilité des cellules tumorales ont été inhibées (**Attia et al. 2008**).

I.B.6. Activité antimicrobienne

Le miel est connu pour son activité antibiotique en particulier sur les plaies cutanées. Il prévient et guérit des infections en complément de la cicatrisation. Il est connu aussi pour son activité antifongique. Il a un spectre très large et ne présente, à ce jour, pas de résistance avérée (**Al-Waili et al., 2011**).

Un grand nombre d'études explorant l'activité antibactérienne du miel sur plus de 70 espèces in-vitro ont été publiées depuis une trentaine d'années (**Blair et al., 2009 ; Molan, 1992**). Les résultats de quelques unes de ces études et d'autres explorant l'activité antifongique du miel sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 1 : Principaux résultats de quelques études explorant l'activité antibactérienne et antifongique du miel in-vitro.

Références	Pays de collection des miels	Bactéries sensibles	Champignons sensibles
Khalil et al., 2014	Pakistan	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella</i>	

		<i>typhimurium, Klebsiella pneumonia, Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Clostridium perfringens type C, Clostridium perfringens type D, Clostridium chauvoei, Staphylococcus aureus et Bacillus subtilis.</i>	
Ayaad et al., 2012	Arabie Saoudite	<i>Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus et Bacillus subtilis.</i>	<i>Candida albicans.</i>
Chanchao, 2009	Thaïlande	<i>Staphylococcus aureus et Escherichia coli.</i>	<i>Candida albicans, Auriobasidium pullulans et Aspergillus niger.</i>
Silici et al., 2010	Turque	<i>P. aeruginosa, P. mirabilis, S. aureus, A. hydrophila, L. monocytogenes, B. subtilis, M. smegmatis et S. typhimurium, B. cereus, E. coli O157: H7 et Y. enterocolitica.</i>	
Omafuybe et Akanbi, 2009	Nigeria	<i>Salmonella spp, Shigella spp, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Bacillus cereus, Proteus vulgaris et Clostridium sporogenes.</i>	
Nwankwo et al., 2014	Nigeria	<i>S. aureus et E. coli</i>	
Demera et Angert, 2004	Costa Rica	<i>P.aeruginosa et Bacillus cereus.</i>	<i>C. albicans et saccharomyces cerevisiae.</i>
Badawy et al., 2004	Egypte	Plusieurs souches d' <i>Escherichia coli O157:H7</i> et de <i>Salmonella typhimurium.</i>	
Al-Waili et al., 2013	Arabie Saoudite	<i>E. coli, E. coli, P. aeruginosa, P. aeruginosa, Klebsiella pneumonia, Klebsiella pneumonia, Salmonella typhimurum, Salmonella typhimurum, Serratia marcescens, Enterobacter aerogenes, S. aureus, S. aureus, Bacillus subtilis, Bacillus subtilis, S. epidermidis, Micrococcus luteus et Bacillus cereus.</i>	<i>C. albicans, C. tropicalis et Aspergillus nidulans.</i>
Basualdo et al., 2007	Argentine	<i>S. aureus, S. epidermidis, S.uberis, P. aeruginosa, E. coli et K. pneumoniae.</i>	
Gallardo-Chacon et al., 2008	Espagne	<i>E. coli O157:H7, E. coli, S. enterica ser. Typhimurium, S. sonnei, B. cereus, L. monocytogenes, S. aureus, S. aureus, S. aureus, S. mutans et E. faecalis.</i>	
Saraf et al., 2009	Iles de Fidji	<i>S.aureus, E.coli, P.aeruginosa, K.pneumoniae et P.mirabilis.</i>	<i>C. albicans.</i>
Wilkinson et Cavanagh, 2005	Australie	<i>E. coli et P. aeruginosa.</i>	

Voidarou et al., 2011	Grèce	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> , <i>methicillin and vancomycin resistant</i> , <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> , <i>methicillin and vancomycin resistant</i> , <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> , <i>methicillin resistant</i> , <i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> (<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>), <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> , <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> reference strain, <i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i> reference strain, <i>Escherichia coli</i> reference strain, <i>Bacillus cereus</i> reference strain, <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> reference strain, <i>Streptococcus pyogenes</i> reference strain et <i>Salmonella typhimurium</i> (<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>).	
Mulu et al., 2004	Ethiopie	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.typhi</i> , <i>S.shiga</i> , <i>K.aerogenes</i> , <i>P.vulgaris</i> ; <i>Clinical isolates: S.aureus, P.mirabilis</i> et <i>P.aeruginosa</i> .	
Cooper et al., 2002	New-Zélande et pays de Galles	Plusieurs souches de <i>S. aureus</i> résistante à la méthicilline (<i>SARM</i>), d' <i>Enterococcus</i> sensible à la vancomycine (<i>ESV</i>) et d' <i>Enterococcus</i> résistante à la vancomycine (<i>ERV</i>).	

I.B.7. Activité cicatrisante

Le miel est connu comme un très bon cicatrisant, l'origine de cette activité vient des propriétés anti-inflammatoire, antibactérienne et nutritionnelle, ainsi que l'acidité et l'action osmotique qui jouent un rôle important. Le miel permet également une angiogenèse à l'abord de la plaie. La migration cellulaire ainsi que l'apport en nutriment sont favorisés. Il permet l'activation du système immunitaire, ce qui entraîne une meilleure détersion de la plaie. Il participe aussi à l'augmentation de la production de collagène (**Majtan, 2014**).

On remarque bien que le miel utilise plusieurs mécanismes pour permettre la cicatrisation.

Le miel a été utilisé comme un produit de soin de la plaie et son utilisation en tant qu'agent de cicatrisation des plaies est rapporté dans le traitement des ulcères veineux de la jambe (**Gethin et Cowman, 2008 ; Jull et al., 2008**), les brûlures (**Subramanium, 1993**), les

ulcères chroniques de la jambe (Oluwatosin et al., 2000) et les ulcères de pression (Weheida et al., 1991).

II. *Nigella sativa* L.

Le genre *Nigella* L. a été nommé d'après les graines noires caractéristiques retrouvées dans la plupart des espèces de *Nigella* (figure 6). Le terme Latin « *nigellus* » est le diminutif de « *niger* », qui signifie noir (Hegi, 1975).

Les grecs nommaient *Nigella sativa* « *μελάνθιον* » melanthion, de « *melas* » qui veut dire noir et « *anthos* » fleur, donc l'étymologie tire du même attribut (Discorides, 2002).

L'espèce *N. damascena* tire son nom de la capitale Syrienne en référence à son origine géographique. Pour les autres espèces, il a été tenu compte de leur utilisation (*N. sativa* L.), notamment comme condiment, ou bien de leur morphologie.

Nigella sativa L. est connue sous d'autres noms en France comme, le *cumin noir*, le *faux cumin*, la *poivrette*, le *sésame noir*, les *cheveux de Vénus* ou encore la *nigelle*.

La multitude de noms commerciaux fait référence aux appellations internationales, on peut retrouver la nigelle sous le nom de *kalonji* dans les épiceries indiennes. Le nom *çörek otu*, qui veut dire littéralement « l'herbe à pain », fait référence à son utilisation traditionnelle en Turquie. En kurde, *reşreşik* fait référence à la couleur noire de la graine, tout comme l'appellation en anglais *black seed* ou *schwarzkümmel* en allemand. En arabe, on connaît la nigelle sous le nom de *habba sawda*. On retrouve donc *Nigella sativa* L. sous ces différentes dénominations dans le commerce.

En Algérie, *Nigella sativa* L. est connue sous le nom de *sinoudj*.



Figure 5 : Graines de *Nigella sativa* L.

II.A. Description botanique de *Nigella sativa* L.

N. sativa L. est une plante herbacée, annuelle, à tige dressée, côtelée, anguleuse et rameuse d'une soixantaine de centimètres de hauteur, portant des feuilles bi- ou tripennatiséquées, oblongues ovales, composées de segments lancéolés oblongs, au pétiole pubescent. Il n'y a pas de feuilles réunies en involucre immédiatement autour de la fleur, contrairement à *damascena nigella* L. :

- Les fleurs sont solitaires, axillaires et terminales, bisexuées, radiales, très riches en nectar ;
- Le calice comporte cinq sépales pétaloïdes, de couleur blanchâtre à bleu pâle, assez brusquement rétrécis à leur base ;
- La corolle est composée de cinq pétales plus petits que les sépales et ayant chacun la forme d'un cornet bilabié, dont la lèvre supérieure est divisée en deux. Les pétales portent à leur sommet deux petits renflements arrondis jaune verdâtre ;
- Chaque fleur possède huit cornets nectarifères, une lèvre inférieure bilobée dont les lobes se terminent en une protubérance émoussée, et une lèvre supérieure poinçonnée ;
- L'androcée est formé de nombreuses étamines fixées sur le réceptacle par de longs filets ;
- Le gynécée consiste en cinq follicules soudés, chacun avec un style long indéhiscent et composé de cinq carpelles soudés entre eux jusqu'à la base des styles persistants.

La plante est hermaphrodite à reproduction autonome. Le fruit correspondant à l'ensemble des follicules soudés forme la capsule contenant plusieurs graines triangulaires blanchâtres qui, lorsque la capsule s'ouvre à maturité, exposées à l'air deviennent noires (figures 6). Les graines sont ovoïdes et mesurent 2 à 3,5 mm ; elles présentent 3 ou 4 angles avec une face supérieure finement granuleuse et réticulée (Bonnier, 1990 ; Ghedira, 2006).

II.B. Composition chimique

Les recherches sur la composition des graines de *N. sativa* L. ont débuté en 1880 avec Greenish, qui publia le premier rapport mentionnant la présence de 37% d'huiles et 4,1% d'éléments minéraux (Greenish, 1880).

Par la suite, des études ont montré la présence d'une diversité de substances naturelles regroupant des lipides, des dérivés terpéniques, des flavonoïdes, des alcaloïdes et des saponines. *N. sativa* L. constitue également une importante source de protéines et de sels minéraux : phosphore, calcium, potassium, magnésium et sodium (Aboutabl et al., 1986). Les valeurs et proportions fournies par la littérature diffèrent d'un auteur à l'autre ; la variété et l'origine des échantillons peuvent en être partiellement responsables. Une approximation de la composition est donnée dans le tableau 3.

Tableau 2 : Composition des graines de *Nigella sativa* L., (Aljassir, 1992 ; Ansari et al., 1988 ; Babayan et al., 1978 ; Hashim et El-Kiey, 1982 ; Menounos et al., 1986 ; Rathee et al., 1982).

Constituant	Quantité (%)
Lipides	30-35
Protéines	16-21
Glucides	33-34
Fibres alimentaires	4,5-6,5
Sels minéraux	3,7-7
Saponines	0,013

II.B.1. Lipides et stérols

Les graines de *N. sativa* L. renferment environ 0,4-2,5% d'huile essentielle, plus de 30% d'huiles fixes (Dominiczak et al., 1991 ; Hashim et El-Kiey, 1982) et 38% de lipides

totaux dont les phospholipides (Martin et al., 2001). Les acides oléique et linoléique sont les deux acides gras majeurs de l'huile de *N. sativa* L., ils constituent 75% des acides gras totaux (Abdel-Aal et Attia, 1993). D'autres auteurs fournissent des valeurs différentes : les graines contiendraient 26,6% d'huiles dont 64,6% d'acide linoléique et 20,4% d'acide palmitique (Sener et al., 1985).

Le tableau 4 représente la composition d'huile fixe des graines de *N. sativa* L. selon l'origine.

Tableau 3 : Composition (en pourcentage) de graines *N. sativa* L. en acides gras selon l'origine de l'échantillon par ordre décroissant (Houghton et al., 1995).

Acide gras	Origine des graines		
	Éthiopie	Inde	Syrie
Linoléique	58	54,68	54,13
Oléique	23,46	25,67	24,51
Palmitique	12,07	13,15	14,64
Stéarique	2,7	2,97	2,6
Eicosadiénoïque	2,87	2,39	3,02
Linoléinique	0,47	0,68	0,69
Arachidique	0,2	0,25	0,2
Myristique	0,21	0,2	0,22
Saturés totaux	15,18	16,57	17,66
Insaturés totaux	84,82	83,43	82,34

Les stérols représentent environ 2% de l'huile fixe. La plupart sont retrouvés sous forme estérifiée et libre.

Le stérol majeur, le β -sitostérol représente à lui seul environ 60% des stérols, puis arrive le stigmastérol à environ 20%. On peut rencontrer le cholestérol à l'état de traces, c'est-à-dire environ 1% (Cheikh-Rouhou et al., 2008 ; Hamrouni-Sellami et al., 2008).

II.B.2. Composés aromatiques

Il a été considéré que la plupart des activités pharmacologiques attribuées à *N. sativa* L. provenaient de son huile essentielle. C'est pourquoi dès 1960 des études ont été entreprises sur les constituants de cette huile volatile (**Mahfouz et El-Dakhkhny, 1960**).

C'est en 1963 que la thymoquinone, monoterpène oxygéné, a été isolée dans l'huile de nigelle, par **El-Dakhkhny** ; d'autres études ont mis en évidence les principaux constituants (**Canonica et al., 1963**). **Burits et Bucar (2000)** ont identifié par GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy), 32 constituants dont la majorité sont des monoterpènes : p-cymène (38%), thymoquinone (30%), carvacrol (5-11%), α -pinène (5-14%), β -pinène (5%), limonène (4%), longifolène (1,2-8%), 4-terpinéol (1,98-6,59%) et t-anéthol (0,25-4,28%).

La présence de thymohydroquinone, de thymol, de produits d'oxydation de la thymoquinone, comme la dithymoquinone sont également signalés (figure 7).

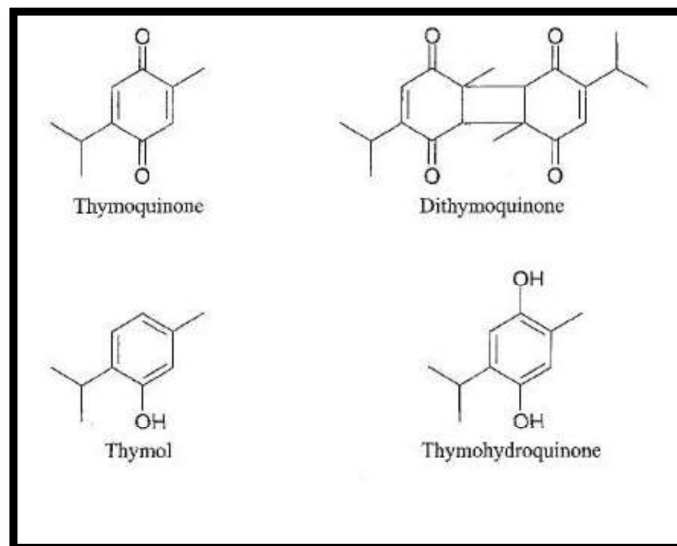


Figure 6 : Représentation chimique de la thymoquinone et de ses dérivés retrouvés dans l'huile essentielle de *Nigella sativa* L.

II.B.3. Saponosides

Les saponosides sont des hétérosides de stérols ou de triterpènes. Ce sont des composés très répandus dans le règne végétal. Solubles dans l'eau, ils libèrent par hydrolyse

un ou plusieurs oses et une génine (sapog nine). La première saponine isolée par Greenisch en 1882 à partir des graines de *N. sativa* L. est la m lianthine, dont l'aglycone est l'h d rag nine (**Greenish, 1880**).

Récemment, d'autres saponosides ont pu être isolés à partir d'un extrait éthanolique des graines de *N. sativa* L. dont le 3-O-[beta-D-xylopyranosyl-(1-3)-alpha-L-rhamnopyranosyl-(1-2)-alpha-L-arabinopyranosyl]-2 (**Ansari et al., 1975**), alors que de nombreux autres saponosides ont pu être déterminés à partir des huiles de *N. sativa* L. (**Abdel-Aal et Attia, 1993**).

Une étude a permis d'isoler à partir de l'extrait méthanolique trois autres saponosides apparentés à l' -h d rine, avec l'élucidation de leurs structures par des méthodes chimiques et spectrales (figure 8) (**Taskin et al., 2005**) :

- 3-O-beta-D-xyl (1-3)-alpha-L-rha- (1-2)-alpha-L-ara-28-O-alpha-L-rha(1-4)-beta-D-glu(1-6) -beta-D-glu-h d rag nine ;
- 3-O-alpha-L-rha-(1-2)alpha-L-ara-28-O-alpha-Lrha(1-4)-beta-D-glu(1-6)-beta-D-glu-h d rag nine ;
- 3-O-beta-D-xyl(1-3)-alpha-L-rha-(1-2)-alpha-L-ara-h d rag nine.

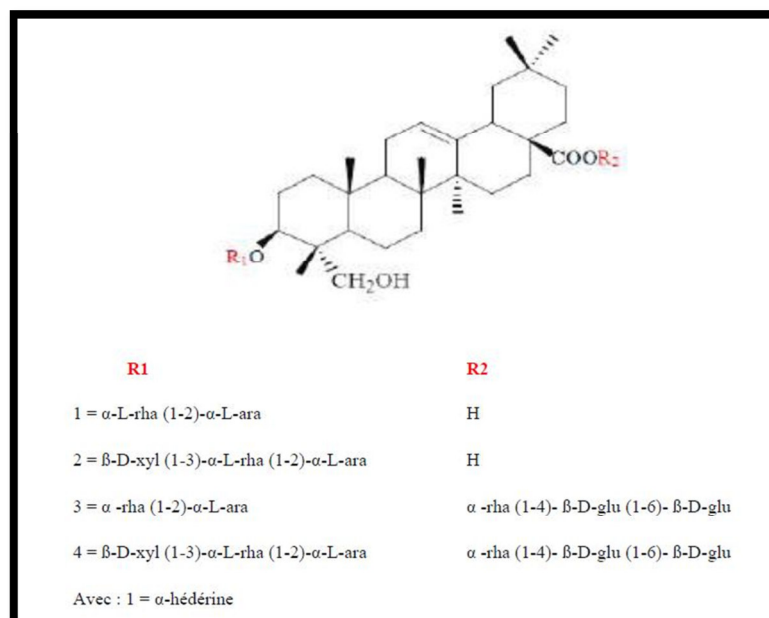


Figure 7 : Structure des saponosides   h d rag nine isolés à partir des graines de *Nigella sativa* L. (**Taskin et al., 2005**).

II.B.4. Polyphénols et flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés aromatiques dont la biosynthèse constitue l'un des processus fondamentaux de la phytochimie. Ils font partie de ce que l'on appelle les composés phénoliques. Les flavonoïdes sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux. Les Renonculacées sont un groupe riche en flavonols et en flavones. En 1997, trois nouveaux flavonoïdes triglycosylés (figure 9) ont été isolés à partir des graines de *N. sativa* L. et leurs structures ont été déterminées (Merfort et al., 1997) :

1. quercétine 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside ;
2. kœmpférol 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside ;
3. quercétine 3-(6-feruloglucosyl) (1→2) galactosyl (1→2) glucoside.

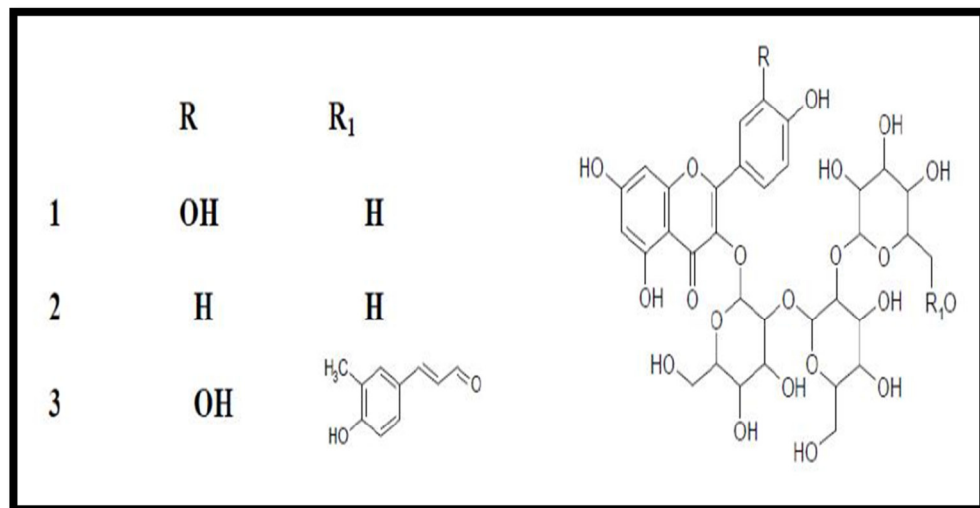


Figure 8 : Structure chimique des trois flavonoïdes isolés de *Nigella sativa* L. (Merfort et al., 1997).

En 2008, quatorze composés phénoliques ont été isolés à partir d'un extrait méthanolique de pousses et de racines de *N. sativa* L.. Ceux-ci sont : l'acide gallique, l'acide parahydroxybenzoïque, l'acide chlorogénique, l'acide vanillique, l'acide para-coumarique, l'acide férulique, l'acide trans-2-hydroxycinnamique, l'acide trans-hydroxycinnamique, l'épicatéchine, la catéchine, la quercétine, l'apigénine, l'amentoflavone et la flavone (Bourgou et al., 2008).

II.B.5. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances présentant un caractère alcalin, contenant de l'azote, le plus souvent inclus dans un hétérocycle. Les alcaloïdes ont, pour la plupart, des actions physiologiques et thérapeutiques à faibles doses. Ils deviennent cependant très toxiques à fortes doses.

Les plus importants alcaloïdes de *N. sativa* L. (figure 10), ont été isolés à partir des graines entre 1985 et 1995 :

- Nigellicine, à noyau indazole (**Atta-Ur-Rahman et al., 1985b**) ;
- Nigellimine, une isoquinoléine (**Atta-Ur-Rahman et Zaman, 1992**) ;
- Nigellimine N-oxyde, dérivé N-oxyde de la nigellimine (**Atta-Ur-Rahman et al., 1985a**) ;
- Nigellidine, également un indazole (**Atta-Ur-Rahman et al., 1995**).

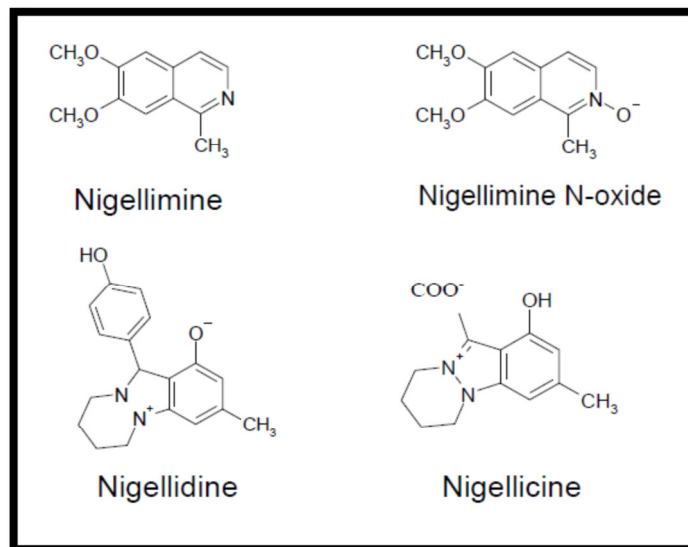


Figure 9 : Structure chimique des principaux alcaloïdes de *Nigella sativa* L. (**Atta-Ur-Rahman et al., 1995**).

II.B.6. Les protéines

Les graines de *Nigella sativa* L. sont très riches en protéines (environ 20%), avec dominance d'acide glutamique (22,4%), d'acide aspartique (10,05%) et d'arginine (9,18%) (**Al-Gaby, 1998**). La protéine la plus étudiée jusqu'à maintenant est la lipase qui catalyse des réactions de trans-estérification (**Tuter et al., 2003**). L'analyse des acides aminés de

l'hydrolysate de ces protéines révèle la présence de 17 acides aminés y compris les 8 acides aminés essentiels (Aljassir, 1992 ; El-Obeid et al., 2006).

II.B.7. Les vitamines et sels minéraux

La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence des vitamines A, B1, B2, B6, PP et de l'acide folique (Nergiz et Otles, 2003).

Les tocophérols totaux constituent 0,05% de l'huile, et sont constitués majoritairement de l' α -tocophérol (48%) et du γ -tocophérol (28%). D'autres vitamines liposolubles comme le β - carotène (0,05%) et la vitamine K1 (0,1%), sont présentes.

Des travaux sur la composition minérale de la graine de *Nigella sativa* L. ont rapporté que sa teneur en potassium est importante (1,18% de poids total de la graine) et que le calcium, le fer, le sodium représentent 0,188 ; 0,0575 et 0,0853% respectivement (Nergiz et Otles, 2003). La teneur des graines en sélénium a été également déterminée, elle représente 0,27 à 0,54 mg/kg de graines (Al-Saleh et al., 2006).

II.C. *Nigella sativa* L. d'après la médecine traditionnelle

Dans la médecine Ayurvédique, le *kalonji* est utilisé en cas d'indigestion, de douleurs menstruelles, d'inflammation bronchique et comme anthelminthique.

En médecine *Unani*, la graine de nigelle est considérée comme abortive et diurétique, elle est utilisée pour les ascites, la toux, la douleur oculaire, l'ictère, la paralysie, les hémorroïdes et la fièvre tierce (Aggarwal et Kunnumakkara, 2009).

En Indonésie, les graines sont ajoutées à des médicaments astringents pour lutter contre les désordres intestinaux (Aggarwal et Kunnumakkara, 2009).

En Malaisie, des cataplasmes de graines sont utilisés pour les maux de tête, les abcès, les ulcères nasaux, l'orchite et le rhumatisme. Les femmes Arabes utilisent la graine de *N. sativa* L. comme galactogène (Aggarwal et Kunnumakkara, 2009).

En Égypte, elle est utilisée contre l'asthme (**El-Fatary et El-Alfy, 1975**).

En usage externe sous forme de pommade, les graines sont utilisées dans le traitement d'abcès, d'hémorroïdes, d'inflammation des testicules et de pédiculose (**Aggarwal et Kunnumakkara, 2009 ; Akhtar et Aslam, 1997**).

En Arabie Saoudite, l'huile est utilisée en usage externe en cas de raideur et de douleurs articulaires, ainsi qu'en cas d'asthme et d'eczéma (**Houghton et al., 1995**).

En Turquie, l'huile de graine est employée par voie orale pour ses vertus carminatives, bronchodilatatrices, expectorantes, antihypertensives, diurétiques, diaphorétiques, stomachiques et pour lutter contre l'indigestion ; en friction elle est préconisée contre les spasmes musculaires, la sciatique et les rhumatismes (**Baser et al., 1986**).

La graine et l'huile de cumin noir, prises seules ou en plus d'autres médicaments, sont efficaces contre l'alopecie, le vitiligo et d'autres problèmes dermatologiques (**Aggarwal et Kunnumakkara, 2009**).

La figure 11 résume bien toutes les indications médicales traditionnelles.

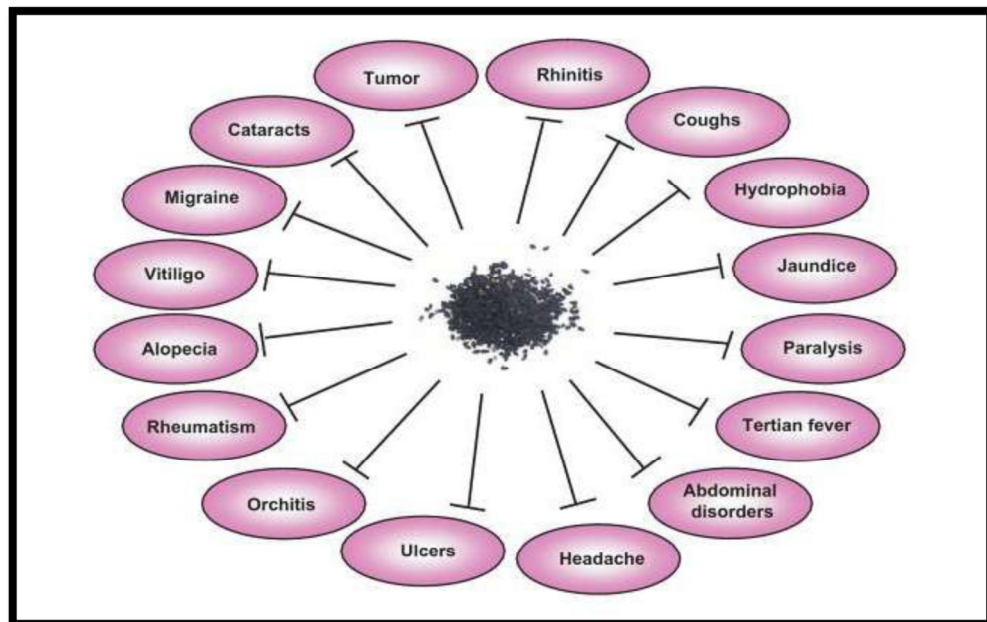


Figure 10 : Usages traditionnels de *Nigella sativa* L. (**Aggarwal et Kunnumakkara, 2009**).

II.D. Activités pharmacologiques de *Nigella sativa* L.

II.D.1. Activité hypoglycémiant

Le traitement avec diverses préparations de *N. sativa* L. engendre systématiquement une diminution de la glycémie chez différents modèles animaux. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette activité hypoglycémiant. Certains de ces mécanismes, telle l'implication de l'insuline, demeurent sujets de controverse. Ainsi, chez le lapin rendu diabétique par l'alloxane, *N. sativa* L. présente une action hypoglycémiant (**Al-Hader et al., 1993**). Selon les mêmes auteurs, cet effet serait indépendant des mécanismes insuliniques puisque l'amélioration de la glycémie n'était pas accompagnée par des modifications de l'insulinémie. D'autres études effectuées chez le rat des sables (*Psammomys obesus*) ont montré que le niveau plasmatique de l'insuline pourrait être réduit par le traitement oral par l'extrait aqueux des graines de *N. sativa* L. (**Labhal et al., 1997**). Par opposition, d'autres études ont montré que l'effet hypoglycémiant de *N. sativa* L. pourrait être lié à une augmentation du niveau d'insuline dans le sang (**Eskander et al., 1995**). De même, les études de la sécrétion d'insuline à l'aide de modèles in vitro ont aussi donné des résultats contradictoires. **Meddah et al. (2009)** ont contribué à la démonstration du fait que *N. sativa* L. inhibe l'absorption intestinale de glucose chez le rat Sprague Dawley, ce qui pourrait participer à la réduction de la glycémie, surtout en période postprandiale. Finalement, l'inhibition de la gluconéogenèse hépatique ainsi que la forte activité antioxydante de *N. sativa* L. ont aussi été mis en cause dans l'activité hypoglycémiant de la plante.

