



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale
- Pas de Modification 4.0 France (CC BY-NC-ND 4.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2025 - Thèse n° 131

LE MIEL ET SON EMPLOI THÉRAPEUTIQUE DANS LA CICATRISATION CUTANÉE CHEZ LE CHIEN : ÉTUDES BIBLIOGRAPHIQUE ET *IN VITRO*.

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 28 novembre 2025
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

BACCONNIER Solène

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2025 - Thèse n° 131

LE MIEL ET SON EMPLOI THÉRAPEUTIQUE DANS LA CICATRISATION CUTANÉE CHEZ LE CHIEN : ÉTUDES BIBLIOGRAPHIQUE ET *IN VITRO*.

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 28 novembre 2025
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

BACCONNIER Solène

Liste des enseignants du 27/10/2025

NOM	Prénom	Statut
ABITBOL	Marie	Professeur
ALVES DE OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences
ARCANGIOLI	Marie-Anne	Professeur
AYRAL	Florence	Maître de conférences
BECKER	Claire	Professeur
BELLUCO	Sara	Professeur
BENAMOU - SMITH	Agnès	Maître de conférences
BERNY	Philippe	Professeur
BLONDEL	Margaux	Maître de conférences
BONNET	Jeanne-Marie	Professeur Émérite
BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences
BRASSARD	Colline	Maître de conférences
BRUTO	Maxime	Maître de conférences
BRUYERE	Pierre	Professeur
BUFF	Samuel	Professeur
BURONFOSSE	Thierry	Professeur
CACHON	Thibaut	Maître de conférences
CADORE	Jean-Luc	Professeur Émérite
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Professeur
CANNON	Leah	Maître de conférences
CHABANNE	Luc	Professeur
CHALVET-MONFRAY	Karine	Professeur
CHANOIT	Guillaume	Professeur
CHETOT	Thomas	Maître de conférences
DE BOYER DES ROCHES	Alice	Professeur
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur
DJELOUADJI	Zorée	Professeur
ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences
GALIA	Wessam	Maître de conférences
GILLET	Benoit	Maître de conférences
GILOT	Emmanuelle	Professeur
GONTHIER	Alain	Maître de conférences
HUGONNARD	Marine	Maître de conférences
HUMBERT	Alexandre	Maître de conférences Stagiaire
JUNOT	Stéphane	Professeur

KIM	Mark	Maître de conférences Stagiaire
KODJO	Angeli	Professeur
KRAFFT	Émilie	Maître de conférences
LAABERKI	Maria-Halima	Professeur
LE GRAND	Dominique	Professeur
LEBLOND	Agnès	Professeur
LEDOUX	Dorothée	Maître de conférences
LEFEBVRE	Sébastien	Maître de conférences
LEGROS	Vincent	Maître de conférences
LEPAGE	Olivier	Professeur
LOUZIER	Vanessa	Professeur
LURIER	Thibaut	Maître de conférences
MAGNIN	Mathieu	Maître de conférences
MARCHAL	Thierry	Professeur
MOSCA	Marion	Maître de conférences
MOUNIER	Luc	Professeur
PEROZ	Carole	Maître de conférences
PIN	Didier	Professeur
PONCE	Frédérique	Professeur
PORPHYRE	Thibaud	Professeur Stagiaire
PORSMOQUER	Charles	Maître de conférences Stagiaire
PORTIER	Karine	Professeur
POUZOT-NEVORET	Céline	Professeur
PROUILLAC	Caroline	Professeur
RACHED	Antoine	Maître de conférences
REMY	Denise	Professeur
RENE MARTELLET	Magalie	Maître de conférences
ROGER	Thierry	Professeur
SAWAYA	Serge	Maître de conférences
SCHRAMME	Michaël	Professeur
SERGENTET	Delphine	Professeur
STORCK	Fanny	Professeur
TORTEREAU	Antonin	Maître de conférences
VICTONI	Tatiana	Maître de conférences
ZENNER	Lionel	Professeur

Remerciements au jury

À Madame la Professeure Marie ABITBOL,

*Docteur en médecine vétérinaire, enseignante-chercheuse en génétique à
VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon,*

Pour m’avoir fait l’honneur d’accepter la présidence de mon Jury de thèse,

Pour votre disponibilité et votre bienveillance tout au long de ma scolarité,

Hommages respectueux.

À Monsieur le Professeur Didier PIN,

*Docteur en médecine vétérinaire, enseignant-chercheur en dermatologie à
VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon,*

Pour avoir accepté d’encadrer la réalisation de ce manuscrit,

Pour votre disponibilité, votre accessibilité, votre gentillesse, vos corrections,

Et votre enthousiasme dans ce travail de thèse.

Mes plus sincères remerciements.

À Madame la maître de conférences Margaux BLONDEL,

*Docteur en médecine vétérinaire, PhD, diplômée ECVS en chirurgie des animaux de
compagnie, VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon,*

Pour m’avoir fait l’honneur d’accepter ce rôle de second assesseur de thèse,

Remerciements chaleureux.



Table des matières

Liste des figures	9
Listes des tableaux	11
Liste des abréviations	13
Introduction	15
PARTIE I.....	17
Revue de littérature : regards croisés sur le miel et la peau	17
I. Le miel.....	17
A. La composition.....	17
B. Les propriétés	22
C. L'intérêt en médecine.....	26
II. La peau	28
A. Structure et fonctions	28
B. La cicatrisation cutanée.....	32
C. Les modèles expérimentaux	38
III. Conclusion sur l'intérêt du miel	43
PARTIE II	45
Étude de l'effet antibactérien des miels de lavande et de châtaigner	45
I. Matériel et Méthodes.....	45
A. Matériel biologique et réactifs.....	45
B. Méthode.....	46
II. Résultats	52
A. Epreuve de faisabilité	52
B. Expérimentation complète.....	55
III. Discussion	58

IV. Conclusion.....	60
PARTIE III	61
Étude de la cytotoxicité du miel de châtaigner sur une lignée de kératinocytes et de fibroblastes canins.....	61
I. Matériel et Méthodes.....	61
A. Matériel biologique et réactifs.....	61
B. Méthodes	62
II. Résultats	67
A. Observation microscopique des cellules avant mise en contact avec le miel	67
B. Après 6 heures d'incubation.....	68
C. Après 24 heures d'incubation.....	73
D. Après 30 heures d'incubation.....	77
E. Après 48 heures d'incubation.....	79
III. Discussion	84
IV. Conclusion.....	86
Conclusion.....	87
Bibliographie	89

Liste des figures

Figure 1 : Composition moyenne du miel.	18
Figure 2 : Schéma des propriétés antibactériennes du miel	23
Figure 3 : Structure de l'épiderme.....	29
Figure 4 : Structure globale de la peau	31
Figure 5 : Les différentes phases de la cicatrisation cutanée.....	34
Figure 6 : Plan de plaque de l'épreuve de faisabilité.....	48
Figure 7 : Plan de la plaque 1 de l'expérience complète	49
Figure 8 : Plan de la plaque 2 de l'expérience complète	50
Figure 9 : Schéma explicatif de la détermination de la CMI.....	51
Figure 10 : Schéma explicatif de la détermination de la CMB	51
Figure 11 : Photos de la plaque de l'épreuve de faisabilité post incubation	52
Figure 12 : Résultats de l'épreuve de faisabilité	53
Figure 13 : Photos des plaques 1 (a) et 2 (b) de l'expérimentation complète post incubation.....	55
Figure 14 : Résultats de l'expérimentation complète de la plaque 1	56
Figure 15 : Résultats de l'expérimentation complète de la plaque 2.....	56
Figure 16 : Résultats de la vérification de la compatibilité entre le réactif CCK8, les milieux de culture et le miel de châtaigner	63
Figure 17 : Plan de plaque aux concentrations initiales de miel.	64
Figure 18 : Plan de plaque aux concentrations diminuées de miel.....	64
Figure 19 : Planche photographique de l'observation microscopique des cellules avant mise en contact avec le miel	67
Figure 20 : Planche photographique de l'observation microscopique des fibroblastes après 6h de mise en contact avec le miel aux concentrations initiales	68
Figure 21 : Planche photographique de l'observation microscopique des kératinocytes après 6h de mise en contact avec le miel aux concentrations initiales...	69
Figure 22 : Planche photographique de l'observation microscopique des fibroblastes après 6h de mise en contact avec le miel aux concentrations diminuées .	71
Figure 23 : Planche photographique de l'observation microscopique des kératinocytes après 6h de mise en contact avec le miel aux concentrations diminuées	72
Figure 24 : Planche photographique de l'observation microscopique des fibroblastes après 24h de mise en contact avec le miel entre 0 et 10 %	74

Figure 25 : Planche photographique de l'observation microscopique des kératinocytes après 24h de mise en contact avec le miel entre 0 et 10%	75
Figure 26 : Planche photographique de l'observation microscopique des fibroblastes après 30h de mise en contact avec le miel entre 0 et 10 %.....	77
Figure 27 : Planche photographique de l'observation microscopique des kératinocytes après 30h de mise en contact avec le miel entre 0 et 10 %..	78
Figure 28 : Planche photographique de l'observation microscopique des fibroblastes après 48h de mise en contact avec le miel entre 0 et 10 %.....	80
Figure 29 : Planche photographique de l'observation microscopique des kératinocytes après 48h de mise en contact avec le miel entre 0 et 10 %	81
Figure 30 : Diagramme de synthèse de la viabilité des fibroblastes après contact avec le miel entre 0 et 10 %.....	83
Figure 31 : Diagramme de synthèse de la viabilité des kératinocytes après contact avec le miel entre 0 et 10 %.....	83

Liste des tableaux

Tableau I : Tableau comparatif entre les miels de lavande, de châtaignier et de manuka.....	21
Tableau II : Tableau récapitulatif des facteurs influençant et retardant la cicatrisation.	37
Tableau III : Tableau comparatif des modèles expérimentaux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> dans l'étude de la cicatrisation cutanée.....	42
Tableau IV : Gamme de dilution des miels	47
Tableau V : Tableau récapitulatif des résultats de l'épreuve de faisabilité	54
Tableau VI : Tableau récapitulatif des résultats de l'expérimentation complète	57
Tableau VII : Tableau des densités optiques des fibroblastes obtenues après 6h de mise en contact avec le miel aux concentrations initiales	70
Tableau VIII : Tableau des densités optiques des kératinocytes obtenues après 6h de mise en contact avec le miel aux concentrations initiales..	70
Tableau IX : Tableau de viabilité des fibroblastes et des kératinocytes après 6h de contact avec le miel aux concentrations entre 0 et 10 %.	73
Tableau X : Tableau de viabilité des fibroblastes et des kératinocytes après 24h de contact avec le miel entre 0 et 10 %.	76
Tableau XI : Tableau de viabilité des fibroblastes et des kératinocytes après 30h de contact avec le miel entre 0 et 10 %.	79
Tableau XII : Tableau de viabilité des fibroblastes et des kératinocytes après 48h de contact avec le miel entre 0 et 10 % (objectif x20).	82
Tableau XIII : Tableau de synthèse de la viabilité des fibroblastes et des kératinocytes après contact avec le miel aux concentrations diminuées.	82

Liste des abréviations

2D : Deux dimensions
3D : Trois dimensions
BMR : Bactéries multi-résistantes
CCK-8 : *Cell Counting Kit-8*
CLSI : *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CMB : Concentration minimale bactéricide
CMI : Concentration minimale inhibitrice
CPEK : *Canine Progenitor Epidermal Keratinocytes*
DMEM : *Dulbecco's modified Eagle's medium*
DO : Densité optique
ECVS : *European College Of Veterinary Surgeons*
et al. : *et alii*
EUCAST : *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
FAO : *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
IL-1 : Interleukine 1
IL-10 : Interleukine 10
IL-1 β : Interleukine 1 bêta
IL-6 : Interleukine 6
MGO : Méthylglyoxal
MHS : Milieu Mueller Hinton
PAV : Pôle d'Analyses de VetAgro Sup
PBS : Tampon phosphate salin
PDGF : *platelet-derived growth factor*
PhD : *Doctor of Philosophy*
PSM : Poste de sécurité microbiologique
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
SKOV-3 : Lignée cellulaire cancéreuse ovarienne
TGF- β : Facteur de croissance transformant (cytokine)
TNF- α : Facteur de nécrose tumorale
UE : Union Européenne

UMF : *Unique Manuka Factor*
VEGF : *Vascular endothelial growth factor*
WHO : *World Health Organization*
WST-8 : *Water soluble tetrazolium 8*
XTT : Kit de prolifération cellulaire

% : Pourcent
+ : Plus
- : Moins
 $\approx$: Environ égale à
 $<$: Inférieur à
 $\leq$: Inférieur ou égale à
°C : Degrés Celsius
 μ L : Microlitre
CO₂ : Dioxyde de carbone
éd. : Édition
Etc. : *et cætera*
h : Heure
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
mL : Millilitre
NaCl : Chlorure de sodium
nm : Nanomètre
O₂ : Dioxygène

Introduction

Les plaies cutanées constituent un motif fréquent de consultation en médecine vétérinaire (Lux, 2022 ; McGavin & Zachary, 2007). Leur prise en charge représente souvent un défi pour le praticien, notamment en raison du risque d'infection et des complications associées à certaines cicatrisations retardées ou chroniques. Le recours à des antibiotiques topiques ou systémiques reste encore courant dans la gestion de ces affections (McLoone *et al.*, 2020 ; Almasaudi, 2021), alors que la lutte contre l'antibiorésistance impose aujourd'hui une utilisation raisonnée de ces molécules (Pasupuleti *et al.*, 2017 ; WHO, 2020). Dans ce contexte, la recherche d'alternatives naturelles et efficaces pour soutenir le processus de cicatrisation tout en réduisant le recours aux antibiotiques apparaît comme une voie prometteuse.

Le miel fait partie des produits naturels suscitant un intérêt croissant dans ce domaine. Utilisé depuis l'Antiquité pour ses propriétés thérapeutiques (Pasupuleti *et al.*, 2017), il bénéficie aujourd'hui d'un regain d'attention, notamment en médecine humaine, pour la gestion des plaies et des infections cutanées (Martinotti & Ranzato, 2018 ; Kurek-Górecka *et al.*, 2020). Ses multiples propriétés en font un candidat intéressant pour une utilisation en médecine vétérinaire.

Si le miel de Manuka, originaire de Nouvelle-Zélande, est aujourd'hui le plus étudié et le plus utilisé dans les dispositifs médicaux à usage humain (Johnston *et al.*, 2021 ; McLoone *et al.*, 2020), son importation soulève des questions écologiques et économiques. Dans une perspective de durabilité et de valorisation des ressources locales, il apparaît donc pertinent d'explorer le potentiel thérapeutique de miels produits en France. Parmi ceux-ci, le miel de lavande et le miel de châtaignier présentent des caractéristiques distinctes et complémentaires : le premier est traditionnellement utilisé pour ses propriétés apaisantes et antiseptiques, tandis que le second est reconnu pour sa richesse naturelle et son pouvoir antimicrobien souvent plus marqué (Kurek-Górecka *et al.*, 2020 ; Pasupuleti *et al.*, 2017 ; Martinotti & Ranzato, 2018). Leur disponibilité et leur origine florale bien identifiée justifient leur sélection pour cette étude.

Les travaux déjà publiés en médecine humaine ont permis de démontrer l'efficacité du miel dans la cicatrisation de plaies infectées, de brûlures ou d'ulcères chroniques (McLoone *et al.*, 2020 ; Martinotti & Ranzato, 2018). Cependant, les données restent encore limitées chez les carnivores domestiques, et les mécanismes d'action du miel dans un contexte vétérinaire

demeurent à préciser (Vogt *et al.*, 2021 ; Lux, 2022). Il semble donc essentiel de mieux comprendre les propriétés fondamentales du miel susceptibles d'intervenir dans la cicatrisation cutanée, notamment son activité antibactérienne et son innocuité cellulaire (Pasupuleti *et al.*, 2017 ; Martinotti & Ranzato, 2018). Ces éléments constituent des prérequis indispensables avant toute application clinique chez l'animal.