II.D.2. Activités cardio-vasculaire

En 1962, **Mahfoud** et collaborateurs ont confirmé l'effet antihypertenseur en utilisant des huiles de graines de nigelle. D'autres chercheurs ont montré que les huiles volatiles des graines de *N. sativa* L., administrées par voie intraveineuse chez le rat normo tendu, pouvaient aussi induire une baisse de la pression artérielle (**El-Tahir et al., 1993b**). Selon ces chercheurs, l'effet hypotenseur observé serait d'origine cérébrale via des mécanismes autant sérotoninergiques que muscariniques. Un groupe marocain a démontré que les huiles de *N. sativa* L. réduisent la tension artérielle chez le rat spontanément hypertendu. Cet effet serait partiellement lié à l'activité diurétique des graines de *N. sativa* L. (**Zaoui et al., 2000**). Les mêmes effets ont été observés quand les huiles de *N. sativa* L. ont été remplacées par la

thymoquinone, celle-ci étant un important principe actif des huiles de *N. sativa* L.. La thymoquinone normalise notamment la pression artérielle chez le rat rendu hypertendu par déficience en NO (**Khattab et Nagi, 2007**).

Par ailleurs, la nigelle et ses dérivés possèdent aussi des effets antispasmodiques qui se manifestent par une inhibition des contractions spontanées et une baisse du tonus de la musculature lisse in vitro, qu'elle soit de nature vasculaire (**Aqel, 1995**), utérine (**Aqel et Shaheen, 1996**) ou intestinale (**Aqel, 1993**). Selon ces auteurs, cet effet antispasmodique serait probablement dû à une activité antagoniste au niveau des canaux calciques membranaires de type L. De même, une étude a montré que les graines de *N. sativa* L. possèdent un effet broncho-dilatateur engendré par un mécanisme d'antagonisme calcique (**Gilani et al., 2001**).

Finalement, une étude japonaise a permis de découvrir que les huiles fixes de *N. Sativa* L., ainsi que trois molécules pures isolées de ces huiles, possèdent un effet inhibiteur sur la coagulation sanguine et l'agrégation plaquettaire comparable à celui de l'aspirine (**Enomoto et al., 2001**).

II.D.3. Activités hypocholestérolémiante et hypolipémiante

Le groupe de **Lahbal** ont montré que l'extrait aqueux des graines de *N. sativa* L. aurait une action hypocholestérolémiante et hypotriglycéridémiante chez le rat des sables et que cette action serait accompagnée d'une baisse de l'insulinémie (**Lahbal et al., 1997**). Ces effets ont été également soulignés par d'autres auteurs chez le rat diabétique (**Al-Awadi et Shoukry, 1988 ; Eskander et al., 1995**). Chez le rat Wistar, la nigelle diminue significativement les valeurs de cholestérol et des triglycérides au niveau plasmatique (**Zaoui et al., 2002**). Une étude biochimique a démontré que les huiles fixes des graines de *N. sativa* L. pouvaient inhiber la production de leucotriène B-4 et de thromboxane B-2 au niveau des liposomes, une inhibition de la peroxydation des lipides et augmenter la perméabilité membranaire des leucocytes en culture (**Houghton et al., 1995**).

II.D.4. Action sur la masse pondérale

En Afrique de nord, les graines de *N. sativa* L. sont traditionnellement préconisées dans le traitement de l'obésité et de l'hyperlipidémie qui l'accompagne souvent. Cette action anti-obésité a été confirmée chez le rat des sables traité oralement par un extrait aqueux des graines de *N. sativa* L. (**Labhal et al., 1997**). Dans le même sens, les huiles fixes de *N. sativa* L. permettent de diminuer le poids corporel à partir de 6 semaines chez le rat Wistar (**Zaoui et al., 2002**). Ces résultats sont confirmés par l'étude menée par **Meddah** et collaborateurs où un traitement de 6 semaines avec l'extrait aqueux des graines de nigelle a réduit la masse pondérale des rats Wistar (**Meddah et al., 2009**).

II.D.5. Activité sur la réponse immunitaire

Pour la première fois en 1987, l'effet de *N. sativa* L. sur la réponse immunitaire a été évalué chez des sujets humains volontaires. L'administration de capsules renfermant la poudre de *N. sativa* L. a entraîné, après cinq semaines de traitement, une augmentation de la population lymphocytaire T helper (CD4) et a contribué à l'amélioration du rapport cellules T helper/cellules T suppresseurs (CD4/CD8). Par ailleurs, *N. sativa* L. augmente de 30% l'activité des cellules tueuses NK (**El-Kadi et Kandil, 1987**). Une autre étude a montré que l'extrait aqueux de *N. sativa* L. stimule la réponse lymphocytaire et la production des interleukine-3. *N. sativa* L. stimule aussi la libération des interleukines-1 β . Cela entraîne une stimulation de l'activité phagocytaire des leucocytes polynucléaires et macrophages (**Haq et al., 1995**).

II.D.6. Activité anti-tumorale

L'extrait de *N. sativa* L. réduit l'incidence de sarcomes et diminue le diamètre des tumeurs induites par des substances chimiques carcinogènes (**Salomi et al., 1991**). Ce même groupe a déterminé que *N. sativa* L. possède un effet anti tumoral envers plusieurs types de cellules malignes. Cette action est due à une inhibition de l'incorporation de thymidine au niveau de l'ADN (**Salomi et al., 1991**). L'extrait d'acétate d'éthyle de *N. sativa* L. lui aussi agit contre la prolifération chez différentes lignées cellulaires cancéreuses (**Swamy et Tan, 2000**). **Kumara et Huat (2001)** ont isolé un principe actif (α -hederine) qui a une forte activité

anti tumorale chez des souris implantés avec un sarcome de poumon et le lymphome murin P388 (Kumara et Huat, 2001).

II.D.7. Activité antimicrobienne

De nombreuses études in vitro ont montré que les différents extraits de graines de *Nigella sativa* L. ont une activité antibactérienne et antifongique variable selon le type d'extrait et l'espèce bactérienne testée. Les résultats de quelques unes de ces études sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 4 : Principaux résultats de quelques études explorant l'activité antibactérienne et antifongique des différents extraits de graines de *Nigella sativa* L.

Références	Extraits testés	Bactéries sensibles	Champignons sensibles
Halawani, 2009	TQ et THQ	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> , <i>Salmonella Enteritidis</i> , <i>Shigella flexneri</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	
Shohayeb et Halawani, 2012	huile volatile et ses fractions : jaune et brune, Thymoquinone, Saponines et Alcaloïdes	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>M. phlei</i> .	
Tanis et al., 2009	Extraits méthanolique et acétonique	<i>B. megaterium</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>L. monocytogenes</i> et <i>P. aeruginosa</i> .	<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>R. rubra</i> et <i>K. fragilis</i> .
	Extrait chloroformique	<i>B. megaterium</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>L. monocytogenes</i> et <i>P. aeruginosa</i> .	<i>S. cerevisiae</i> , <i>R. rubra</i> et <i>K. fragilis</i> .
Nazir et Latif, 2012	Extrait aqueux	<i>Klebsiella sp.</i> , <i>Proteus sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Shigella sp.</i>	
Harzallah et al., 2012	Huile fixe	<i>L. monocytogenes</i> , <i>E. feacalis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>M. luteus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> et <i>P. aeruginosa</i> .	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabata</i> , <i>C. Krusei</i> et <i>C. parapsilosis</i> .
Ainane et	Huile essentiel	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus</i>	

al., 2014		<i>aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> et <i>Salmonella enterica</i> .	
Piras et al., 2013	Huiles essentiel et fixe	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. tuberculosis</i> et <i>M. avium</i> .	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> et <i>C. krusei</i> .
Shahid et al., 2013	Extraits méthanolique et éthanolique	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> et <i>S. typhimurium</i> .	
	Extrait d'acétate d'éthyle	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> et <i>K. pneumoniae</i> .	
Liaqat et al., 2015	Extrait éthanolique	plusieurs souches de <i>Staphylococcus aureus</i> résistantes à la vancomycine (SARV).	
Chaudhry et Tariq, 2008	Extrait aqueux (Infusion)	<i>Citrobacter spp.</i> , <i>Klebsiella ozaenae</i> , <i>Micrococcus roseus</i> , <i>Streptococcus intermedius</i> et <i>Streptococcus sanguis</i> .	
	Extrait aqueux (Décoction)	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Klebsiella ozaenae</i> , <i>Micrococcus roseus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus intermedius</i> , <i>Streptococcus morbillorium</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> et <i>Streptococcus sanguis</i> .	
Kokoska L. et al., 2008	Huiles essentiels obtenus par: HD, SD, SE-SD et SFE-SD.	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	
Kamal et al., 2010	Extrait aqueux	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> et <i>Salmonella typhimurium</i> .	
Javed et al., 2012	Extraits aqueux et méthanolique	<i>Pseudomonas syringica</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> et <i>Candida albicans</i> .
	Extrait éthanolique	<i>Pseudomonas syringica</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus sp.</i>	
	Extrait hexanique	<i>Pseudomonas syringica</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Aspergillus flavus</i> .

Hannan et al., 2008	Extrait éthanolique	plusieurs souches de <i>Staphylococcus aureus</i> résistantes à la méthicilline (SARM).	
Hasan et al., 2013	Extraits méthanolique et aqueux	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Streptococcus pyogenes</i> .	
Mishra, 2011	Extraits méthanolique et éthanolique	<i>Staphylococcus aureus</i> et <i>pseudomonas aeruginosa</i> .	
	Extrait d'acétate d'éthyle	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Escherichia coli</i> .	
Harzallah et al., 2011	Huile essentiel	<i>S. mitis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>Gemella morbillorum</i> et <i>S. sanguis</i> .	
	Thymoquinone	<i>S. mitis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>Gemella morbillorum</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> et <i>S. salivarius</i> .	
Suresh Kumar et al., 2010	Extraits de SCCO ₂ - (120bar/40°C), de SCCO ₂ - (280bar/50°C), d'acétate d'éthyle, méthanolique, hexanique et hydrométhanolique	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Yersinia enterocolitica</i> .	
Sellami et al., 2013	Extraits éthanolique et hexanique	<i>Staphylococcus epidermidis</i> .	

II.D.8. Activité cicatrisante

Les graines de *Nigella sativa* L. et son huile ont été utilisés pour favoriser la guérison des plaies chez les animaux de ferme (Ahmed et al., 1995). De plus, l'application de l'extrait d'éther de graines de *Nigella sativa* L. par voie topique sur la peau infectée par des staphylocoques chez des souris améliore la guérison en réduisant le nombre des globules blanches, l'infection locale et l'inflammation, l'expansion bactérienne et la déficience tissulaire (Abu-Al-Basal, 2011). L'application du gel de l'huile de graines de *Nigella sativa* L. sur des plaies chez les rats diabétiques réduit l'inflammation et accélère le processus de ré-épithélialisation (Sari et al., 2014).

En utilisant des fibroblastes gingivaux humains en monocouche, l'extrait aqueux de graines de *Nigella sativa* L. présentait une faible activité de piégeage des radicaux libres et induit la prolifération des fibroblastes gingivaux avec une activité de fermeture de plaie accélérée malgré son effet non significatif sur la synthèse du collagène (**Ab-Rahman et al., 2014**). L'administration du Thymoquinone (TQ) qui est un composant très important des graines de *Nigella sativa* L. par la voie systémique et / ou topique réduit l'inflammation et le stress oxydatif et accélère le taux de fermeture de la plaie ou de la re-épithélialisation (**Selçuk et al., 2013**).

II.D.9. Autres actions biologiques

Plusieurs autres activités biologiques de *N. sativa* L. ont été rapportées dans la littérature. La liste suivante en cite la majeure partie :

- Activité chronotrope négative (**El-Tahir et al., 1993b**) ;
- Stimulant respiratoire (**El-Tahir et al., 1993a**) ;
- Activité anti-nématodes (**Abivardi, 1971**) ;
- Effet anti-convulsant (**Devynck et al., 1982**) ;
- Inhibition de plaque dentaire (**Namba et al., 1985**) ;
- Inhibition de la formation de l'aflatoxine (**El-Shayeb et Mabrouk, 1984**) ;
- Activité analgésique (**Khanna et al., 1993**) ;
- Activité hémostatique (**Gracza, 1986**) ;
- Activité neuroleptique (**Devynck et al., 1982**) ;
- Protection contre la fibrose et la cirrhose du foie (**Turdogan et al., 2001**) ;
- Protection contre l'ulcère (**El-Dakhakhny et al., 2000a**) ;
- Activité anti-oxydante (**Burits et Bucar, 2000**).



***DEUXIEME PARTIE : ETUDE
EXPERIMENTALE***



Chapitre I : Matériels et méthodes

La majeure partie expérimentale a été réalisée au niveau des laboratoires pédagogiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret. La préparation des extraits de graines de *Nigella sativa L.* a été réalisée au laboratoire de protection des végétaux et les tests microbiologiques ont été réalisés au laboratoire de microbiologie. L'élevage des lapins et les expérimentations de la cicatrisation ont été réalisés en dehors de l'Université, dans une animalerie provisoire privée.

Les expérimentations ont été réalisées pendant la période allant de Janvier à Août 2016.

I. Matériels

I.A. Les graines de *Nigella sativa L.*

Les graines de *Nigella sativa L.* ont été achetées à partir d'un herboriste à El-Eulma (Sétif), au mois de Janvier 2016.

I.B. Le miel

Le miel étudié est un miel poly-floral (d'après les connaissances de l'apiculteur), et il a été récolté dans la région d'El-Eulma (Sétif) et il a été conservé à l'abri de la lumière.

I.C. Les milieux de culture

Suivant les méthodes employées et selon les souches bactériennes recherchées, nous avons utilisé les milieux de cultures suivants :

- Gélose nutritive ;
- Gélose Muller-Hinton ;
- Gélose Chapman ;
- Gélose MacConkey ;
- Gélose BEA ;
- Bouillon nutritive ;
- Bouillon Muller-Hinton ;
- Galerie API 20E ;

- Galerie API Staph + API Staph Medium ;
- Galerie API 20Strep.

Les milieux de cultures proviennent du commerce (Biomérieux SA-France) et ils ont été fournis aimablement par la Direction de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Tiaret.

La composition de ces milieux est décrite dans l'annexe 1.

I.D. Les produits chimiques

Notre étude a nécessité aussi l'utilisation des produits chimiques suivants :

- Ethanol 96% ;
- Méthanol ;
- Acétate d'éthyle ;
- Dimethyl Sulphoxide (DMSO) ;
- Eau distillée ;
- Huile à immersion ;
- Violet de gentiane ;
- Solution de lugol ;
- Solution de décoloration (éthanol) ;
- fuchsine basique ;
- Eau oxygéné ;
- Disques d'oxydase.

Les produits chimiques proviennent aussi du commerce et ils ont été fournis aimablement par la Direction de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Tiaret.

I.E. Les médicaments

Notre étude a nécessité aussi l'utilisation des médicaments suivants :

- IMALGENE[®] (MERIAL) ;
- PAXMAN[®] (VIRBAC) ;

- DIAZEPAM[®] (TVM) ;
- POVIP[®] (SAIDAL) ;
- CICATRYL-BIO[®] (ACM).

Les médicaments ont été achetés à partir des locaux de vente en gros des produits et matériels médicaux et vétérinaires à El-Eulma (Sétif).

La composition et les indications de ces médicaments sont décrites dans l'annexe 3.

II. Méthodes

II.A. Isolement, purification, identification et conservation des bactéries

II.A.1. Isolement des bactéries

Les prélèvements ont été réalisés au niveau de la clinique des carnivores domestiques de l'Institut des Sciences Vétérinaires de l'Université de Tiaret.

Les bactéries ont été isolées à partir de prélèvements de plaies superficielles d'un chien d'un an qui a présenté une plaie aigue au niveau du genou du membre postérieur gauche et d'un chaton de 3 mois qui a présenté une plaie chronique au niveau du métatarse du membre postérieur gauche.

Les prélèvements ont été réalisés au niveau de la plaie à l'aide d'un écouvillon imbibé avec de l'eau distillé stérile et ils ont été acheminés au laboratoire de microbiologie dans un délai de moins de 2 heures.

Ensuite, ces prélèvements bactériologiques ont été mis dans 5 ml de bouillon nutritif et ils ont été incubés à 37 °C pendant 24 heures. Après l'incubation, deux à trois gouttes du bouillon nutritif ont étéensemencées séparément sur des milieux sélectifs pour isoler les principales bactéries reconnues responsables des infections des plaies :

- Milieu Chapman (pour l'isolement des Staphylocoques) ;
- Milieu MacConkey (pour l'isolement des entérobactéries et des pseudomonaceae) ;
- Milieu BEA (pour l'isolement des entérocoques).

Ces milieux ont été incubés en aérobie à 37 °C pendant 24 heures.

II.A.2. Purification et identification des souches bactériennes isolées

Après 24 heures d'incubation, les différentes colonies ont été repiquées dans les mêmes milieux sélectifs qui ont été portés à l'incubation à 37 °C pendant 24 heures pour la purification des bactéries qui a été confirmée par la coloration de Gram.

Après la purification des bactéries isolées, on a procédé à leur identification selon l'aspect morphologique des colonies et par les différents tests bactériologiques classiques.

II.A.2.1. Etude macroscopique

Une observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur un milieu solide (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité).

II.A.2.2. Etude microscopique

L'observation microscopique au grossissement ($G \times 100$) permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association.

II.A.2.3. Coloration de Gram

Principe

La coloration de Gram permet de distinguer les bactéries à Gram négatif qui apparaissent roses et les bactéries à Gram positif qui apparaissent violettes. Cette différence de coloration est liée à des différences de nature de la paroi bactérienne.

La coloration de Gram permet de renseigner sur :

- Le type Gram + ou Gram - ;
- la forme des bactéries ;
- la taille ;
- le mode de regroupement.

Procédure de la coloration (la méthode décrite par Delarras (2007))

1. Préparer un frottis de la souche isolée sur une lame ;
2. Recouvrir le frottis de violet de gentiane, laisser agir 1 minute puis rincer à l'eau distillée ;
3. Verser du lugol et laisser agir pendant 1 minute, rincer à l'eau distillée ;
4. Décolorer à l'alcool entre 15 et 30 secondes, puis rincer à l'eau distillée ;
5. Recolorer avec de la fuchsine pendant 10 à 30 secondes, rincer à l'eau distillée ;
6. Sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen ;
7. Observation au microscope optique à l'objectif x100 et à l'immersion.

Interprétation

Le violet de gentiane et le lugol forment un complexe chimique qui colore le cytoplasme de toutes les bactéries en violet. Les bactéries qui ont une paroi imperméable à l'alcool ne prennent pas la fuchsine, elles restent colorées en violet et sont dites à Gram positif. Les bactéries qui ont une paroi perméable à l'alcool (du fait de sa constitution chimique différente et d'une différence d'épaisseur) : l'alcool pénètre dans les bactéries et décolore leur cytoplasme, les bactéries deviennent incolores et sont recolorées par la fuchsine. Elles sont colorées en rose et sont dites à Gram négatif.

II.A.2.4. Tests biochimiques

II.A.2.4.1. Catalase

Principe

Ce test est appliqué principalement sur les bactéries à Gram positif et permet de différencier la famille bactérienne des Micrococcaceae qui sont catalase positive, des autres familles qui sont catalase négative : les Streptococcaceae et les Enterococcaceae.

Procédure

Une petite quantité de culture bactérienne est prélevée du haut des colonies à l'aide d'une pipette Pasteur à partir du milieu de culture ; les colonies sont prélevées soigneusement, puis placée sur une lame, et à l'aide d'une pipette Pasteur sont ajoutées quelques gouttes du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Interprétation

Une réaction positive se traduit par le dégagement de bulles de gaz (oxygène).

II.A.2.4.2. Oxydase

Principe

Le test de l'oxydase permet de distinguer les bacilles de la famille des Entérobactériaceae à oxydase négative, des autres bacilles Gram négatif à oxydase positive.

Cet examen est utilisé comme un indicateur redox qui passe d'une teinte incolore (quand c'est réduit) à une couleur rose-violette (quand c'est oxydé). Les bactéries qui possèdent le cytochrome C sont capables d'éliminer des électrons (oxyde) de cet indicateur redox, cause pour laquelle la couleur change.

Procédure

Le test réalisé avec un disque d'oxydase imprégné de X-diméthyl paraphenylène diamine (incolore).

Déposer un disque imprégné de réactif sur une lame, l'imbiber avec une goutte d'eau distillée stérile. Prélever une colonie parfaitement isolée (plusieurs si petits colonies) avec une pipette Pasteur boullée et l'écraser sur le disque pendant une dizaine de secondes. Observer immédiatement.

Interprétation

Apparition d'une coloration rose/violette → Oxydation du réactif → Souche oxydase +
Absence de coloration rose/violette → Absence d'oxydation du réactif → Souche oxydase -

II.A.2.4.3. API 20E

Introduction et objet du test

API 20E est un système standardisé pour l'identification des *Entérobactériaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

Principe

La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

II.A.2.4.4. API Staph

Introduction et objet du test

API Staph est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria* comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données.

Principe

La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

II.A.2.4.5. API 20Strep

Introduction et objet du test

API 20Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques, entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants.

Principe

La galerie API 20Strep comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

II.A.3. Conservation des souches bactériennes isolées

La conservation des bactéries isolées a été réalisée par leur ensemencement sur une gélose nutritive inclinée dans des tubes à essais et ces cultures pures ont été conservées à +4 °C à l'obscurité.

II.B. Procédé d'extraction

II.B.1. Broyage

Les graines de *Nigella sativa L.* ont été nettoyées des impuretés, lavées avec de l'eau de robinet et séchées à l'abri de la lumière pendant quelques jours, ensuite elles ont été broyées à l'aide d'un mortier en poudre moyennement fine à partir de laquelle des différents extraits ont été préparés.

II.B.2. Extraction

L'extraction a été réalisée par la macération de la poudre de graines de *Nigella sativa L.* dans des solvants de polarité croissante (acétate d'éthyle, éthanol 96% et méthanol) en suivant la méthode décrite par **Shahid et al. (2013)** avec quelques modifications.

3 échantillons de 50 g de poudre de *Nigella sativa L.* ont été macérés dans 3 Erlenmeyers et chaque Erlenmeyer contient 150 ml d'un solvant différent. Les échantillons de la poudre ont été laissés macérer pendant 2 semaines à la température ambiante du laboratoire de protection des végétaux et à l'abri de la lumière. Pour faciliter l'extraction, une agitation occasionnelle de ces mélanges (poudre + solvants) a été effectuée.

Les macérés ont été filtrés sur des papiers filtres, évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif (Heidolph®) à 50 °C (**Sellami et al., 2013**) jusqu'à l'obtention de 3 matières visqueuses différentes qui sont les extraits. Ces 3 extraits ont été conservés dans des flacons de verre stériles dans le réfrigérateur à +4 °C jusqu'à leur utilisation (**Shahid et al., 2013 ; Sellami et al., 2013**).

L'extraction a été répétée 3 fois pour chaque extrait pour produire de quantités suffisantes pour notre étude.



Figure 11 : Macération de la poudre de graines de *Nigella sativa L.* dans l'acétate d'éthyle, l'éthanol et le méthanol.



Figure 12 : Evaporateur rotatif de type Heidolph®.

II.B.3. Calcul de rendement

Les différents extraits obtenus et pesés nous ont permis de calculer le rendement de chaque extraction en utilisant l'équation suivante :

$$\mathbf{R = (Me / Pe) \times 100}$$

R : rendement.

Me : masse de l'extrait.

Pe : prise d'essai.

II.C. Etude de l'activité antibactérienne du miel et des extraits de graines de *Nigella sativa L.*

II.C.1. Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été préparé en suivant la méthode décrite par **Chaudhry et al. (2015)** et **Kamal et al. (2010)**, et il a été utilisé dans l'étude de l'activité antibactérienne du miel et des différents extraits de *Nigella sativa L.* simultanément.

Une culture active pour chaque espèce bactérienne a été préparée par le transfert d'une colonie de la culture du stock dans un tube de 10 ml de bouillon nutritif stérile. Les tubes inoculés ont été incubés sans agitation à 37 °C pendant 24 heures.

À l'aide d'un spectrophotomètre, la turbidité de chaque suspension bactérienne a été ajustée à 10^8 UFC/ml par la dilution dans un bouillon nutritif stérile, ensuite 100 µl de cette suspension bactérienne ont été versés dans un tube de 10 ml de bouillon nutritif stérile pour standardiser la suspension bactérienne à une turbidité correspond à 10^6 UFC/ml.

II.C.2. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits de graines de *Nigella sativa L.*

L'étude de l'activité antibactérienne des extraits de graines de *Nigella sativa L.* a été effectuée en suivant la méthode décrite par **Chaudhry et al. (2015)** et **Kamal et al. (2010)** avec quelques modifications. Cette méthode est appelée « *la méthode de diffusion des puits sur gélose* ou *Agar well diffusion assay* ».

Tous les milieux de cultures ont été préparés avec la gélose Muller-Hinton dans des boîtes de pétri de 9 cm. Après la solidification de la gélose, des puits de 7 mm de diamètre ont été creusés dans la gélose à l'aide de l'extrémité large d'une pipette pasteur flambée dans la flamme du bec bunsen, pour produire 4 puits par boîte.

Pour le test des 3 extraits (extrait méthanolique, extrait éthanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle), une seule concentration égale à 300 mg/ml a été préparée pour chaque extrait par l'utilisation du Dimethyl Sulphoxide (DMSO) comme un solvant.

À l'aide d'un écouvillon, 100 µl (10^5 UFC) de chaque suspension bactérienne standardisée ont été ensemencés sur la surface de la gélose Muller-Hinton creusée. Les géloses ensemencées ont été laissés sécher pendant 5 min, ensuite 100 µl de chaque solution des 3 extraits ont été versés dans un puits (chaque puits a été rempli avec 30 mg d'un extrait différent solubilisé dans le DMSO) et le 4^{ème} puits a été rempli avec 100 µl de DMSO comme un témoin négatif. Les solutions ont été laissés diffuser sur la gélose à la température du laboratoire pendant 15-20 min avant l'incubation.

Après une incubation à 37 °C pendant 24 heures, toutes les boîtes de pétri ont été examinées pour rechercher les zones d'inhibition de la croissance bactérienne et pour mesurer leurs diamètres.

Ces tests ont été répétés 3 fois pour chaque souche bactérienne. L'effet antibactérien a été enregistré en mm comme un diamètre moyen des zones d'inhibition de la croissance bactérienne résultantes.

II.C.3. Détermination de l'activité antibactérienne du miel

L'étude de l'activité antibactérienne des différentes concentrations du miel a été effectuée aussi par « *la méthode de diffusion des puits sur gélose* ou *Agar well diffusion assay* » en suivant le protocole décrit par **Akujobi et Njoku (2010)** avec quelques modifications qui rapprochent cette méthode à celle utilisée pour l'étude de l'activité antibactérienne des différents extraits de graines de *Nigella sativa L.*

Tous les milieux de cultures ont été préparés avec la gélose Muller-Hinton dans des boîtes de pétri de 9 cm. Après la solidification de la gélose, des puits de 7 mm de diamètre ont été creusés dans la gélose à l'aide de l'extrémité large d'une pipette pasteur flambée dans la flamme du bec bunsen, pour produire 5 puits par boîte. Des différentes concentrations du miel ont été préparées en utilisant la dilution volume/volume (v/v) avec l'eau distillée stérile : 20%, 50%, 70% et 100% (non dilué).

À l'aide d'un écouvillon, 100 µl (10^5 UFC) de chaque suspension bactérienne standardisé ont été ensemencés sur la surface de la gélose Muller-Hinton creusée. Les géloses ensemencés ont été laissés sécher pendant 5 min, ensuite 100 µl de chaque concentration du

miel ont été versés dans un puits (chaque puits a été rempli avec une concentration différente du miel) et le 5^{ème} puits a été rempli avec 100 µl d'eau distillée stérile comme un témoin négatif. Les différentes concentrations du miel ont été laissées diffuser sur la gélose à la température du laboratoire pendant 15-20 min avant l'incubation.

Après une incubation à 37 °C pendant 24 heures, toutes les boîtes de pétri ont été examinées pour rechercher les zones d'inhibition de la croissance bactérienne et pour mesurer leurs diamètres.

Ces tests ont été répétés 3 fois pour chaque souche bactérienne. L'effet antibactérien a été enregistré en mm comme un diamètre moyen des zones d'inhibition de la croissance bactérienne résultantes.

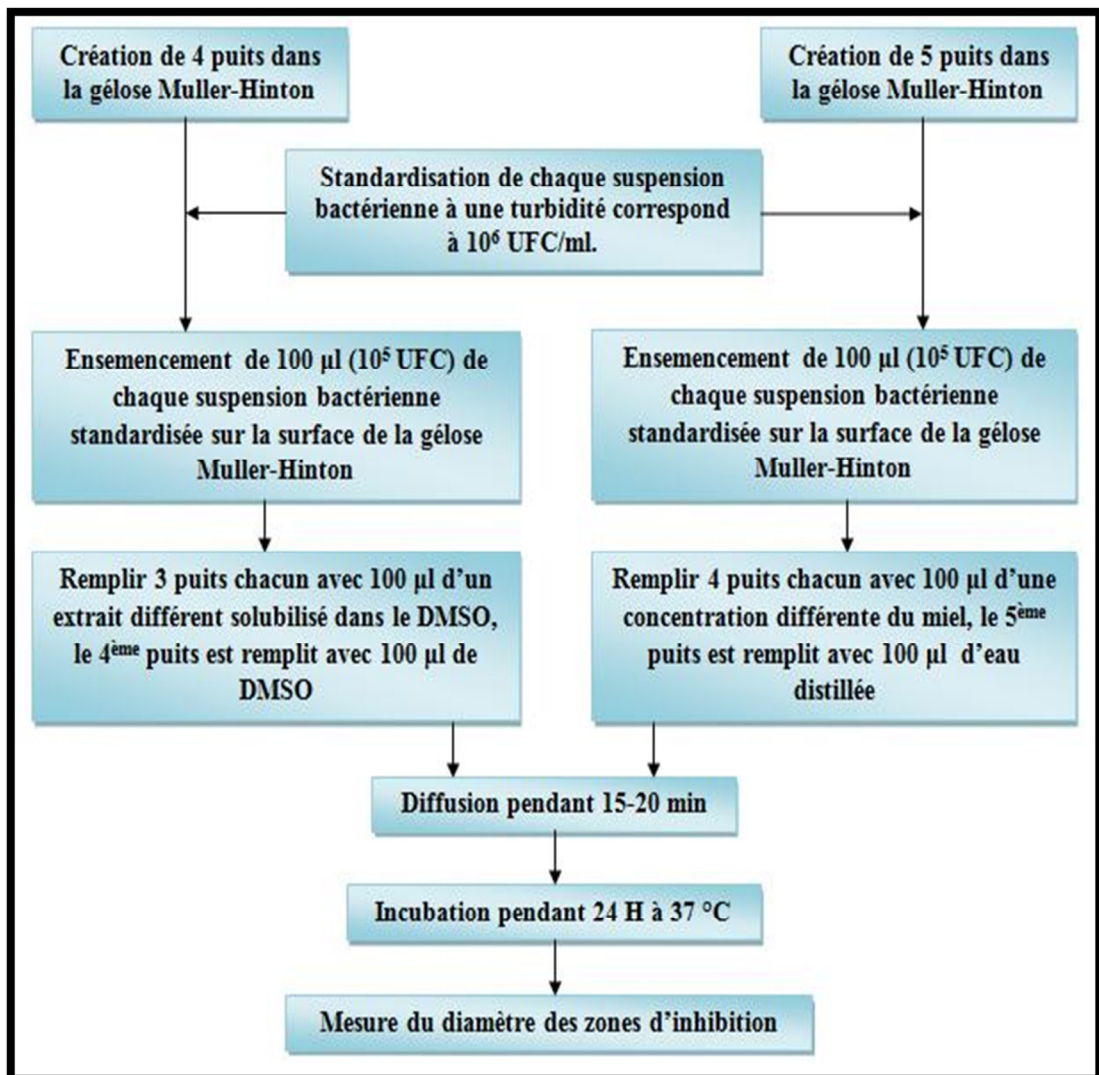


Figure 13 : Représentation schématique de la méthode d'étude de l'activité antibactérienne du miel et des extraits de graines de *Nigella sativa* L.

II.D. Etude de l'influence de l'addition de 5% (p/p) des différents extraits de graines de *Nigella sativa L.* sur l'activité antibactérienne et la concentration minimale bactéricide (CMB) du miel

II.D.1. Préparation des mélanges naturels

3 mélanges naturels ont été préparés par l'addition de 5% (p/p) des différents extraits de graines de *Nigella sativa L.* au miel étudié, et la composition de ces mélanges naturels a été :

- Le 1^{er} mélange naturel (MN 1) : 95 g de miel + 5 g d'extrait d'acétate d'éthyle (EAE) ;
- Le 2^{ème} mélange naturel (MN 2) : 95 g de miel + 5 g d'extrait éthanolique (EE) ;
- Le 3^{ème} mélange naturel (MN 3) : 95 g de miel + 5 g d'extrait méthanolique (EM).

Tous les mélanges naturels ont été préparés fraîchement et ils ont été conservés dans le réfrigérateur à +4 °C à l'abri de la lumière.

II.D.2. Préparation de l'inoculum

L'inoculum utilisé pour la détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) du miel et des mélanges naturels a été préparé en suivant la méthode de **Majtan et al. (2010)** avec petites modifications de l'utilisation du bouillon nutritif à la place du PBS tamponné.

Pour chaque espèce bactérienne une culture active sur une gélose nutritive a été effectuée, ensuite quelques colonies de cette culture ont été suspendues dans un bouillon nutritif stérile, et à l'aide d'un spectrophotomètre, la turbidité de la suspension bactérienne a été ajustée à 10^8 UFC/ml, ensuite 1 ml de cette suspension bactérienne a été versé dans un tube de 9 ml de bouillon nutritif stérile pour standardiser la suspension bactérienne à une turbidité correspond à 10^7 UFC/ml.

II.D.3. Détermination de la CMB du miel et des mélanges naturels

L'étude de la CMB du miel et des mélanges naturels (MNs) a été effectuée par « *la méthode de dilution en bouillon* ou *Broth Dilution Method* » en suivant le protocole décrit par **Alzahrani et al. (2011)** avec quelques modifications.

Pour le miel et pour chaque mélange naturel ; 14 tubes à essai stériles ont été utilisés pour tester des différentes concentrations (v/v) : 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,09%, 0,04%, 0,02% et 0,01%.

A l'aide d'une pipette graduée stérile, 1 ml de miel et 1 ml de chaque mélange naturel a été transféré séparément dans les premiers tubes à essai pour une concentration de 100% (pas de dilution). 1 ml de bouillon Muller-Hinton stérile a été transféré dans chaque des autres tubes à essai destinés aux autres concentrations décroissantes.

Ensuite 1 ml de miel et 1 ml de chaque mélange naturel a été transféré séparément dans les premiers tubes à essai qui contiennent 1 ml de bouillon Muller-Hinton stérile pour obtenir une concentration de 50%, puis le contenu de ces tubes à essai a été homogénéisé par un vortex.

Après l'homogénéisation, 1 ml de contenu de chaque tube à essai de la concentration 50% a été transféré dans le tube à essai suivant. Les mêmes procédures ont été répétées jusqu'à la concentration 0,01% à partir du quelle et après une bonne homogénéisation, 1 ml du contenu des tubes à essai a été rejeté.

10 μ l (10^5 UFC) de chaque suspension bactérienne standardisée ont été versés dans les tubes à essai de différentes concentrations. Un control positif a été fait par l'inoculation de 10 μ l (10^5 UFC) de chaque suspension bactérienne standardisée dans 1 ml de bouillon Muller-Hinton stérile. Un control négatif a été fait par l'addition de 0,5 ml de bouillon Muller-Hinton stérile au 0,5 ml de miel et de chaque mélange naturel.

Tous les tubes à essai ont été incubés à 37 °C pendant 24 heures. Après l'incubation et après une bonne homogénéisation par le vortex, une subculture pour chaque tube à essai a été

faite par ensemencement de 10 µl de milieu de culture (contenu dans les tubes à essai) sur la surface de la gélose nutritive étalée dans des boites de pétri.

Après une incubation à 37 °C en aérobie et pendant 24 heures, le nombre des colonies a été calculé sur la gélose nutritive des subcultures et la concentration minimale bactéricide (CMB) a été déterminée comme la moindre concentration montre l'absence de croissance bactérienne.

Ces tests ont été répétés 03 fois pour chaque souche bactérienne.

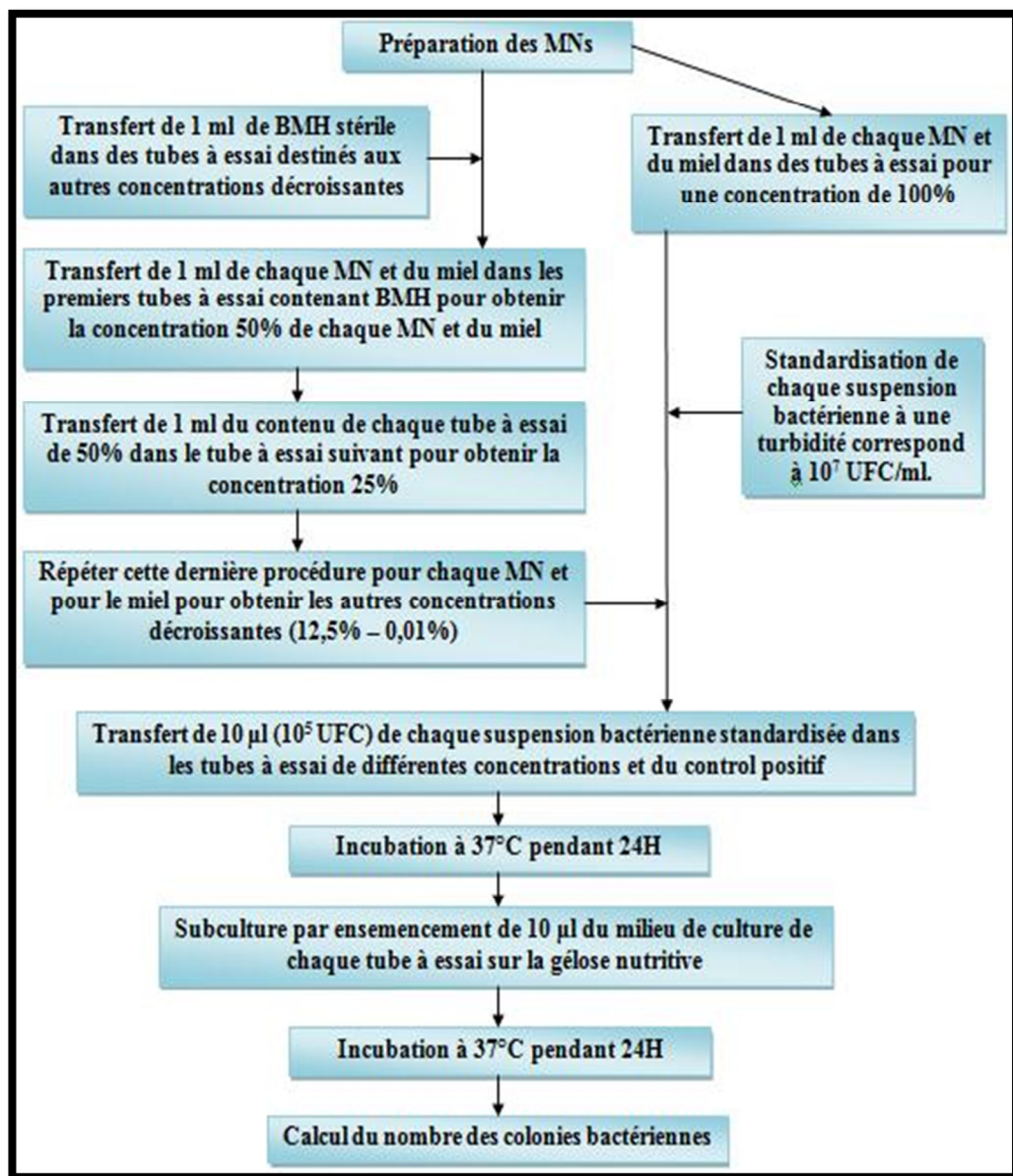


Figure 14 : Représentation schématique de la méthode d'étude de l'influence de l'addition de 5% (p/p) des différents extraits de graines de *Nigella sativa L.* sur l'activité antibactérienne et la concentration minimale bactéricide (CMB) du miel.

II.E. Etude de l'influence de l'addition de 5% (p/p) des différents extraits de graines de *Nigella sativa L.* sur l'activité cicatrisante du miel

II.E.1. Animaux d'expérience

6 lapins impubères (mâles et femelles) ont été obtenus d'une ferme privée située à El-Eulma (Sétif), leurs poids étaient 0,5-0,75 kg. L'élevage de ces lapins a été effectué dans une chambre avec une température de 20-25 °C. Chaque lapin a été placé dans une cage individuelle en acier inoxydable avec accès libre à l'eau et à l'alimentation.

Les lapins ont été nourris quotidiennement par des aliments sous forme de granulés d'origine commerciale (aliments granulés pour lapins, Sarl La Production Locale, CEREGAN) associés à des légumes et ils ont reçu de l'eau en abondance.

Les lapins ont été laissés pendant une semaine pour l'adaptation dans cette chambre avant le début de l'expérimentation.

II.E.2. Réalisation des plaies expérimentales

II.E.2.1. Anesthésie

La nourriture a été mise en suspension huit à dix heures avant l'administration de l'anesthésie. Les deux cotés de région thoraco-lombaire de chaque lapin ont été préparés chirurgicalement : la peau a été rasée avec une lame de rasoir et désinfectée à l'aide de polyvidone iodée à 10% (POVIP[®] ; SAIDAL).

Ensuite, les animaux ont été anesthésiés par l'injection intramusculaire d'un mélange d'anesthésiques : 40 mg/kg de chlorhydrate de Kétamine (IMALGENE[®] 500 ; Merial) + 10 mg/Kg de Xylazine (PAXMAN[®] ; VIRBAC) + 4 mg/Kg de Diazépam (DIAZEPAM[®] ; TVM) (Omar, 2009).

II.E.2.2. Induction des plaies

Avant l'excision de la peau, la profondeur de l'anesthésie a été évaluée par : la disparition des différents reflexes (comme le reflexe podale), la disparition des mouvements volontaires et ainsi que la disparition des réponses lors de stimulation douloureuse par le pincement des espaces interdigités.

Un gabarit a été utilisé pour marquer 5 carrés de 10 mm sur 10 mm sur les deux cotés de la région thoraco-lombaire de l'animal (3 carrés dans un coté et 2 carrés dans l'autre coté).

L'animal anesthésié a été placé en décubitus latéral sur la table, ensuite sur les lieux de l'excision marqués, des lambeaux de peau de pleine épaisseur « full thickness » ont été excisés à l'aide d'un bistouri, des ciseaux et des pinces à préhension.

Lors de changement de coté de l'animal pour la réalisation des deux dernières plaies, les 3 premières plaies ont été protégées par des compresses stériles qui ont été utilisées aussi pour juguler les hémorragies.

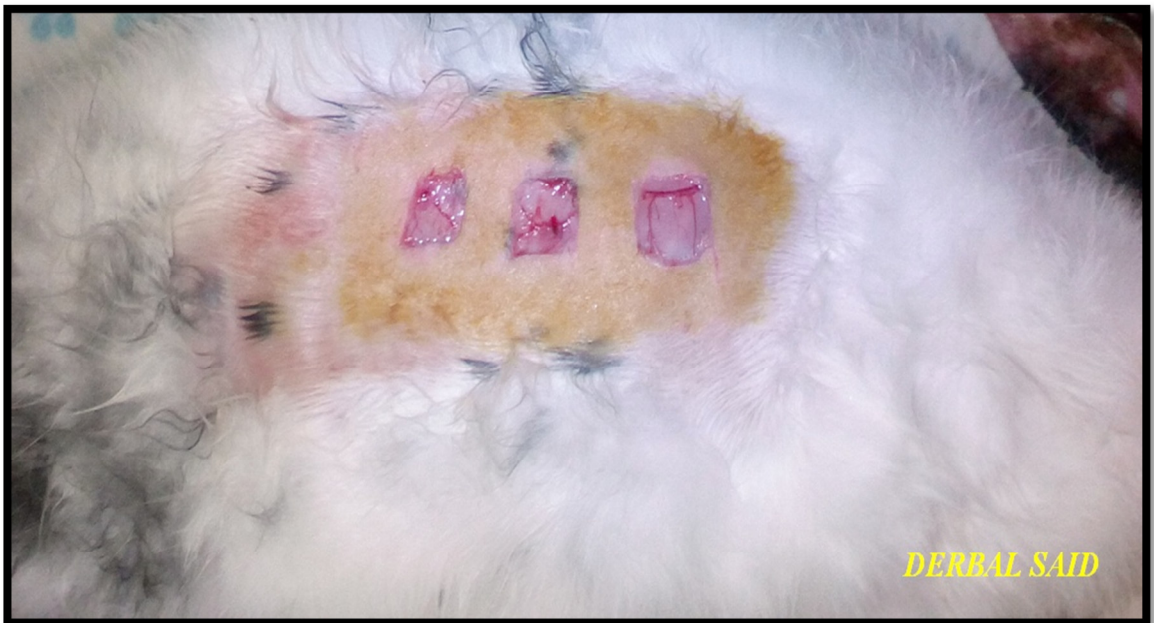


Figure 15 : Induction des 3 premières plaies expérimentales dans la région thoraco-lombaire du lapin.

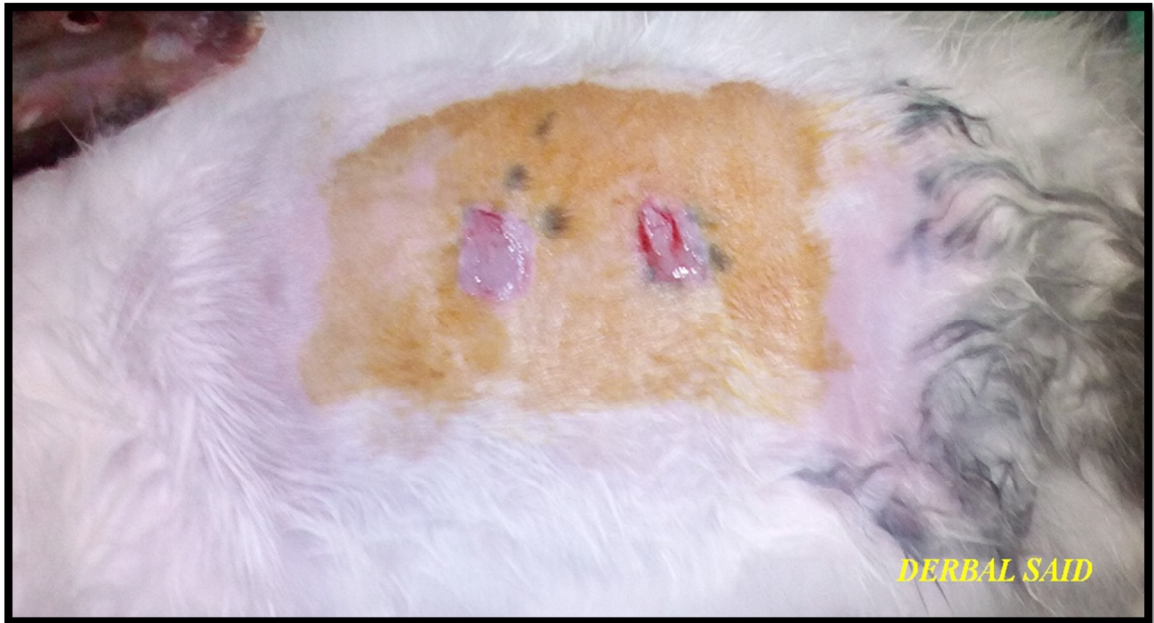


Figure 16 : Induction des 2 dernières plaies expérimentales dans la région thoraco-lombaire du lapin.

II.E.3. Application des traitements

Les traitements ont été appliqués immédiatement après l'induction des plaies :

- La 1^{ère} plaie a été traitée avec le MN 1 (miel + EAE) ;
- La 2^{ème} plaie a été traitée avec le MN 2 (miel + EE) ;
- La 3^{ème} plaie a été traitée avec le MN 3 (miel + EM) ;
- La 4^{ème} plaie a été traitée avec le miel ;
- La 5^{ème} plaie a été traitée avec la pommade Cicatryl-Bio[®] (control positif).

Les produits cicatrisants ont été étalés en couches de la même épaisseur sur les plaies expérimentales qui ont été protégées par la suite par un pansement (tissu rigide aéré et hypoallergénique ; PHARMA SOINS).

Enfin, les lapins ont été placés dans leurs cages (cages individuelles) et ils ont été laissés pour réveiller.

L'application des produits cicatrisants a été répétée 2 fois par jour jusqu'à la guérison complète des plaies.

II.E.4. Étude de l'évolution de la cicatrisation

L'évolution de la cicatrisation des plaies a été étudiée par la méthode planimétrique qui consiste à mesurer la surface des plaies au cours de leur évolution dans le temps, ce qui permet le calcul du pourcentage de contraction de ces plaies.

Ainsi, l'évolution de la cicatrisation de ces plaies a été étudiée par la détermination de la période de ré-épithélialisation.

II.E.4.1. Mesure de la surface des plaies

Les contours des plaies expérimentales traitées ont été dessinés sur des pellicules transparentes (désinfectées par l'alcool) à l'aide d'un crayon marqueur (à pointe fine et encre indélébile) après leur application sur ces plaies.

Ensuite, ces pellicules transparentes ont été appliquées sur une feuille de papier-millimètre et à partir de la forme géométrique obtenue, un comptage manuel des millimètres-carrés inclus dans cette dernière est possible et permet de mesurer la surface de la plaie selon l'équation suivante :

$$\text{Surface d'une plaie} = [(\text{nombre des millimètres-carrés entiers}) + (\text{nombre des millimètres-carrés partiels} / 2)].$$

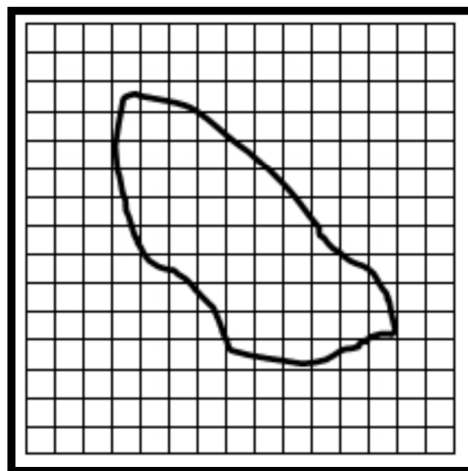


Figure 17 : Les millimètres-carrés entiers et partiels inclus dans la forme géométrique de la plaie.

II.E.4.2. Calcul du pourcentage de contraction des plaies

Afin de déduire le pourcentage de contraction des plaies, la moyenne des surfaces des cinq plaies traitées avec le même produit cicatrisant a été calculée puis comparée avec la moyenne des surfaces initiales de ces plaies, en utilisant l'équation suivante (**Gopinath et al., 2004**) :

Pourcentage de contraction	=	$\frac{\text{(taille de la plaie initiale à } J_0 - \text{taille de la plaie à } J_n)}{\text{taille de la plaie initiale à } J_0} \times 100$
-----------------------------------	----------	---

II.E.4.3. Détermination de la période de ré-épithélialisation

La période de ré-épithélialisation a été estimée par le nombre de jours requis pour la chute de l'escarre et fermeture totale de la plaie qui ne laisse derrière elle aucune blessure résiduelle à vif (**Thakur et al., 2011**).

II.F. Analyse statistique des résultats

Les résultats étant exprimés sous la forme de moyenne \pm écart type. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2007. L'analyse de la variance (ANOVA) à un seul facteur a été établie suivie par t-Test.

- **Analyses de variances (ANOVA)** ; pour la comparaison des moyennes de plus de deux groupes ;
- **t-Test** ; pour la comparaison des moyennes de deux groupes indépendants.

Les différences entre les moyennes sont considérées comme significativement différentes lorsque $p < 0.05$.



Chapitre II : Résultats et discussion

I. Identification des bactéries isolées**I.A. Morphologie des bactéries**

L'origine et l'aspect macroscopique et microscopique des souches bactériennes isolées sont décrits dans le tableau 6.

Tableau 5 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des bactéries isolées.

	Origine (espèce animale)	Milieu de culture (milieu sélectif)	Aspect macroscopique des colonies	Aspect microscopique des colonies
Souche n° 01	Chaton	MacConkey	Colonies roses (lactose +)	Bacilles G -
Souche n° 02	Chaton	Chapman	Colonies jaunes dorées (mannitol +)	Coques G+, disposées en grappe de raisin
Souche n° 03	Chaton	BEA	Colonies translucides avec un halo noir	Coques G+, disposées en chainettes
Souche n° 04	Chien	MacConkey	Colonies jaunes (lactose -)	Bacilles G-
Souche n° 05	Chien	Chapman	Colonies roses (mannitol -)	Coques G+

I.B. Identification biochimique des bactéries

Les résultats concernant les tests biochimiques appliqués sur les souches bactériennes isolées et l'identification de l'espèce (ou le genre) de ces souches bactériennes sont rassemblés dans le tableau 7.

Tableau 6 : Caractéristiques biochimiques des bactéries isolées.

	Test de catalase	Test d'oxydase	Galerie API 20E	Galerie API Staph	Galerie API 20Strep
Souche n° 01	NR	(-)	<i>Escherichia coli</i>	NR	NR
Souche n° 02	(+)	NR	NR	<i>Staphylococcus aureus</i>	NR
Souche n° 03	(-)	NR	NR	NR	<i>Enterococcus faecalis</i>
Souche n° 04	NR	(-)	<i>Enterobacter sp.</i>	NR	NR
Souche n° 05	(+)	NR	NR	<i>Staphylococcus intermedius</i>	NR

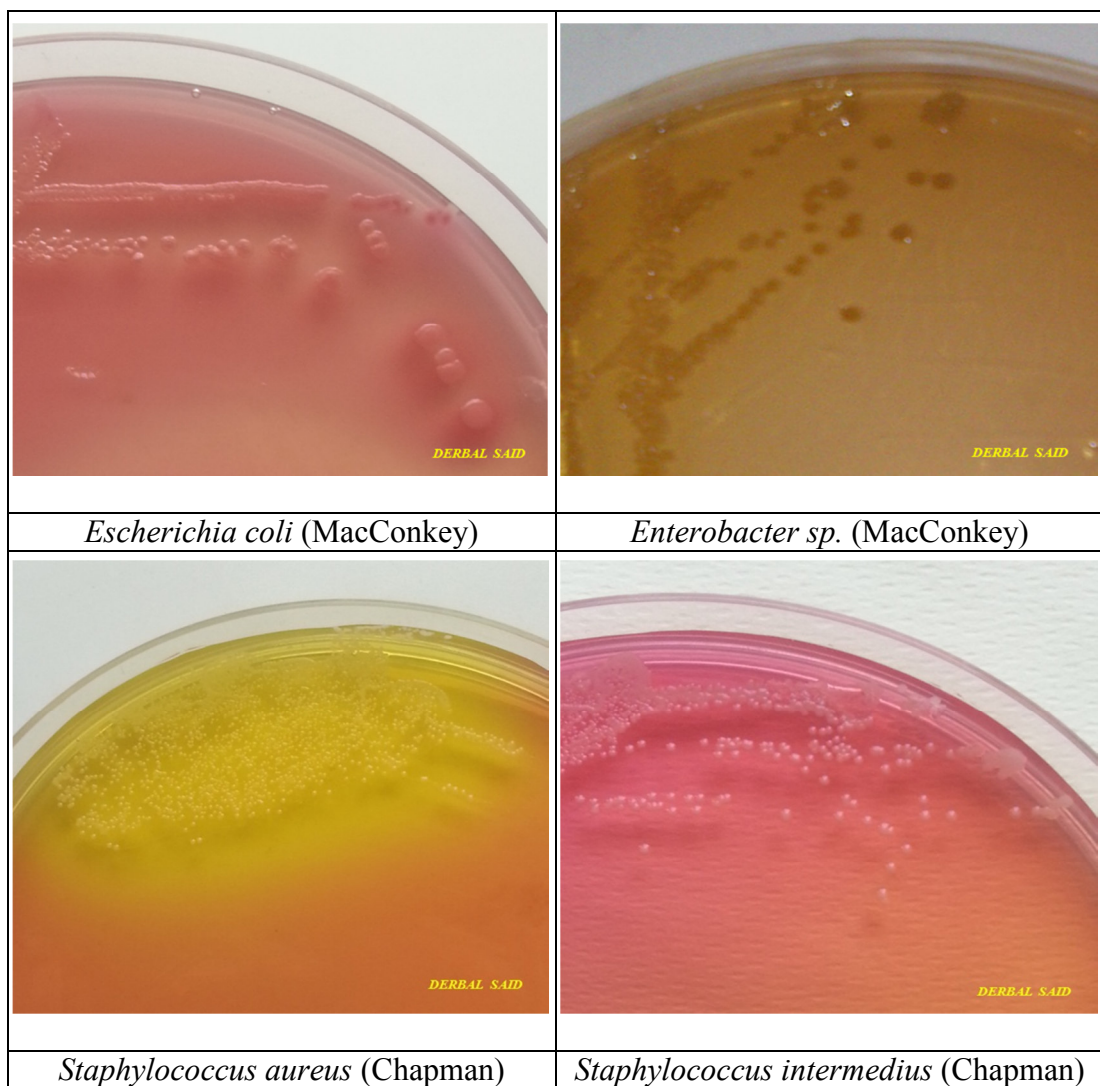
NR : non recherché, (+) : réaction positif, (-) : réaction négatif.

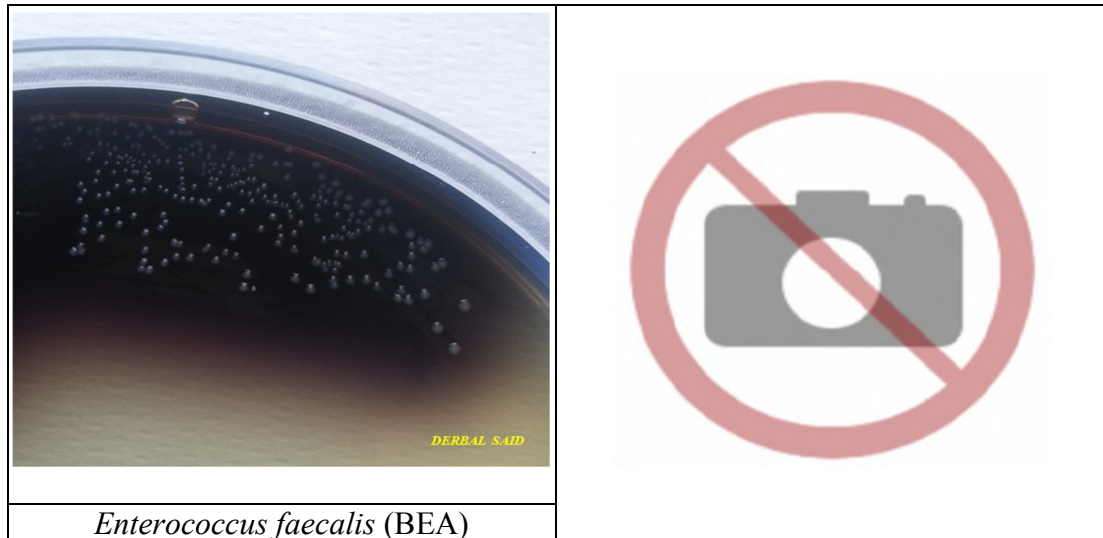
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre II : Résultats et discussion

Par cette méthode utilisée, nous avons isolé 5 souches bactériennes, 3 sont connues par leur grand pouvoir pathogène et elles sont incriminées dans plusieurs états pathologiques chez les différents animaux domestiques comme les mammites, les endométrites..., et ces souches bactériennes sont : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*.

Les 2 autres souches bactériennes, en l'occurrence *Enterobacter sp.* et *Staphylococcus intermedius* sont moins pathogènes et appartiennent à la flore cutanée transitoire chez le chien, cependant, *Staphylococcus intermedius* est responsable de la majorité des pyodermites bactériennes chez le chien.





Enterococcus faecalis (BEA)

Figure 18 : Aspect des colonies des bactéries isolées sur leurs milieux sélectifs.



Figure 19 : Identification biochimique d'*Escherichia coli* par la galerie API 20E. (+) : réaction positif et (-) : réaction négatif.

II. Rendement d'extraction des différents extraits de graines de *Nigella sativa L.*

Les résultats concernant le rendement des différents extraits (l'extrait d'acétate d'éthyle, l'extrait éthanolique et l'extrait méthanolique) de graines de *Nigella sativa L.* sont rassemblés dans le tableau 8 et présentés par l'histogramme de la figure 21.

Tableau 7 : Rendement des différents extraits de graines de *Nigella sativa L.* en % (p/p).