L'objectif de ce travail de thèse est donc d'évaluer, par une approche expérimentale *in vitro*, les propriétés du miel susceptibles d'influencer favorablement la cicatrisation cutanée, en se concentrant sur deux aspects essentiels : son activité antibactérienne sur des bactéries d'intérêt vétérinaire et sa cytotoxicité potentielle sur des lignées cellulaires cutanées canines.

Dans une première partie, une étude bibliographique exposera les connaissances actuelles sur le miel et ses propriétés thérapeutiques, ainsi que les mécanismes de la cicatrisation cutanée et les facteurs pouvant l'altérer. La deuxième partie sera consacrée à l'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des miels de lavande et de châtaignier. Enfin, la troisième partie présentera les résultats de l'étude de cytotoxicité menée sur les lignées cellulaires canines, dans le but d'apprécier l'innocuité du miel de châtaignier et de discuter son potentiel d'utilisation en médecine vétérinaire.

PARTIE I

Revue de littérature : regards croisés sur le miel et la peau

I. Le miel

A. La composition

1. Définition et origine du miel

D'après le Codex Alimentarius (FAO, 2001), le miel est défini comme « la substance naturelle sucrée produite par les abeilles à partir du nectar de plantes ou à partir de sécrétions provenant de parties vivantes de plantes ou à partir d'excrétions d'insectes piqueur-suceurs laissées sur les parties vivantes de plantes, que les abeilles butinent, transforment en les combinant avec des substances spécifiques qu'elles sécrètent, déposent, déshydratent, emmagasinent et laissent affiner et mûrir dans les rayons de la ruche ». La législation de l'Union Européenne précise que l'espèce d'abeille qui produit du miel est l'*Apis mellifera* (Directive 2014/63 / EU).

2. Composition chimique globale

a. Constituants majeurs

Selon Pasupuleti *et al.* (2017), le miel est une solution sursaturée de sucres (environ 82 % de glucides), principalement de fructose (environ 38 %) et de glucose (environ 31 %), auxquels s'ajoutent de nombreuses autres substances actives conférant au miel sa richesse chimique et ses propriétés biologiques. La teneur en eau, généralement comprise entre 15 et 20 %, joue un rôle déterminant dans sa viscosité, sa cristallisation et sa stabilité microbiologique. Outre les sucres simples, le miel contient des oligosaccharides en proportions variables. Ces derniers peuvent influencer certaines de ses propriétés, présentées dans la section suivante. Il renferme également une fraction protéique minoritaire (0,1 à 0,5 %), composée d'enzymes issues de la sécrétion des abeilles. Parmi ces enzymes, l'invertase, la diastase

(α -amylase), la glucose oxydase et la catalase jouent un rôle essentiel dans la transformation du nectar et dans la stabilité chimique du produit final (Pasupuleti *et al.* 2017). Ces enzymes participent notamment à la conversion du saccharose en glucose et fructose (invertase), à la dégradation des polysaccharides (diastase), et à la formation du peroxyde d'hydrogène, molécule centrale dans l'activité antimicrobienne du miel (glucose oxydase). Cette richesse enzymatique, soulignée par Pasupuleti *et al.*, confère au miel une activité biologique intrinsèque, qui le distingue des simples solutions sucrées.

La composition du miel comprend également une diversité de composés phénoliques et flavonoïdes tels que l'acide caféique, l'acide férulique, la quercétine, le kaempférol, la pinocembrine, la galangine... (Kurek-Górecka *et al.*, 2020). Les acides organiques (principalement l'acide gluconique, produit de l'oxydation du glucose par la glucose oxydase) confèrent au miel un pH acide (entre 3,2 et 4,5). La fraction minérale du miel, représentant environ 0,1 à 0,5 %, est constituée d'éléments tels que le potassium, le calcium, le magnésium, le sodium, le phosphore, le fer, le cuivre, le zinc et le manganèse. Le miel contient en outre des vitamines (notamment du groupe B et de la vitamine C), des acides aminés libres comme la proline, marqueur de maturité, ainsi que de petites quantités de composés volatils responsables de ses arômes caractéristiques (Pasupuleti *et al.*, 2017). La composition moyenne du miel est présentée dans la figure 1, illustrant la proportion relative de ses principaux constituants.

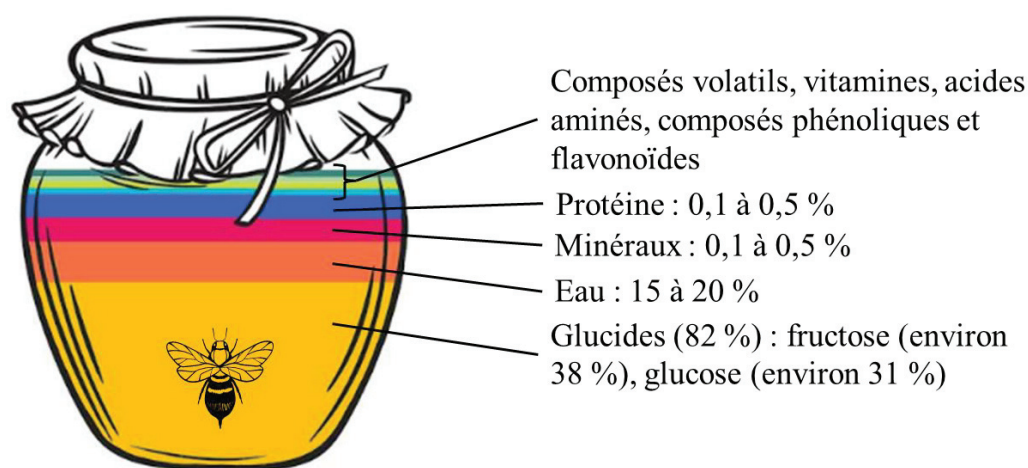


Figure 1 : Composition moyenne du miel. Source : Solène Bacconnier.

b. Facteurs de variation de la composition

La composition du miel, bien que globalement homogène dans sa structure biochimique (principalement constituée de sucres simples, d'eau, d'enzymes et de composés secondaires), présente une variabilité importante en fonction de multiples facteurs liés à l'environnement géographique et climatique, à la flore, à l'espèce d'abeille et aux conditions de transformation (Pasupuleti *et al.*, 2017).

Parmi les facteurs majeurs, l'origine florale joue un rôle déterminant. Chaque espèce végétale confère au nectar une composition spécifique en sucres, acides organiques et composés phénoliques, qui se retrouvent dans le miel final (Kurek-Górecka *et al.*, 2020). Par exemple, les fleurs riches en fructose, comme les fleurs d'acacia, produisent des miels plus doux et plus fluides, tandis que celles à dominance de glucose, telles que le colza, donnent des miels plus cristallisables (Da Silva *et al.*, 2016).

L'origine géographique et climatique influence également la concentration en minéraux et en polyphénols : les miels issus de régions chaudes et sèches tendent à être plus concentrés et riches en composés antioxydants que ceux produits dans des zones tempérées ou humides (Pasupuleti *et al.*, 2017). Cette corrélation s'explique par le stress oxydatif subi par les plantes en climat aride, stimulant la synthèse de métabolites secondaires phénoliques transférés au nectar (Kurek-Górecka *et al.*, 2020).

L'espèce d'abeille productrice constitue un autre facteur de variation. Les différentes espèces (*Apis mellifera*, *Apis dorsata*, *Apis cerana*) ne possèdent pas le même répertoire enzymatique, ce qui modifie la proportion de sucres réduits et l'activité enzymatique du miel (Johnston *et al.*, 2021). Ces différences peuvent influencer la vitesse de maturation du nectar et le profil biochimique final.

Enfin, les conditions de récolte, de transformation et de stockage, exercent une influence non négligeable. La température de conservation, l'exposition à la lumière et la durée de stockage modifient la stabilité des enzymes (glucose oxydase, diastase) et la teneur en composés phénoliques (Kurek-Górecka *et al.*, 2020). Une exposition prolongée à la chaleur ou à l'humidité peut ainsi entraîner une dégradation partielle des constituants bioactifs et réduire les propriétés thérapeutiques du miel.

Ainsi, la composition du miel résulte d'un équilibre entre facteurs biologiques (flore, abeilles) et environnementaux (climat, stockage), donnant à chaque miel un profil biochimique unique.

c. Exemples de compositions selon l'origine florale

Les caractéristiques physico-chimiques et bioactives du miel varient significativement selon l'origine florale. Trois miels à fort intérêt thérapeutique et bien documentés illustrent cette diversité : les miels de lavande, de châtaignier et de manuka.

Le miel de lavande est généralement clair, à arôme floral prononcé, et contient des taux élevés de fructose et d'acide gluconique, ce qui lui confère une saveur douce et une cristallisation lente. Il est particulièrement riche en acides phénoliques dérivés de l'acide caféique et en flavonoïdes tels que la quercétine et la lutéoline (Kurek-Górecka *et al.*, 2020). Ces composés participent à son activité antioxydante et légèrement antibactérienne (Pasupuleti *et al.*, 2017).

Le miel de châtaignier, à la couleur foncée et à l'amertume caractéristique, présente une teneur élevée en polyphénols et en minéraux, notamment en potassium, magnésium et manganèse (Kurek-Górecka *et al.*, 2020). Sa proportion relativement élevée de fructose par rapport au glucose limite sa cristallisation. Ce miel se distingue par une activité antioxydante supérieure à celle de nombreux miels clairs, corrélée à sa forte concentration en tanins et en composés phénoliques (Pasupuleti *et al.*, 2017). Ces propriétés justifient son emploi traditionnel dans la désinfection et la cicatrisation des plaies cutanées (Martinotti & Ranzato, 2018).

Le miel de manuka, issu du *Leptospermum scoparium* néo-zélandais, se caractérise par la présence d'un composé unique : le méthylglyoxal (MGO), dérivé de la dihydroxyacétone présente dans le nectar (Johnston *et al.*, 2021). Ce composé confère au miel de manuka une activité antibactérienne spécifique et stable, désignée sous le terme Unique Manuka Factor (UMF). Sa teneur élevée en MGO, en association avec ses enzymes (glucose oxydase, catalase), en fait un miel de référence dans la recherche biomédicale pour ses applications en cicatrisation cutanée et lutte contre l'antibiorésistance (McLoone *et al.*, 2020).

Les miels de lavande, de châtaignier et de manuka illustrent trois profils biochimiques distincts, chacun associé à des propriétés thérapeutiques spécifiques. Le tableau I résume les

principales caractéristiques physico-chimiques et biologiques de ces miels selon leur origine florale.

Tableau I : Tableau comparatif entre les miels de lavande, de châtaignier et de manuka. Source : Solène Bacconnier.

Type de miel	Caractéristiques physico-chimiques	Principaux composés bioactifs	Activités biologiques dominantes
Lavande	Clair, riche en fructose et acide gluconique, cristallisation lente	Quercétine, lutéoline, acide caféique	Antioxydante, antibactérienne modérée
Châtaignier	Foncé, riche en polyphénols et minéraux (K, Mg, Mn)	Tanins, acide gallique, quercétine	Antioxydante élevée, cicatrisante
Manuka	Ambré, visqueux, MGO élevé	Méthylglyoxal, leptospermone	Antibactérienne forte (UMF), cicatrisante

Pour la suite de l'étude, nous nous limiterons aux miels de châtaigner et de lavande pour des raisons écologiques et économiques. Ainsi, la diversité florale détermine non seulement les caractéristiques organoleptiques du miel, mais aussi ses propriétés biologiques et thérapeutiques, qui seront explorées plus en détail dans la partie suivante.

B. Les propriétés

La composition biochimique complexe du miel, riche en sucres simples, enzymes, composés phénoliques et éléments minéraux, se traduit par une large gamme de propriétés biologiques. Ces effets, longtemps observés empiriquement, sont aujourd'hui documentés par de nombreuses études expérimentales et cliniques.

Les constituants du miel agissent de manière synergique pour conférer à ce produit naturel des activités antibactériennes, antioxydantes, anti-inflammatoires et cicatrisantes. Ces propriétés, variables selon l'origine florale et la qualité du miel, expliquent son intérêt croissant en médecine humaine et vétérinaire, notamment dans la prise en charge des plaies cutanées.

1. Propriétés antibactériennes

L'une des caractéristiques les plus étudiées du miel est son activité antibactérienne à large spectre, mise en évidence contre de nombreuses bactéries Gram + et Gram –, y compris des souches multirésistantes telles que *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), *Pseudomonas aeruginosa*, ou *Escherichia coli* (Almasaudi, 2021 ; Johnston *et al.*, 2021 ; McLoone *et al.*, 2020).

Cette action repose sur plusieurs mécanismes complémentaires :

- **L'effet osmotique** : la forte concentration en sucres ($\approx 80\%$) et la faible activité de l'eau créent un environnement hypertonique inhibant la croissance bactérienne.
- **Le pH acide du miel** (3,2–4,5), dû à la présence d'acide gluconique, perturbe la viabilité microbienne et potentialise l'effet d'autres composés (Pasupuleti *et al.*, 2017).
- **La production de peroxyde d'hydrogène** (H_2O_2), par la glucose oxydase, contribue à l'effet bactéricide, notamment dans les miels dilués où cette enzyme reste active (Pasupuleti *et al.*, 2017 ; Johnston *et al.*, 2021).
- Certains miels, notamment le miel de manuka, possèdent une activité antibactérienne non peroxydique, attribuée au **méthylglyoxal** (MGO), molécule issue de la dihydroxyacétone présente dans le nectar du *Leptospermum scoparium* (Johnston *et al.*, 2021). Ce composé réagit avec les protéines et les acides nucléiques des bactéries, entraînant une inhibition métabolique irréversible.
- L'activité antibactérienne est également renforcée par la **présence de flavonoïdes et acides phénoliques** (pinocembrine, caféique, férulique), qui exercent des effets

synergiques avec le peroxyde d'hydrogène (Kurek-Górecka *et al.*, 2020). Ces molécules agissent sur la perméabilité membranaire, la dénaturation des protéines bactériennes et la génération de stress oxydatif. L'ensemble de ces mécanismes est synthétisé dans la figure 2, qui illustre les principales voies d'action antibactérienne du miel.

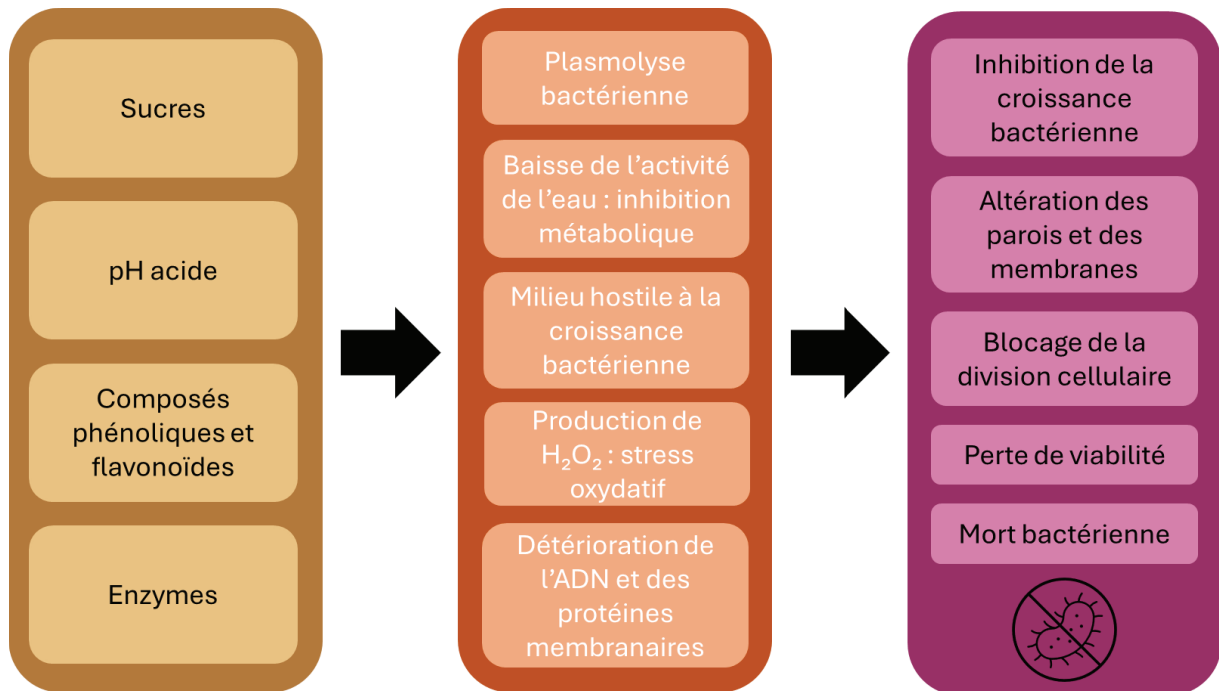


Figure 2 : Schéma des propriétés antibactériennes du miel.