Extrait	Rendement en % (p/p)
Extrait d'acétate d'éthyle (EAE)	23,22
Extrait éthanolique (EE)	8,37
Extrait méthanolique (EM)	8,98

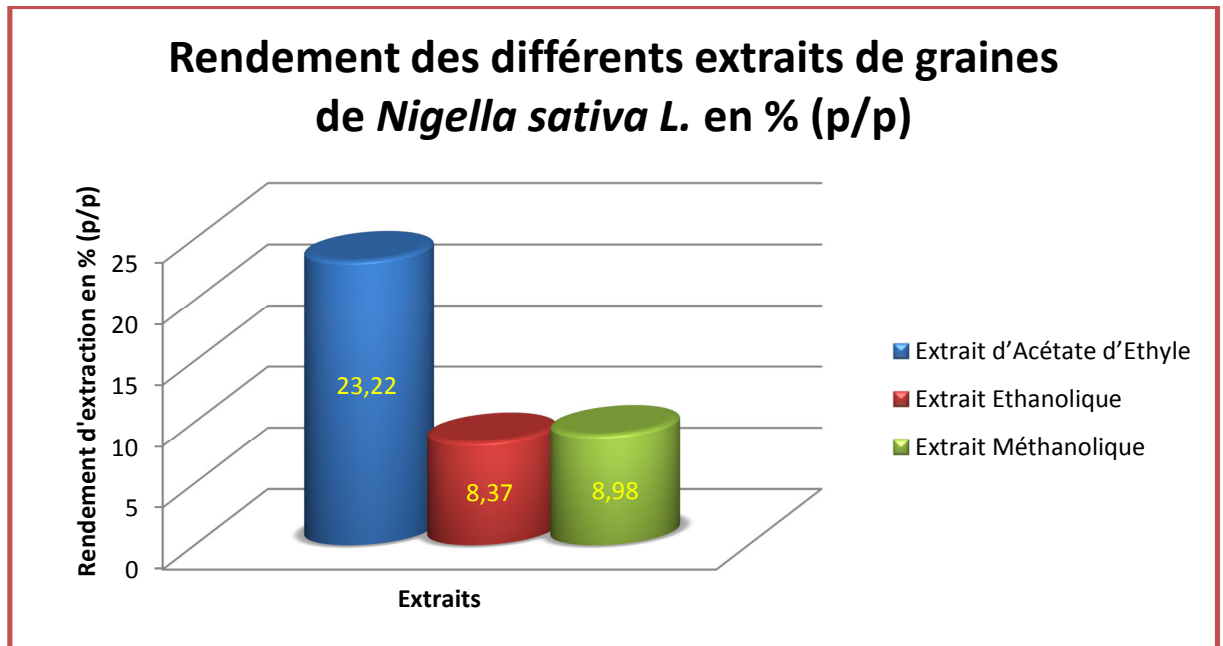


Figure 20 : Histogramme présentant le rendement des différents extraits de graines de *Nigella sativa L.* en % (p/p).

La valeur la plus élevée a été obtenue avec l'extrait d'acétate d'éthyle et avec un rendement de 23,22%, ensuite on a la valeur 8,98% obtenue avec l'extrait méthanolique et enfin la valeur la plus basse a été obtenue avec l'extrait éthanolique et avec un rendement de 8,37%.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Javed et al. (2012)** dont le rendement de l'extrait méthanolique a été supérieur au rendement de l'extrait éthanolique, et en accord aussi avec ceux rapportés par **Suresh Kumar et al. (2010)** dont le rendement de l'extrait d'acétate d'éthyle a été supérieur au rendement de l'extrait méthanolique.

La différence quantitative entre ces rendements est attribuée à la différence méthodologique de l'extraction puisque **Javed et al. (2012)** et **Suresh Kumar et al. (2010)** ont adopté la méthode d'extraction à l'aide du « Soxlet ».

Ainsi, le produit d'extraction varie également en termes de la qualité, de la quantité et de la composition selon le climat, la composition du sol, l'organe végétal, l'âge, etc. (**Bakkali et al., 2008**).

III. Activité antibactérienne du miel

Dans cette partie, nous avons testé l'activité inhibitrice d'un miel poly-floral sur des bactéries isolées à partir des plaies superficielles des carnivores domestiques, ces bactéries sont Gram + (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* et *Enterococcus faecalis*) et Gram – (*Escherichia coli* et *Enterobacter sp.*).

Les résultats des tests de l'activité antibactérienne du miel poly-floral sur les bactéries isolées dans cette étude sont rassemblés dans le tableau 9 et présentés par l'histogramme de la figure 22.

Tableau 8 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches bactériennes isolées obtenues avec les différentes concentrations (v/v) du miel.

Bactéries	Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches bactériennes isolées			
	20%	50%	70%	100%
<i>Escherichia coli</i>	9,66 ± 1,15	11,66 ± 2,08	12,33 ± 1,15	19 ± 1,73
<i>Enterobacter sp.</i>	13,66 ± 0,57	13,66 ± 1,52	14,33 ± 2,51	15 ± 2
<i>Staphylococcus aureus</i>	15,66 ± 4,04	18 ± 4,35	16,66 ± 0,57	19 ± 3,46
<i>Staphylococcus intermedius</i>	10,33 ± 0,57	11,66 ± 0,57	12 ± 1	16,33 ± 0,57
<i>Enterococcus faecalis</i>	13,66 ± 0,57	12,33 ± 0,57	12 ± 0	14,33 ± 0,57

Remarque : Les résultats sont représentés par la moyenne ± écart-type.

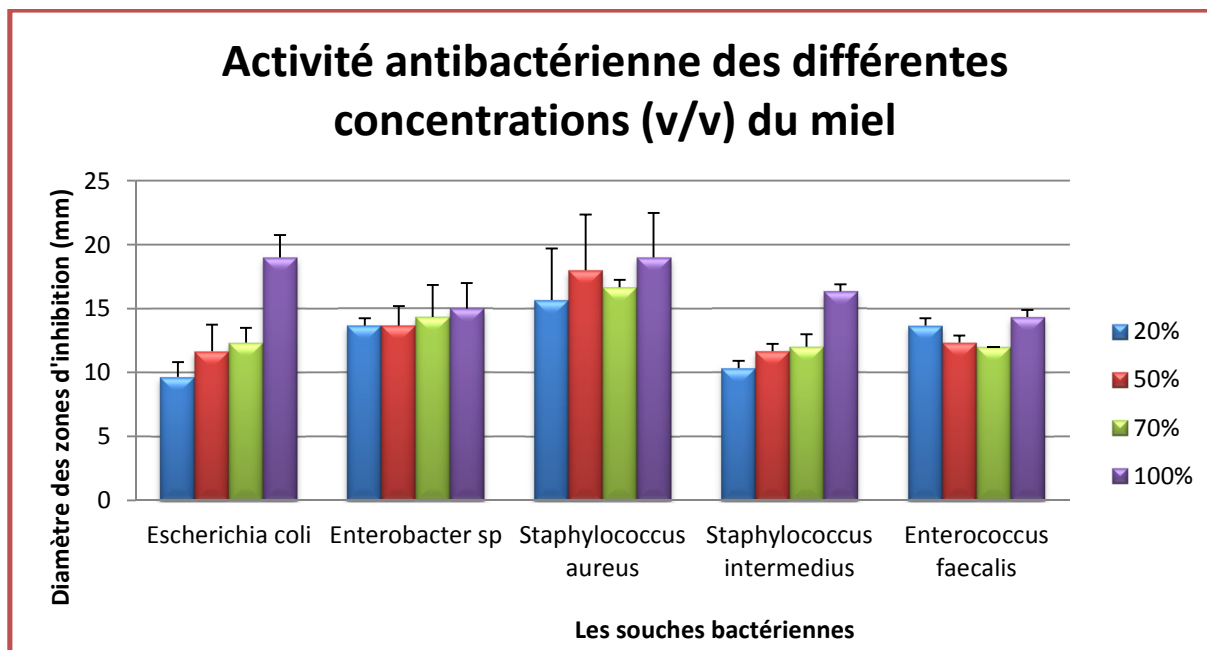


Figure 21 : Histogramme présentant les diamètres des zones d'inhibition (moyenne ± écart-type) des souches bactériennes isolées obtenues avec les différentes concentrations (v/v) du miel.

Une étude a montré que l'activité antimicrobienne peut être le résultat de la concentration élevée en sucre, l'acidité, la production de peroxyde d'hydrogène, les flavonoïdes, les phénols ou d'autres composants non identifiés présents dans le miel (**Bogdanov, 2012**). D'autres études ont montré que les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, sont responsables des propriétés antimicrobiennes du miel (**Bogdanov, 1997 ; Vit et Tomas-Barberan, 1998a ; Vit et al., 1998b**).

Estevinho et al. (2008) et **Kwakman et Zaat (2012)** ont rapporté que certains types de miels contiennent d'autres composants bioactifs à activité antibactérienne, y compris le méthylglyoxal, le défensine-1, et le lysozyme. Ainsi, **Kwakman et al. (2010)**, **Kwakman et al. (2011a)** et **Kwakman et al. (2011b)** ont rapporté que le miel contient le défensine-1 d'abeille qui est suffisant pour inhiber la croissance des bactéries.

En outre, il a été suggéré que la présence de différentes souches de *L. acidophilus* dans le miel obtenu à partir de différentes sources peut contribuer aux propriétés antimicrobiennes du miel (**Al-Waili et al., 2005 ; Aween et al., 2012**).

De nombreuses études ont indiqué que le peroxyde d'hydrogène joue un rôle important dans l'activité antimicrobienne du miel (**Lee et al., 2008a ; Lee H. et al., 2008b ; Taormina P.J. et al., 2001**). Quand le miel est dilué, une enzyme dérivée d'abeille « glucose oxydase » est activée dans le miel et catalyse la production lente de peroxyde d'hydrogène qui inhibe la croissance bactérienne (**White et al., 1963**). Cette activité varie sensiblement d'un miel à l'autre (**Molan, 1992b**).

Molan (1992a) a rapporté que l'activité de l' H_2O_2 dans le miel non dilué est supprimée par le faible pH du miel puisque l'enzyme « glucose oxydase » a un pH optimal de 6,1 avec une activité minimale de pH 5,5 et au maximum de PH 8.

L'activité antibactérienne du miel dépend du synergisme entre tous les composants bioactifs et le miel contenant plus d'une substance active a un pouvoir plus élevé en tant qu'agent antimicrobien (**Al-Waili et al., 2013**).

En règle générale, les composants phytochimiques ne font qu'une contribution mineure à l'activité antibactérienne du miel, mais pour certains miels, comme celui appelé « miel de

Manuka », des composés phytochimiques non identifiés apportent une contribution importante (**Molan, 1992b**).

Pendant notre étude, nous avons observé que toutes les bactéries isolées sont sensibles à toutes les concentrations étudiées du miel, mais avec des degrés variables, et la plus grande sensibilité de toutes ces bactéries a été observée avec le miel non dilué. La différence de la sensibilité entre ces bactéries a été significative ($p < 0,05$) à chacune des concentrations étudiées du miel.

Plusieurs auteurs ont rapportés que la plus grande sensibilité des bactéries a été observée avec le miel non dilué (**Khalil et al., 2014 ; Ayaad et al., 2012 ; Chanchao, 2009 ; Basualdo et al., 2007**), ce qui corrobore nos résultats.

La plus grande sensibilité des bactéries est obtenue avec le miel non dilué puisque sa propriété antimicrobienne dépend de sa teneur élevée en sucre abaissant l'activité hydrique, ainsi, la dilution du miel va changer son effet osmotique (**Molan, 1992a**), son PH acide et son effet antibactérien (**Molan, 1992a ; Molan, 1996**).

Après la dilution de notre miel et la réduction de son osmolarité, il a encore inhibé la croissance des bactéries isolées, suggérant la présence d'une activité antibactérienne autre que la simple hyperosmolarité dépendant du sucre.

La zone d'inhibition la plus petite a été observée avec la concentration 20% sur *Escherichia coli* et son diamètre a été de **09,66 ± 1,15 mm**. La zone d'inhibition la plus large a été observée avec le miel non dilué sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, et les diamètres de ces zones d'inhibition ont été de **19 ± 3,46 mm** et **19 ± 1,73 mm** respectivement, et avec une différence de sensibilité non significative ($p > 0,05$) entre ces deux bactéries au miel non dilué.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Khalil et al. (2014), Ayaad et al. (2012), Chanchao (2009)** et **Basualdo et al. (2007)** puisqu'ils ont montré que *Staphylococcus aureus* est la bactérie la plus sensible aux miels, ainsi que ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Omafuvbe et Akanbi (2009)** et **Nazir et Latif (2012)** puisqu'ils ont montré qu'*Escherichia coli* est la bactérie la plus sensible aux miels.

Staphylococcus aureus a été la bactérie la plus sensible au miel étudié malgré qu'elle est considéré comme la bactérie la plus osmotolérante capable de provoquer une infection de la plaie (Chirife et al., 1983).

Omafuvbe et Akanbi (2009) ont rapporté que *Staphylococcus aureus* est résistante aux miels nigériens comme un résultat inattendu, ainsi, Basualdo et al. (2007) ont rapporté qu'*Escherichia coli* est résistante aux miels commercialisés en Argentine.

Il y a peu d'études concernant l'activité antibactérienne du miel sur *Staphylococcus intermedius* et *Enterobacter sp.*, comme celle d'Al-Waili et al. (2013) qui ont rapporté que la bactérie *Enterobacter aerogenes* est sensible aux miels d'Arabie Saoudite.

D'autres auteurs ont rapporté qu'*Enterococcus faecalis* est sensible aux miels du Pakistan (Khalil et al., 2014) et d'Espagne (Gallardo-Chacon et al., 2008), mais Basualdo et al. (2007) ont rapporté que cette bactérie est résistante aux miels d'Argentine.



Figure 22 : Activité antibactérienne des différentes concentrations du miel sur *Staphylococcus aureus*. 20%, 50%, 70% et 100% : différentes concentrations du miel et H₂O : témoin négatif.



Figure 23 : Zone d'inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* obtenue avec le miel non dilué (100%).

IV. Activité antibactérienne des extraits de graines de *Nigella sativa L.*

Dans cette partie, nous avons testé l'activité inhibitrice des extraits méthanolique, éthanolique et d'acétate d'éthyle de graines de *Nigella sativa L.* sur les bactéries isolées.

Les résultats des tests de l'activité antibactérienne de ces extraits sur les bactéries isolées pendant cette étude sont rassemblés dans le tableau 10 et présentés par l'histogramme de la figure 25.

Tableau 9 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches bactérienne isolées obtenues avec les différents extraits de graines de *Nigella sativa L.*

Bactéries	Diamètres des zones d'inhibition (mm) des différentes souches bactériennes isolées		
	Extrait d'acétate d'éthyle	Extrait éthanolique	Extrait méthanolique
<i>Escherichia coli</i>	10 ± 0	10 ± 0	0
<i>Enterobacter sp.</i>	13,66 ± 0,57	11,66 ± 0,57	11,66 ± 0,57
<i>Staphylococcus aureus</i>	12 ± 1	10,66 ± 1,15	12,66 ± 0,57
<i>Staphylococcus intermedius</i>	15,66 ± 0,57	12 ± 1	13,66 ± 0,57
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	12,66 ± 0,57	12,33 ± 1,15

Remarque : Les résultats sont représentés par la moyenne ± écart-type.

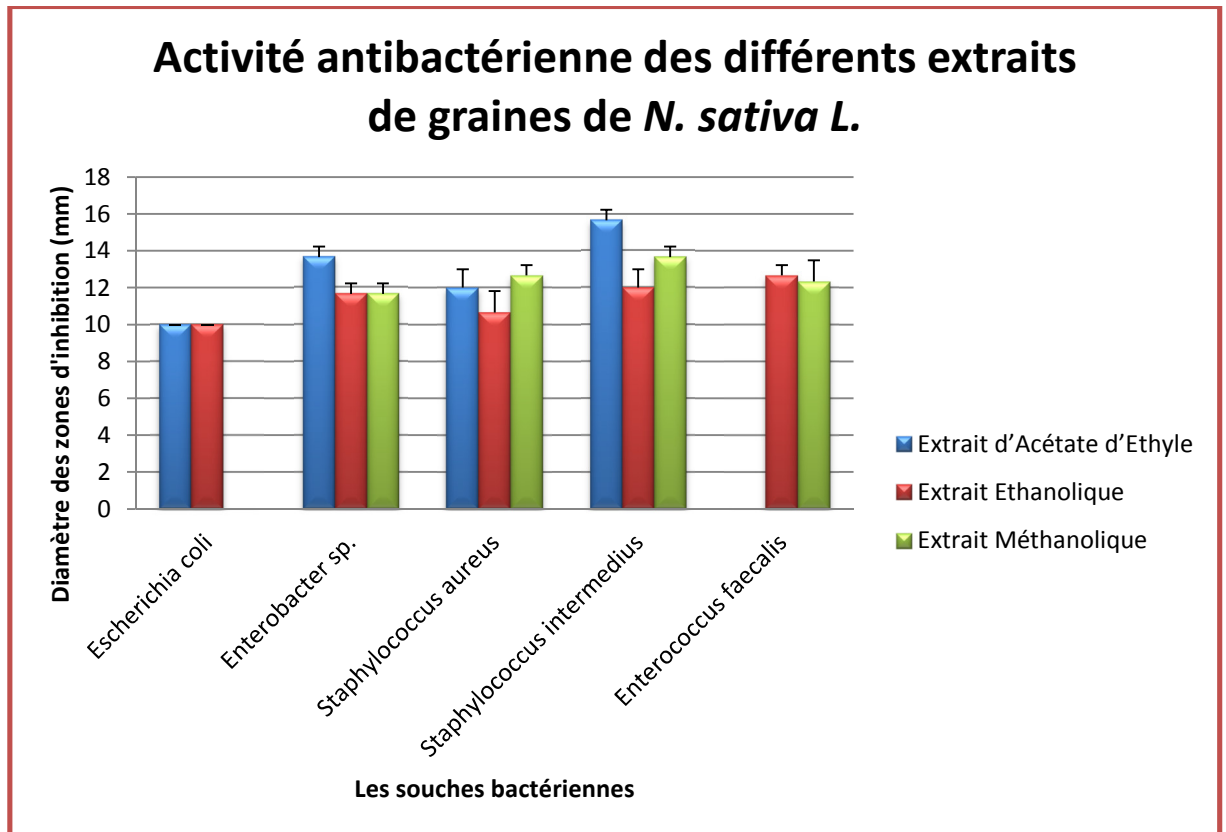


Figure 24 : Histogramme présentant les diamètres des zones d'inhibition (moyenne \pm écart-type) des souches bactériennes isolées obtenues avec les différents extraits de graines de *Nigella sativa L.*. La croissance d'*E. coli* n'a pas été inhibée par l'extrait méthanolique et la croissance d'*E. faecalis* n'a pas été inhibée par l'extrait d'acétate d'éthyle.

Des solvants polaires (l'éthanol et le méthanol) et un solvant moyennement polaire (l'acétate d'éthyle) ont été utilisés pour extraire les métabolites secondaires de graines de *Nigella sativa L.* qui diffèrent par leur polarité et leur structure et donc des différents extraits qui ont des propriétés biologiques distinctes.

Au cours du processus d'extraction, les solvants diffusent dans le matériel végétal et solubilisent des composés solides de polarité similaire (Green, 2004).

Les guérisseurs traditionnels utilisent principalement de l'eau pour la préparation de remèdes à partir d'extrait aqueux des plantes, mais les solvants organiques ont été trouvés pour donner une activité antimicrobienne plus cohérente par rapport aux extraits aqueux (Parekh et al., 2005).

A la concentration de 0,3 g/ml, l'extrait éthanolique a été actif sur toutes les bactéries et l'extrait d'acétate d'éthyle a été lui aussi actif sur toutes les bactéries, sauf sur

Enterococcus faecalis, et la différence de la sensibilité entre les bactéries étudiées a été significative ($p < 0,05$) à chacun de ces deux extraits. L'extrait méthanolique a été actif sur toutes les bactéries sauf sur *Escherichia coli* et la différence de la sensibilité entre les bactéries étudiées a été non significative ($p > 0,05$) à cet extrait.

La zone d'inhibition la plus large a été obtenue avec l'extrait d'acétate d'éthyle sur *Staphylococcus intermedius* avec un diamètre de $15,66 \pm 0,57$ mm, et la zone d'inhibition la plus petite a été obtenue avec les extraits éthanolique et d'acétate d'éthyle sur *Escherichia coli*, avec un diamètre de 10 ± 0 mm.

Escherichia coli a présenté une sensibilité égale aux extraits éthanolique et d'acétate d'éthyle mais elle a été résistante à l'extrait méthanolique, et ce résultat n'est pas en accord avec ceux rapportés par **Shahid et al. (2013)**, **Mishra (2011)**, **Javed et al. (2012)**, **Suresh Kumar et al. (2010)**, **Tanis et al. (2009)** et **Sellami et al. (2013)**.

Shahid et al. (2013) ont rapporté qu'*Escherichia coli* est sensible aux extraits méthanolique et éthanolique et résistante à l'extrait d'acétate d'éthyle ; **Mishra (2011)** a rapporté l'inverse des résultats de **Shahid et al. (2013)** et il a montré qu'*Escherichia coli* est résistante aux extraits méthanolique et éthanolique et sensible à l'extrait d'acétate d'éthyle.

Javed et al. (2012) ont rapporté aussi qu'*Escherichia coli* est sensible aux extraits méthanolique et éthanolique et **Suresh Kumar et al. (2010)** ont rapporté qu'*Escherichia coli* est sensible aux extraits méthanolique et d'acétate d'éthyle.

D'autres auteurs ont rapporté qu'*Escherichia coli* est sensible à l'extrait méthanolique (**Tanis et al., 2009**) et résistante à l'extrait éthanolique (**Sellami et al., 2013**).

Staphylococcus aureus a été sensible à tous les extraits étudiés et ce résultat est en accord avec ceux rapportés par **Tanis et al. (2009)**, **Shahid et al. (2013)**, **Liaqat et al. (2015)**, **Hannan et al. (2008)**, **Mishra (2011)** et **Suresh Kumar et al. (2010)**, mais n'est pas en accord avec ceux rapportés par **Sellami et al. (2013)**.

Tanis et al. (2009), **Shahid et al. (2013)**, **Mishra (2011)** et **Suresh Kumar et al. (2010)** ont rapporté que *Staphylococcus aureus* est sensible à l'extrait méthanolique, ainsi,

Shahid et al. (2013) et **Mishra (2011)** ont rapporté que cette bactérie est sensible à l'extrait éthanolique.

Liaqat et al. (2015) ont rapporté que toutes les souches de *Staphylococcus aureus* résistante à la vancomycine (*SARV*) sont sensibles à l'extrait éthanolique et **Hannan et al. (2008)** ont rapporté que toutes les souches de *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (*SARM*) sont sensibles aussi à l'extrait éthanolique.

Shahid et al. (2013), **Mishra (2011)** et **Suresh Kumar et al. (2010)** ont rapporté que *Staphylococcus aureus* est sensible à l'extrait d'acétate d'éthyle et selon les résultats rapportés par **Sellami et al. (2013)**, cette bactérie est résistante à l'extrait éthanolique.

D'après nos résultats, *Staphylococcus intermedius* est sensible à tous les extraits étudiés et *Enterococcus faecalis* est sensible aux extraits méthanolique et éthanolique mais résistante à l'extrait d'acétate d'éthyle.

Il n'existe aucune étude qui porte sur l'activité antibactérienne des extraits méthanolique, éthanolique et d'acétate d'éthyle sur *Staphylococcus intermedius* et *Enterococcus faecalis*, mais il y'a des auteurs qui ont rapporté qu'*Enterococcus faecalis* est sensible aux autres extraits comme l'huile fixe (**Harzallah et al., 2012 ; Piras et al., 2013**) et l'huile essentielle (**Piras et al., 2013**), tandis que **Harzallah et al. (2011)** ont rapporté que cette bactérie est résistante à l'huile essentielle.

D'après nos résultats, *Enterobacter sp.* est sensible à tous les extraits étudiés et les études concernant l'activité antibactérienne des extraits méthanolique, éthanolique et d'acétate d'éthyle sur ce genre *Enterobacter sp.* sont rares, seuls **Tanis et al. (2009)** qui ont rapporté qu'*Enterobacter aerogenes* est sensible à l'extrait méthanolique, ainsi que **Sellami et al. (2013)** qui ont rapporté qu'*Enterobacter cloacae* est résistante à l'extrait éthanolique.

Ainsi, **Ainane et al. (2014)** ont rapporté qu'*Enterobacter cloacae* est sensible à l'huile essentielle et **Kamal et al. (2010)** ont rapporté qu'*Enterobacter aerogenes* est sensible à l'extrait aqueux, tandis que **Sellami et al. (2013)** ont rapporté qu'*Enterobacter cloacae* est résistante aux extraits aqueux et hexanique.

Les résultats négatifs ne signifient pas l'absence des constituants bioactifs, les composés actifs peuvent être en quantités insuffisantes pour montrer l'activité avec la concentration appliquée (Taylor et al., 2001).

En effet, les différentes sources des extraits, le facteur agro-climatique, la manipulation de l'expérience et les ingrédients phytochimiques dans l'extrait contribuent également aux différences des résultats obtenus (Erdman et al., 2007).

L'activité antibactérienne des extraits éthanolique, méthanolique et d'acétate d'éthyle de graines de *Nigella sativa L.* est attribuable en grande partie au Thymoquinone (TQ) puisque Singh et al. (2014) et Suresh Kumar et al. (2010) ont rapporté que ces extraits sont riches en TQ et Halawani (2009), Shohayeb et Halawani (2012) et Harzallah et al. (2011) ont démontré que ce composant bioactif a un effet antibactérien très puissant.

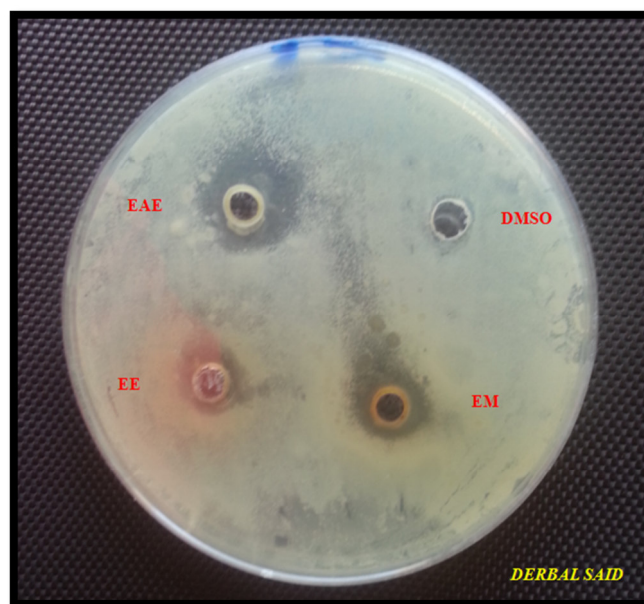


Figure 25 : Activité antibactérienne des différents extraits de graine de *Nigella sativa L.* sur *Staphylococcus intermedius*. **EAE** : extrait d'acétate d'éthyle, **EE** : extrait éthanolique, **EM** : extrait méthanolique et **DMSO** : témoin négatif.



Figure 26 : Zone d'inhibition de la croissance de *Staphylococcus intermedius* obtenue avec l'extrait d'acétate d'éthyle de graines de *Nigella sativa L.*

V. Influence de l'addition de 5% (p/p) des différents extraits de graines de *Nigella sativa L.* sur l'activité antibactérienne et la concentration minimale bactéricide (CMB) du miel

Les résultats concernant l'efficacité antibactérienne et la CMB du miel et l'influence de l'addition des différents extraits de *Nigella sativa L.* sur ces propriétés antibactériennes sont rassemblés dans les tableaux 11 et 12.

Tableau 10 : Efficacité antibactérienne du miel et des mélanges naturels (MNs) sur les bactéries isolées.

Concentration du produit naturel (dilution v/v)	Produit naturel	Le nombre des colonies des souches bactériennes				
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>Staph. intermedius</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
100%	MN 1	-	-	-	-	-
	MN 2	-	-	-	-	-
	MN 3	-	-	-	-	-
	Miel	-	-	-	-	-
50%	MN 1	-	_*	_*	-	_*
	MN 2	-	-	_*	-	_*
	MN 3	-	-	-	-	-
	Miel	-	-	_*	-	_*
25%	MN 1	_*	+++	+++	-	+++
	MN 2	_*	_*	+	-	+++
	MN 3	_*	-	-	-	-
	Miel	-	_*	++	_*	+

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre II : Résultats et discussion

12,5%	MN 1	+++	+++	+++	-	+++
	MN 2	+++	+++	+++	-	+++
	MN 3	+	-*	-*	-*	-*
	Miel	-*	+++	+++	+++	+++
6,25%	MN 1	+++	+++	+++	-*	+++
	MN 2	+++	+++	+++	-*	+++
	MN 3	+++	+++	+++	++	+++
	Miel	+++	+++	+++	+++	+++
3,12%	MN 1	+++	+++	+++	+++	+++
	MN 2	+++	+++	+++	+++	+++
	MN 3	+++	+++	+++	+++	+++
	Miel	+++	+++	+++	+++	+++

MN : mélange naturel. (-) : pas de croissance. (-*) : concentration minimale bactéricide CMB. (+) : 1-10 colonies bactériennes. (++) : 10-100 colonies bactériennes. (+++) : >100 colonies bactériennes.

Remarque : pour les autres concentrations (1,56% - 0,01%), le nombre des colonies de toutes les bactéries a été >100 (+++).

Tableau 11 : La concentration minimale bactéricide (CMB) du miel et des mélanges naturels (MNs) sur les bactéries isolées.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus intermedius</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
MN 1	25%	50%	50%	6,25%	50%
MN 2	25%	25%	50%	6,25%	50%
MN 3	25%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%
Miel	12,5%	25%	50%	25%	50%

Pour *Escherichia coli*, l'effet antibactérien du miel a été le plus fort du moment qu'il a tué tout l'inoculum de cette bactérie avec une concentration de 12,5% qui a été la CMB, la CMB des mélanges naturels a été 25% et le MN 3 a tué presque tout l'inoculum de cette bactérie avec la concentration 12,5% et seulement quelques colonies (1-10 colonies) ont apparu sur la gélose nutritive après 24 heures d'incubation.

Pour *Enterobacter sp.*, l'effet antibactérien du MN 3 a été le plus fort puisqu'il a tué tout l'inoculum de cette souche bactérienne avec une concentration de 12,5% qui a été la CMB, la CMB du miel et du MN 2 a été 25% et celle du MN 1 a été 50%, et ce dernier mélange naturel a eu le plus faible effet antibactérien.

Pour *Staphylococcus aureus*, l'effet antibactérien du MN 3 a été le plus fort avec une CMB de 12,5%, la CMB de tous les autres produits naturels a été 50% et le MN 2 a tué presque tout l'inoculum de cette bactérie avec la concentration 25% et seulement quelques colonies (1-10 colonies) ont apparu sur la gélose nutritive après 24 heures d'incubation.