Source : Solène Bacconnier.

Ainsi, le miel agit par une multitude de voies biochimiques rendant le développement de résistances bactériennes peu probable, ce qui en fait un adjuvant intéressant face à l'antibiorésistance croissante (McLoone *et al.*, 2020 ; Almasaudi, 2021).

2. Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires

a. Activité antioxydante

Le miel possède une forte capacité antioxydante, principalement liée à sa richesse en polyphénols, flavonoïdes et composés volatils (Pasupuleti *et al.*, 2017 ; Kurek-Górecka *et al.*, 2020). Ces molécules agissent comme piègeurs de radicaux libres et modulateurs de l'oxydoréduction cellulaire. Les principaux antioxydants identifiés sont la quercétine, la pinocembrine, la chrysine, la galangine, et l'acide caféique, dont la concentration varie selon l'origine florale. Les miels foncés (châtaignier, sarrasin, manuka) présentent une activité antioxydante supérieure à celle des miels clairs (lavande, acacia) en raison de leur teneur plus élevée en polyphénols et en minéraux (Kurek-Górecka *et al.*, 2020). Cette activité contribue non seulement à la protection cellulaire contre le stress oxydatif, mais également à la modulation des phases de cicatrisation, en favorisant un microenvironnement propice à la prolifération cellulaire (Martinotti & Ranzato, 2018).

b. Activité anti-inflammatoire

Les composés phénoliques du miel interviennent également dans la régulation des voies de signalisation inflammatoires. Plusieurs études ont montré que le miel réduit la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 β et IL-6, tout en augmentant l'expression de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) (Pasupuleti *et al.*, 2017 ; Martinotti & Ranzato, 2018). Le miel module notamment la voie de transcription du NF- κ B, limitant la cascade inflammatoire et la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Ces effets sont particulièrement bénéfiques dans le contexte de la cicatrisation cutanée, où un excès d'inflammation retarde la régénération tissulaire. L'action combinée des antioxydants et des anti-inflammatoires naturels du miel favorise donc la résolution rapide du processus inflammatoire tout en protégeant les tissus contre le stress oxydatif secondaire (Martinotti & Ranzato, 2018 ; Kurek-Górecka *et al.*, 2020).

3. Propriétés cicatrisantes et régénératives

a. Effet sur les cellules cutanées

Le miel exerce une action directe sur les cellules de la peau impliquées dans la réparation tissulaire. *In vitro*, il stimule la migration et la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes, ainsi que la production de collagène (Martinotti & Ranzato, 2018). Ces effets sont attribués à la présence combinée de sucres réducteurs, d'acides aminés et de composés phénoliques qui favorisent la synthèse de la matrice extracellulaire. Le miel induit également une angiogenèse locale en augmentant la production de VEGF (*vascular endothelial growth factor*), contribuant à la formation d'un réseau capillaire nécessaire à la régénération tissulaire (Martinotti & Ranzato, 2018).

b. Effet sur les phases de cicatrisation

Le miel agit à différents niveaux du processus cicatriciel, ce qui sera développé ultérieurement :

- **Phase inflammatoire** : par son effet antibactérien et anti-inflammatoire, il limite la charge microbienne et favorise un environnement sain pour la réparation (Pasupuleti *et al.*, 2017).
- **Phase de granulation** : il stimule la prolifération fibroblastique et la néoangiogenèse (Martinotti & Ranzato, 2018).
- **Phase de ré épithélialisation** : il favorise la migration des kératinocytes grâce à un environnement humide, acide et riche en nutriments (McLoone *et al.*, 2020).
- **Phase de remodelage** : la stimulation de la synthèse du collagène et la réduction du stress oxydatif participent à une cicatrice plus stable et moins fibreuse (Martinotti & Ranzato, 2018).

Ces mécanismes convergent vers une accélération globale de la cicatrisation cutanée et une meilleure qualité du tissu régénéré.

En somme, le miel apparaît comme un produit biologique multifonctionnel, combinant effets antimicrobiens, antioxydants, anti-inflammatoires et régénératifs. Ces propriétés, bien documentées *in vitro* et *in vivo* chez plusieurs espèces, justifient l'intérêt croissant pour son utilisation thérapeutique, notamment dans un contexte d'antibiorésistance. La section suivante

s'attachera à explorer cette dimension médicale et à replacer le miel dans le cadre plus large de la médecine vétérinaire contemporaine.

C. L'intérêt en médecine

L'antibiorésistance constitue aujourd'hui l'un des enjeux majeurs de santé publique mondiale. L'augmentation constante des infections provoquées par des bactéries multi-résistantes compromet l'efficacité des antibiotiques conventionnels et met en péril les progrès réalisés dans les domaines de la médecine humaine et vétérinaire. Dans ce contexte, la recherche d'alternatives naturelles dotées d'une activité antimicrobienne avérée s'impose comme une priorité.

Utilisé depuis l'Antiquité pour ses vertus curatives, le miel fait l'objet d'un regain d'intérêt scientifique. Les recherches contemporaines confirment son potentiel thérapeutique, notamment face aux pathogènes résistants. Cet intérêt croissant repose sur des preuves expérimentales et cliniques solides, qui démontrent son efficacité dans le traitement des plaies infectées, des ulcères chroniques et des brûlures. Le miel apparaît ainsi comme une option complémentaire crédible dans la lutte contre l'antibiorésistance, en médecine humaine comme en médecine vétérinaire.

1. Le miel comme alternative naturelle face à l'antibiorésistance

a. Contexte sanitaire

La propagation rapide des bactéries multi-résistantes (BMR) représente une menace majeure pour la santé mondiale. Face à l'émergence de souches pathogènes telles que *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) ou *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant, la recherche se tourne vers des approches thérapeutiques complémentaires.

Dans ce cadre, le miel médical s'impose comme une alternative naturelle à fort potentiel. Sa composition complexe, combinant des mécanismes d'action physico-chimiques et biologiques (acidité, osmolarité, enzymes oxydatives, polyphénols, méthylglyoxal), confère une activité antimicrobienne plurifactorielle à l'encontre de laquelle les bactéries ne développent pas de résistance (Pasupuleti *et al.*, 2017 ; McLoone *et al.*, 2020).

b. Le miel et les bactéries multi-résistantes

Plusieurs études récentes ont démontré l'efficacité du miel contre des pathogènes multi-résistants, notamment *S. aureus* (SARM), *Pseudomonas aeruginosa* et *Clostridium difficile* (McLoone *et al.*, 2020 ; Hammond & Donkor, 2013). Outre son effet bactéricide direct, le miel agit sur des processus critiques de virulence tels que la formation de biofilms, réduisant la persistance et la résistance bactérienne (Martinotti & Ranzato, 2018). Son mode d'action multifactoriel, impliquant à la fois la génération de peroxyde d'hydrogène et la présence de composés spécifiques comme le méthylglyoxal, rend peu probable le développement de résistances croisées (Johnston *et al.*, 2021). Le miel apparaît dès lors non comme un substitut des antibiotiques, mais comme un adjuvant thérapeutique susceptible d'en renforcer l'efficacité et de limiter la pression sélective à l'origine de l'antibiorésistance.

2. Utilisation clinique du miel en médecine humaine

L'emploi du miel à visée thérapeutique, longtemps empirique, s'appuie aujourd'hui sur une base scientifique solide. Des essais cliniques ont confirmé son efficacité dans le traitement des plaies infectées, des brûlures, des ulcères diabétiques et des escarres (Kurek-Górecka *et al.*, 2020 ; McLoone *et al.*, 2020).

Le miel de manuka, standardisé selon son *Unique Manuka Factor* (UMF), est intégré dans de nombreux dispositifs médicaux (pansements, gels, pommades) à usage hospitalier. Son action topique réduit la charge bactérienne, favorise la granulation et accélère l'épithélialisation, tout en améliorant le confort du patient.

De plus, le miel montre une excellente tolérance et ne provoque ni irritation, ni cytotoxicité, ce qui le distingue de plusieurs antiseptiques conventionnels. Cette combinaison d'efficacité et d'innocuité justifie sa place croissante dans les protocoles de soin des plaies chroniques et infectées.

3. Intérêt du miel en médecine vétérinaire

En médecine vétérinaire, l'usage thérapeutique du miel connaît un essor parallèle, soutenu par des observations cliniques convaincantes (Tomczak, 2010 ; Lux, 2022). Appliqué sur des plaies chirurgicales, traumatiques ou infectées chez diverses espèces (chien, chat, cheval, bovin), le miel favorise une cicatrisation rapide, une réduction de la charge bactérienne et une amélioration du confort de l'animal. Son emploi permet de diminuer la fréquence d'utilisation des antibiotiques topiques et systémiques, contribuant ainsi à la politique globale de réduction de l'antibiorésistance en santé animale. Le miel se distingue également par sa disponibilité, sa sécurité d'usage et son faible coût, ce qui en fait une solution accessible, particulièrement adaptée dans les contextes de soins ruraux ou à faibles ressources.

II. La peau

A. Structure et fonctions

La peau des carnivores domestiques, notamment du chien et du chat, constitue le plus grand organe de leur corps et joue un rôle essentiel de barrière protectrice, de régulation et de perception sensorielle. Elle se compose de trois couches principales (épiderme, derme et hypoderme) ainsi que de structures annexes telles que les poils, les glandes sébacées et sudoripares (McGavin & Zachary, 2007 ; Miller *et al.*, 2013).

1. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium stratifié kératinisé, formé principalement de kératinocytes organisés en plusieurs couches (basale, épineuse, granuleuse et cornée). Chez le chien et le chat, il est plus fin que chez l'homme, mais présente une activité de renouvellement cellulaire rapide, favorisant la cicatrisation après blessure (Miller *et al.*, 2013). La couche basale assure la régénération continue des kératinocytes et contient des mélanocytes, responsables de la pigmentation cutanée et de la photoprotection (McGavin & Zachary, 2007). Cette architecture garantit une barrière physique et immunologique contre les agents pathogènes et les agressions chimiques (Lux, 2022). Le détail des différentes couches de l'épiderme est illustré dans la figure 3.

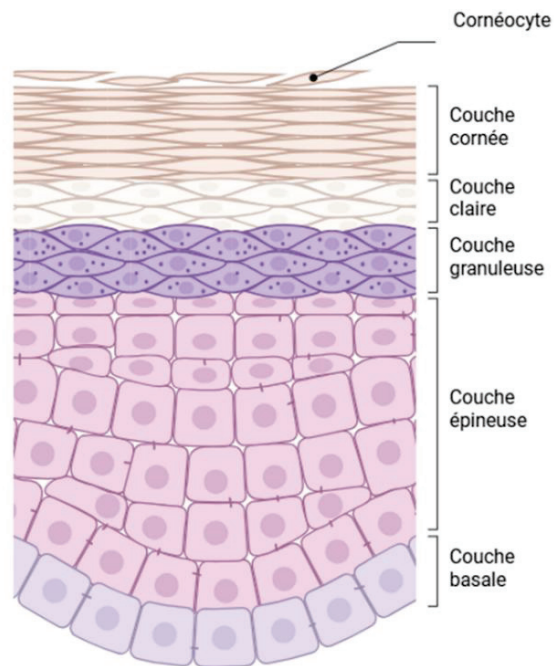


Figure 3 : Structure de l'épiderme. Source : BioRender.

2. La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique forme une interface dynamique assurant la cohésion et la communication entre les kératinocytes épidermiques et les fibroblastes dermiques. Elle joue un rôle clé dans la transmission des signaux nécessaires à la cicatrisation, notamment lors de la migration cellulaire post-lésionnelle (Lux, 2022).

3. Le derme

Le derme est une couche conjonctive vascularisée composée de fibres de collagène et d'élastine, assurant la souplesse, la résistance mécanique et la thermorégulation. Il abrite également les annexes cutanées (follicules pileux, glandes sébacées et glandes sudoripares) et un réseau dense de capillaires (McGavin & Zachary, 2007). Les fibroblastes y produisent les éléments de la matrice extracellulaire et jouent un rôle majeur dans la phase de prolifération cicatricielle (Velnar *et al.*, 2009).

4. L'hypoderme

L'hypoderme est une couche de tissu adipeux et conjonctif lâche reliant la peau aux muscles sous-jacents. Il agit comme réserve énergétique, amortisseur mécanique, et isolant thermique. Chez le chien, cette couche est généralement plus développée, favorisant une meilleure mobilité cutanée lors de la suture ou de la cicatrisation (Lux, 2022).

5. Les annexes cutanées

Les poils et les glandes cutanées participent à la protection thermique, sensorielle et chimique. Les follicules pileux, en particulier, sont entourés de cellules souches épidermiques capables de régénérer la peau après une lésion (Miller *et al.*, 2013). Les glandes sébacées sécrètent le sébum, essentiel pour maintenir l'hydratation et l'intégrité de la barrière cutanée. Les glandes sudoripares, qui ne participent pas à la thermorégulation chez le chien et le chat, sécrètent une sueur très riche en protéines jouant un rôle dans la fonction barrière, la communication entre les individus (phéromones) et l'excrétion de substances métaboliques (McGavin & Zachary, 2007).

6. Innervation, vascularisation et réseau lymphatique

La peau est richement innervée par des fibres nerveuses (sensitives, motrices et végétatives) assurant la perception tactile, thermique et douloureuse. Ces terminaisons nerveuses interviennent aussi dans la régulation de la cicatrisation via la libération de neuropeptides favorisant l'angiogenèse et la prolifération cellulaire (Velnar *et al.*, 2009).

La vascularisation cutanée est essentielle à l'apport d'oxygène et de nutriments. Elle conditionne la vitesse de réparation et la résistance aux infections (Lux, 2022).

Enfin, le réseau lymphatique draine les fluides interstitiels et participe à la défense immunitaire locale et à la résolution de l'inflammation post-traumatique (McGavin & Zachary, 2007).

En synthèse, la figure 4 illustre la structure anatomique et fonctionnelle de la peau, en représentant l'agencement de ses principales couches, la distribution des annexes cutanées et les réseaux vasculo-nerveux qui assurent son intégrité physiologique.

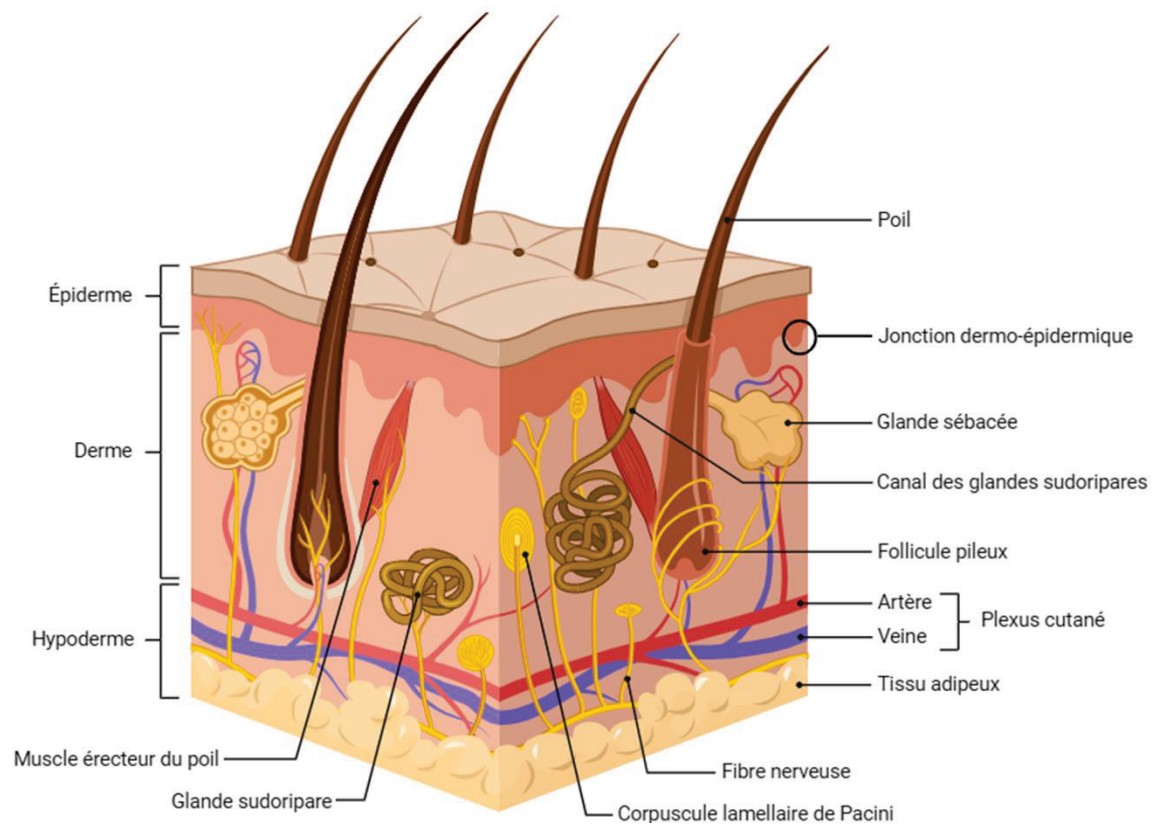


Figure 4 : Structure globale de la peau. Source : BioRender.

B. La cicatrisation cutanée

La cicatrisation est un processus biologique complexe visant à restaurer l'intégrité anatomique et fonctionnelle de la peau après une lésion. Chez les carnivores domestiques, comme chez les autres mammifères, elle s'organise en plusieurs phases dynamiques et interconnectées : hémostase, inflammation, prolifération et remodelage (Velnar *et al.*, 2009 ; Lux, 2022). Ces mécanismes sont modulés par la nature de la plaie, la vascularisation locale et les spécificités physiologiques de l'espèce (Bohling & Henderson, 2006 ; Lux, 2022).

1. Les phases de cicatrisation

a. Phase d'hémostase

L'hémostase débute immédiatement après la blessure. La vasoconstriction transitoire réduit la perte sanguine, suivie par la formation d'un clou plaquettaire et la libération de médiateurs tels que le PDGF (*platelet-derived growth factor*) et le TGF- β , amorçant la réponse inflammatoire (Velnar *et al.*, 2009). Chez le chien et le chat, la coagulation s'accompagne rapidement d'une infiltration leucocytaire précoce, essentielle pour prévenir la contamination bactérienne (McGavin & Zachary, 2007).

b. Phase inflammatoire

Durant cette phase, les neutrophiles migrent vers la plaie pour éliminer les pathogènes, suivis par les macrophages, qui phagocytent l'ensemble des débris cellulaires et sécrètent des cytokines réparatrices (IL-1, TNF- α , VEGF) (Wilkinson & Hardman, 2020 ; Lux, 2022).

Cette phase est cruciale pour préparer le lit de la plaie, mais son excès ou sa prolongation peuvent retarder la cicatrisation, notamment chez le chat où l'inflammation est souvent moins efficace et plus lente à se résoudre (Bohling & Henderson, 2006).

c. Phase de prolifération

La phase proliférative se caractérise par la formation du tissu de granulation, composé de fibroblastes, de néocapillaires et de matrice extracellulaire. Les fibroblastes produisent du collagène de type III et des glycosaminoglycanes, assurant la résistance mécanique du tissu (Velnar *et al.*, 2009). Les kératinocytes migrent depuis les bords de la plaie et les follicules pileux pour reformer l'épiderme, tandis que l'angiogenèse rétablit la vascularisation locale (McGavin & Zachary, 2007). Chez le chien, cette phase est rapide et efficace, alors que chez le chat, la formation du tissu de granulation est souvent plus lente et parfois excessive, conduisant à des plaies hypertrophiques (Bohling & Henderson, 2006 ; Lux, 2022).

d. Phase de maturation et remodelage

La dernière phase consiste en la conversion du collagène de type III en collagène de type I, plus résistant, et en la réorganisation de la matrice extracellulaire (Velnar *et al.*, 2009). La vascularisation diminue progressivement, et la plaie retrouve sa solidité. Cependant, la peau cicatricielle ne retrouve jamais totalement sa résistance initiale, atteignant environ 70 à 80 % de la force tissulaire d'origine (McGavin & Zachary, 2007). Chez les carnivores domestiques, cette phase peut s'étendre sur plusieurs semaines selon la localisation et la tension cutanée locale (Lux, 2022). Les grandes étapes de ce processus sont représentées dans la figure 5, qui illustre les quatre phases de cicatrisation cutanée.

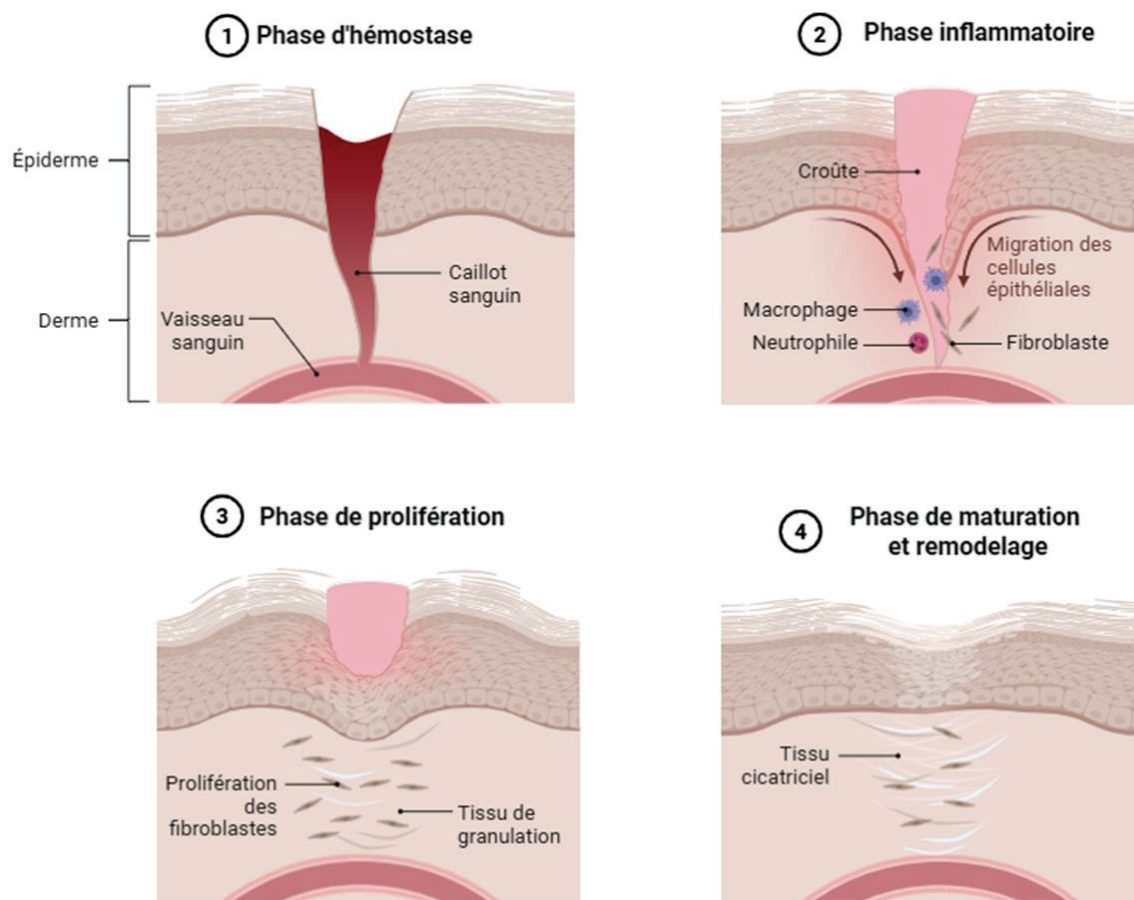


Figure 5 : Les différentes phases de la cicatrisation cutanée. Source : BioRender.

2. Les facteurs influençant et retardant la cicatrisation

La cicatrisation cutanée est un processus physiologique finement régulé, mais de nombreux paramètres peuvent en perturber le déroulement normal. Ces facteurs peuvent être regroupés en trois grandes catégories : locaux, systémiques et environnementaux (Lux, 2022). Chacun agit à différents niveaux du processus cicatriciel, modifiant l'équilibre entre les phases inflammatoire, proliférative et de remodelage.

a. Facteurs locaux

Les facteurs locaux concernent directement la plaie et son environnement tissulaire immédiat. L'un des principaux obstacles à une cicatrisation efficace est l'infection. La présence de bactéries dans la plaie prolonge la phase inflammatoire, stimule la libération de métalloprotéases et détruit le tissu de granulation en formation (Dai *et al.*, 2011). Ces altérations enzymatiques entraînent un retard significatif du comblement et de l'épithélialisation, tout en augmentant le risque de formation de tissus cicatriciels fibreux et inesthétiques.

De même, la nécrose tissulaire ou l'hypoxie locale nuisent gravement à la cicatrisation. L'hypoxie empêche la prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène, tout en réduisant la néoangiogenèse (Lux, 2022). La bonne perfusion sanguine de la plaie est donc un prérequis essentiel à la régénération tissulaire.

La tension cutanée et les mouvements mécaniques excessifs autour de la plaie sont également des freins importants. Les contraintes mécaniques perturbent la migration des kératinocytes et provoquent des microruptures du tissu en formation, retardant la fermeture complète (Miller *et al.*, 2013). Chez les carnivores domestiques, ces effets sont particulièrement marqués sur les zones articulaires ou les régions soumises à une forte mobilité.

Enfin, la présence de corps étrangers, tels que des poils, des sutures inadaptées ou des débris, entretient une inflammation chronique et favorise la formation de granulomes (McGavin & Zachary, 2007). Une détersion soigneuse et un contrôle rigoureux de l'environnement de la plaie sont donc indispensables à une cicatrisation optimale. Toutefois, l'usage excessif d'antiseptiques ou l'usage d'antiseptiques trop agressifs freinent la cicatrisation par leur action toxique sur les kératinocytes et les fibroblastes.

b. Facteurs systémiques

Les facteurs systémiques englobent l'état général de l'animal et ses affections concomitantes. L'âge avancé est associé à une diminution de la prolifération cellulaire, une angiogenèse plus lente et une réponse immunitaire affaiblie, ralentissant globalement le processus cicatriciel (Wilkinson & Hardman, 2020).

Les maladies métaboliques, telles que le diabète sucré, l'insuffisance hépatique ou les troubles endocriniens, exercent un effet négatif majeur. Elles altèrent la microcirculation, réduisent la synthèse du collagène et augmentent la susceptibilité aux infections (McGavin & Zachary, 2007). Chez le chien diabétique, par exemple, la plaie demeure souvent humide et inflammatoire plus longtemps, avec une régénération épithéliale retardée.

La malnutrition, notamment protéique, entraîne une carence en acides aminés nécessaires à la production de collagène et de matrice extracellulaire. Les animaux dénutris présentent un tissu de granulation peu dense et fragile, susceptible de se désagréger facilement (Lux, 2022).

Enfin, certains traitements médicamenteux, en particulier les corticostéroïdes, les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les immunosuppresseurs, interfèrent avec la cascade inflammatoire et la synthèse de collagène (Lux, 2022). Ces effets iatrogènes sont souvent observés chez les animaux atteints de maladies chroniques nécessitant une corticothérapie prolongée.

c. Facteurs environnementaux

Les conditions extérieures jouent elles aussi un rôle déterminant dans la qualité et la rapidité de la cicatrisation. Une hygiène insuffisante ou un environnement contaminé favorisent la colonisation bactérienne et la surinfection de la plaie, compromettant la formation du tissu de granulation (Negut *et al.*, 2018). La température et le taux d'humidité ambiants exercent également une influence : une plaie trop sèche ralentit la migration des kératinocytes, tandis qu'une humidité excessive favorise la macération et les infections secondaires (Lux, 2022).

De plus, le stress et l'immobilisation inadéquate de l'animal peuvent modifier la perfusion tissulaire et la réponse hormonale au niveau local. Une production accrue de cortisol, par exemple, inhibe la réponse inflammatoire initiale et retarde la phase de prolifération (Lux,

2022). Le contrôle du stress et le maintien de conditions environnementales optimales sont donc des composantes essentielles de la prise en charge post-opératoire.

Ces différents paramètres sont résumés dans le tableau II, qui distingue les principaux facteurs locaux, systémiques et environnementaux susceptibles d'influencer la qualité et la rapidité de la cicatrisation cutanée.

Tableau II : Tableau récapitulatif des facteurs influençant et retardant la cicatrisation.

Source : Solène Bacconnier.

	Facteurs	Mécanisme physiopathologique	Conséquences sur la cicatrisation
Facteurs locaux	Infection bactérienne	Prolongation de la phase inflammatoire, libération excessive de protéases, destruction du tissu de granulation	Retard de formation du tissu de granulation, risque d'infection chronique
	Nécrose ou hypoxie tissulaire	Diminution de l'apport en O ₂ et nutriments ; réduction de la prolifération fibroblastique et de la synthèse de collagène	Ralentissement de la régénération, cicatrice fragile
	Tension cutanée excessive / mouvement mécanique	Microruptures du tissu en formation, inhibition de la migration kératinocytaire	Retard de fermeture, désunion de plaie
	Corps étrangers	Inflammation persistante, réponse à corps étranger, formation de granulome	Plaie chronique, mauvaise qualité cicatricielle
Facteurs systémiques	Âge avancé	Diminution de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse, ralentissement de la réponse immunitaire	Retard global de cicatrisation
	Maladies métaboliques (diabète, insuffisance hépatique)	Altération de la microcirculation, baisse de la synthèse du collagène, susceptibilité accrue aux infections	Plaies chroniques, faible résistance tissulaire
	Malnutrition protéique	Carence en acides aminés essentiels, déficit en collagène et matrice extracellulaire	Tissu de granulation peu dense et fragile
	Traitements médicamenteux	Inhibition de la phase inflammatoire initiale et de la synthèse de collagène	Cicatrisation lente, risque de désunion
Facteurs environnementaux	Hygiène et contamination	Prolifération bactérienne, inflammation locale persistante	Risque accru d'infection et de plaies chroniques
	Température et humidité	Déshydratation de la plaie ou macération excessive, altération de la migration kératinocytaire	Épithélialisation retardée
	Stress et immobilisation inadéquate	Hypercortisolisme, vasoconstriction, perturbation de la perfusion locale	Diminution de la vascularisation, retard de prolifération
	Conditions nutritionnelles et de logement	Apport énergétique insuffisant, traumatismes répétés, mauvaise aération	Retard de cicatrisation, surinfection

Les retards de cicatrisation peuvent conduire à des plaies chroniques, à la formation de tissu de granulation excessif (notamment chez le chat) ou à des infections récidivantes (Bohling & Henderson, 2006 ; Lux, 2022). L'usage d'agents naturels comme le miel médical peut aider à réduire la charge microbienne, moduler l'inflammation et stimuler la prolifération cellulaire, apportant ainsi une alternative thérapeutique prometteuse en médecine vétérinaire (Negut *et al.*, 2018 ; Lux, 2022).