Pour *Staphylococcus intermedius*, l'effet antibactérien de MN 1 et MN 2 a été le plus fort avec une CMB de 6,25%, la CMB du MN 3 a été 12,5% et celle du miel a été 25%, et donc l'effet antibactérien du miel a été le plus faible.

Pour *Enterococcus faecalis*, l'effet antibactérien du MN 3 a été le plus fort avec une CMB de 12,5%, la CMB des autres produits naturels a été 50%, le miel a tué presque tout l'inoculum de cette bactérie avec la concentration 25% et seulement quelques colonies (1-10 colonies) ont apparu sur la gélose nutritive après 24 heures d'incubation.

Ces résultats ont montré que l'ajout des extraits de graines de *Nigella sativa L.* peut potentialiser comme il peut diminuer l'effet antibactérien du miel et il semble qu'il y a un synergisme et un antagonisme entre le miel et les extraits selon l'extrait ajouté et la bactérie testée.

Les mécanismes exacts de la synergie et de l'antagonisme entre les extraits de *Nigella sativa L.* et le miel sont incertains et d'autres études sont nécessaires pour élucider ces mécanismes.

Le MN 3 a montré la plus grande efficacité antibactérienne puisqu'il a eu la plus petite CMB pour *Enterobacter sp.*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*, ainsi, ce mélange naturel a tué presque tout l'inoculum d'*Escherichia coli* avec une concentration de 12,5% et seulement quelques colonies (1-10 colonies) ont apparu sur la gélose nutritive après 24 heures d'incubation, et ce mélange naturel a été plus efficace que le miel contre *Staphylococcus intermedius*.

Par conséquent, l'extrait méthanolique est le meilleur additif (à 5% ; p/p) capable de potentialiser l'effet antibactérien du miel sur les bactéries infectant les plaies superficielles.

L'aptitude de l'extrait méthanolique à potentialiser l'effet antibactérien du miel est attribuable en grande partie à sa richesse en Thymoquinone (TQ).

VI. Influence de l'addition de 5% (p/p) des différents extraits de graines de *Nigella sativa L.* sur l'activité cicatrisante du miel

Un lapin est mort pendant la période d'adaptation, tandis que les autres (5 lapins) ont survécu jusqu'à la fin de l'étude. De même, il n'y avait aucun signe macroscopique d'une infection des plaies.

A cause de l'élasticité de la peau des lapins, les surfaces des plaies expérimentales ont été changées et la différence entre ces surfaces a été non significative ($p > 0,05$).

Lorsque les plaies expérimentales ont été petites, leurs surfaces n'ont été mesurées qu'une seule fois à J₇ après l'induction des plaies, et certaines plaies ont été guéries complètement avant la deuxième semaine (9 plaies ont été guéries à J₁₁).

L'aspect, la surface, le pourcentage de contraction et la période de ré-épithélialisation de chaque plaie traitée sont rassemblées dans l'annexe 4.

Les surfaces des plaies expérimentales calculées en mm², les pourcentages de contraction des plaies traitées à J₇ et les périodes de ré-épithélialisation de ces plaies sont enregistrés dans le tableau 13.

Ainsi, les pourcentages de contraction des plaies traitées à J₇ et les périodes de ré-épithélialisation de ces plaies sont présentés par les histogrammes des figures 28 et 29.

Tableau 12 : Efficacité cicatrisante du miel et des mélanges naturels (MNs) sur les plaies expérimentales.

	Surfaces des plaies expérimentales à J₀ (mm²)	Pourcentages de contraction à J₇ (%)	Périodes de ré-épithélialisation (N^{bre} de jours)
MN 1	93,2 ± 16,67	62,14 ± 26,86	13,6 ± 4,21
MN 2	119 ± 31,65	47,77 ± 11,57	15,6 ± 4,15
MN 3	104,8 ± 11,45	64,42 ± 17,66	12,2 ± 2,16
Miel	91,2 ± 11,62	66,5 ± 17,17	13,4 ± 3,04
Cicatryl-Bio[®]	99 ± 17,93	25,05 ± 11,97	13,8 ± 2,28

Remarque : Les résultats sont représentés par la moyenne ± écart-type.

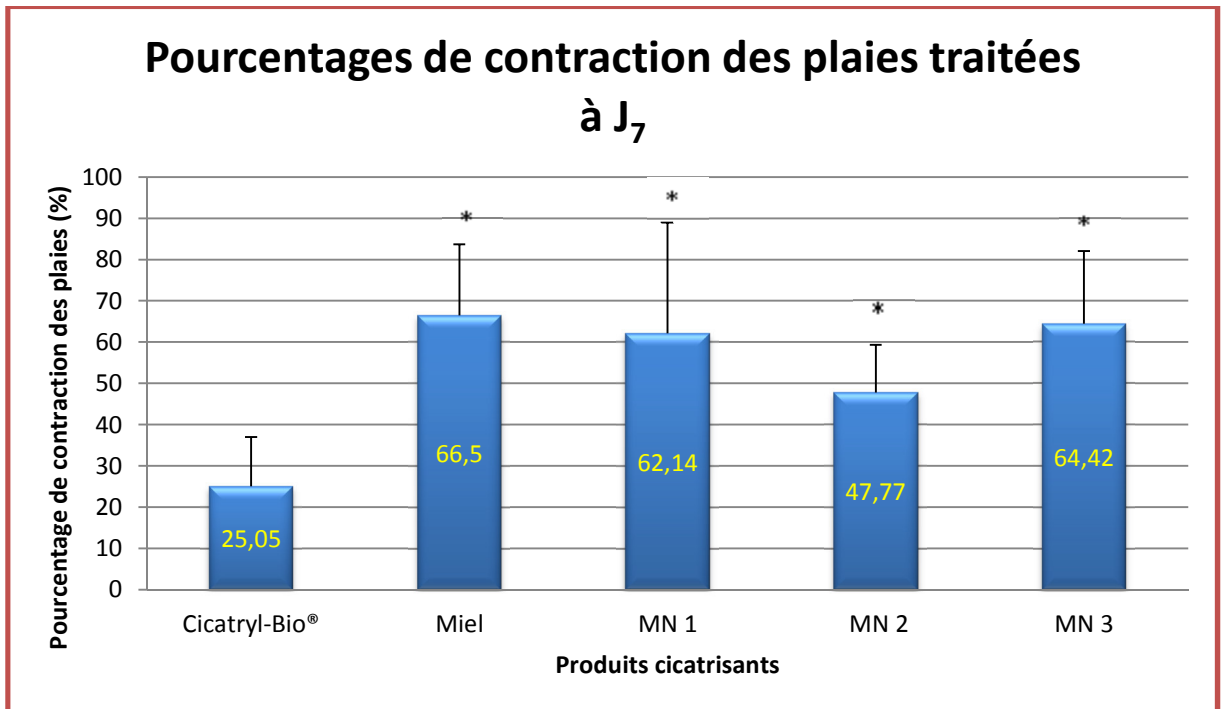


Figure 27 : Histogramme présentant les pourcentages de contraction (moyenne ± écart-type) des plaies traitées à J₇ (%). (*) : Indique une différence significative (p<0.05) par rapport au pourcentage obtenu avec Cicatryl-Bio®. (#) : Indique une différence significative (p<0.05) par rapport au pourcentage obtenu avec le miel.

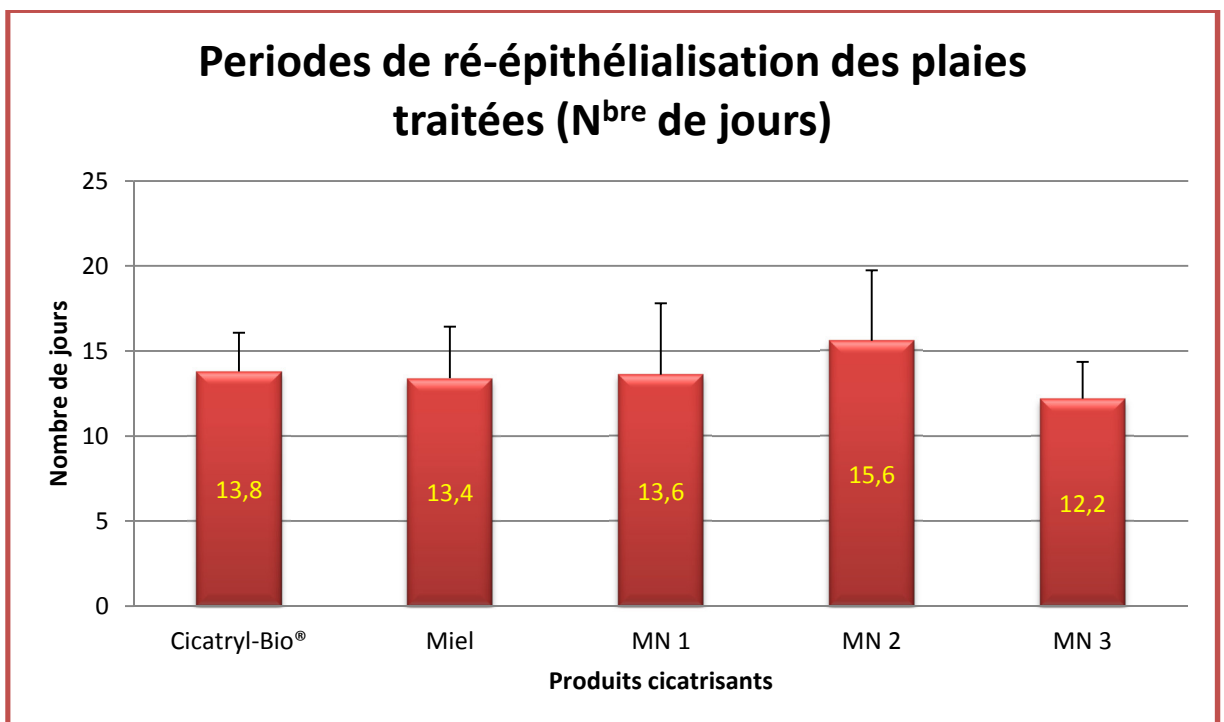


Figure 28 : Histogramme présentant les périodes de ré-épithélialisation (moyenne ± écart-type) des plaies traitées (N^{bre} de jours). (*) : Indique une différence significative (p<0.05) par rapport à la période obtenue avec Cicatryl-Bio®. (#) : Indique une différence significative (p<0.05) par rapport à la période obtenue avec le miel.

Des différents modèles d'animaux d'expérimentation tels que le porc (Mekkes et al., 1998), le cobaye (Eldad et al., 1998 ; Webster et al., 1962) et le rat (Hosnuter et al., 2004 ; Han M.C. et al., 2005) ont été utilisés dans plusieurs études concernant la cicatrisation des plaies.

Le modèle utilisé ici (lapin) est simple, reproductible et permet grâce à son gabarit l'induction de 5 plaies expérimentales sur le même animal pour la réalisation d'une comparaison entre les effets cicatrisants de 5 produits cicatrisants appliqués séparément sur ces plaies expérimentales.

Le modèle de cicatrisation des plaies d'excision d'un lambeau cutané fournit une approche *in vivo* pour étudier la cicatrisation des plaies liées à la perte des substances cutanées chez les animaux domestiques.

Il y'a des auteurs qui ont utilisé le lapin comme un modèle animal pour étudier l'effet cicatrisant de l'huile de *Nigella sativa L.* (Abu-Zinadah, 2009 ; Al-Mutheffer, 2010) et de son mélange avec le miel (Allwayzy, 2013).

A J₇, les pourcentages de contraction des plaies traitées avec le MN 1, le MN 2, le MN 3, le miel et Cicatryl-bio[®] ont été **62,14 ± 26,86%**, **47,77 ± 11,57%**, **64,42 ± 17,66%**, **66,5 ± 17,17%** et **25,05 ± 11,97%** respectivement, seulement les pourcentages de contraction des plaies traitées avec le MN 1, le MN 3 et le miel ont dépassé la moitié (>50%).

Le pourcentage de contraction le plus élevé a été obtenu avec le miel et avec une différence significative ($p < 0,05$) avec le pourcentage de contraction le plus bas obtenu avec Cicatryl-Bio[®].

Ainsi, les pourcentages de contraction des plaies traitées avec les mélanges naturels ont été plus élevés significativement ($p < 0,05$) à celui des plaies traitées avec Cicatryl-Bio[®] et le pourcentage de contraction des plaies traitées avec le miel a été plus élevé à ceux des plaies traitées avec les mélanges naturels, mais avec une différence non significative ($p > 0,05$).

Les périodes de ré-épithélialisation des plaies traitées avec le MN 1, le MN 2, le MN 3, le miel et Cicatryl-Bio[®] ont été **13,6 ± 4,21 J, 15,6 ± 4,15 J, 12,2 ± 2,16 J, 13,4 ± 3,04 J, 13,8 ± 2,28 J** respectivement.

La période de ré-épithélialisation la plus courte a été obtenue avec le MN 3 et avec une différence non significative ($p>0,05$) avec la période de ré-épithélialisation la plus longue obtenue avec le MN 2.

Les périodes de ré-épithélialisation des plaies traitées avec le MN 1, le MN 3 et le miel ont été plus courtes à celle des plaies traitées avec Cicatryl-bio[®] et avec une différence non significative ($p>0,05$), et la période de ré-épithélialisation des plaies traitées avec le MN 2 a été plus longue à celle des plaies traitées avec Cicatryl-Bio[®] et avec une différence non significative ($p>0,05$).

Les périodes de ré-épithélialisation des plaies traitées avec le MN 1 et le MN 2 ont été plus longues à celle des plaies traitées avec le miel et avec une différence non significative ($p>0,05$), et la période de ré-épithélialisation des plaies traitées avec le MN 3 a été plus courte à celle des plaies traitées avec le miel et avec une différence non significative ($p>0,05$).

Ces résultats ont montré que l'ajout des extraits de *Nigella sativa L.* diminue l'effet de contraction du miel sur la plaie traitée et cette influence peut être attribuable au changement du PH du miel induit par l'ajout des extraits de *Nigella sativa L.*. Le pH du miel est faible et varie de 3,2 à 4,5 avec un composant dominant qui est l'acide gluconique (**Ansari et Alexander, 2009**), et le pH acide contribue à l'environnement idéal pour l'activité fibroblastique, la migration, la prolifération et l'organisation du collagène, ce qui entraîne une stimulation de la cicatrisation des plaies (**Mwipatayi et al., 2004**).

D'après nos résultats, il en ressort que l'ajout des différents extraits de *Nigella sativa L.* au miel a une influence variable sur la durée de la période de ré-épithélialisation de la plaie traitée selon le type d'extrait ajouté, l'extrait peut améliorer comme il peut diminuer l'effet cicatrisant du miel.

Les mécanismes de l'influence des extraits de *Nigella sativa L.* sur l'effet cicatrisant du miel sont incertains et nécessitent d'autres études pour les élucider.

La période de ré-épithélialisation la plus courte a été obtenue avec le MN 3 qui a donné aussi un pourcentage de contraction des plaies plus élevé à ceux obtenus avec les autres mélanges naturels et Cicatryl-Bio®.

Le MN 3 a montré un effet cicatrisant efficace sur les plaies expérimentales dans le modèle du lapin, en favorisant la contraction de la plaie et en réduisant la durée de la ré-épithélialisation.

Par conséquent, l'extrait méthanolique est le meilleur additif (à 5% ; p/p) capable d'améliorer l'effet cicatrisant du miel sur les plaies superficielles.

Dans notre étude, l'extrait méthanolique n'a pas amélioré l'effet cicatrisant du miel pendant la première semaine après l'excision des lambeaux cutanés, cette période correspond à la phase inflammatoire (**Park et Barbul, 2004**), mais parce que l'ajout de cet extrait a réduit la période de ré-épithélialisation des plaies traitées, il suggère qu'il a amélioré l'effet cicatrisant du miel après la première semaine et cette période correspond à la phase proliférative et de remodelage (**Park et Barbul, 2004**).

Si une inflammation modérée et brève est indispensable à l'initiation du processus de cicatrisation, une inflammation excessive et/ou prolongée est préjudiciable à la réparation cutanée. En effet, dans les cas où un stimulus inflammatoire persiste dans la plaie, les radicaux libres sont produits en quantité importante et de façon prolongée.

Les radicaux libres agissent sur des éléments importants de la cellule tels que les lipides, les protéines, les glucides et l'ADN résultant en des dommages cellulaires et la mort cellulaire. Les radicaux libres ont des effets défavorables sur la cicatrisation, le tissu de granulation ainsi que sur les tissus de collagène et cartilagineux (**Keskin et al., 1999**).

Les dégâts infligés à la peau résultant de la production d'espèces réactives de l'oxygène et aussi d'une réduction des divers capteurs des radicaux libres enzymatiques et non enzymatiques, ce qui empêche ainsi le processus de guérison (**Seraslan et al., 2007**). Les enzymes antioxydantes comme le superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase

(GSH-Px) et le catalase (CAT) décomposent les radicaux libres pour accélérer la cicatrisation des plaies.

Erejuwa et al. (2014) et **Uwaudat et al. (2011)** ont rapporté que le miel a des propriétés anti-inflammatoires, ainsi, **Alzharani et al. (2012)** et **Aljadi et Kamaruddin (2004)** ont rapporté que le miel a des propriétés antioxydantes, ces propriétés confirment que le miel est efficace dans la cicatrisation des plaies.

Selon la littérature, le miel produit une régénération tissulaire rapide et supprime l'inflammation, l'œdème et l'exsudation, et sa viscosité élevée constitue une barrière de protection pour éviter les infections des plaies (**molan, 1999**).

Il a été examiné par **Mwipatayi et al. (2004)** que le miel fournit un pansement de cicatrisation humide qui empêche la croissance des bactéries même si la plaie est fortement infectée, cette propriété du miel a été déjà confirmée dans la première partie de notre étude.

Le miel établi un milieu humide capable de protéger la plaie, réduire le taux d'infection, réduire la douleur, débrider les tissus nécrotiques et favoriser la formation de tissu de granulation (**Subrahmanyam, 1998**).

Nous interprétons le résultat concernant l'amélioration de l'effet cicatrisant du miel par l'extrait méthanolique de *Nigella sativa L.* que cet extrait a participé avec ses propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes. La potentialisation de l'effet antibactérien du miel par l'extrait méthanolique a été déjà confirmée dans la première partie de notre étude.

Ces propriétés ont été confirmées récemment par **Yildiz et Balikci (2016)** qui ont rapportés que l'extrait méthanolique de *Nigella sativa L.* a des effets antimicrobien, antioxydant et anti-inflammatoire lors de son infusion intra-utérine chez les vaches pour traiter des endométrites cliniques.

Les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires de l'extrait méthanolique sont attribuables aussi en grande partie au Thymoquinone (TQ), cependant, **Selçuk et al. (2013)** ont rapporté que l'administration du TQ par la voie systématique et/ou topique chez le rat

réduit l'inflammation de même que le stress oxydatif et accélère le taux de fermeture de la plaie ou de la ré-épithélialisation.

D'autres études ont démontré l'activité antioxydante du TQ in vitro (**Badary et al., 2003 ; Daba et Abdel-Rahman, 1998 ; El-Mahmoudy et al., 2002 ; Nagi et Mansour, 2000**) et in vivo (**Burits et Bucar, 2000 ; Enomoto et al., 2001 ; Badary et al., 2000 ; Badary, 1999**).

D'autres études ont démontré l'activité anti-inflammatoire du TQ in vitro (**Mansour et Tornhamre, 2004 ; Houghton et al., 1995 ; El-Dakhakhny et al., 2002**) et in vivo (**Mohamed et al., 2003; Mahgoub, 2003**).

Abu-Zinadah (2009) et **Al-Mutheffer (2010)** ont rapporté que l'application topique de l'huile de *Nigella sativa L.* améliore la cicatrisation des plaies expérimentales induites dans la peau des lapins, ainsi, **Allwayzy (2013)** a rapporté que le mélange de l'huile de *Nigella sativa L.* avec le miel améliore la cicatrisation des plaies induites au niveau des oreilles des lapins.

Selon une autre étude portant sur les effets de la nigelle sur la cicatrisation des plaies induites chez le rat, l'huile de graines de *Nigella sativa L.* s'est avérée capable de guérir la plaie dans une période significativement plus courte (**Varol, 2008**).



***CONCLUSION ET
RECOMMANDATIONS***

CONCLUSION

Le miel multi-floral d'El-Eulma (Sétif) est un produit naturel ayant des vertus médicales, essentiellement par son effet antibactérien et cicatrisant. Il peut être utilisé comme un pansement liquide naturel pour traiter les plaies infectées.

L'extrait éthanolique de graines de *Nigella sativa L.* est un agent antibactérien efficace, pouvant être utilisé comme un véritable détergent pour les plaies infectées.

L'extrait méthanolique des graines de *Nigella sativa L.* est un extrait naturel de qualité médicale, qui peut être utilisé en tant qu'additif pour potentialiser l'effet antibactérien et améliorer l'effet cicatrisant du miel.

Le miel et l'extrait méthanolique de graines de *Nigella sativa L.* constituent un mélange naturel très important et très efficace dans le traitement des plaies infectées. Ce mélange peut garder son pouvoir bactéricide jusqu'à la concentration 12,5% quand il est dilué par les fluides de la plaie, ce qui accélère la détersion de la plaie infectée. Ainsi, ce mélange naturel accélère les phases proliférative et de remodelage de la cicatrisation des plaies superficielles.

RECOMMANDATIONS

Ce travail peut être considéré comme une étude préliminaire en vue d'évaluer les propriétés cicatrisantes du miel d'El-Eulma (Sétif), mais qui devra être complétée et approfondie. D'autres procédures concernant l'étude de ce miel nous apparaissent importantes à réaliser :

- Etude de plusieurs échantillons de ce miel proviennent de plusieurs ruches ;
- Etude des deux types de ce miel : le miel mono-floral et le miel poly-floral ;
- Détermination du type d'activité antibactérienne de ce miel : activité peroxyde ou non peroxyde. Cependant, le miel à activité non peroxyde est le meilleur pour le traitement des plaies, puisque l'enzyme catalase qui provient de l'organisme et présente au niveau des plaies catalyse les peroxydes d'hydrogène à activité antibactérienne libérés par le miel lors de sa dilution par les fluides des plaies ;
- L'étude de l'activité antibactérienne de ce miel sur d'autres bactéries très pathogènes et contaminant habituellement les plaies ou les brûlures des animaux domestiques, comme *corynebacterium pseudotuberculosis* (abcès, acné contagieux, lymphadénite caséuse, lymphangite ulcéral), *pseudomonas aeruginosa* (aggravation des brûlures et septicémie) et *clostridium tetani* (tétanos) ;
- Constatation de l'absence des antibiotiques résiduels dans ce miel et qui peuvent le polluer après une antibiothérapie éventuelle des abeilles. Ces antibiotiques potentialisent l'activité antibactérienne du miel ;
- Etude de l'activité cicatrisante de ce miel sur d'autres types de plaies (brûlures et plaies d'origine chimique), et même sur les différentes incisions (cicatrisation par première intention) ;
- Etude histologique de l'activité cicatrisante de ce miel sur un nombre élevé d'animaux d'expérience.

Dans notre étude, seulement l'activité antibactérienne de 3 types d'extraits de *Nigella sativa L.* a été étudiée ; l'étude de l'activité cicatrisante de ces extraits est souhaitable. Ainsi, il y'a plusieurs solvants chimiques et plusieurs méthodes d'extraction qui permettent d'obtenir un grand nombre d'extraits différents à activités antibactérienne et cicatrisante différentes. Parmi ces extraits, l'huile essentielle qui semble le meilleur agent antibactérien et cicatrisant selon la littérature, et il est composé principalement par le Thymoquinone (TQ).

Ainsi, il semble difficile de proposer des recommandations pour améliorer en plus l'effet antibactérien et cicatrisant du miel par les extraits de *Nigella sativa L.*, car les mécanismes de l'interaction entre le miel et ces extraits végétaux sont incertains et nécessitent d'autres études qui semblent un peu compliquées ; néanmoins, il est possible de suggérer quelques recommandations afin d'améliorer en mieux l'effet antibactérien et cicatrisant du miel. Nous recommandons ainsi ce qui suit :

- Un essai d'addition d'huile essentielle ou d'autres extraits de graines de *Nigella sativa L.* obtenus à l'aide d'autres solvants ;
- Un essai d'addition du Thymoquinone (TQ) pur ; ce composant bioactif semble capable d'améliorer en mieux les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel avec un pourcentage d'addition minime qui ne modifie pas beaucoup le PH du miel.

Il est important de signaler que la présente étude bien qu'elle soit basée sur des constatations macroscopiques soutenue par des tests microbiologiques, nous à permis de faire le point sur les activités antibactérienne et cicatrisante du miel d'El-Eulma (Sétif) et sur l'extrait idéal de *N. sativa L.* capable d'améliorer ces propriétés pharmacologiques. Il est nécessaire donc de renforcer et d'amplifier les recherches concernant ce mélange naturel (miel + extrait méthanolique), en particulier par :

- Etude de l'activité cicatrisante de ce mélange naturel sur des plaies accidentelles chroniques infectées chez les différents animaux domestiques ;
- Suivi de la cicatrisation de ces plaies chroniques traitées par des études histologiques, en vue d'évaluer l'influence de ce mélange naturel sur l'angiogénèse (vaisseaux sanguins néoformés), la formation de la fibrose (fibroblastes) et du collagène (fibres de collagène), la formation de l'œdème et de l'exsudat fibrino-leucocytaire, ainsi que sur la ré-épithélialisation.

Dans le souci de l'étude de l'activité cicatrisante de ce mélange naturel sur des plaies accidentelles chroniques infectées chez les différents animaux domestiques, il est souhaitable d'appliquer le protocole proposé suivant :

1. Examen clinique de l'animal

- Cet examen doit permettre de mettre rapidement en évidence d'éventuelles maladies pouvant altérer le pronostic vital de l'animal et de déterminer quelles procédures doivent être effectuées prioritairement ;
- Le plus important est d'évaluer le bon fonctionnement des appareils pulmonaire et cardiovasculaire.

2. Examen et préparation de la plaie de l'animal

- L'administration par voie générale d'un produit morphinique et d'un sédatif pour rendre l'examen et la préparation des plaies possible (car la douleur des plaies chroniques est intense) ;
- L'administration par voie générale de l'Amoxicilline - Acide Clavulanique ou l'Ampicilline, malgré que l'antibiothérapie ne peut en aucun cas remplacer une bonne détersion ni même compléter une détersion incomplète ;
- La tonte de la région péri-lésionnelle à l'aide d'une tondeuse pour mettre la peau à nu, ce qui présente plusieurs avantages :
 - ✓ le nettoyage de la périphérie de la plaie est plus aisé et efficace ;
 - ✓ la mise en évidence d'autres plaies moins visibles ;
 - ✓ la plaie est moins exposée à la contamination, principalement représentée par les poils ;
 - ✓ le pansement tient beaucoup mieux sur la peau glabre.
- L'élimination des poils le plus régulièrement possible, pour éviter qu'ils n'aillent contaminer la plaie ;
- Le nettoyage de la plaie par irrigation avec une solution stérile (NaCl 0,9%) sous pression d'une compresse puisque l'action mécanique joue un rôle primordial lors de la détersion de la plaie. La pression élimine les débris, les tissus nécrosés, les corps étrangers et une grande partie de bactéries.

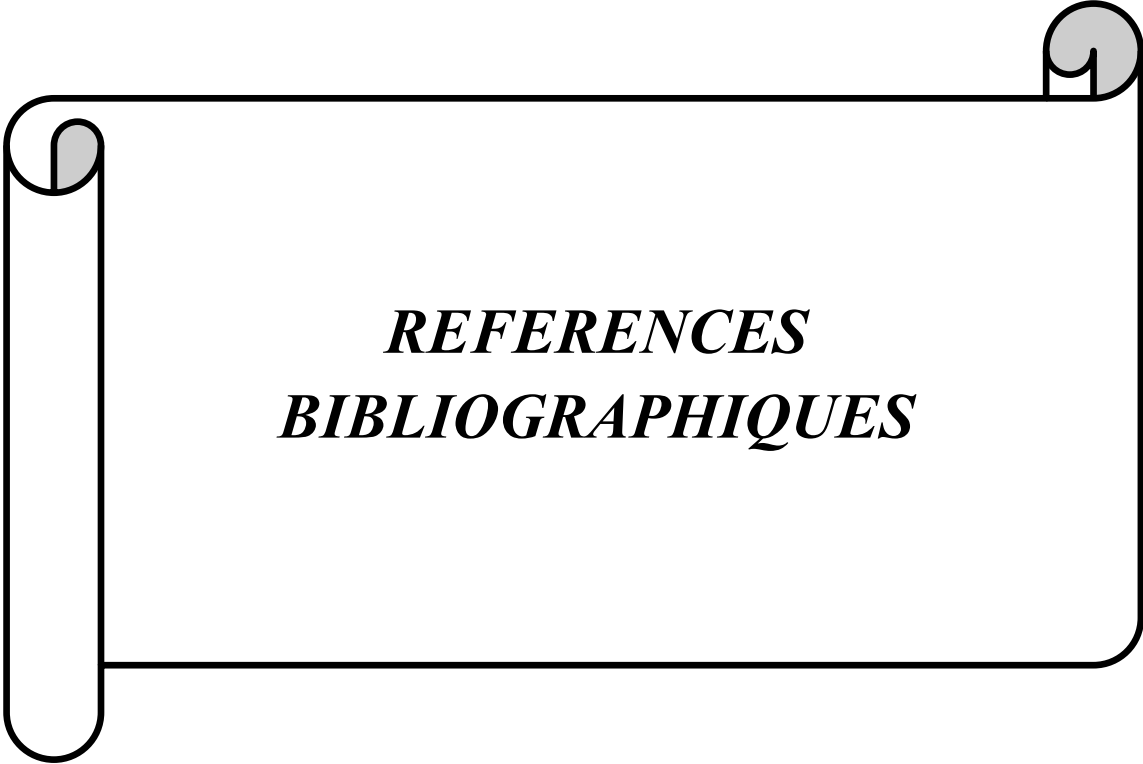
3. L'application du mélange naturel

- La détersion de la plaie est dans un premier temps obtenue par application du mélange naturel deux fois par jour. Parce que si la plaie reste encore contaminée, elle présente un risque élevé de généralisation de l'infection pendant ce stade de détersion, ainsi que les exsudats produits par la plaie sont importants pendant ce stade, ce qui va encore diluer le miel et diminuer rapidement son pouvoir antibactérien. L'activité antibactérienne du miel dilué (s'il est à activité peroxyde) risque d'être altérée par le catalase endogène au niveau de la plaie ;
- Ce mélange naturel est appliqué en quantité suffisante sur la plaie afin de bénéficier de ses effets thérapeutiques. Typiquement, on comble tout le volume de la plaie avec ce mélange naturel ;
- Lorsque la surface de la plaie est verticale, ce mélange naturel est imprégné dans des compresses stériles qui sont appliquées par la suite sur la plaie pour éviter leur fuite en dehors du pansement et pour maintenir une quantité suffisante de ce mélange naturel ;
- Le mélange naturel est chauffé préalablement à la température corporelle, ce qui peut permettre de le fluidifier et de rendre son imprégnation plus aisée ;
- Après le comblement de la plaie par le mélange naturel, elle doit être recouverte avec un pansement rigide comme une couche externe (soit avec une bande cohésive, soit avec une bande collante) ;
- A chaque changement de pansement, le lit de la plaie doit être lavé avec une solution saline isotonique (NaCl 0,9%) afin d'éliminer les résidus qui ont pu être laissés par le mélange naturel avant l'application d'un nouveau pansement ;
- Lorsque la fréquence des changements de pansements dépend directement de la quantité d'exsudats produits par la plaie, ces changements de pansement peuvent ensuite être plus espacés pendant les stades de bourgeonnement et d'épithélialisation et se renouvèlent toutes les 24 H ;
- Pour les plaies à surface verticale, au stade d'épithélialisation, le mélange naturel est appliqué directement sur la plaie. Il faut éviter à ce stade le contact de la compresse avec la plaie pour prendre soin de ses berges à partir desquels les cellules épithéliales migrent pour recouvrir la plaie ;
- A la fin de la cicatrisation, l'éosine alcoolique est appliquée et la plaie est laissée sans protection à l'air libre.