C. Les modèles expérimentaux

L'étude de la cicatrisation cutanée et de l'effet de substances naturelles comme le miel repose sur des approches expérimentales variées, allant des cultures cellulaires aux modèles animaux. Ces modèles constituent des outils indispensables pour comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents à la réparation tissulaire et pour évaluer la sécurité et l'efficacité des traitements proposés avant leur application clinique.

La cicatrisation est un processus complexe, impliquant la prolifération coordonnée de multiples types cellulaires (kératinocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages) et l'interaction dynamique entre médiateurs inflammatoires, facteurs de croissance et composants de la matrice extracellulaire. Reproduire cette complexité dans un cadre expérimental nécessite des modèles adaptés au niveau de questionnement : les modèles *in vitro* permettent d'isoler et d'analyser des mécanismes cellulaires spécifiques dans un environnement contrôlé, tandis que les modèles *in vivo* offrent une vision intégrée de la cicatrisation dans un organisme complet.

Ainsi, le choix du modèle dépend étroitement de l'objectif de recherche : exploration mécanistique, évaluation toxicologique, ou validation physiologique. Dans le cas du miel, dont les propriétés thérapeutiques sont multiples (antibactériennes, anti-inflammatoires, pro-angiogéniques), la combinaison de ces approches expérimentales est essentielle pour appréhender ses effets de manière rigoureuse et transposable à la pratique vétérinaire.

1. Les modèles *in vitro*

Les modèles *in vitro* constituent un outil essentiel dans l'étude des processus de cicatrisation cutanée et dans l'évaluation de nouvelles substances à visée thérapeutique, telles que le miel. Leur intérêt principal réside dans la possibilité d'isoler des variables spécifiques (type cellulaire, concentration du produit, durée d'exposition) tout en limitant les contraintes éthiques et biologiques inhérentes à l'expérimentation animale. Ces modèles permettent de comprendre, à un niveau cellulaire et moléculaire, les effets d'un agent sur la prolifération, la migration ou la différenciation des cellules impliquées dans la régénération tissulaire (Mathes *et al.*, 2014).

Selon Mathes *et al.* (2014), l'évolution des modèles cutanés *in vitro* a permis de passer de simples cultures cellulaires en monocouches à des modèles tridimensionnels reproduisant l'architecture épidermique et dermique. Ces modèles de peau combinent des fibroblastes dermiques et des kératinocytes cultivés dans des matrices extracellulaires de collagène, parfois complétés par des cellules immunitaires ou endothéliales. Ce type de modèle permet de reproduire plus fidèlement les interactions cellulaires, la stratification de l'épiderme et la synthèse de la matrice extracellulaire, des éléments fondamentaux de la cicatrisation (Mathes *et al.*, 2014).

Les cultures primaires de fibroblastes et de kératinocytes restent néanmoins la base des essais exploratoires. Ces cellules permettent d'évaluer la cytotoxicité, la prolifération ou la migration cellulaire après exposition à un agent donné. Pipiya *et al.* (2024) ont rappelé que les cultures primaires conservent mieux les caractéristiques physiologiques des tissus d'origine que les lignées cellulaires passagées, qui, bien que plus stables et faciles à manipuler, perdent parfois certaines fonctions différenciées. Cette distinction est essentielle dans le contexte de la recherche translationnelle, car elle influence directement la pertinence biologique des résultats obtenus.

Les tests de viabilité (tels que le MTT, le XTT ou l'*Alamar Blue*) sont les outils les plus utilisés pour évaluer l'effet d'un agent sur la survie et la prolifération cellulaire. Rasulova *et al.* (2025) ont ainsi étudié l'effet du miel multifloral sur des lignées de cellules cancéreuses ovariennes humaines (SKOV-3) et sur des fibroblastes dermiques humains. Ils ont montré une inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses, dont l'intensité dépend de la dose, mais aucune cytotoxicité notable sur les fibroblastes, suggérant une certaine sélectivité et une absence de toxicité sur les cellules normales. Ces observations confirment la possibilité

d'utiliser des fibroblastes comme modèle pertinent pour évaluer la biocompatibilité du miel dans des conditions cutanées.

De plus, certains travaux se sont intéressés à l'effet du miel sur des cellules mésenchymateuses, connues pour leur rôle dans la régénération tissulaire. Rosadi *et al.* (2023) ont réalisé une revue systématique de l'effet du miel d'abeille sur la prolifération des cellules souches mésenchymateuses. Ils concluent que les composants bioactifs du miel (notamment les flavonoïdes et polyphénols) stimulent la prolifération et la migration de ces cellules, favorisant ainsi la régénération tissulaire. Ces résultats ouvrent la voie à l'utilisation du miel comme agent régénératif, au-delà de ses propriétés antimicrobiennes classiques.

L'ensemble de ces approches *in vitro* présente donc un intérêt majeur pour étudier les effets du miel dans un contexte contrôlé, permettant de mesurer sa cytotoxicité, son potentiel de stimulation cellulaire, et d'explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans la cicatrisation, comme la modulation de l'expression de cytokines, de facteurs de croissance ou de protéines de la matrice extracellulaire. Toutefois, ces modèles ne reproduisent pas totalement la complexité d'un tissu vivant : vascularisation, réponse inflammatoire, microbiote et contraintes mécaniques y sont absents (Mathes *et al.*, 2014). C'est pourquoi les résultats *in vitro* nécessitent toujours une validation *in vivo* avant toute transposition clinique.

2. Les modèles *in vivo*

Les modèles *in vivo* permettent d'évaluer l'efficacité réelle du miel dans un contexte physiologique complet, en tenant compte de la vascularisation, de la réponse immunitaire et des interactions tissulaires. Ils représentent l'étape indispensable entre les observations *in vitro* et l'application clinique chez l'animal ou l'homme.

Chez les rongeurs, les modèles de plaies excisées ou brûlées sont les plus utilisés. Ces modèles permettent d'évaluer l'effet du miel sur la vitesse de fermeture de la plaie, la qualité du tissu cicatriciel, la réépithélialisation et l'angiogenèse. De nombreuses études ont montré que le miel favorise la contraction des plaies, réduit l'inflammation et stimule la formation de nouveaux capillaires, notamment par la libération de facteurs tels que le VEGF ou le TGF- β (Tashkandi, 2021 ; Vogt *et al.*, 2022). Ces travaux confirment que l'application topique du miel permet une cicatrisation plus rapide et de meilleure qualité, avec une réduction du risque infectieux.

En médecine vétérinaire, plusieurs études *in vivo* ont été menées chez le chien et le chat, bien que leur nombre reste limité. Elles confirment globalement les observations faites chez le rongeur et l'homme : le miel diminue la charge bactérienne, favorise le développement du tissu de granulation et réduit la douleur locale (Stevanović *et al.*, 2024). Son application sur des plaies, traumatiques ou chirurgicales, a montré une amélioration du délai de cicatrisation, tout en maintenant un environnement humide favorable à la régénération tissulaire.

Les modèles animaux présentent néanmoins certaines limites. Le type de plaie (incision, brûlure, plaie infectée), la profondeur et la surface de la plaie influencent fortement les résultats, tout comme l'origine botanique du miel et son mode de préparation. Par ailleurs, le métabolisme, l'épaisseur cutanée et la flore microbienne diffèrent selon les espèces, rendant la transposition interspécifique délicate. Ces limites justifient la complémentarité entre les approches *in vitro* et *in vivo* dans l'évaluation du miel comme agent thérapeutique cutané.

Ainsi, les modèles *in vitro* offrent une compréhension mécanistique des effets du miel sur les cellules de la peau, tandis que les modèles *in vivo* permettent d'en confirmer la pertinence biologique dans un organisme complet. Le tableau III en propose une comparaison synthétique, soulignant leur complémentarité dans l'étude des effets du miel sur la cicatrisation cutanée.

Tableau III : Tableau comparatif des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* dans l'étude de la cicatrisation cutanée. Source : Solène Bacconnier.

Type de modèle	Description générale	Avantages principaux	Inconvénients / limites
In vitro	Études réalisées sur cultures cellulaires (kératinocytes, fibroblastes, macrophages) ou tissus reconstitués, dans un environnement contrôlé.	Contrôle précis des variables expérimentales (pH, température, concentration d'agent). Coût réduit, reproductibilité élevée. Aucune contrainte éthique animale. Permet d'évaluer des mécanismes cellulaires ou moléculaires spécifiques (migration, prolifération, production de collagène).	Ne reproduit pas la complexité de l'organisme vivant (vascularisation, innervation, immunité). Absence d'interactions systémiques et de réponse inflammatoire intégrée. Effets limités à une échelle cellulaire.
In vivo	Études réalisées sur des animaux (souris, rat, lapin, chien, chat), avec plaies induites ou chirurgicales.	Reflète les interactions complexes entre tissus, cellules immunitaires et facteurs systémiques. Permet d'évaluer la cicatrisation complète (inflammation, granulation, remodelage). Mesure directe des effets cliniques (temps de cicatrisation, qualité du tissu réparé).	Variabilité biologique interindividuelle. Contraintes éthiques et réglementaires importantes. Coûts et temps d'expérimentation plus élevés. Interprétation parfois limitée pour extrapoler à d'autres espèces.

L'intégration de ces deux niveaux d'étude est indispensable pour valider le miel comme outil thérapeutique fiable dans la cicatrisation cutanée, notamment en médecine vétérinaire canine et féline.

III. Conclusion sur l'intérêt du miel

L'étude de la cicatrisation cutanée et des propriétés du miel met en évidence la convergence entre une compréhension fine des mécanismes physiologiques et l'exploitation raisonnée d'un produit naturel aux multiples potentialités thérapeutiques. La peau, organe dynamique et hautement spécialisé, assure des fonctions essentielles de protection, de thermorégulation, de communication et de défense immunitaire. Lorsqu'elle est lésée, elle met en œuvre un processus de réparation complexe et coordonné, visant à restaurer son intégrité structurelle et fonctionnelle. Le processus cicatriciel associe successivement une phase inflammatoire, une phase proliférative et une phase de remodelage, dont la coordination dépend d'un dialogue constant entre les cellules, les médiateurs chimiques et leur environnement tissulaire.

Dans ce contexte, le miel apparaît comme un agent biologique particulièrement intéressant pour accompagner et optimiser ces mécanismes physiologiques. Sa composition physico-chimique, dominée par les sucres simples mais enrichie en enzymes, polyphénols, acides organiques et minéraux, lui confère des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires et cicatrisantes aujourd'hui bien documentées. En favorisant la détersion, la stimulation cellulaire et la néoangiogenèse, tout en limitant la prolifération bactérienne, le miel agit de manière synergique sur l'ensemble des phases de cicatrisation cutanée.

L'intérêt thérapeutique du miel dépasse désormais le cadre empirique : il s'inscrit dans une approche rationnelle de la médecine moderne, soutenue par des données expérimentales *in vitro* et *in vivo* qui confirment ses effets biologiques. Parallèlement, dans un contexte sanitaire mondial marqué par la progression de l'antibiorésistance, le miel offre une alternative naturelle crédible. Sa capacité à inhiber la croissance de souches bactériennes multirésistantes, conjuguée à son faible potentiel de résistance et à son excellente tolérance, en fait un adjuvant prometteur aux thérapeutiques conventionnelles, tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire.

Ainsi, la littérature met en lumière le rôle du miel comme outil thérapeutique multifonctionnel, à la croisée des approches naturelles et de la médecine fondée sur les preuves. Cependant, si les effets du miel sont largement démontrés chez l'homme, les données vétérinaires, notamment chez le chien et le chat, demeurent encore fragmentaires. Ces constats justifient pleinement la mise en place d'études expérimentales visant à mieux caractériser ses effets sur la cicatrisation cutanée dans les espèces animales de compagnie, afin d'évaluer son potentiel réel dans la pratique clinique vétérinaire.

PARTIE II

Étude de l'effet antibactérien des miels de lavande et de châtaigner

Les infections bactériennes appartiennent aux facteurs de retard de cicatrisation des plaies. De plus, comme nous l'avons expliqué dans la partie précédente, il est important de trouver des alternatives à l'utilisation des antibiotiques. L'objectif de cette étude est donc de montrer l'effet antibactérien des miels sélectionnés.

Cette étude a été menée au sein du Pôle d'Analyses de VetAgro Sup (PAV) qui nous a demandé de réaliser dans un premier temps, une épreuve de faisabilité pour montrer que le protocole sélectionné fonctionnait avec les miels choisis, avant de réaliser autant de duplicas que souhaités dans un souci d'utilisation et d'économie du matériel.

I. Matériel et Méthodes

A. Matériel biologique et réactifs

Les bactéries *Staphylococcus pseudintermedius* sensibles à tous les antibiotiques sauf aux pénicillines, *Staphylococcus pseudintermedius* multirésistantes et *Pseudomonas aeruginosa* multirésistantes ont été sélectionnées car elles appartiennent à la flore cutanée pathogène et sont communément retrouvées dans diverses infections de la peau. Nous avons choisi de travailler avec des miels produits en France et facilement accessibles à tous, pour des raisons environnementales et pratiques. Les miels utilisés étaient les miels, de châtaignier et de lavande, de la maison Vergnon (La Viallère, 38 780, Pont Evêque). Le bouillon Cœur-Cerveille (BHI pour *Brain Heart Infusion*), (référence AEB110110, de Biomérieux, lot 2316990) a été utilisé comme bouillon de culture. C'est un milieu de culture microbiologique non-sélectif. De l'eau déminéralisée a été utilisée pour diluer les miels aux concentrations 5, 10, 15, 20, 25 et 30% pour l'épreuve de faisabilité puis 15, 20, 25, 30, 35 et 40% pour la suite de l'étude. Les milieux de cultures utilisés pour la détermination des concentrations minimales bactéricides étaient des géloses Mueller Hinton 2 + 5 % de sang de mouton (MHS) (lot 1010736560, de

Biomérieux). Enfin, des ampoules API® suspension Medium (lot 1009705240, de Biomérieux) contenant du chlorure de sodium (NaCl) à 0.85 % ont été utilisées pour créer les inocula bactériens.

B. Méthode

Afin de déterminer les effets des différents miels sur la croissance bactérienne, la technique de microdilution en bouillon ou *broth dilution method* a été utilisée. Elle permet d'ensemencer des volumes identiques de bouillons avec des solutions d'agent antimicrobien à des concentrations en augmentation. Cette méthode est la même que celle utilisée dans de nombreux pays, ainsi que celle publiée par le *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) et utilisée par l'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (*International Organization for Standardization*, 2019).

1. Inoculum des souches

À l'aide d'œses, nous avons prélevé des colonies bactériennes que nous avons mélangées aux ampoules stériles de suspension jusqu'à obtenir une turbidité de 1 McFarland au lecteur Mc Farland. En microbiologie, les normes McFarland sont utilisées comme référence pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes afin que le nombre de bactéries se situe dans une gamme de concentrations données pour normaliser les tests microbiens.