Remarque : pour certains animaux, une anesthésie générale est parfois nécessaire à la réalisation de ces étapes.

4. Le suivi de la cicatrisation de la plaie traitée

- Au cours de chaque renouvellement du pansement, une évaluation de certains paramètres de la plaie doit être réalisée :
 - ✓ L'évaluation clinique de la plaie en prenant en compte l'aspect global de la plaie, l'aspect du tissu de granulation et le déroulement de l'épithélialisation ;
 - ✓ La mesure de la surface de la plaie ;
 - ✓ Le suivi histologique du déroulement de la cicatrisation de la plaie traitée.
- Ces données doivent toujours être consignées dans un dossier clinique.



***REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES***

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (01)-Abdel-Aal E., et Attia R. (1993). Characterization of Black cumin (*Nigella sativa*) seeds. *Alexandria Sci Exch J.* (14): 497-482.
- (02)-Abivardi C. (1971). Studies on the Effects of Nine Iranian Anthelmintic Plant Extracts on the Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of Phytopathology.*71. pp: 300-308.
- (03)-Aboutabl E., El-Azzouny A., et Hammerschmidt F. (1986). Aroma volatiles of *Nigella sativa* L. seeds. *Progress in Essential Oil Research.* Berlin. New York: Walter de Gruyter & Co.
- (04)-Ab Rahman M.R., Abdul Razak F. et Mohd Bakri M. (2014). Evaluation of wound closure activity of *Nigella sativa*, *Melastoma malabathricum*, *Pluchea indica*, and *Piper sarmentosum* extracts on scratched monolayer of human gingival fibroblasts. *Evid Based Complement. Altern. Med.* 2014, 190342.
- (05)-Abu-Al-Basal M.A. (2011). Influence of *Nigella sativa* fixed oil on some blood parameters and histopathology of skin in staphylococcal infected BALB/c mice. *Pak. J. Biol. Sci.* 14 (23): 1038–1046.
- (06)-Abu-Zinadah O.A. (2009). Using *Nigella sativa* Oil to Treat and Heal Chemical Induced Wound of Rabbit Skin. *JKAU: Sci.* Vol. 21 No. 2. pp: 335-346.
- (07)-Aggarwal B.B. et Kunnumakkara A.B. (2009). *Molecular Targets and Therapeutic Uses of Spices. Modern Uses for Ancient Medicine.* Singapore: World Scientific Publishing.
- (08)-Ahmed I.H., Awad M.A., El-Mahdy M., Gohar H.M. et Ghanem, A.M. (1995). The effect of some medicinal plant extracts on wound healing in farm animals. *Assiut Vet. Med. J.* 32 (64): 236–244.
- (09)-Ainane T., Askaoui Z., Elkouali M., Talbi M., Lahsasni S., Warad I. et Ben Hadda T. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Nigella sativa* seeds from Beni Mellal (Morocco): What is the most important part, Essential Oil or the rest of seeds? *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (6): 2017-2020.
- (10)-Akhtar M. et Aslam M. (1997). Anticestodal principles of *Nigella sativa* Linn. (Kolanji) seeds. *Pak J Pharmacol.* 14 (2). Pp: 7-14.
- (11)-Akujobi C.O. et Njoku H.O. (2010). Bioassay for the Determination of Microbial Sensitivity to Nigerian Honey. *Global Journal of Pharmacology.* 4(1): 36-40.
- (12)-Al-Awadi F. et Shoukry M. (1988). The lipid lowering effect of an anti-diabetic plant extract. *Acta Diabetol Lat.* 25. Pp: 1-5.
- (13)-Al-Gaby A. (1998). Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* cake protein. *Die Nahrung.* (42). Pp: 290-294.

- (14)-Al-Hader A., Aqel M. et Hasan Z. (1993). Hypoglycemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *Int J Pharmacog.* 31. Pp: 96-100.
- (15)-Aljadi A.M. et Kamaruddin M.Y. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry.* Vol. 85. n° 4. pp: 513-518.
- (16)-Aljassir M. (1992). Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa*) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chemistry* (45). Pp: 239-242.
- (17)-Allwayzy K.R. (2013). Effect of Locally Applied Black-seed Oil and Honey Mixture on Wound Healing. *International Journal of Scientific & Technology Research.* Volume 2, Issue 12: 31-34.
- (18)-Al Mofleh I.A., Alhaider A.A. et Mossa J.S. (2008). Effect of an Aqueous Suspension of Black Cumin *Nigella sativa* on Necrotizing Agents-Induced Gastric Injury in Experimental Animals. *Saudi J Gastroenterol.* 14: 128–134.
- (19)-Al-Mutheffer E.A. (2010). The effect of local application black seed (*Nigella sativa*) oil on wound healing in rabbits. *Al- Anbar J. Vet. Sci.* Vol.: 3 No. (1): 91-97.
- (20)-Alsaif M.A. (2008). Effect of *Nigella sativa* oil on metabolic responses to prolonged systemic injury in rats. *Biol. Sci.* 8(6): 974-983.
- (21)-Al-Saleh I., Billedo G. et El-Doush I. (2006). Levels of selenium, DL- α -tocopherol, DL- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds. *J Food Comp Analysis.* (19): 167-175.
- (22)-Al-Waili N., Akmal M., Al-Waili F., et al. (2005). The antimicrobial potential of honey from United Arab Emirates on some microbial isolates. *Med Sci Monit.* 11: 433-438.
- (23)-Al-Waili N., Al Ghamdi A., Ansari M.J., Al-Attal Y., Al-Mubarak A., et Salom K. (2013). Differences in Composition of Honey Samples and Their Impact on the Antimicrobial Activities against Drug Multiresistant Bacteria and Pathogenic Fungi. *Archives of Medical Research.* 44: 307-316.
- (24)-Al-Waili N., Salom K. et Al-Ghamdi A.A. (2011). Honey for Wound Healing, Ulcers, and Burns. *Data Supporting Its Use in Clinical Practice.* *The Scientific World Journal.* Vol. 11. Pp: 766-787.
- (25)-Al-Waili N.S., Salom K., Butler G. et Al Ghamdi A.A. (2011b). Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control. *J Med Food.* 14(10): 1079-96.
- (26)-Alzahrani H.A., Bakhotmah B.A. et Boukraâ L. (2011). In Vitro Susceptibility of Diabetic Wound Bacteria to Mixtures of Honey, *Commiphora molmol* and *Nigella sativa*. *The Open Nutraceuticals Journal.* 4 : 172-175.
- (27)-Ansari A.A. et Alexander C. (2009). Effect of natural honey (Produced by African sculata in Guyana) against bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and

Staphylococcus aureus) and fungus (Candida albicans). World J. Dairy & FoodSciL. 4 (1): 73-77.

(28)-Ansari A., Hassan S., Kenne L., Atta-U-Rahman et Wehler J. (1988). Structural studies on a saponin isolated from *Nigella sativa*. *Phytochemistry*. (27). Pp: 3977-3979.

(29)-Ansari A., Osman S. et Subbaram R. (1975). Component acids of minor seed oils. *J Oil Technol Assoc India*. (7): 26-27.

(30)-Aqel M. (1993). Effects of *Nigella sativa* seeds on intestinal smooth muscle. *Int J Pharmacogn*. 31. Pp: 55-60.

(31)-Aqel M. (1995). The relaxing effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on vascular smooth muscles. *Dirasat*. 19. Pp: 91-100.

(32)-Aqel M. et Shaheen R. (1996). Effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on the uterine smooth muscle of rat and guinea pig. *J Ethnopharmacol*, 52. Pp: 23-26.

(33)-Atta-Ur-Rahman M., Ahmed S., Choudhary M., et Habib-Urrahman. (1985a). Nigellimine-N-oxide-a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Heterocycles*. (23). Pp: 953-955.

(34)-Atta-Ur-Rahman M., Cun-Heng H. et Clardy J. (1985b). Isolation and structure determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron letters* .(23). Pp: 2759-2762.

(35)-Atta-Ur-Rahman M., Hassan S., Coudhary M., Ni C. et Clardy J. (1995). Nigellidine : a new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron letters*. (36). Pp: 1993-1996.

(36)-Atta-Ur-Rahman M., et Zaman K. (1992). Nigellimine : a new isoquinoline alkaloid from *Nigella sativa*. *J Nat Prod* (55). Pp: 676-678.

(37)-Attia W.Y., Gabrys M.S., El-Shaikh K.A. et Othman GA. (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):169-83

(38)-Aween M.M., Hassan Z., Muhialdin B.J., et al. (2012).Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from honey marketed in Malaysia against selected multiple antibiotic resistant (MAR) Gram-positive bacteria. *J Food Sci*. 77: 364-371.

(39)-Ayaad T.H., Shaker G.H. et Almuhaana A.M. (2012). Isolation of antimicrobial peptides from *Apis florea* and *Apis carnica* in Saudi Arabia and investigation of the antimicrobial properties of natural honey samples. *Journal of King Saud University – Science*. 24: 193–200.

(40)-Babayan V., Kootungal D. et Halaby G. (1978). Proximate analysis, Fatty acid and amino acid composition of *Nigella sativa* seeds. *Food Sciences* (43): 1314-1315.

(41)-Badary O.A. (1999). Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *J Ethnopharmacol*. 67:135– 42.

- (42)-Badary O.A., Abdel-Naim A.B., Abdel-Wahab M.H. et Hamada F.M. (2000). The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology*. 143: 219– 26.
- (43)-Badary O.A., Taha R.A., Gamal el-Din A.M. et Abdel-Wahab M.H. (2003). Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol*. 26: 87 – 98.
- (44)-Badawy O.F.H., Shafii S.S.A., Tharwat E.E. et Kamal A.M. (2004). Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* infection. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*. 23 (3): 1011-1022.
- (45)-Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils. *Food. Chem. Toxicol*. 46: 446–475.
- (46)-Baser K., Honda G. et Miki W. (1986). *Herb drugs and herbalists in Turkey*. Institute for the study of languages and cultures of Asia and Africa. Tokyo.
- (47)-Basualdo C., Sgroy V., Finola M.S. et Marioli J.M. (2007). Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology*. 124: 375–381.
- (48)-Bello Y.M., Falabella A.F. et al. (2001). Infection and wound healing. *Wounds*. 13(4): 127-131.
- (49)-Blair S.E., Cokcetin N.N., Harry E.J. et Carter D.A. (2009). The unusual antibacterial activity of medical-grade iepto sperm urn honey: antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 28 (10): 1199-1208.
- (50)-Bogdanov S. (1997). Nature and origin of the antibacterial substances in Honey, *Lebensm-Wiss. Technol*. 30: 748–753.
- (51)-Bogdanov S. (2012). Honey as nutrient and functional food. *Bee Product Sci* 2012;1-28.
- (52)-Bonnier G. (1990). *La grande flore en couleur*. Paris: Belin.
- (53)-Borradori L. et Sonnenberg A. (1999). Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol*. 112: 411-418.
- (54)-Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H. et Marzouk B. (2008). Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots anr roots. *C. R. Biologies*. (331): 48-55.
- (55)-Bowler P.G., Duerden B.I. et Armstrong D.G. (2001). Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev*. 14: 244-269.
- (56)-Bradbear N. (2010). Le rôle des abeilles dans le développement rural. Manuel sur la récolte, la transformation et la commercialisation des produits et services dérivés des abeilles. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome. 238 p.

- (57)-Burits M., et Bucar F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* L. essential oil. *Phytother Res.* 14 (5): 323-328.
- (58)-Canonica L., Jommi G., Scolastico C. et Bonati A. (1963). The pharmacologically active principle in *Nigella sativa*. *Gazzetta chimica italiana.* (93): 1404-1407.
- (59)-Chanchao C. (2009). Antimicrobial activity by *Trigona laeviceps* (stingless bee) honey from Thailand. *Pak J Med Sci.* 25(3): 364-369.
- (60)-Chaudhry H., Fatima N. et Ahmad I.Z. (2015). Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Potentials of *Nigella sativa* L. Suspension Cultures under Elicitation. *Bio Med Research International.* Volume 2015, Article ID 708691, 13 pages.
- (61)-Chaudhry N.M.A. et Tariq P. (2008). In Vitro Antibacterial Activities of Kalonji, Cumin and Poppy Seed. *Pak. J. Bot.* 40(1): 461-467.
- (62)-Cheikh-Rouhou S., Besbes S., Lognay G., Blecker C., Deroanne C. et H A. (2008). Sterol composition of black cumin (*Nigella sativa*) and Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oils. *J Food Comp Analysis.* (21): 162-168.
- (63)-Cherbuliez T. et Domerego R. (2003). *L'apithérapie, médecine des abeilles.* Bruxelles. Editions Amyris SPRL. 255 p.
- (64)-Chirife J., Herszage L., Joseph A. et Kohn E.S. (1983). In vitro study of bacterial growth inhibition in concentrated sugar solutions: microbiological basis for the use of sugar in treating infected wounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 23(5): 766–773.
- (65)-Clark R.A.F. (1985). Cutaneous tissue repair: Basic biologic considerations. I. *J Am Acad Dermatol.* 13(5): 701-725.
- (66)-Colwell A.S., Longaker M.T. et Lorenz H. P. (2003). Fetal wound healing. *Front Biosci.* 8: 1240-1248.
- (67)-Cooper R.A., Halas E. et Molan P. (2002a). The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *J. Burn Care Rehabil.* 23: 366–370.
- (68)-Cooper R.A., Molan P.C. et Harding K.G. (2002). The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of Applied Microbiology.* 93(5): 857–863.
- (69)-Costerton J.W., Stewart P.S. et Greenberg E.P. (1999). Bacterial biofilm : A common cause of persistent infections. *Science.* 284 : 1318-1322.
- (70)-Cousin N. (2010). *Les trésors de la ruche, Miel, gelée royale, pollen....* Paris. Editions du Club France loisirs avec l'autorisation des Editions Rustica. 143p.
- (71)-Daba M.H. et Abdel-Rahman M.S. (1998). Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Lett.* 95: 23– 9.

- (72)-Darrigol J.L. (1979). Le miel pour votre santé. St-Jean-de-Braye(France). Editions Dangles. 140p.
- (73)-Decline F. et Rousselle P. (2000). Keratinocyte migration require $\alpha 3\beta 1$ integrin-mediated interaction with the laminin 5 gamma-2 chain. *J Cell Sci.*, 114: 811-823.
- (74)-Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris.
- (75)-Demera J.H. et Angert E.R. (2004). Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phylogeographic regions of Costa Rica. *Apidologie*. 35: 411–417.
- (76)-Deodhar A.K. et Rana R.E. (1997). Surgical physiology of wound healing: a review. *J Postgrad Med*. 43: 52-56.
- (77)-Devynck M.A., Pernollet M.G. et Nunez A.M. (1982). Diffuse structural alterations in cell membranes of spontaneously hypertensive rat. *Proc Natl Acad Sci USA*. 79. Pp: 5057-5060.
- (78)-Dioscorides P. (2002). De materia medica. (M. Aufmesser, Trad.) Hildesheim: Olms-Weidmann.
- (79)-Doillon C.J., Dunn M.G., Berg R.A. et Silver F.H. (1985). Collagen deposition during wound repair. *Scanning Elect Microsc.* 11: 897-903.
- (80)-Domerego R. et al. (2007). les remèdes de la ruche. Monaco. Alpen Editions. 96p.
- (81)-Dominiczak A., Lazar D., Das A. et Bohr D. (1991). Lipid Bilayer in genetic Hypertension. *Hypertension*. 18. Pp: 748-757.
- (82)-Dow G., Browne A. et Sibbald R.G. (1999). Infection in chronic wounds: Controversies in diagnosis and treatment. *Ostomy Wound Management*. 45: 23-40.
- (83)-Dow S.W. et Jones R.L. (1987). Anaerobic infections. *Comp Cont Educ Pract Vet*. 9 : 711-720.
- (84)-Eldad A., Weinberg A., Breiterman S., Chaouat M., Palanker D. et Ben-Bassat H. (1998). Early nonsurgical removal of chemically injured tissue enhances wound healing in partial thickness burns. *Burns*. 24: 166–172.
- (85)-El-Dakhakhny M., Barakat M., El-Halim M.A. et Aly, S.M. (2000a). Effects of *Nigella sativa* oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. *J Ethnopharmacol*. 72. Pp: 299-304.
- (86)-El-Dakhakhny M., Madi N.J., Lembert N. et Ammon H.P. (2002). *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *J Ethnopharmacol*. 81: 161– 4.

- (87)-El-Fatary H., et El-Alfy T. (1975). Isolation and structure assignment of an antimicrobial principle from the volatile oil of *Nigella sativa* L. seeds. *Die Pharmazie*, 30 (2), pp. 109-111.
- (88)-El kadi A. et Kandil O. (1987). The black seed (*Nigella sativa*) and immunity: Its effects on human T cell subsets. *Fed Proc.* 46. Pp: 1222.
- (89)-El-Mahmoudy A., Matsuyama H., Borgan M.A., Shimizu Y., El-Sayed M.G., Minamoto N. et al. (2002). Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2: 1603– 11.
- (90)-El-Obeid A., Al-Harbi S., Al-Jomah N. et Hassib A. (2006). Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomedicine.* (13): 324-333.
- (91)-El-Saleh S.C., Al-Sagair O.A. et Al-Khalaf M.I. (2004). Thymoquinone and *Nigella sativa* oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats. *Int J Cardiol.* 93:19– 23.
- (92)-El-Shayeb N.M.A. et Mabrouk S.S. (1984). Utilisation of some edible and medicinal plants to inhibit aflatoxin formation. *Nutr Rep Int.* 29. Pp: 273-282
- (93)-El Tahir K.E., Ashour M.M. et al-Harbi M.M. (1993a). The respiratory effects of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in guinea-pigs: elucidation of the mechanism(s) of action. *Gen Pharmacol.* 24. Pp: 1115-1122.
- (94)-El Tahir K.E., Ashour M.M. et al-Harbi M.M. (1993b). The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in rats: elucidation of the mechanism of action. *Gen Pharmacol.* 24. Pp: 1123-1131.
- (95)-Enomoto S., Asano R., Iwahori Y., Narui T., Okada Y., Singab A.N. et Okuyama T. (2001). Hematological studies on black cumin oil from the seeds of *Nigella sativa* L. *Biol Pharm Bull.* 24. Pp: 307-310.
- (96)-Erdman J.W., Balentine D., Arab L., Beecher G., Dwyer J.T., Folts J., Harnly J., Hollman P., Keen C.L., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G. et Burrowes J. (2007). Flavonoids and Heart Health. Proceeding of the IL SI North America Flavonoids Workshop. *The Journal of Nutrition.* 137: 718-737.
- (97)-Erejuwa.O.O., Sulaiman S.A. et Wahab M.S.A. (2014). Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of cancer. *Molecules (Basel, Switzerland).* Vol. 19. n° 2. Pp: 2497-2522.
- (98)-Eskander E.F., Won-Jun H., Ibrahim K.A. et Abdelal W.E. (1995). Hypoglycemic effect of a herbal formulation in alloxan induced diabetic rats. *Egyptian journal of pharmaceutical sciences.* 36. Pp: 253-270.
- (99)-Estevinho L., Pereira A., Moreira I., et al. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food Chem Toxicol.* 46: 3774-3779.

- (100)-Eteraf-Oskouei T. et Najafi M. (2013). Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. *Iran J Basic Med Sci.* 16:731-742.
- (101)-Fournier R. (2009). *ABC de l'Apithérapie.* Paris. Editions Grancher. 140p.
- (102)-Fry D.E. et Barie P.S. (2011). The changing face of *Staphylococcus aureus*; a continuing surgical challenge. *Surg Infect (Larchmt).* 12: 191-203.
- (103)-Gailit J. et Clark R.A.F. (1994). Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 6: 717-725.
- (104)-Gallardo-Chacón J.J., Caselles M., Izquierdo M. et Rius N. (2008). Inhibitory activity of monofloral and multifloral honeys against bacterial pathogens. *Journal of Apicultural Research and Bee World.* 47(2): 132–137.
- (105)-Gethin G. et Cowman S. (2008). Manuka honey vs. hydrogel- a prospective, open label, multicentre, randomized controlled trial to compare desloughing efficacy and healing outcomes in venous ulcers. *Journal of Clinical Nursing.* 10: 1365-2702.
- (106)-Gharbi M. (2011). *Les produits de la ruche: origines - fonctions naturelles - composition - propriétés thérapeutiques.*
- (107)-Ghedira K. (2006). La Nigelle cultivée : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytotherapie.* 4: 1-7.
- (108)-Gilani A.H., Aziz N., Khurram I.M., Chaudhary K.S. et Iqbal A. (2001). Bronchodilator, spasmolytic and calcium antagonist activities of *Nigella sativa* seeds (Kalonji): a traditional herbal product with multiple medicinal uses. *J Pak Med Assoc.* 51. Pp: 115-120.
- (109)-Goldsby R.A., Kindt T.J. et Osborne B.A. (2000). *Kuby Immunology.* 4e ed. New York: W. H. Freeman and company. 670 pages.
- (110)-Gopinath D., M. R., Ahmed K., Gomathi K., Chitra P.K., Sehgal, Jayakumar R. (2004). Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials.* 25. (10):1911–1917.
- (111)-Gracza L. (1986). *Pharmaceutical plant extracts. Patent-Ger Offen.* 511. Pp: 22.
- (112)-Greene C.E. (1998). *Mycobacterial Infections.* In : Greene, C.E. (ed.) : *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* Philadelphia : Saunders. 313-325.
- (113)-Greenish H. (1880). *Contribution to the Chemistry of Nigella sativa (Vol. 10).* *Pharmac J Trans.*
- (114)-Green R.J. (2004). *Antioxidant Activity of Peanut Plant Tissues.* Masters Thesis. North Carolina State University. USA.

- (115)-Haddad P.S., Martineau L.C., Lyoussi B. et Le P.M. (2006). Antidiabetic plants of North Africa and the Middle East. In: Traditional medicines for modern times: Antidiabetic plants (A. Soumyanath, ed.). Boca Raton, FL. CRC Press. 12. Pp: 221-241.
- (116)-Halawani E. (2009). Antibacterial Activity of Thymoquinone and Thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and Their Interaction with Some Antibiotics. *Advances in Biological Research*. 3 (5-6): 148-152.
- (117)-Hamrouni-Sellami I., Kchouk M. et Marrzouk B. (2008). Lipid and aroma composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds from Tunisia. *J Food Biochem*. (32): 335-352.
- (118)-Han M.C., Durmus A.S., Karabulut E. et Yaman I. (2005). Effects of Turkish propolis and silver sulfadiazine on burn wound healing in rats. *Revue de Medecine Veterinaire*. 156: 624-627.
- (119)-Hannan A., Saleem S., Chaudhary S., Barkaat M. et Arshad M.U. (2008). Anti bacterial activity of *nigella sativa* against clinical isolates of methicillin resistant staphylococcus aureus. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 20(3): 72-74.
- (120)-Haq A., Abdullatif M., Lobo P.I., Khabar K.S., Sheth K.V. et al-Sedairy S.T. (1995). *Nigella sativa*: effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte phagocytic activity. *Immunopharmacology*. 30. Pp: 147-155.
- (121)-Haryanto R.N., Tamae U., Kanae M., Suriadi R., Junko S. et Toshio N. (2012). Effectiveness of Indonesian Honey on the Acceleration of Cutaneous Wound Healing: An Experimental Study in Mice. *WOUNDS*. 24(4): 110-119.
- (122)-Harzallah H.J., Kouidhi B., Flamini G., Bakhrouf A. et Mahjoub T. (2011). Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and thymoquinone. *Food Chemistry*. 129: 1469-1474.
- (123)-Harzallah H.J., Noumi E., Bekir K., Bakhrouf A. et Mahjoub T. (2012). Chemical composition, antibacterial and antifungal properties of Tunisian *Nigella sativa* fixed oil. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 6(22): 4675-4679.
- (124)-Hasan N.A., Nawahwi M.Z. et Malek H.A. (2013). Antimicrobial Activity of *Nigella sativa* Seed Extract (Aktiviti Antimikrob Ekstrak *Nigella sativa*). *Sains Malaysiana*. 42(2): 143-147.
- (125)-Hashim F. et El-Kiey M. (1982). *Nigella sativa* seeds of Egypt. *J Pharm Sci UAR*. (3): 121-133.
- (126)-He D. (2006) Bilan des connaissances actuelles sur la cicatrisation des plaies cutanées chez le chien et le chat. Thèse de doctorat vétérinaire. Université Paul Sabatier. Toulouse. 230 p.
- (127)-Hegi G. (1975). *Illustrierte Flora von Mitteleuropa* (éd. 2nd edn., Vol. III). Berlin: Parey.

- (128)-Hirosaki T., Mizushima H., Tsubota Y., Moriyama K. et Miyazaki K. (2000). Structural requirement of carboxyl-terminal globular domains of laminin alpha 3 chain for promotion of rapid cell adhesion and migration by laminin-5. *J Biol Chem.* 275(29): 22495- 22502.
- (129)-Hosnuter M., Gurel A., Babuccu O., Armutcu F., Kargi E. et Isikdemir A. (2004). The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns.* 30: 121–125.
- (130)-Houghton P.J., Zarka R., De Las Heras B. et Hoult J.R. (1995). Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med.* 61: 33– 6.
- (131)-Hsueh P., Chen W. et Luh K. (2005). Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria causing nosocomial infections from 1991–2003 at a university hospital in Taiwan. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 26: 463–472.
- (132)-Hunt T.K., Hopf H. et Hussain Z. (2000). Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care.* 13(2 Suppl): 6-11.
- (133)-Javed S., Shahid A.A., Haider M.S., Umeera A., Ahmad R. et Mushtaq S. (2012). Nutritional, phytochemical potential and pharmacological evaluation of *Nigella Sativa* (Kalonji) and *Trachyspermum Ammi* (Ajwain). *Journal of Medicinal Plants Research Vol.* 6(5): 768-775.
- (134)-Jean-Prost P. (2005). 7e édition revue et complétée par Le Conte Y. *Apiculture : Connaître l'abeille. Conduire le rucher.* 698 p.
- (135)-Johnston, D.E. (1992). Cicatrisation des plaies cutanées. *Le Point Vétérinaire.* Numéro spécial. 24: 21-34.
- (136)-Jull A.B., Rodgers A. et Walker N. (2008b). Honey as a topical treatment for wounds. *Cochrane Database of Systematic Reviews.*
- (137)-Jull A.B, Walker N., Parag V., Molan P. et Rodgers A. (2008a). Randomized clinical trial of honey impregnated dressings for venous leg ulcers. *British Journal of Surgery.* 295: 175-182.
- (138)-Kainulainen T., Hakkinen L., Hamidi S., Larjava K., Kallioinen M., Peltonen J., Salo T., Larjava H. et Oikarinen A. (1998). Laminin-5 expression is independent of the injury and the microenvironment during reepithelialization of wounds. *J Histochem Cytochem.,* 46(3): 353-360.
- (139)-Kamal A., Arif J.M. et Ahmad I.Z. (2010). Potential of *Nigella sativa* L. seed during different phases of germination on inhibition of bacterial growth. *E3 Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research.* Vol. 1(1). Pp: 009-013.
- (140)-Keskin D., Karsan O., Ezirmik N. et Ciftcioglu A. (1999). The effects of alpha-tocopherol on fracture healing in rabbits (in Turkish). *Turkish Journal of Arthroplasty.* 10: 207–210.

- (141)-Khalil A.T., Khan I., Ahmad K., Khan Y.A., Khan J. et Shinwari Z.K. (2014). Antibacterial activity of honey in north-west Pakistan against select human pathogens. *J Tradit Chin Med.* 34(1): 86-89.
- (142)-Khanna T., Zaidi F.A. et Dandiya P.C. (1993). CNS and analgesic studies on *Nigella sativa*. *Fitoterapia.* 64. Pp: 407-410.
- (143)-Khattab M.M. et Nagi M.N. (2007). Thymoquinone supplementation attenuates hypertension and renal damage in nitric oxide deficient hypertensive rats. *Phytother Res.* 21. Pp: 410-414.
- (144)-Kirui P.K., Cameron J., Benghuzzi H.A. et al. (2004). Effects of sustained delivery of thymoquinone on bone healing of male rats. *Biomed Sci Instrum.* 40: 111-116.
- (145)-Kokoska L., Havlik J., Valterova I., Sovova H., Sajfirtova M., et Jankovska I. (2008). Comparison of Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Nigella sativa* Seed Essential Oils Obtained by Different Extraction Methods. *Journal of Food Protection.* Vol. 71. No. 12. Pages: 2475–2480.
- (146)-Kumara S.S. et Huat B.T. (2001). Extraction, isolation and characterisation of antitumor principle, alpha-hederin, from the seeds of *Nigella sativa*. *Planta Med.* 67. Pp: 29-32.
- (147)-Kwakman P.H., De Boer L., Ruyter-Spira C.P. et al. (2011a). Medical-grade honey enriched with antimicrobial peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 30: 251-257.
- (148)-Kwakman P.H., Te Velde A.A., De Boer L. et al. (2010). How honey kills bacteria. *FASEB J.* 24: 2576-2582.
- (149)-Kwakman P.H., Te Velde A.A., De Boer L., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E. et Zaat S.A.J. (2011b). Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. *PLoS ONE.* 6(3): 17709.
- (150)-Kwakman P.H. et Zaat S.A. (2012). Antibacterial components of honey. *IUBMB Life.* 64: 48-55.
- (151)-Labhal A., Settaf A., Bennani-Kabchi N., Cherrah Y., Slaoui A. et Hassar M. (1997). Actions anti-obésité, hypocholestérolémiantes et hypotriglycéridémiantes de *Nigella sativa* chez le *Psammomys obesus*. *Caducée,* 27, pp. 26-28.
- (152)-Lachman J., Orsak M., Hejtmankova A. et al. (2010). Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *LWT-Food Science and Technology.* 43(1): 52-58.
- (153)-Larjava H., Salo T., Haapasalmi K., Kramer R.H. et Heino J. (1993). Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *J Clin Invest.* 92(3): 1425-1435.
- (154)-Laurent O. (2005). *Les bienfaits du Miel.* Paris. Editions De Vecchi S.A.101p.

- (155)-Lee H., Churey J.J. et Worobo R.W. (2008a). Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *International Journal of Food Microbiology*. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.030.
- (156)-Lee H., Churey J.J. et Worobo R.W. (2008b). Purification and structural characterization of bacillomycin F produced by a bacterial honey isolate active against *Byssochlamys fulva* H25. *Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03797.x.
- (157)-Lequet L. (2010). Du nectar à un miel de qualité : contrôles analytiques du miel et conseils pratiques à l'intention de l'apiculteur amateur. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude-Bernard – Lyon 1. 194 p.
- (158)-Liaqat F., Sheikh A.A., Nazir J., Hussain T., Rabbani M., Shaheen A.Y. et Muhammad J. (2015). Isolation identification and control of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*. *Pak. J. Pharm. Sci.* Vol.28. No.3. pp: 997-1004.
- (159)-Lodish H., Baltimore D., Bark A., Zipursky S.L., Matsudaira P. et Darnell J. (1997). *Biologie moléculaire de la cellule*. 3e ed. Bruxelles: De Boeck Université. 1344 pages.
- (160)-Mahfouz M. et El-Dakhakhny M. (1960). The isolation of a crystalline active principle from *Nigella sativa* seeds. *J Pharm Sci UAR.* (1): 9-19.
- (161)-Mahgoub A.A. (2003). Thymoquinone protects against experimental colitis in rats. *Toxicol Lett.* 143: 133– 43.
- (162)-Majtan J. (2014). Honey: an immunomodulator in wound healing. Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. Vol. 22. n° 2. Pp: 187-192.
- (163)-Majtan J., Majtanova L., Bohova J. et Majtan V. (2010). Honeydew honey as a potent antibacterial agent in eradication of multi-drug resistant *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cancer patients. *Phytotherapy Research.* 25 (4): 01-17.
- (164)-Mansour M. et Tornhamre S. (2004). Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 19: 431– 6.
- (165)-Martin G., Duez H., Blanquart C.V.B., Poulain P., Fruchart J., et al. (2001). Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest.* (107): 1423-1432.
- (166)-Martin P., Hopkinson-Woolley J. et McCluskey J. (1992). Growth factors and cutaneous wound repair. *Prog Growth Factor Res.* 4(1): 25-44.
- (167)-Martini M.C. et Seiller M. (2006). *Actifs et additifs en cosmétologie*. 3e édition. Paris : Editions Tec & Doc ; Cachan. Éditions Médicales internationales. XXVIII-1051 p.
- (168)-Mason L.K. (1993). Treatment of contaminated wounds, including wounds of the abdomen and thorax. In Harari J.: *Surgical complications and wound healing in the small animal practice*. Philadelphia, Saunders, W.B. 33-62.

- (169)-Meddah B., Ducroc R., El Abbes Faouzi M., Eto B., Mahraoui L., Benhaddou-Andaloussi A., Martineau L.C., Cherrah Y. et Haddad P.S. (2009). *Nigella sativa* inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rats. *J Ethnopharmacol.* 121. Pp: 419-424.
- (170)-Mekkes J.R., Le Poole C., Das P.K., Bos J.D. et Westerhof W. (1998). Efficient debridement of necrotic wounds using proteolytic enzymes derived from Antarctic krill: a double-blind, placebocontrolled study in a standardized animal wound model. *Wound Repair and Regeneration.* 6: 50–58.
- (171)-Menounos P., Staphylakins K. et Gegiou D. (1986). The sterols of *Nigella sativa* seed oil. *Phytochemistry.* (25): 761-763.
- (172)-Mercurio A.M., Rabinovitz I. et Shaw L.M. (2001). The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 13(5): 541-545.
- (173)-Merfort I., Wray V., Barakat H., Hussein S., Nawwar M. et Willuhn G. (1997). Flavonoid triglycerides from seeds of *Nigella sativa*. *Phytochemistry.* (46): 359-363.
- (174)-Mishra R.P. (2011). Effect of Metal Ions and Drugs on Antibacterial Activities of *Nigella Sativa* (L.) Seeds. *WebmedCentral Ayurvedic Medicine.* 2(8): 01-09.
- (175)-Mohamed A., Shoker A., Bendjelloul F., Mare A., Alzrigh M., Benghuzzi H., et al. (2003). Improvement of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by thymoquinone; an oxidative stress inhibitor. *Biomed Sci Instrum.* 39: 440–5.
- (176)-Molan P.C. (1992a). The antibacterial activity of honey. 1. The nature of antibacterial activity. *Bee World.* 73 (1), 5-28.
- (177)-Molan P.C. (1992b). The antibacterial activity of honey. 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World.* 73: 59–76.
- (178)-Molan P.C. (1996). Honey for the treatment of infections. *Bee Infor. Med.* 3 (2): 6-7.
- (179)-Molan P.C. (1999). The role of honey in the management of wounds. *J Wound Care.* 8(8): 415-418.
- (180)-Molan P.C. (2001). Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *Am J Clin Dermatol.* 2: 13-19.
- (181)-Molan P.C. (2002). Not all honeys are the same for wound healing. *Bull. Eur. Tissue Rep. Soc.* 9: 5–6.
- (182)-Moll R. et Moll I. (1998). Epidermal adhesion molecules and basement membrane components as target structure of autoimmunity. *Virchows Arch.* 432: 487-504.
- (183)-Moriello K.A. (1994). Diseases of the skin. In Sherding RG (ed): *The Cat : Diseases and Clinical Management* 2nd Ed. Edinburgh. UK. Churchill Livingstone. 1907-1968.

- (184)-Muller G.H., Kirk R.W. et Scott D.W. (2001). Structure and function of the skin. In Muller G.H., Kirk R. W. Small animal dermatology. Saunders (Ed.): 1-70.
- (185)-Mulu A., Tessema B. et Derbie F. (2004). In vitro assessment of the antimicrobial potential of honey on common human pathogens. *EthiopJ.Health Dev.* 18(2): 107-111.
- (186)-Mwipatayi B.P. Angel D., Norrish J., Hamilton M.J., Scott A. et Sieunarine K. (2004). The use of honey in chronic leg ulcers: a literature review. *Primary Intention.* 12(3): 107-112.
- (187)-Nagi M.N. et Mansour M.A. (2000). Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacol Res.* 41: 283– 9.
- (188)-Namba T., Tsunozuka M., Dissanayake D.M.R.B., Pilapitiya U., Saito K., Kakuichi N. et Hattori M. (1985). Studies on dental caries prevention by traditional medicine (Part VII) screening of ayurvedic medicines for anti plaque action. *Shoyakugaku Zasshi.* 39. Pp: 146-153.
- (189)-Nazir S. et Latif Z. (2012). Screening of natural extracts for their antibacterial activity against different enteric pathogens isolated from soil, water and rotten fruit samples. *African Journal of Microbiology Research.* Vol. 6(40): 6864-6870.
- (190)-Nergiz C. et Otles S. (2003). Some characteristics of *Nigella sativa* L. seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry.* (83): 63-68.
- (191)-Nguyen B.P., Gil S.G. et Carter W.G. (2000). Deposition of laminin 5 by keratinocytes regulates integrin adhesion and signaling. *J Biol Chem.* 275(41): 31896-31907.
- (192)-Nguyen B.P., Ren X.D., Schwartz M.A. et Carter W.G. (2001). Ligation of integrin $\alpha 3\beta 1$ by laminin 5 at the wound edge activates rho-dependent adhesion of leading keratinocytes on collagen. *J Biol Chem.* 276(47): 43860-43870.
- (193)-Noli C. (2006). Structure et physiologie de la peau et du pelage. In Guagere E, Prelaud P. Guide pratique de dermatologie canine. Merial Kalianxis (Ed.): 17-30.
- (194)-Nwankwo C.M., Ezekoye C.C. et Igbokwe S.O. (2014). Phytochemical screening and antimicrobial activity of apiary honey produced by honey bee (*Apis mellifera*) on clinical strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *African Journal of Biotechnology.* Vol. 13(23). Pp: 2367-2372.
- (195)-Oluwatosin O.M., Olabanji J.K., Oluwatosin O.A., Tijani L.A. et Onyechi H.U. (2000). A comparison of topical honey and phenytoin in the treatment of chronic leg ulcers. *African Journal of Medical Sciences* 29(1): 31-34.
- (196)-Omafuvbe B.O. et Akanbi O.O. (2009). Microbiological and physico-chemical properties of some commercial Nigerian honey. *African Journal of Microbiology Research.* Vol. 3(12). Pp: 891-896.
- (197)-Omar R. A. (2009). Efficiency of some analgesic mixed with general anaesthesia and their influence on bone healing, Ph. D. Thesis University of Baghdad.

- (198)-Oršolić N., Knezević A., Sver L., Terzić S., Hackenberger B.K. et Basić I. (2003). Influence of honey bee products on transplantable murine tumours Vet. Comp. Oncol. 14(4):216-226
- (199)-O'Toole E.A., Marinkovich M.P., Hoeffler W.K., Furthmayr H. et Woodley D.T. (1997). Laminin-5 inhibits human keratinocyte migration. Exp Cell Res. 233: 330-339.
- (200)-Parekh J., Jadeja D. et Chanda S. (2005). Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. Turk. J. Biol. 29: 203-210.
- (201)-Park J.E. et Barbul A. (2004). Understanding the role of immune regulation in wound healing. Am J Surg. 187: 11–16
- (202)-Pavletic M. (1993). Atlas of small animal reconstructive surgery. Philadelphia : Lippincot. 340p
- (203)-Pavletic M. (2003). The integument. In Slatter D. Textbook of small animal surgery. third edition. WB Saunders (Ed.): 250-259.
- (204)-Phillips J.D. (1992). Medicinal plants. Biologist. 39: 187–191.
- (205)-Piras A., Rosa A., Marongiu B., Porcedda S., Falconieri D., Dessì M.A., Ozcelik B., Koca U. (2013). Chemical composition and in vitro bioactivity of the volatile and fixed oils of *Nigella sativa* L. extracted by supercritical carbon dioxide. Industrial Crops and Products. 46: 317– 323.
- (206)-Rabinovitz I. et Mercurio A.M. (1997). The integrin alpha6beta4 functions in carcinoma cell migration on laminin-1 by mediating the formation and stabilization of actin-containing motility structures. J Cell Biol. 139(7): 1873-1884.
- (207)-Rathee P., Mishra S. et Kaushal R. (1982). Antimicrobial activity of essential oil, fixed oil and unsaponifiable matter of *Nigella sativa*. Indian J Pharm Sci. (44): 8-10.
- (208)-Remedios A. (1999). Complications of wound healing. In Fowler, D. Williams, J.M : BSAVA, Manual of canine and feline wound management and reconstruction. 1st Ed, Cheltenham, BSAVA (British Small Animal Veterinary Association). 137-143.
- (209)-Rosin E., Dow S.W., Daly W.R. et al. (1993). Surgical wound infection and use of antibiotics. In Slatter D (ed) : Text-book of small animal surgery. 2nd Ed, WB Saunders. Philadelphia. 84-95.
- (210)-Ryan, M. C., Lee, K., Miyashita, Y. et Carter, W. G., Targeted disruption of the LAMA3 gene in mice reveals abnormalities in survival and late stage differentiation of epithelial cells. J Cell Biol, 1999. 145(6): 1309-1323.
- (211)-Salomi M.J., Nair S.C. et Panikkar K.R. (1991). Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice. Nutr Cancer. 16. Pp: 67-72.

- (212)-Saraf R., Bowry V., Rao D., Saraf P. et Molan P. (2009). The antimicrobial efficacy of Fijian honeys against clinical isolates from diabetic foot ulcers. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 1(3): 64-71.
- (213)-Sari Y., Dhadhang W.K., Nasruddin S., Arington I.G., Toshio N. (2014). *Asian Journal of Pharmaceutical & Biological Research (AJPBR)*. 4(1): 16-22.
- (214)-Scott D.W. (1987). Normal integument of the cat. In J. Holzworth : *Diseases of the cat. Medicine and surgery. Volume 1. Philadelphia, W.B. Saunders*. 619-625.
- (215)-Scott D.W. et Miller W.H. (2003). Structure and function of the skin. In *Equine dermatology. Saunders (Ed.): 1-58*.
- (216)-Selçuk C.T., Durgun M., Tekin R., Iyas Y., Bozkurt M., Akçay C., Alabalik U. et Basarali M.K. (2013). Evaluation of the effect of thymoquinone treatment on wound healing in a rat burn model. *Journal of Burn Care & Research*. 34 (5): 274-281.
- (217)-Sellami M., Ghariani B., Louati H., Miled N. et Gargouri Y. (2013). Biological Activities of Extracts of Different Spices and Plants. *International Journal of Current Engineering and Technology*. Vol.3. No.3: 1051-1060.
- (218)-Sener B., Kusmenoglu S., Mutlugil A., et Bingol F. (1985). A study with seed oil of *Nigella sativa*. *Gazi Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*. (2): 1-7.
- (219)-Sepehr S. (2010). The most important medicinal uses of honey, and its side effects in the book of the Canon by Avicenna, and in the modern medical literature: a comparative study. *J ApiProd ApiMed Sci*. 2:43.
- (220)-Serarслан G., Altug M.E. et Kontas T. (2007). The effects of cafeic acid phenethyl ester on plasma lipid peroxidation, antioxidant status and nitric oxide levels in incisional wound model (in Turkish). *Turkderm Dergisi*. 41: 11–14.
- (221)-Serini G. et Gabbiani G. (1999). Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res*. 250(2): 273-283.
- (222)-Shahid W., Durrani R., Iram S., Durrani M. et Khan F.A. (2013). Antibacterial activity in Vitro of medicinal plants. *Sky Journal of Microbiology Research* Vol. 1(2). Pp: 5–21.
- (223)-Shohayeb M. et Halawani E. (2012). Comparative Antimicrobial Activity of Some Active Constituents of *N. sativa* L. *World Applied Sciences Journal*. 20(2): 182-189.
- (224)-Sibbald R.G. et al. (2003). Preparing the wound bed 2003: Focus on infection and inflammation. *Ostomy Wound Management*. 49(11): 24-51.
- (225)-Silici S., Sagdic O. et Ekici L. (2010). Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. *Food Chemistry*. 121: 238–243.
- (226)-Singh S., Das S.S., Singh G., Schuff C., De Lampasona M.P. et Catalán C.A.N. (2014). Composition, In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil and

Oleoresins Obtained from Black Cumin Seeds (*Nigella sativa* L.). BioMed Research International. Volume 2014, Article ID 918209, 10 pages: 01-10.

(227)-Smith K.L. et Dean S.J. (1998). Tissue repair of the epidermis and dermis. *J Hand Ther.* 95-104.

(228)-Styrt B. et Gorbach S.L. (1989). Recent developments in the understanding of the pathogenesis and treatment of anaerobic infection. *N Engl J Med.* 321: 240-246.

(229)-Subrahmanyam M. (1998). A prospective randomised clinical and histological study of superficial burn wound healing with honey and silver sulfadiazine. *Burns.* 24(2): 157-161.

(230)-Subramaniam M. (1993). Honey impregnated gauze versus polyurethane film (OpSite) in the treatment of burns- a prospective randomized study. *British Journal of Plastic Surgery.* 46(4): 322-323.

(231)-Suresh Kumar T.V., Negi P.S. et Udaya Sankar K. (2010). Antibacterial Activity of *Nigella sativa* L. Seed Extracts. *Antibacterial Activity of Nigella sativa L. Seed Extracts.* *British Journal of Pharmacology and Toxicology.* 1(2): 96-100.

(232)-Swamy S.M. et Tan B.K. (2000). Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds. *J Ethnopharmacol.* 70. Pp: 1-7.

(233)-Tan H.T., Abdul Rahman R., Gan S.H. et al. (2009). The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. *BMC Complement Altern Med.* 9: 34.

(234)-Tan M.K., Adli D.S.H., Tumiran M.A., Abdulla M.A. et Yusoff K.M. (2012). The Efficacy of Gelam Honey Dressing towards Excisional Wound Healing. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012: 805932.

(235)-Tanis H., Aygan A. et Digrak M. (2009). Activity of four *Nigella* species grown in southern Turkey. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 771-774.

(236)-Taormina P.J., Niemira B.A. et Beuchat L.R. (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology.* 69: 217-225.

(237)-Taskin M., Alankus-Caliskan O., Anil H., Abou-Gazar H., Akhan I., et Bedir E. (2005). Triterpène saponins from *Nigella sativa* L. *Turkish J Chem.* (29): 561-569.

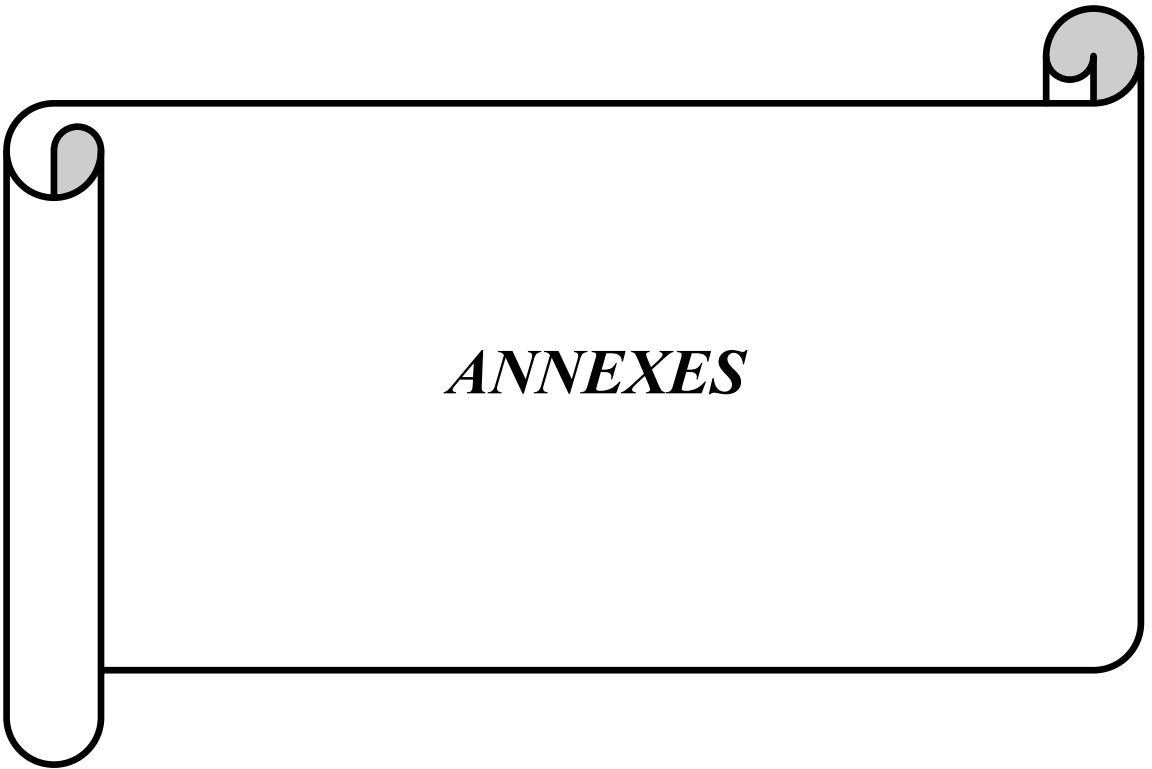
(238)-Taylor J.L.S., Rabe T., McGaw L.J., Jäger A.K. et Van Staden J. (2001). Towards the scientific validation of traditional medicinal plants. *Plant Growth Regul.* 34(1): 23-37.

(239)-Thakur R., Jain N., Pathak R. et Sandhu S.S. (2011). Practices in Wound Healing Studies of Plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume 2011, Article ID 438056, 17 pages.

(240)-Tortora G.J., Grabowski S.R. et Parent J. (1994). *Principes d'anatomie et de physiologie.* Anjou: Centre Éducatif et Culturel inc. 1203 pages.

- (241)-Türkdoğan M.K., Ağaoğlu Z., Yener Z., Sekeroğlu R., Akkan H.A. et Avci M.E. (2001). The role of antioxidant vitamins (C and E), selenium and *Nigella sativa* in the prevention of liver fibrosis and cirrhosis in rabbits: new hopes. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 108. Pp: 71-73.
- (242)-Tuter M., Aksoy H., Ustun G., Riva S., Secundo F. et Ipekler S. (2003). Partial purification of *Nigella sativa* L. seed lipase and its application in hydrolytic reactions. Enrichment of γ -linolenic acid from borage oil. *J Am Chem Soc.* (80): 273-241.
- (243)-Utani A., Nomizu M., Matsuura H., Kato K., Kobayashi T., Takeda U., Aota S., Nielsen P.K. et Shinkai H. (2001). A unique sequence of the laminine α 3 G domain binds to heparin and promotes cell adhesion through syndecan-2 and -4. *J Biol Chem.* 276(31): 28779-28788.
- (244)-Varol Y. (2008). Investigation of the effects of *Nigella Sativa* oil on cutaneous wound healing in rats. [Thesis]. T.C. Marmara Universitesi Saglik Bilimleri Enstitusu. Istanbul.
- (245)-Viguiet E. et Degorce F. (1992). Eléments anatomiques fondamentaux en chirurgie cutanée plastique et reconstructrice chez les carnivores domestiques. *Point Vet.* 24 (numéro spécial "Chirurgie plastique et reconstructrice"): 5-19.
- (246)-Vit P., Oddo L.P., Marano M.L., de Mejias E.S. (1998b). Venezuelan stingless bee honeys characterized by multivariate analysis of physicochemical properties, *Apidologie.* 29: 377-389.
- (247)-Vit P. et Tomás-Barberán F.A. (1998a). Flavonoids in Meliponinae honeys from Venezuela related to their botanical, geographical, and entomological origin to assess their putative anticataract activity, *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 206: 288-293.
- (248)-Voidarou C., Alexopoulos A., Plessas S., Karapanou A., Mantzourani I., Stavropoulou E., Fotou K., Tzora A., Skoufos I. et Bezirtzoglou E. (2011). Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Anaerobe.* 17: 375-379.
- (249)-Waldron D.R. et Trevor P. (1993). Management of superficial skin wounds. In Slatter D (ed): *Text-book of small animal surgery.* 2nd Ed, WB Saunders. Philadelphia. 269-280.
- (250)-Webster M.E., Altieri P.L., Conklin D.A., Berman S., Lowenthal J.P. et Gochenour R.B. (1962). Enzymatic debridement of third-degree burns on guinea pigs by *Clostridium histolyticum* proteinases. *Journal of Bacteriology.* 83: 602-608.
- (251)-Weheida S.M., Naguib H.H., El-Banna H.M. et Marzouk S. (1991). Comparing the effects of two dressing techniques on healing of low grade pressure ulcer. *Journal of Medical Research Institute Alexandria.* 12(2): 259-278.
- (252)-White J.W., Subers M.H. et Schepartz A. (1963). The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochemica et Biophysica Acta.* 73: 57-70.
- (253)-Wilkinson J.M. et Cavanagh H.M.A. (2005). Antibacterial Activity of 13 Honeys Against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Food.* 8(1): 100-103.

- (254)**-Witte M.B. et Barbul A. (1997). General principles of wound healing. *Surg Clin North Am.* 77(3): 509-528.
- (255)**-Wysocki A.B. (1999). Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *Nurs Clin North Am.* 34(4): 777-797.
- (256)**-Yamaguchi Y. et Yoshikawa K. (2001). Cutaneous wound healing: an update. *J Dermatol.* 28(10): 521-534.
- (257)**-Yildiz A. et Balikci E. (2016). Antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activity of *Nigella sativa* in clinically endometritic cows. *Journal of Applied Animal Research.* 44(1) : 431-435.
- (258)**-Ythier D. (1992). Antisepsie et chirurgie cutanée. *Le Point Vétérinaire.* Numéro spécial. 24: 47-51.
- (259)**-Zaoui A., Cherrah Y., Alaoui K., Mahassine N., Amarouch H. et Hassar M. (2002). Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. *J Ethnopharmacol.* 79. Pp: 23-26.
- (260)**-Zaoui A., Cherrah Y., Lacaille-Dubois M.A., Settaf A., Amarouch H. et Hassar M. (2000). Diuretic and hypotensive effects of *Nigella sativa* in the spontaneously hypertensive rat. *Thérapie.* 55. Pp: 379-382.



ANNEXES

ANNEXE 1 : LES MILIEUX DE CULTURE

1. Gélose Bile Esculine Agar (BEA)

Composition: en grammes par litre d'eau distillée

Peptone de viande.....	5
Extrait de viande.....	3
Bile de bœuf.....	40
Esculine.....	1
Citrate de fer.....	0,5
Agar.....	14,5
PH final =	6,6

2. Gélose Chapman

Composition: en grammes par litre d'eau distillée

Peptone.....	11
Extrait de viande.....	1
NaCl.....	75
Mannitol.....	10
Rouge de phénol.....	0,025
Agar.....	15
PH =	7,5

3. Gélose Mac Conkey

Composition: en grammes par litre d'eau distillée

Peptone de caséine.....	17
Peptone de viande.....	3
Sels biliaires.....	1,5
Cristal violet.....	0,001
Lactose.....	10
Rouge neutre.....	0,03
NaCl.....	5
Agar.....	13,5
PH final =	7,1

4. Gélose Mueller-Hinton

Composition: en grammes par litre d'eau distillée

Infusion de viande de bœuf.....	300 ml
Peptone de caséine.....	17,5
Amidon de maïs.....	1,5
Agar.....	17
PH final =	7,4

5. Gélose nutritive ordinaire

Composition: en grammes par litre d'eau distillée

Extrait de levure.....	2
------------------------	---

Extrait de viande.....	1
Peptone.....	5
NaCl.....	5
Agar.....	15
PH final = 7,4	

6. Bouillon Muller-Hinton

Composition: en grammes par litre d'eau distillée

Infusion de viande de bœuf.....	300 ml
Peptone de caséine.....	17,5
Amidon de maïs.....	1,5
PH final = 7,4	

7. Bouillon nutritif

Composition: en grammes par litre d'eau distillée

Extrait de levure.....	2
Extrait de viande.....	1
Peptone.....	5
NaCl.....	5
PH final = 7,4	

ANNEXE 2 : TABLEAU DE LECTURE DES GALERIE D'IDENTIFICATION

1. Tableau de lecture de la galerie API Staph :

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTAT	
			NEGATIF	POSITIF
0	Aucun	Témoin négatif	rouge	—
GLU FRU MNE MAL LAC TRE MAN XLT MEL	D-Glucose D-Fructose D-Mannose Maltose Lactose D-Trehalose D-Mannitol Xylitol D-Mélibiose	(Témoin positif) (D-GLUcose) acidification (D-FRUctose) acidification (D-ManNosE) acidification (MALtose) acidification (LACtose) acidification (D-TREhalose) acidification (D-MANnitol) acidification (XyLiTol) acidification (D-MELibiose)	rouge *	jaune
NIT	nitrate de potassium	Réduction des NITrates en nitrites	<u>NIT 1 + NIT 2 / 10 min</u>	
			incolore-rose pâle	rouge
PAL	β -naphtyl phosphate	Phosphatase ALcaline	<u>ZYM A + ZYM B / 10 min</u>	
			jaune	violet
VP	sodium pyruvate	production d'acétyl méthyl-carbinol (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>	
			incolore-rose pâle	violet-rose
RAF XYL SAC MDG NAG	D-raffinose D-xylose D-saccharose méthyl- α Dglucopyranoside N-acétyl-glucosamine	acidification (RAFfinose) acidification (XYLose) acidification (SACcharose) acidification (Méthyl- α DGlucopyranoside) acidification (N-Acétyl-Glucosamine)	rouge	jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	Arginine DiHydrolase	jaune	orange-rouge
<u>URE</u>	urée	UREase	jaune	rouge-violet

* Les tests MNE et XLT peuvent être oranges, lorsqu'ils sont entourés ou précédés de tests positifs. On doit alors les considérer comme négatifs.

2. Tableau de lecture de la galerie API 20Strep :

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
VP	sodium pyruvate	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / jusqu'à 10 min</u> (3)	
			Incolore	Rose-Rouge
HIP	acide hippurique	hydrolyse (acide HIPpurique)	<u>NIN / jusqu'à 10 min</u>	
			Incolore/Bleu pâle Gris-bleuté	Bleu foncé/Violet

ESC	esculine citrates de fer	hydrolyse β -glucosidase (ESCuline)	4 h	24 h	4 h	24 h
			Incolore Jaune pâle	Incolore Jaune pâle Gris clair	Noir Gris	Noir
PYR A	acide pyroglutamique β - naphtylamide	PYRrolidonyl Arylamidase	<u>ZYM A + ZYM B / 10 min</u> (PYRA à LAP) (1) au besoin décoloré par éclairage intense			
			Incolore ou Orange très pâle		Orange	
α GA L	6-bromo-2-naphtyl- α Dgalactopyranoside	α -GALactosidase	Incolore		Violet	
β GU R	acide naphthol- ASB β glucuronique	β -GIUcuRonidase	Incolore		Bleu	
β GA L	2-naphtyl- β Dgalactopyranoside	β -GALactosidase	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
PAL	2-naphtyl phosphate	Phosphatase ALcaline	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
LAP	L-leucine- β - naphtylamide	Leucine AminoPeptidase	Incolore		Orange	
<u>ADH</u>	L-arginine	Arginine DiHydrolase	Jaune		Rouge	
<u>RIB</u>	D-ribose	acidification (RIBose)	4 h	24 h	4 h	24 h
<u>ARA</u>	L-arabinose	acidification (ARAbinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange /Jaune	Jaune
<u>MAN</u>	D-mannitol	acidification (MANnitrol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange /Jaune	Jaune
<u>SOR</u>	D-sorbitol	acidification (SORbitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange /Jaune	Jaune
<u>LAC</u>	D-lactose (origine bovine)	acidification (LACTose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange /Jaune	Jaune
<u>TRE</u>	D-tréhalose	acidification (TREhalose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange /Jaune	Jaune
<u>INU</u>	Inuline	acidification (INUline)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange /Jaune	Jaune
<u>RAF</u>	D-raffinose	acidification (RAFfinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange /Jaune	Jaune
<u>AMD</u>	amidon (2)	acidification (AMiDon)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange /Jaune	Jaune
GLYG	glycogène	acidification (GLYcoGène)	Rouge ou Orange		Jaune franc	

(1) Lors d'une deuxième lecture après 24 heures d'incubation, on peut remarquer un dépôt dans les tubes où ont été ajoutés les réactifs ZYM A et ZYM B. Ce phénomène est normal et ne doit pas être pris en considération.