2. Gamme de dilution

Dans un premier temps, nous avons réalisé une gamme de dilution des miels de châtaignier et de lavande, avec des concentrations variant entre 5 et 30 % de miel pour l'épreuve de faisabilité, présentée dans le tableau suivant. À la lumière des premiers résultats, nous avons décidé d'augmenter les concentrations des miels, pour une gamme allant de 15 à 40 % pour la suite de l'étude.

Tableau IV : Gamme de dilution des miels. Source : Solène Bacconnier.

Dilution préparée (%)	Dilution finale dans le bouillon de culture (%)	Quantité de miel (μL)	Quantité d'eau déminéralisée (μL)	Volume final (mL)
10	5	200	1 800	2
20	10	400	1 600	
30	15	600	1 400	
40	20	800	1 200	
50	25	1 000	1 000	
60	30	1 200	800	
70	35	1 400	600	
80	40	1 600	400	

3. *Broth dilution method*

Nous avons ensemencé les plaques de 96 puits selon les plans de plaque illustrés par les figures 6, 7 et 8. Les différents témoins contenaient : 200 μL de miel de châtaignier à 15 %, 200 μL de miel de lavande à 15 %, 200 μL de milieu de culture BHI, 200 μL de l'inoculum 1, 200 μL de l'inoculum 2, 200 μL de l'inoculum 3, 100 μL de BHI et 100 μL de l'inoculum 1, 100 μL de BHI et 100 μL de l'inoculum 2, 100 μL de BHI et 100 μL de l'inoculum 3, 200 μL d'eau déminéralisée (utilisée pour réaliser la gamme de dilution). Le reste des puits a été ensemencé avec 50 μL de BHI, 50 μL d'inoculum et 100 μL de la gamme de dilution des miels, en s'assurant du mélange des différentes suspensions et en respectant les plans de plaque. Les plaques ont été mises à incuber à 36,6 °C pendant 20h.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M1	M2	S1	S2	S3	M1 à 5% S1	M1 à 10% S1	M1 à 15% S1	M1 à 20% S1	M1 à 25% S1	M1 à 30% S1	BHI
B	M1 à 5% S2	M1 à 10% S2	M1 à 15% S2	M1 à 20% S2	M1 à 25% S2	M1 à 30% S2	M1 à 5% S3	M1 à 10% S3	M1 à 15% S3	M1 à 20% S3	M1 à 25% S3	M1 à 30% S3
C	M1 à 5% S1	M1 à 10% S1	M1 à 15% S1	M1 à 20% S1	M1 à 25% S1	M1 à 30% S1	M1 à 5% S3	M1 à 10% S3	M1 à 15% S3	M1 à 20% S3	M1 à 25% S3	M1 à 30% S3
D	M1 à 5% S2	M1 à 10% S2	M1 à 15% S2	M1 à 20% S2	M1 à 25% S2	M1 à 30% S2	M1 à 5% S2	M1 à 10% S2	M1 à 15% S2	M1 à 20% S2	M1 à 25% S2	M1 à 30% S2
E	M2 à 5% S1	M2 à 10% S1	M2 à 15% S1	M2 à 20% S1	M2 à 25% S1	M2 à 30% S1	M2 à 5% S2	M2 à 10% S2	M2 à 15% S2	M2 à 20% S2	M2 à 25% S2	M2 à 30% S2
F	M2 à 5% S3	M2 à 10% S3	M2 à 15% S3	M2 à 20% S3	M2 à 25% S3	M2 à 30% S3	M2 à 5% S3	M2 à 10% S3	M2 à 15% S3	M2 à 20% S3	M2 à 25% S3	M2 à 30% S3
G	M2 à 5% S1	M2 à 10% S1	M2 à 15% S1	M2 à 20% S1	M2 à 25% S1	M2 à 30% S1	M2 à 5% S1	M2 à 10% S1	M2 à 15% S1	M2 à 20% S1	M2 à 25% S1	M2 à 30% S1
H	M2 à 5% S2	M2 à 10% S2	M2 à 15% S2	M2 à 20% S2	M2 à 25% S2	M2 à 30% S2	M2 à 5% S2	M2 à 10% S2	M2 à 15% S2	M2 à 20% S2	M2 à 25% S2	M2 à 30% S2

M1	Lavande	S1	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> sensible sauf aux pénicillines
M2	Chataignier	S2	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> multirésistant
BHI	Bouillon de culture seul	S3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirésistant

Figure 6 : Plan de plaque de l'épreuve de faisabilité. Source : Solène Bacconnier.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	20	11	12
A	M1 à 15%	M2 à 15%	S1 / BHI	S2 / BHI	S3 / BHI	BHI	M1 à 15% S1	M1 à 20% S1	M1 à 25% S1	M1 à 30% S1	M1 à 35% S1	M1 à 40% S1
B	M1 à 15% S2	M1 à 20% S2	M1 à 25% S2	M1 à 30% S2	M1 à 35% S2	M1 à 40% S2	M1 à 15% S1	M1 à 20% S1	M1 à 25% S1	M1 à 30% S1	M1 à 35% S1	M1 à 40% S1
C	M1 à 15% S2	M1 à 20% S2	M1 à 25% S2	M1 à 30% S2	M1 à 35% S2	M1 à 40% S2	M1 à 15% S3	M1 à 20% S3	M1 à 25% S3	M1 à 30% S3	M1 à 35% S3	M1 à 40% S3
D	M1 à 15% S3	M1 à 20% S3	M1 à 25% S3	M1 à 30% S3	M1 à 35% S3	M1 à 40% S3	M1 à 15% S3	M1 à 20% S3	M1 à 25% S3	M1 à 30% S3	M1 à 35% S3	M1 à 40% S3
E	M2 à 15% S1	M2 à 20% S1	M2 à 25% S1	M2 à 30% S1	M2 à 35% S1	M2 à 40% S1	M2 à 15% S2	M2 à 20% S2	M2 à 25% S2	M2 à 30% S2	M2 à 35% S2	M2 à 40% S2
F	M2 à 15% S3	M2 à 20% S3	M2 à 25% S3	M2 à 30% S3	M2 à 35% S3	M2 à 40% S3	M2 à 15% S2	M2 à 20% S2	M2 à 25% S2	M2 à 30% S2	M2 à 35% S2	M2 à 40% S2
G	M2 à 15% S1	M2 à 20% S1	M2 à 25% S1	M2 à 30% S1	M2 à 35% S1	M2 à 40% S1	M2 à 15% S1	M2 à 20% S1	M2 à 25% S1	M2 à 30% S1	M2 à 35% S1	M2 à 40% S1
H	M2 à 15% S3	M2 à 20% S3	M2 à 25% S3	M2 à 30% S3	M2 à 35% S3	M2 à 40% S3	M2 à 15% S3	M2 à 20% S3	M2 à 25% S3	M2 à 30% S3	M2 à 35% S3	M2 à 40% S3

M1	Lavande	S1	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> sensible sauf aux pénicillines
M2	Chataignier	S2	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> multirésistant
BHI	Bouillon de culture seul	S3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirésistant

Figure 7 : Plan de la plaque 1 de l'expérience complète. Source : Solène Bacconnier.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	20	11	12
A	M1 à 15% S1	M1 à 20% S1	M1 à 25% S1	M1 à 30% S1	M1 à 35% S1	M1 à 40% % S1	M2 à 15% S2	M2 à 20% S2	M2 à 25% S2	M2 à 30% S2	M2 à 35% S2	M2 à 40% % S2
B	M1 à 15% S1	M1 à 20% S1	M1 à 25% S1	M1 à 30% S1	M1 à 35% S1	M1 à 40% % S1	M1 à 15% S1	M1 à 20% S1	M1 à 25% S1	M1 à 30% S1	M1 à 35% S1	M1 à 40% % S1
C	M1 à 15% S2	M1 à 20% S2	M1 à 25% S2	M1 à 30% S2	M1 à 35% S2	M1 à 40% % S2	M1 à 15% S2	M1 à 20% S2	M1 à 25% S2	M1 à 30% S2	M1 à 35% S2	M1 à 40% % S2
D	M1 à 15% S3	M1 à 20% S3	M1 à 25% S3	M1 à 30% S3	M1 à 35% S3	M1 à 40% % S3	M1 à 15% S2	M1 à 20% S2	M1 à 25% S2	M1 à 30% S2	M1 à 35% S2	M1 à 40% % S2
E	M1 à 15% S3	M1 à 20% S3	M1 à 25% S3	M1 à 30% S3	M1 à 35% S3	M1 à 40% % S3	M1 à 10% S2	M1 à 10% S3	Eau déminéralisée	M2 à 10% S1	M2 à 10% S2	M2 à 10% S3
F	M2 à 15% S1	M2 à 20% S1	M2 à 25% S1	M2 à 30% S1	M2 à 35% S1	M2 à 40% % S1	M2 à 15% S1	M2 à 20% S1	M2 à 25% S1	M2 à 30% S1	M2 à 35% S1	M2 à 40% % S1
G	M2 à 15% S2	M2 à 20% S2	M2 à 25% S2	M2 à 30% S2	M2 à 35% S2	M2 à 40% % S2	M2 à 15% S2	M2 à 20% S2	M2 à 25% S2	M2 à 30% S2	M2 à 35% S2	M2 à 40% % S2
H	M2 à 15% S3	M2 à 20% S3	M2 à 25% S3	M2 à 30% S3	M2 à 35% S3	M2 à 40% % S3	M2 à 15% S3	M2 à 20% S3	M2 à 25% S3	M2 à 30% S3	M2 à 35% S3	M2 à 40% % S3

M1	Lavande	S1	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> sensible sauf aux pénicillines
M2	Chataignier	S2	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> multirésistant
BHI	Bouillon de culture seul	S3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirésistant

Figure 8 : Plan de la plaque 2 de l'expérience complète. Source : Solène Bacconnier.

4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice (CMI) désigne la plus faible concentration d'un agent antimicrobien qui inhibe la croissance visible d'un microorganisme. Nous avons donc déterminé à l'œil nu les CMI après incubation (Hammond & Donkor, 2013) comme l'explique la figure 9.

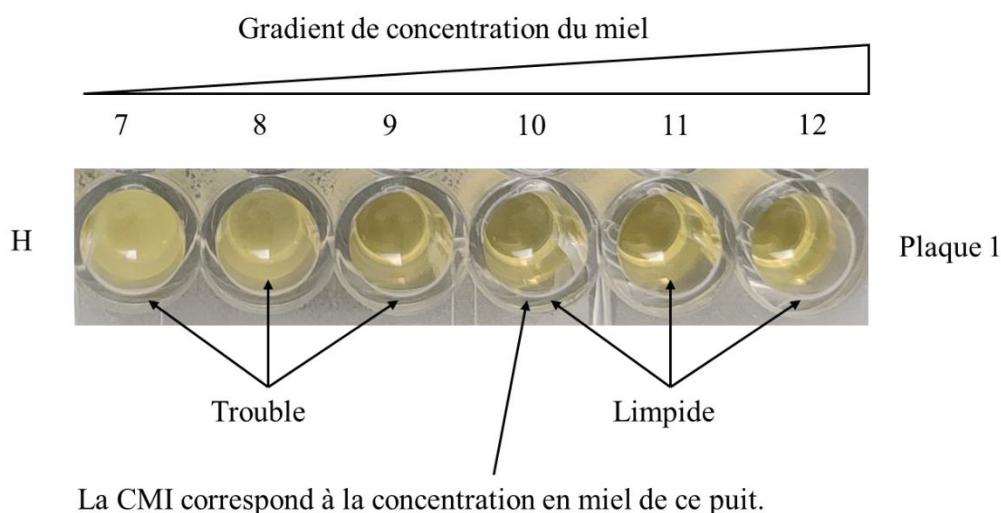


Figure 9 : Schéma explicatif de la détermination de la CMI.

Source : Solène Bacconnier.

5. Détermination de la concentration minimale bactéricide

La concentration minimale bactéricide (CMB) désigne la plus faible concentration d'un agent antimicrobien qui tue le micro-organisme (Hammond & Donkor, 2013). Pour déterminer la CMB, nous avons ensemencé des géloses Mueller Hinton 2 à l'aide d'œses 10 μ L à partir des puits où aucune turbidité n'était visible à l'œil nu. Ces géloses ont été incubées pendant 24 heures à 36,6 °C. La CMB est définie comme la première dilution à laquelle aucune croissance ou moins de trois colonies bactériennes est observée. Cette définition est illustrée par la figure 10.

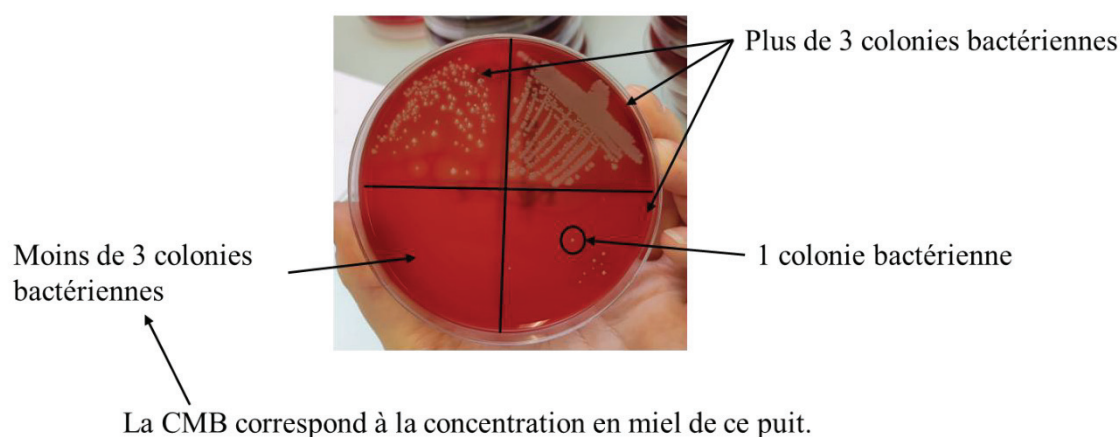


Figure 10 : Schéma explicatif de la détermination de la CMB.

Source : Solène Bacconnier.

II. Résultats

A. Epreuve de faisabilité

1. Les témoins

Les témoins négatifs (puits contenant uniquement du miel, respectivement de lavande et de châtaignier, à 15 % ou du bouillon BHI, sans inoculum bactérien) sont restés limpides, confirmant l'absence de contamination. Ces résultats sont visibles sur la figure 11 en A1, A2 et A12. Les témoins positifs (puits contenant chacun uniquement l'une des trois souches bactériennes) sont devenus troubles, confirmant leur capacité à croître dans les conditions expérimentales, comme le montre la figure 11 en A3, A4 et A5.