(2) L'acidification de l'amidon est fréquemment moins forte que celle des autres sucres.

(3) Une coloration rose pâle obtenue après 10 minutes doit être considérée négative.


3. Tableau de lecture de l'API 20E :

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS / ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
ONPG	Orthonitrophényl-13-Dgalactopyranoside	beta-galactosidase	Incolore	jaune (1)
<u>ADH</u>	Arginine	arginine dihydrolase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>LDC</u>	Lysine	lysine décarboxylase	jaune	orangé
<u>ODC</u>	Ornithine	omithine décarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
CIT	Citrate de sodium	utilisation du citrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu (3)
<u>H2S</u>	thiosulfate de sodium	production d'H2S	incolore / grisâtre	dépôt noir/fin liseré
<u>URE</u>	Urée	Uréase	jaune	rouge / orangé
TDA	Tryptophane	tryptophane désaminase	<u>TDA / immédiat</u>	
			jaune	marron foncé
IND	Tryptophane	production d'indole	JAMES / immédiat ou IND / 2 min	
			JAMES Incolore vert pâle/jaune IND Jaune	JAMES Rose IND anneau rouge
VP	pyruvate de sodium	production d'acétoïne	VP1 + VP2 / 10 min (5)	
			incolore	rose / rouge
GEL	gélatine de Kohn	gélatinase	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	Glucose	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	Mannitol	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	Jaune
SOR	Sorbitol	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	Jaune
SAC	Saccharose	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	Jaune
MEL	Melibiose	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	Jaune
ARA	Arabinose	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	Jaune
OX	sur papier filtre	cytochrome-oxydase	OX/1-2min	
			incolore	violet
N03 N02 tube GLU		production de NO2	NIT 1 + NIT 2 / 2-3 min	
			jaune	rouge
		réduction au stade N2	Zn / 5 min	
			Rouge	jaune
MOB	API M Medium ou microscope	Mobilité	immobile	mobile
McC	Milieu de MacConkey	Culture	absence	présence
0F-F	glucose (API 0F	fermentation: sous huile	vert	Jaune
0F-O	Medium)	oxydation : à l'air	vert	jaune


- (1) Une très légère couleur jaune est également positive.
- (2) Une couleur orange apparaissant après 36-48 H d'incubation doit être considérée négative.
- (3) Lecture dans la cupule (zone aérobie) .
- (4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.
- (5) Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.

ANNEXE 3 : COMPOSITION ET INDICATIONS DES MEDICAMENTS


1. IMALGENE® 500 (MERIAL)

PHOTO	COMPOSITION	INDICATION
	<p>Substance(s) active(s) : Kétamine (s.f. de chlorhydrate).....50 mg</p> <p>Excipient(s) : Chlorobutanol hémihydraté.....5 mg Excipient qsp.....1 ml</p>	<p>- Anesthésie générale.</p>


2. PAXMAN® (VIRBAC)

PHOTO	COMPOSITION	INDICATION
	<p>Substance(s) active(s) : Xylazine.....20 mg</p> <p>Excipient(s) : Parahydroxybenzoate de méthyle (E218)..... 1,8 mg Parahydroxybenzoate de propyle (E216)..... 0,2 mg Excipients q.s.p..... 1 ml</p>	<p>- Sédation, analgésie, et myorelaxation. - Prémédication lors d'une anesthésie générale.</p>


3. DIAZEPAM® (TVM)

PHOTO	COMPOSITION	INDICATION
	<p>Substance(s) active(s) : Diazépam.....5 mg</p> <p>Excipient(s): Alcool benzylique.....15,7 mg Alcool benzoïque.....2,5 mg Benzoate de sodium.....47,5 mg Excipients q.s.p.....1 ml</p>	<p>- Prise en charge à court terme des troubles convulsifs et des spasmes musculo-squelettiques d'origine centrale et périphérique. - Utilisation dans le cadre d'un protocole pré-anesthésique ou de sédation.</p>

4. POVIP® (SAIDAL)

PHOTO	COMPOSITION	INDICATION
	<p>Substance(s) active(s) : Povidone (DCI) iodée.....10 g</p> <p>Excipient(s): Nonoxinol 9, Glycérol, Hydroxyde de sodium, Hydrogénophosphate disodique anhydre, Acide citrique monohydraté, Eau purifiée.</p> <p>Excipients q.s.p.....100 ml</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Antiseptie des plaies ou brûlures superficielles et peu étendues. - Traitement d'appoint des affections de la peau et des muqueuses primitivement bactériennes ou susceptibles de se surinfecter. - Antiseptie de la peau du champ opératoire.

5. CICATRYL-BIO® (ACM)

PHOTO	COMPOSITION	INDICATION
	<p>Aqua, Cetyl alcohol, Petrolatum, Isopropyl myristate, Sorbitol, Glyceryl stearate, Hydroxypropyl starch phosphate, PEG 75-stearate, Chlorhexidine digluconate, Tocopheryl acetate, Ceteth-20, Steareth-20, Polyacrylamide, C 13-14 isoparaffin, Laureth 7, Methyl paraben, Propyl paraben, Imidazolidinyl urea.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Soins complémentaires des peaux abîmées par des agressions extérieures : plaies, écorchures, brûlures ou par des traitements physiques (laser, radiothérapie).

ANNEXE 4 : RECAPITULATIF RESULTATS D'ANALYSES

1. Diamètres des zones d'inhibition des bactéries sensibles aux différentes concentrations du miel (mm)

	20%			50%			70%			100%		
<i>Escherichia coli</i>	11	09	09	10	14	11	13	11	13	18	21	18
<i>Enterobacter sp.</i>	14	14	13	14	15	12	17	14	12	13	15	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	20	12	21	20	13	17	17	16	15	21	21
<i>Staphylococcus intermedius</i>	11	10	10	12	12	11	12	11	13	16	16	17
<i>Enterococcus faecalis</i>	14	14	13	12	12	13	12	12	12	14	15	14

2. Diamètres des zones d'inhibition des bactéries sensibles aux différents extraits de *N. sativa L.* (mm)

	EAE			EE			EM		
<i>Escherichia coli</i>	10	10	10	10	10	10	-	-	-
<i>Enterobacter sp.</i>	14	13	14	12	11	12	12	11	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	12	11	12	10	10	13	13	12
<i>Staphylococcus intermedius</i>	16	15	16	11	13	12	14	13	14
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	13	12	13	13	11	13

3. Surfaces des plaies expérimentales à J₀ (mm²)

	Lapin 01	Lapin 02	Lapin 03	Lapin 04	Lapin 05
MN 1	97	93	119	79	78
MN 2	110	150	102	153	80
MN 3	114	107	117	91	95
Miel	101	106	87	81	81
Cicatryl-bio [®]	71	99	117	112	96

4. Surfaces des plaies traitées à J₇ (mm²)

	Lapin 01	Lapin 02	Lapin 03	Lapin 04	Lapin 05
MN 1	10	37	56	12	60
MN 2	45	107	54	76	37
MN 3	18	30	34	39	59
Miel	17	21	44	22	43
Cicatryl-bio[®]	40	77	90	83	86

5. Pourcentages de contraction des plaies traitées à J₇ (%)



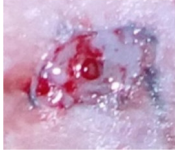




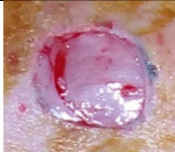
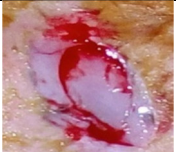
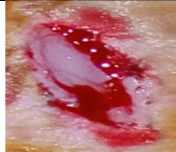
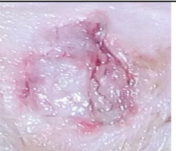














	Lapin 01	Lapin 02	Lapin 03	Lapin 04	Lapin 05
MN 1	89,69	60,21	52,94	84,81	23,07
MN 2	59,09	28,66	47,05	50,32	53,75
MN 3	84,21	71,96	70,94	57,14	37,89
Miel	83,16	80,18	49,42	72,83	46,91
Cicatryl-bio[®]	43,66	22,22	23,07	25,89	10,41

6. Périodes de ré-épithélialisation des plaies traitées (N^{bre} de J)

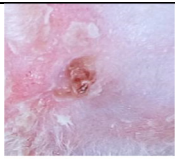


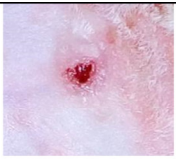

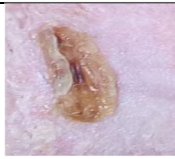
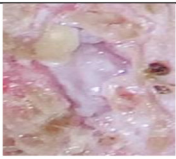
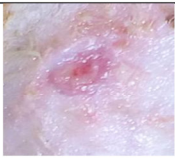
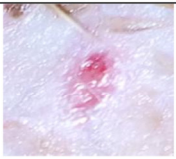
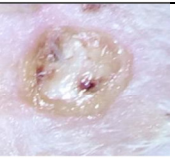
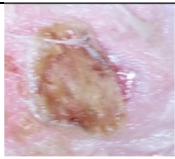

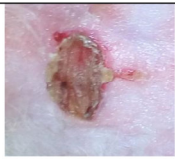
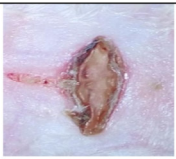

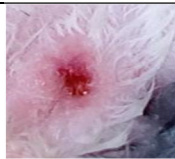
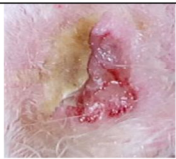


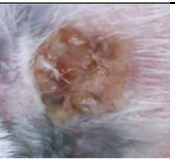
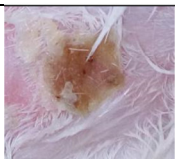


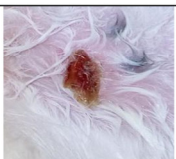

	Lapin 01	Lapin 02	Lapin 03	Lapin 04	Lapin 05
MN 1	11	13	21	11	12
MN 2	12	16	18	21	11
MN 3	11	12	16	11	11
Miel	11	11	18	12	15
Cicatryl-bio[®]	11	15	17	13	13

ANNEXE 5 : ASPECT, SURFACE, POURCENTAGE DE CONTRACTION ET PERIODE DE RE-EPITHELIALISATION DES PLAIES.

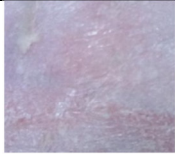



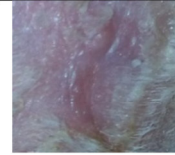

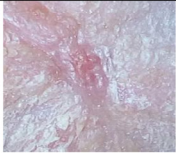
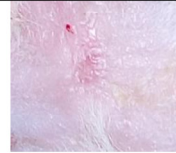
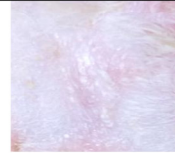
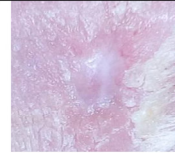




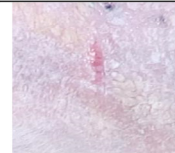

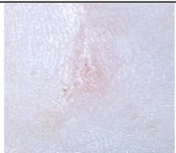


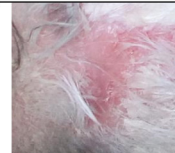



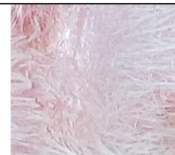

1. Aspect et surface des plaies expérimentales à J₀ :

		MN 1	MN 2	MN 3	Miel	Cicatryl-Bio®
Lapin n° 1	Photo					
	Surface (mm²)	97	110	114	101	71
Lapin n° 2	photo					
	Surface (mm²)	93	150	107	106	99
Lapin n° 3	Photo					
	Surface (mm²)	119	102	117	87	117
Lapin n° 4	Photo					
	Surface (mm²)	79	153	91	81	112
Lapin n° 5	Photo					
	Surface (mm²)	78	80	95	81	96

2. Aspect, surface et pourcentage de contraction des plaies traitées à J₇ :

		MN 1	MN 2	MN 3	Miel	Cicatryl-Bio [®]
Lapin n° 1	photo					
	Surface (mm ²)	10	45	18	17	40
	% de contr	89,69	59,09	84,21	83,16	43,66
Lapin n° 2	photo					
	Surface (mm ²)	37	107	30	21	77
	% de contr	60,21	28,66	71,96	80,18	22,22
Lapin n° 3	photo					
	Surface (mm ²)	56	54	34	44	90
	% de contr	52,94	47,05	70,94	49,42	23,07
Lapin n° 4	photo					
	Surface (mm ²)	12	76	39	22	83
	% de contr	84,81	50,32	57,14	72,83	25,89
Lapin n° 5	photo					
	Surface (mm ²)	60	37	59	43	86
	% de contr	23,07	53,75	37,89	46,91	10,41

3. Aspect de guérison et période de ré-épithélialisation des plaies traitées :

		MN 1	MN 2	MN 3	Miel	Cicatryl-Bio®
Lapin n° 1	photo					
	Période de ré-épith (J)	11	12	11	11	11
Lapin n° 2	photo					
	Période de ré-épith (J)	13	16	12	11	15
Lapin n° 3	photo					
	Période de ré-épith (J)	21	18	16	18	17
Lapin n° 4	photo					
	Période de ré-épith (J)	11	21	11	12	13
Lapin n° 5	photo					
	Période de ré-épith (J)	12	11	11	15	13

ANNEXE 6 : STATISTIQUES DESCRIPTIVES DES RESULTATS

1. Diamètres des zones d'inhibition des bactéries sensibles aux différentes concentrations du miel (mm)

	20%			50%			70%			100%		
	N actifs	Moyenne	Ecart-type	N actifs	Moyenne	Ecart-type	N actifs	Moyenne	Ecart-type	N actifs	Moyenne	Ecart-type
<i>E.coli</i>	3	09,66	1,15	3	11,66	2,08	3	12,33	1,15	3	19	1,73
<i>Enterobacter sp.</i>	3	13,66	0,57	3	13,66	1,52	3	14,33	2,51	3	15	2
<i>S. aureus</i>	3	15,66	4,04	3	18	4,35	3	16,66	0,57	3	19	3,46
<i>S. intermedius</i>	3	10,33	0,57	3	11,66	0,57	3	12	1	3	16,33	0,57
<i>E. faecalis</i>	3	13,66	0,57	3	12,33	0,57	3	12	0	3	14,33	0,57
ANOVA (P-value)	0,016			0,033			0,006			0,043		

	T-test (P-value)			
	20%	50%	70%	100%
<i>E. coli</i> VS <i>Enterobacter sp.</i>	0,005	0,250	0,279	0,058
<i>E. coli</i> VS <i>S. aureus</i>	0,068	0,085	0,004	1
<i>E. coli</i> VS <i>S. intermedius</i>	0,421	1	0,724	0,064
<i>E. coli</i> VS <i>E. faecalis</i>	0,005	0,621	0,643	0,011
<i>Enterobacter sp.</i> VS <i>S. aureus</i>	0,443	0,179	0,192	0,158
<i>Enterobacter sp.</i> VS <i>S. intermedius</i>	0,002	0,101	0,209	0,329
<i>Enterobacter sp.</i> VS <i>E. faecalis</i>	1	0,230	0,183	0,608
<i>S. aureus</i> VS <i>S. intermedius</i>	0,086	0,067	0,002	0,258
<i>S. aureus</i> VS <i>E. faecalis</i>	0,443	0,089	0,0001	0,082
<i>S. intermedius</i> VS <i>E. faecalis</i>	0,002	0,230	1	0,013

2. Diamètres des zones d'inhibition des bactéries sensibles aux différents extraits de *N. sativa L.* (mm)

	EAE			EE			EM		
	N actifs	Moyenne	Ecart-type	N actifs	Moyenne	Ecart-type	N actifs	Moyenne	Ecart-type
<i>E. coli</i>	3	10	0	3	10	0	3	0	0
<i>Enterobacter sp.</i>	3	13,66	0,57	3	11,66	0,57	3	11,66	0,57
<i>S. aureus</i>	3	12	1	3	10,66	1,15	3	12,66	0,57
<i>S. intermedius</i>	3	15,66	0,57	3	12	1	3	13,66	0,57
<i>E. faecalis</i>	3	0	0	3	12,66	0,57	3	12,33	1,15
ANOVA (P-value)	0,00003			0,012			0,066		

	T-test (P-value)		
	EAE	EE	EM
<i>E. coli</i> VS <i>Enterobacter sp.</i>	0,0003	0,007	X
<i>E. coli</i> VS <i>S. aureus</i>	0,025	0,373	X
<i>E. coli</i> VS <i>S. intermedius</i>	0,00007	0,025	X
<i>E. coli</i> VS <i>E. faecalis</i>	X	0,001	X
<i>Enterobacter sp.</i> VS <i>S. aureus</i>	0,066	0,250	0,101
<i>Enterobacter sp.</i> VS <i>S. intermedius</i>	0,013	0,643	0,013
<i>Enterobacter sp.</i> VS <i>E. faecalis</i>	X	0,101	0,421
<i>S. aureus</i> VS <i>S. intermedius</i>	0,005	0,205	0,101
<i>S. aureus</i> VS <i>E. faecalis</i>	X	0,055	0,677
<i>S. intermedius</i> VS <i>E. faecalis</i>	X	0,373	0,148

3. Surfaces des plaies expérimentales à J₀ (mm²)

	N actifs	Moyenne	Ecart-type	ANOVA (P-value)
MN 1	5	93,2	16,67	0,335
MN 2	5	119	31,65	
MN 3	5	104,8	11,45	
Miel	5	91,2	11,62	
Cicatryl-bio [®]	5	99	17,93	

4. Pourcentages de contraction des plaies traitées à J₇ (%)

	N actifs	Moyenne	Ecart-type	ANOVA (P-value)
MN 1	5	62,14	26,86	0,0078
MN 2	5	47,77	11,57	
MN 3	5	64,42	17,66	
Miel	5	66,5	17,17	
Cicatryl-bio [®]	5	25,05	11,97	

	T-test (P-value)
MN 1 VS Cicatryl-bio [®]	0,022
MN 2 VS Cicatryl-bio [®]	0,015
MN 3 VS Cicatryl-bio [®]	0,003
Miel VS Cicatryl-bio [®]	0,002
MN 1 VS Miel	0,767
MN 2 VS Miel	0,077
MN 3 VS Miel	0,855
MN 1 VS MN 3	0,877
MN 2 VS MN 3	0,115
MN 1 VS MN 2	0,304

5. Périodes de ré-épithélialisation des plaies traitées (N^{bre} de J)

	N actifs	Moyenne	Ecart-type	ANOVA (P-value)
MN 1	5	13,6	4,21	0,609
MN 2	5	15,6	4,15	
MN 3	5	12,2	2,16	
Miel	5	13,4	3,04	
Cicatryl-bio[®]	5	13,8	2,28	

	T-test (P-value)
MN 1 VS Cicatryl-bio[®]	0,927
MN 2 VS Cicatryl-bio[®]	0,420
MN 3 VS Cicatryl-bio[®]	0,288
Miel VS Cicatryl-bio[®]	0,820
MN 1 VS Miel	0,933
MN 2 VS Miel	0,368
MN 3 VS Miel	0,493
MN 1 VS MN 3	0,527
MN 2 VS MN 3	0,143
MN 1 VS MN 2	0,471

Effet cicatrisant et antibactérien du miel et des extraits de graines de *Nigella sativa* L. sur des bactéries isolées à partir des plaies superficielles des animaux domestiques.

Résumé :

La cicatrisation des plaies est un processus complexe, qui est influencé par de multiples facteurs. Le traitement des plaies reste un axe important de la recherche dans ce domaine. L'utilisation de produits naturels pour des traitements alternatifs est de plus en plus utilisée au cours de ces dernières décennies. Le miel et les graines de *Nigella sativa* L. sont considérés comme les plus anciens produits de la médecine alternative.

L'extraction par macération de la poudre grossière de graines de *Nigella sativa* L. dans des solvants de polarité croissante (acétate d'éthyle, éthanol 96 % et méthanol) a permis d'obtenir trois extraits visqueux différents, et avec les rendements suivants : l'extrait d'acétate d'éthyle (23,22%), l'extrait méthanolique (08,98%) et l'extrait éthanolique (08,37%).

L'étude bactériologique de deux plaies superficielles d'un chaton et d'un chien a permis d'isoler 5 souches bactériennes qui ont été identifiées par les différents tests bactériologiques classiques et par les tests biochimiques aussi. Ces souches bactériennes ont été des Gram- : *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.* et des Gram+ : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* et *Enterococcus faecalis*.

L'exploration in vitro de l'effet antibactérien d'un miel poly-floral récolté dans la région d'El-Eulma (Sétif) et des extraits méthanolique, éthanolique et d'acétate d'éthyle de graines de *Nigella sativa* L. sur les souches bactériennes par la méthode de diffusion des puits sur gélose (*Agar well diffusion assay*) a démontré que les différentes concentrations du miel étudiées (20%, 50%, 70% et 100% ; v/v) ont été actives sur toutes les souches bactériennes, et les différents extraits de graines de *Nigella sativa* L. ont présenté à la concentration 300 mg/ml une activité variable sur ces souches bactériennes. Il est à signaler que l'extrait éthanolique a été actif sur toutes les souches bactériennes, tandis que l'extrait méthanolique a été inactif sur *Escherichia coli* et l'extrait d'acétate d'éthyle a été inactif sur *Enterococcus faecalis*.

L'étude de l'influence de l'addition de 5% (p/p) des extraits méthanolique, éthanolique et d'acétate d'éthyle de graines de *Nigella sativa* L. sur l'activité antibactérienne et la concentration minimale bactéricide (CMB) du miel par la méthode de dilution en bouillon (*Broth Dilution Method*) a montré qu'il y'a un antagonisme et un synergisme entre ces extraits et le miel selon le type d'extrait additionné et la souche bactérienne testée. Il en ressort de ces résultats que l'extrait méthanolique est le meilleur additif utilisé pour potentialiser l'effet antibactérien du miel, ce qui a permis de diminuer la CMB du miel contre *Enterobacter sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* et *Enterococcus faecalis*.

L'étude de l'influence de l'addition de 5% (p/p) des extraits méthanolique, éthanolique et d'acétate d'éthyle de graines de *Nigella sativa* L. sur l'activité cicatrisante du miel sur des plaies expérimentales d'excision d'un lambeau cutané de pleine épaisseur de la peau de 5 lapins a montré aussi qu'il y'a un antagonisme et un synergisme entre ces extraits et le miel selon le type d'extrait additionné. Il en ressort aussi que l'extrait méthanolique est le meilleur additif à utiliser pour améliorer l'effet cicatrisant du miel car il permet aussi d'obtenir un pourcentage de contraction des plaies à J₇ plus élevé par rapport au celui obtenu avec les autres extraits, et plus élevé significativement (p<0,05) par rapport à celui obtenu par l'application du Cicatryl-Bio[®]. Il est d'intérêt de signaler que le mélange de l'extrait méthanolique au miel a permis d'obtenir la période de ré-épithélialisation des plaies la plus courte.

Mots clés : Miel, *Nigella sativa* L., Bactéries, Effet antibactérien, Plaie, Effet cicatrisant, Animaux domestiques.

Healing and antibacterial effect of honey and extracts of Black Seed on bacteria isolated from superficial wounds of domestic animals.

Summary:

Wound healing is a complex process that is influenced by multiple factors. Wound treatment remains an important focus of research. The use of natural products as an alternative treatment has been rising in recent decades. Honey and Black Seed are considered between the oldest methods used in alternative medicine.

The extraction by maceration of the coarse powder of Black Seed in solvents of increasing polarity (ethyl acetate, ethanol 96% and methanol) yielded three different viscous extracts with the following yields : extract of ethyl acetate (23.22%), the methanol extract (08.98%) and the ethanol extract (08.37%).

The bacteriological study of two superficial wounds of a kitten and a dog was used to isolate five bacterial strains that have been identified by various classical bacteriological tests and biochemical tests. These bacterial strains were Gram- : *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.* and Gram+: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Enterococcus faecalis*.

In vitro exploration of antibacterial effect of a poly-floral honey harvested in the region of El-Eulma (Sétif) and methanolic, ethanolic and ethyl acetate extracts of Black Seed on bacterial strains by the method of *agar well diffusion assay* showed that different concentrations of studied honey (20%, 50%, 70% and 100%, v/v) were active on all bacterial strains, and various extracts of Black Seed presented at the concentration of 300 mg/ml a varying activity on these bacterial strains with the ethanolic extract was active on all bacterial strains but the methanolic extract was inactive on *Escherichia coli* and the ethyl acetate extract was inactive on *Enterococcus faecalis*.

The study of the influence of the addition of 5% (w/w) of methanolic, ethanolic and ethyl acetate extracts of Black Seed on the antibacterial activity and the minimal bactericidal concentration (MBC) of honey by the *broth dilution method* showed that there an antagonism and a synergism between the extracts and honey depending on the type of added extract and the tested bacterial strain and that has being showed that the methanolic extract is the best additive to potentiate the antibacterial effect of honey with the addition of this extract reduced the CMB of honey against *Enterobacter spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Enterococcus faecalis*.

The study of the influence of the addition of 5% (w/w) of methanolic, ethanolic and ethyl acetate extracts of Black Seed on the healing activity of honey on experimental wounds of excision of a skin flap of full thickness of 5 rabbits also showed that there an antagonism and a synergism between the extracts and honey depending on the type of added extract as he stood also that the methanolic extract is the best additive for improving the healing effect of honey with the addition of this extract to honey yielded a higher percentage of wound contraction at 7 days compared to that obtained by addition of other extracts and more significantly elevated ($p < 0.05$) compared to that obtained by applying the Cicatryl-Bio[®], and the addition of methanolic extract to honey yielded the shorter period of re-epithelialization of the wound.

Keywords: Honey, *Nigella sativa* L., Bacteria, Antibacterial effect, Wound, Healing effect, Domestic animals.

المفعول اللانم والمضاد للبكتيريا للعسل و لمستخلصات بذور حبة البركة على بكتيريا معزولة من جروح سطحية لحيوانات أليفة

ملخص:

التئام الجروح هي عملية معقدة تتأثر بعوامل متعددة، لا يزال علاج الجروح محورا مهما للبحث، استخدام المنتجات الطبيعية كعلاج بديل قد ارتفع في العقود الأخيرة، العسل و بذور حبة البركة هي من أقدم الطب البديل. الاستخراج بواسطة النقع لمسحوق خشن من بذور حبة البركة في مذيبات ذو استقطاب متزايد (خلات الايثيل، ايثانول و ميثانول) أسفر عن ثلاثة مستخلصات لزجة مختلفة مع العوائد التالية : مستخلص خللات الايثيل (23,22%)، مستخلص الميثانول (08,98%) و مستخلص الايثانول (08,37%).

سمحت الدراسة البكتيريولوجية لجرحين سطحيين لقط صغير و كلب بعزل خمسة أصناف من البكتيريا التي تم تحديد أصنافها بعدة اختبارات بكتيريولوجية كلاسيكية و اختبارات بيوكيميائية و كانت هذه السلالات البكتيرية غرام (+) : *Staphylococcus aureus*.

الاستكشاف في التأثير المضاد للبكتيريا في المختبر لعسل من مصدر متعدد الأزهار تم جنيه في منطقة العلمة (سطيف) و لمستخلصات الميثانول، الايثانول و خللات الايثيل لبذور حبة البركة على السلالات البكتيرية من خلال طريقة *agar well diffusion assay* أظهرت أن التركيزات المختلفة للعسل المدروس (20%، 50%، 70%، 100% ؛ ح/ح) كانت فعالة على جميع السلالات البكتيرية، و المستخلصات المختلفة لبذور حبة البركة قدمت مع تركيز 300 ملغ/مل فعالية متفاوتة على هذه السلالات البكتيرية بحيث أن مستخلص الايثانول كان فعالا على جميع السلالات البكتيرية و لكن مستخلص الميثانول كان غير فعال على *Escherichia coli* و كذلك مستخلص خللات الايثيل كان غير فعال على *Enterococcus faecalis*.

دراسة تأثير إضافة 5% (ث/ث) من مستخلصات الميثانول، الايثانول و خللات الايثيل لبذور حبة البركة على الفعالية المضادة للبكتيريا و على الحد الأدنى للتركيز القاتل للبكتيريا للعسل من خلال طريقة *Broth dilution method* أظهرت أن هناك معاكسة و تعاون بين هذه المستخلصات و العسل تبعا لنوع المستخلص المضاف و السلالة البكتيرية التي يجري اختبارها و قد ظهر أن مستخلص الميثانول هو أفضل إضافي لتحفيز المفعول المضاد للبكتيريا للعسل بحيث أن إضافة هذا المستخلص خفضت الحد الأدنى للتركيز القاتل للبكتيريا للعسل ضد *Enterobacter sp.*

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus intermedius*, *Enterococcus faecalis*, دراسة تأثير إضافة 5% (ث/ث) من مستخلصات الميثانول، الايثانول و خللات الايثيل لبذور حبة البركة على الفعالية اللانمة للعسل على جروح تجريبية باستئصال جزء جلدي ذو سمك كامل من جلد 5 أرانب أظهرت أيضا أنه هناك معاكسة و تعاون بين هذه المستخلصات و العسل تبعا لنوع المستخلص المضاف و قد ظهر أن مستخلص الميثانول هو أفضل إضافي لتحسين المفعول اللانم للعسل بحيث أن إضافة هذا المستخلص إلى العسل أسفرت عن نسبة انكماش الجروح في اليوم السابع عالية مقارنة بما كان يحصل عليها بإضافة المستخلصات الأخرى وعالية بشكل ملحوظ ($p > 0,05$) مقارنة مع تلك التي تم الحصول عليها من خلال استعمال Cicatryl-Bio[®] كما أن إضافة مستخلص الميثانول للعسل أسفرت عن أقصر فترة إعادة اندمال بتشكيل النسيج الظاهري للجروح.

كلمات البحث: العسل، حبة البركة، بكتيريا، مفعول مضاد للبكتيريا، جرح، مفعول لانم، حيوانات أليفة.