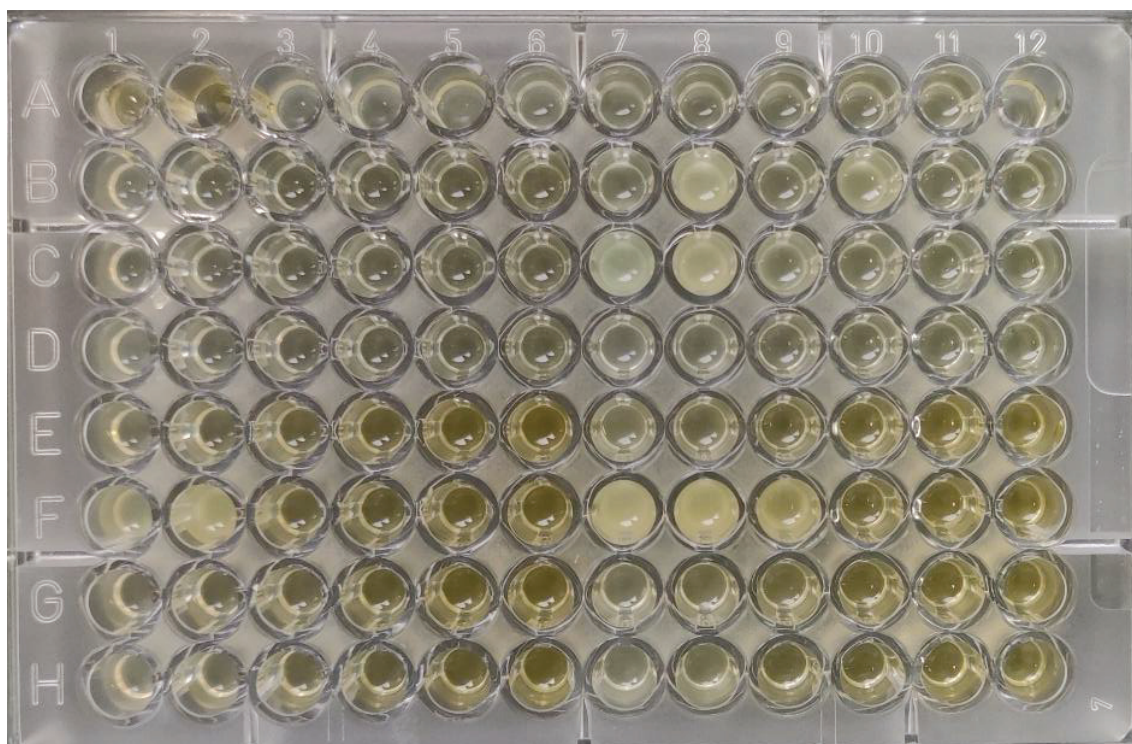


Figure 11 : Photos de la plaque de l'épreuve de faisabilité post incubation.

Source : Solène Bacconnier.

2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

La CMI a été déterminée comme la plus faible concentration de miel n'entraînant aucune croissance visible après incubation. Les résultats sont présentés avec la figure 12.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	-	-	+	+	+	+	+	+/-	-	-	-	-	+	Puit trouble
B	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	Puit limpide
C	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+/-	Puis douteux -> considéré trouble
D	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-		
E	+	+	-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	-		CMI
F	+	+	+/-	-	-	-	+	+	+	-	-	-		CMB
G	+	+/-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-		
H	+	+	+/-	-	-	-	+	+	-	-	-	-		CMI = CMB

Figure 12 : Résultats de l'épreuve de faisabilité. Source : Solène Bacconnier.

Dans cette phase exploratoire, la souche 1 (*Staphylococcus pseudintermedius* sensible aux pénicillines) voit sa croissance inhibée à partir de 15 % pour le miel de châtaignier, et entre 15 et 20 % pour le miel de lavande. Pour la souche 2 (*S. pseudintermedius* multirésistant), le miel de châtaignier est inhibiteur dès 15 à 20 %, tandis que le miel de lavande l'est à partir de 15 %. Enfin, la souche 3 (*Pseudomonas aeruginosa* multirésistant) nécessite 20 % de miel de châtaignier ou 25 % de miel de lavande pour observer l'inhibition.

3. Détermination des concentrations minimales bactéricides

La CMB a été déterminée comme la plus faible concentration ne laissant apparaître aucune colonie (ou ≤ 3 colonies) après ensemencement et incubation sur gélose. Les résultats sont également présentés dans la figure 12.

Pour la souche 1, les deux miels présentent une activité bactéricide à partir de 30 %. Pour la souche 2, le miel de châtaignier est bactéricide dès 25 %, tandis que le miel de lavande ne l'est pas aux concentrations testées. Pour la souche 3, l'effet bactéricide est observé à partir

de 20 % pour le miel de châtaignier, et 30 % pour le miel de lavande. Le tableau V récapitule les résultats des CMI et CMB selon chaque souche et chaque miel.

Tableau V : Tableau récapitulatif des résultats de l'épreuve de faisabilité.

Source : Solène Bacconnier.

		Miel de lavande		Miel de châtaignier	
		CMI	CMB	CMI	CMB
S1 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> sensible sauf aux pénicillines	1	20%	30%	15%	/
	2	15%	/	15%	/
	3	Non réalisé	Non réalisé	15%	30%
S2 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> multirésistant	1	15%	/	20%	25%
	2	15%	/	20%	25%
	3	15%	/	15%	25%
S3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirésistant	1	25%	/	20%	20%
	2	25%	30%	20%	30%
	3	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé

Ces premiers résultats suggèrent que le miel de châtaignier pourrait présenter une activité antibactérienne plus marquée que le miel de lavande sur les souches testées. De plus, ils montrent également qu'en dessous de 15 % de miel, la croissance bactérienne n'est pas inhibée. En conséquence, nous avons choisi de poursuivre l'étude avec des concentrations entre 15 % et 40 % de miel.

B. Expérimentation complète

L'épreuve de faisabilité ayant permis de valider la pertinence et la reproductibilité du protocole, nous avons obtenu l'accord pour réaliser l'expérimentation complète avec un nombre accru de répétitions, en suivant la même méthodologie.

1. Les témoins

Lors de l'expérimentation complète, les puits témoins négatifs (miel de lavande ou de châtaignier aux concentrations testées, ainsi que bouillon BHI sans inoculum) sont demeurés parfaitement limpides, confirmant l'absence de contamination durant l'essai (figure 13, positions A1, A2 et A6).

Les témoins positifs, contenant l'une des trois souches bactériennes dans son milieu de culture BHI, ont présenté une turbidité marquée après incubation, témoignant de leur viabilité dans les conditions expérimentales retenues (figure 13, positions A3, A4 et A5).

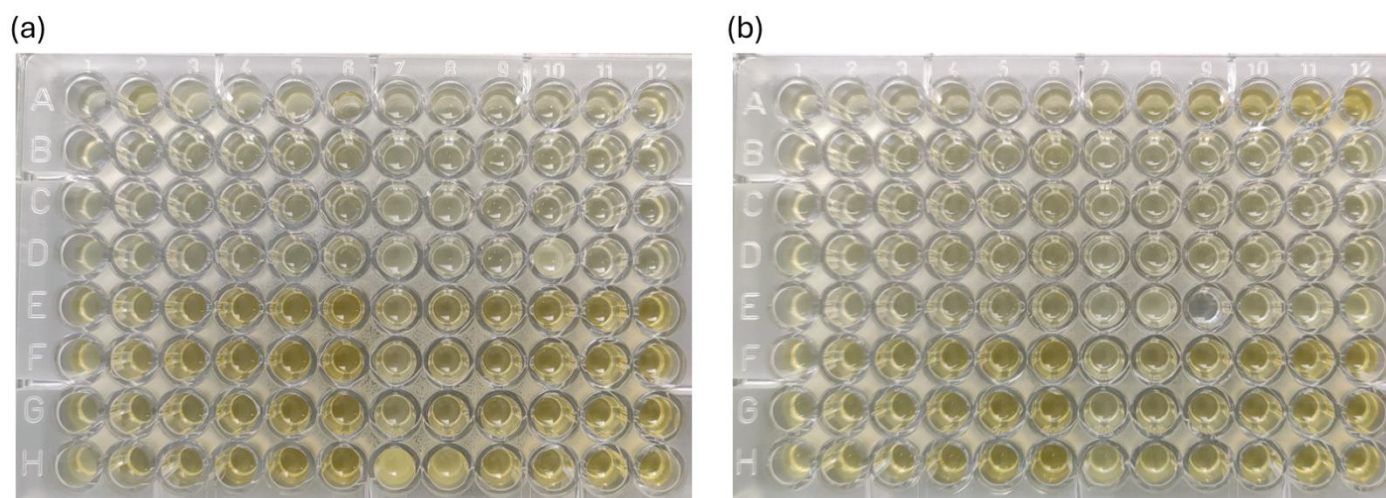


Figure 13 : Photos des plaques 1 (a) et 2 (b) de l'expérimentation complète post incubation. Source : Solène Bacconnier.

2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

La CMI correspond à la plus faible concentration de miel empêchant toute croissance bactérienne visible après incubation. Dans cette série expérimentale élargie, la souche 1 (*Staphylococcus pseudintermedius* sensible aux pénicillines) est inhibée à partir de 25 % pour le miel de châtaignier, et entre 20 % et 25 % pour le miel de lavande. Concernant la souche 2

(*S. pseudintermedius* multirésistant), une inhibition complète est observée dès 25 % pour le miel de châtaignier, et dès 20 % pour le miel de lavande. Enfin, la souche 3 (*Pseudomonas aeruginosa* multirésistant) ne montre macroscopiquement aucune croissance à partir de 25 % de miel, qu'il soit de châtaignier ou de lavande. Les valeurs obtenues pour chaque combinaison « miel – souche » sont synthétisées dans les figures 14 et 15. Les photographies des plaques illustrant ces résultats sont présentées figure 13 (ci-dessus).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
B	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
C	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
D	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
E	+	+	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-
F	+	+	+/-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-
G	+	+	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-
H	+	+	+/-	-	-	-	+	+	+	-	-	-

	CMI
	CMB
	CMI = CMB

+	Puit trouble
-	Puit limpide
+/-	Puis douteux -> considéré trouble

Figure 14 : Résultats de l'expérimentation complète de la plaque 1.

Source : Solène Bacconnier.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+/-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-
B	+/-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
C	+	+/-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
E	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
F	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
G	+	+	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-
H	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

	CMI
	CMB
	CMI = CMB

+	Puit trouble
-	Puit limpide
+/-	Puis douteux -> considéré trouble

Figure 15 : Résultats de l'expérimentation complète de la plaque 2.

Source : Solène Bacconnier.

3. Détermination des concentrations minimales bactéricides

La CMB a été définie comme la concentration minimale ne permettant pas la survie des bactéries après repiquage sur gélose (absence totale de colonies ou ≤ 3 colonies). Pour la souche 1, un effet bactéricide est observé à partir de 25 % avec le miel de châtaignier, alors que le miel de lavande ne montre pas de bactéricidie dans la gamme de concentrations testées. Pour la souche 2 (*S. pseudintermedius* multirésistant), le miel de châtaignier devient bactéricide entre 30 % et 40 % selon les séries, tandis que le miel de lavande ne l'est qu'exceptionnellement à 40 %. Enfin, pour la souche 3 (*Pseudomonas aeruginosa* multirésistant), la bactéricidie est atteinte à partir de 35 % de miel de châtaignier, mais n'est pas observée avec le miel de lavande aux concentrations évaluées. Les résultats sont également présentés dans les figures 14 et 15. Le tableau VI récapitule également, pour chaque souche, les concentrations de CMI et CMB associées.

Tableau VI : Tableau récapitulatif des résultats de l'expérimentation complète.

Source : Solène Bacconnier.

		Miel de lavande		Miel de châtaignier	
		CMI	CMB	CMI	CMB
S1 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> sensible sauf aux pénicillines	1	25%	/	25%	25%
	2	25%	/	25%	25%
	3	20%	/	25%	30%
	4	20%	/	25%	30%
	5	20%	/	25%	30%
S2 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> multirésistant	1	25%	/	25%	35%
	2	25%	/	25%	35%
	3	25%	/	25%	30%
	4	20%	/	25%	40%
	5	20%	40%	25%	30%
S3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirésistant	1	25%	/	30%	40%
	2	25%	/	30%	/
	3	25%*	/	30%	35%
	4	25%	/	25%	/
	5	25%	/	25%	/

* Résultats douteux de la série

Dans l'ensemble, on note que les valeurs de CMI et de CMB obtenues dans cette seconde phase sont supérieures à celles relevées lors de l'épreuve de faisabilité, suggérant une variabilité expérimentale ou une sensibilité moindre des bactéries issues de la phase de test.

III. Discussion

Cette étude *in vitro* a permis de confirmer que les deux miels testés (châtaignier et lavande) possèdent une activité antibactérienne mesurable. Aux concentrations les plus faibles évaluées, leur action est essentiellement inhibitrice (bactériostatique), tandis qu'à des concentrations plus élevées, le miel de châtaignier manifeste une action bactéricide sur certaines souches. Bien que l'expérimentation ait été limitée à une concentration maximale de 40 %, les résultats obtenus, couplés aux données de la littérature (Olaitan *et al.*, 2007), permettent de dire qu'un miel pur (100 %) ne permettrait pas la survie des bactéries testées. Il est donc probable qu'entre 40 % et 100 % de concentration, le seuil exact de la CMB soit atteint pour l'ensemble des souches, même si celui-ci n'a pas pu être déterminé dans le cadre de cette étude.

L'effet antibactérien observé confirme l'intérêt potentiel du miel comme alternative aux antibiotiques, notamment dans un contexte de résistance croissante. Toutefois, certaines différences ont été relevées entre les deux types de miel. Le miel de châtaignier a montré une activité bactéricide plus marquée que le miel de lavande, tout en présentant une viscosité moindre, ce qui facilitera son utilisation pour la suite de l'étude et son application en pratique clinique. Ces éléments ont donc motivé le choix de poursuivre les investigations uniquement avec le miel de châtaignier. L'analyse des résultats met également en évidence un profil particulier pour *Pseudomonas aeruginosa*, sur laquelle l'action des deux miels s'est avérée majoritairement bactériostatique dans les gammes testées, ce qui est cohérent avec les observations rapportées par Grego *et al.* (2016) sur des miels italiens.

Plusieurs limites doivent néanmoins être prises en compte dans l'interprétation des résultats. La viscosité du miel a pu influencer la répartition homogène des solutions, notamment pour le miel de lavande, rendant la diffusion et le contact avec les bactéries, inégaux selon les puits. Le nombre de séries expérimentales reste également limité, ce qui restreint la robustesse statistique des résultats et la portée comparative entre les deux miels. De plus, les souches utilisées lors de la deuxième phase provenaient des survivantes de l'épreuve de faisabilité, ce

qui pourrait avoir introduit un biais en sélectionnant des bactéries plus tolérantes aux stress environnementaux. Enfin, certaines divergences dans les valeurs de CMI et de CMB entre répétitions suggèrent une variabilité expérimentale inhérente à ce type de test, fréquente dans les études utilisant des produits naturels complexes. Ces facteurs doivent être considérés comme des limites méthodologiques.

Malgré ces limites, plusieurs éléments renforcent la pertinence et la fiabilité de l'étude. Les souches bactériennes sélectionnées font partie des agents les plus fréquemment impliqués dans les surinfections cutanées chez le chien, ce qui confère aux résultats une réelle applicabilité clinique. Par ailleurs, la méthode utilisée (la micro-dilution en bouillon), conforme aux recommandations du CLSI et de l'EUCAST, garantit la rigueur et la comparabilité des résultats. Enfin, cette étude se distingue par son originalité : à notre connaissance, il s'agit de la première évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des miels de lavande et de châtaignier sur des souches bactériennes d'intérêt vétérinaire, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives de recherche appliquée.

Par ailleurs, il est intéressant de confronter ces résultats aux concentrations en miel présentes dans certains produits vétérinaires à visée cicatrisante. La composition en miel varie fortement d'un produit à l'autre : par exemple, Honeyderm® contient 70 % de miel, tandis que pour Vetramil®, la proportion exacte n'est pas communiquée par le fabricant. Cette variabilité, associée au fait que le type de miel (origine botanique, géographique, méthodes de préparation) est rarement précisé, rend toute comparaison directe avec nos résultats délicate. Il serait donc réducteur de considérer qu'un produit est nécessairement antibactérien du seul fait qu'il contient du miel : l'effet bactériostatique ou bactéricide dépend non seulement de la qualité du miel, mais aussi de sa concentration, qui doit atteindre un certain seuil pour être efficace. Nos résultats suggèrent ainsi qu'une vigilance s'impose dans l'évaluation et le choix de ces formulations pour un usage vétérinaire. En outre, ces données valident l'intérêt du miel de châtaignier comme candidat pertinent pour la suite des travaux, avec une efficacité démontrée sur des souches bactériennes d'intérêt vétérinaire, et ouvrent la voie à des applications thérapeutiques plus ciblées.

IV. Conclusion

Cette première étude *in vitro* a permis de confirmer l'activité antibactérienne du miel de châtaignier sur des souches bactériennes cliniquement pertinentes en médecine vétérinaire, avec un effet bactéricide observé à partir de concentrations comprises entre 25 % et 35 % selon la souche. Comparé au miel de lavande, le miel de châtaignier a montré une efficacité supérieure et une viscosité plus faible, ce qui en fait un candidat plus adapté pour des applications cliniques potentielles.

Cependant, démontrer l'efficacité antibactérienne d'un produit ne suffit pas à garantir sa pertinence thérapeutique : avant toute utilisation sur un animal, et a fortiori sur une plaie, il est indispensable d'évaluer son innocuité vis-à-vis des tissus sains. Cette étape est cruciale pour éviter toute toxicité locale susceptible de retarder la cicatrisation. C'est pourquoi nous avons choisi de poursuivre nos travaux par un test de cytotoxicité du miel de châtaignier sur deux lignées cellulaires canines représentatives de la peau : les fibroblastes et les kératinocytes.

PARTIE III

Étude de la cytotoxicité du miel de châtaigner sur une lignée de kératinocytes et de fibroblastes canins

L'objectif de cette deuxième étude *in vitro* était de montrer l'innocuité du miel de châtaignier envers des kératinocytes et des fibroblastes canins. Pour cela un test de cytotoxicité a été réalisé avec du CCK-8 (*Cell Counting Kit-8*) réactif équivalent à celui du test MTT. Il s'agit d'un test colorimétrique sensible permettant de déterminer le nombre de cellules viables au cours d'une étude de cytotoxicité. Le WST-8 (*water soluble tetrazolium 8*) est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes en culture, en Formazan, un composé de couleur orangé. La quantité de Formazan produite est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes. En mesurant la densité optique à 450 nm, il est ainsi possible de connaître la quantité de cellules viables dans une culture cellulaire, après différents temps de contact avec la substance étudiée.

I. Matériel et Méthodes

A. Matériel biologique et réactifs

Le miel de châtaignier utilisé a été le même que celui de l'étude précédente : le miel de châtaignier de la maison Vergnon (La Viallère, 38 780, Pont Evêque).

Pour représenter la peau *in vitro*, deux types de cellules ont été choisis pour cette étude : une lignée de kératinocytes épidermiques canins appelés *Canine Progenitor Epidermal Keratinocytes* (CPEK), issue du laboratoire CELLnTECK *advanced cell systems* (Bern, Suisse) et des fibroblastes primaires isolés au laboratoire de dermatologie à partir de prélèvements de peau de chiot mort-né. Ces cellules ont été utilisées entre les passages P2 et P4. Les cellules ont été cultivées dans deux milieux de culture spécifiques :

- Le milieu de culture *CnT-09 Canine Epithelial Proliferation Medium*, pour les kératinocytes. Ce milieu a été supplémenté avec un mélange nutritif spécifique des

kératinocytes canins appelé *Complement medium CnT*. Ces réactifs proviennent du laboratoire *CELLnTECK advanced cell systems* (Bern, Suisse)

- Le milieu essentiel minimum modifié par Dulbecco, pour les fibroblastes. Ce milieu a été supplémenté avec du sérum de veau fœtal 10 %, des antibiotiques (mélange de pénicilline et de streptomycine) 2 % et de la glutamine 1 %. Ces réactifs proviennent du laboratoire Eurobio Scientific (Les Ulis, France).

Des mélanges de miel de châtaignier avec les milieux de culture des kératinocytes et des fibroblastes ont été réalisés dans les proportions 0 %, 15 %, 25 %, 50 % et 75 % de miel de châtaignier lors du contact avec les cellules. Après une première série test, nous avons décidé d'ajouter les concentrations suivantes à l'étude : 1 %, 2,5 %, 5 %, 7,5 % et 10 %.

Le réactif CCK-8 utilisé a été commandé chez le fournisseur Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

B. Méthodes

1. Vérification de la compatibilité du CCK-8 avec le miel de châtaignier

Tout d'abord, nous avons vérifié l'absence de réaction indésirable entre les milieux de culture, le PBS, le CCK8 et le miel de châtaignier qui pourrait gêner la lecture de densité optique. Dans une plaque de 96 puits à fond plat, les mélanges suivants ont été réalisés en triplicata : PBS + miel 75 %, PBS + miel 75 % + milieu de culture des kératinocytes, PBS + miel 50 % et PBS + miel 50 % + milieu de culture des fibroblastes. Ensuite, 10 µl de CCK8 ont été ajoutés à chacun des puits avant une incubation, pendant 20 minutes, à 37°C. Aucune différence de couleur des puits, aussi bien pour la solution de miel à 50 % que pour celle à 75 %, n'a été observée. La présence de milieu de culture DMEM ne modifie pas non plus la couleur de la solution, comme le montre la figure 16. Par conséquent, il est possible de réaliser les tests de cytotoxicité avec le CCK8 et les solutions de miel. Cependant, au vu de la viscosité du miel de châtaignier et de sa coloration naturelle, il est impératif de bien laver les puits de cellules avant l'ajout du CCK8.

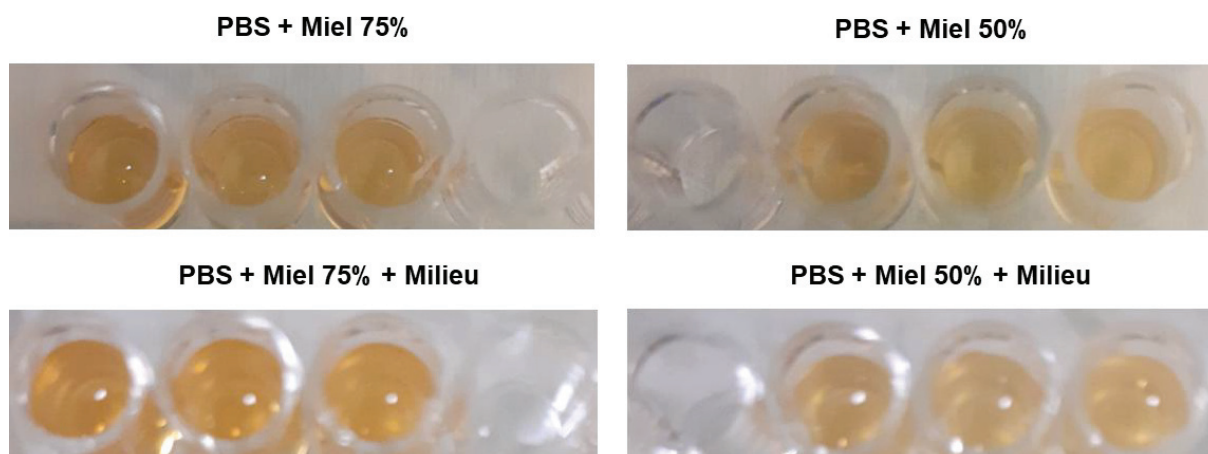


Figure 16 : Résultats de la vérification de la compatibilité entre le réactif CCK8, les milieux de culture et le miel de châtaigner. Source : Nadège Milhau.

2. Mise en contact du miel et des cellules

Tout d'abord, les kératinocytes et les fibroblastes ont été mis en culture dans 8 plaques de 96 puits, à raison de 100 μ L par puit à partir d'une solution de cellules trypsinées contenant 2×10^5 cellules/mL. Les plaques ont été incubées dans une étuve à 37°C, 5 % CO₂ en atmosphère humide pendant 24 heures. Après incubation, les plaques ont été vidées stérilement sous PSM par retournement sur une lingette absorbante afin de ne garder que le tapis cellulaire dans les puits. Les différentes solutions de miel ont ensuite été distribuées selon les plans de plaque présentés en figures 17 et 18, avant d'être incubées à nouveau à l'étuve.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	Fibroblastes + solution de miel à 75 %
	Fibroblastes + solution de miel à 50 %
	Fibroblastes + solution de miel à 25 %
	Fibroblastes + solution de miel à 15 %
	Témoin : Fibroblastes + milieu de culture
	Milieu de culture des fibroblastes

	Kératinocytes + solution de miel à 75 %
	Kératinocytes + solution de miel à 50 %
	Kératinocytes + solution de miel à 25 %
	Kératinocytes + solution de miel à 15 %
	Témoin : Kératinocytes + milieu de culture
	Milieu de culture des kératinocytes

Figure 17 : Plan de plaque aux concentrations initiales de miel.

Source : Solène Bacconnier

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	Fibroblastes + solution de miel à 10 %
	Fibroblastes + solution de miel à 7,5 %
	Fibroblastes + solution de miel à 5 %
	Fibroblastes + solution de miel à 2,5 %
	Fibroblastes + solution de miel à 1 %
	Témoin : Fibroblastes + milieu de culture

	Kératinocytes + solution de miel à 10 %
	Kératinocytes + solution de miel à 7,5 %
	Kératinocytes + solution de miel à 5 %
	Kératinocytes + solution de miel à 2,5 %
	Kératinocytes + solution de miel à 1 %
	Témoin : Kératinocytes + milieu de culture

Figure 18 : Plan de plaque aux concentrations diminuées de miel.

Source : Solène Bacconnier

3. Test colorimétrique de cytotoxicité

À la fin de la période de mise en contact entre les cellules et le miel allant de 6 à 48 heures, les solutions de miel ont été éliminées par aspiration à la pipette puis remplacées par 100 µL de milieu de culture frais. Dans chaque puits, 10 µL de CCK8 ont été ajoutés et les plaques ont été incubées à nouveau pendant deux heures. À la suite de cette deuxième incubation, la densité optique (DO) de chaque plaque a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm (Spectrophotomètre pour microplaques Multiskan™, Thermo Fisher Scientific). L'expérience a été réalisée deux fois afin vérifier la répétabilité des résultats.

4. Calcul de viabilité

Pour calculer le pourcentage de viabilité cellulaire, plusieurs étapes de traitement des données sont nécessaires :

- ✓ Calcul de la densité optique moyenne des milieux de culture seuls

Chaque milieu de culture a été mesuré huit fois. La densité optique moyenne (DO_{moyenne}) a été calculée séparément pour les milieux de culture des kératinocytes et des fibroblastes, avec la formule suivante :

$$DO_{\text{Mkéra moyenne}} = \frac{DO_{\text{Mkéra1}} + DO_{\text{Mkéra2}} + \dots + DO_{\text{Mkéra8}}}{8}$$

- ✓ Correction des DO mesurées pour chaque puits

Pour chaque puits contenant des cellules, la DO mesurée au spectrophotomètre ($DO_{\text{mesurée}}$) a été corrigée en soustrayant la DO moyenne du milieu de culture correspondant ($DO_{\text{Mkéra moyenne}}$ et $DO_{\text{Mfibro moyenne}}$) :

$$DO_{\text{corrigée}} = DO_{\text{mesurée}} - DO_{\text{M moyenne}}$$

- ✓ Calcul de la DO moyenne des puits témoins

À partir des puits témoins (sans exposition au miel) et après correction, la DO moyenne a été calculée pour chaque lignée cellulaire :

$$DO_{\text{Témoin_moyenne}} = \frac{DO_{\text{Témoin_corrigée}_1} + DO_{\text{Témoin_corrigée}_2} + \dots + DO_{\text{Témoin_corrigée}_8}}{8}$$

- ✓ Calcul du pourcentage de viabilité cellulaire

Le pourcentage de viabilité pour chaque puits a été déterminé en divisant sa DO corrigée par la DO moyenne des puits témoins de la même lignée cellulaire, puis en multipliant par 100 :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{DO_{\text{corrigée}}}{DO_{\text{Témoin_moyenne}}} \times 100$$

Enfin, la viabilité moyenne a été calculée à partir des duplicas de plaques pour chaque concentration de miel. Ainsi, chaque valeur de viabilité moyenne correspond à la moyenne des résultats obtenus pour un total de 16 puits (8 puits par plaque $\times$ 2 plaques).

II. Résultats

A. Observation microscopique des cellules avant mise en contact avec le miel

Après 24 heures de culture des deux types cellulaires et avant la mise en contact avec les solutions de miel, l'observation au microscope montre des cellules adhérentes, présentant une bonne croissance cellulaire (présence de nombreuses cellules allongées en cours de division) avec très peu de mortalité (absence de débris cellulaire dans le milieu de culture). Les kératinocytes présentent une morphologie hexagonale et les fibroblastes sont fusiformes, comme le montre la figure 19.

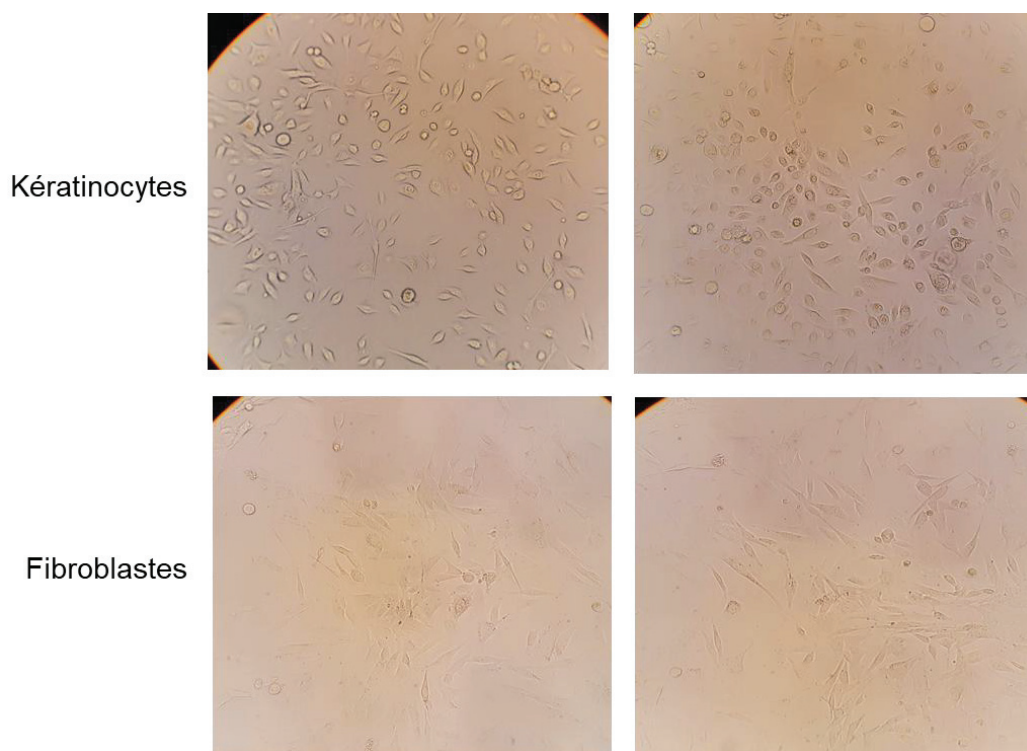


Figure 19 : Planche photographique de l'observation microscopique des cellules avant mise en contact avec le miel (objectif x20). Source : Nadège Milhau.

B. Après 6 heures d'incubation

1. Concentrations en miel entre 15 et 75 %

a. Observation microscopique

L'observation des puits contenant les fibroblastes ayant été en contact pendant six heures avec les solutions de miel de 15 à 75 % révèle qu'il n'y a plus de cellules adhérentes au fond des puits. Quelques cellules rondes en suspension et des débris cellulaires sont observés dans les puits ainsi que des résidus de miel. Dans les puits contenant les kératinocytes, quelques cellules adhérentes sont encore visibles au fond des puits. Les observations sont identiques pour toutes les solutions de miel. En revanche, les cellules des puits témoins sont toujours adhérentes et présentent les caractéristiques morphologiques qui leurs sont propres. Les photographies des observations microscopiques sont présentées avec les figures 20 et 21.

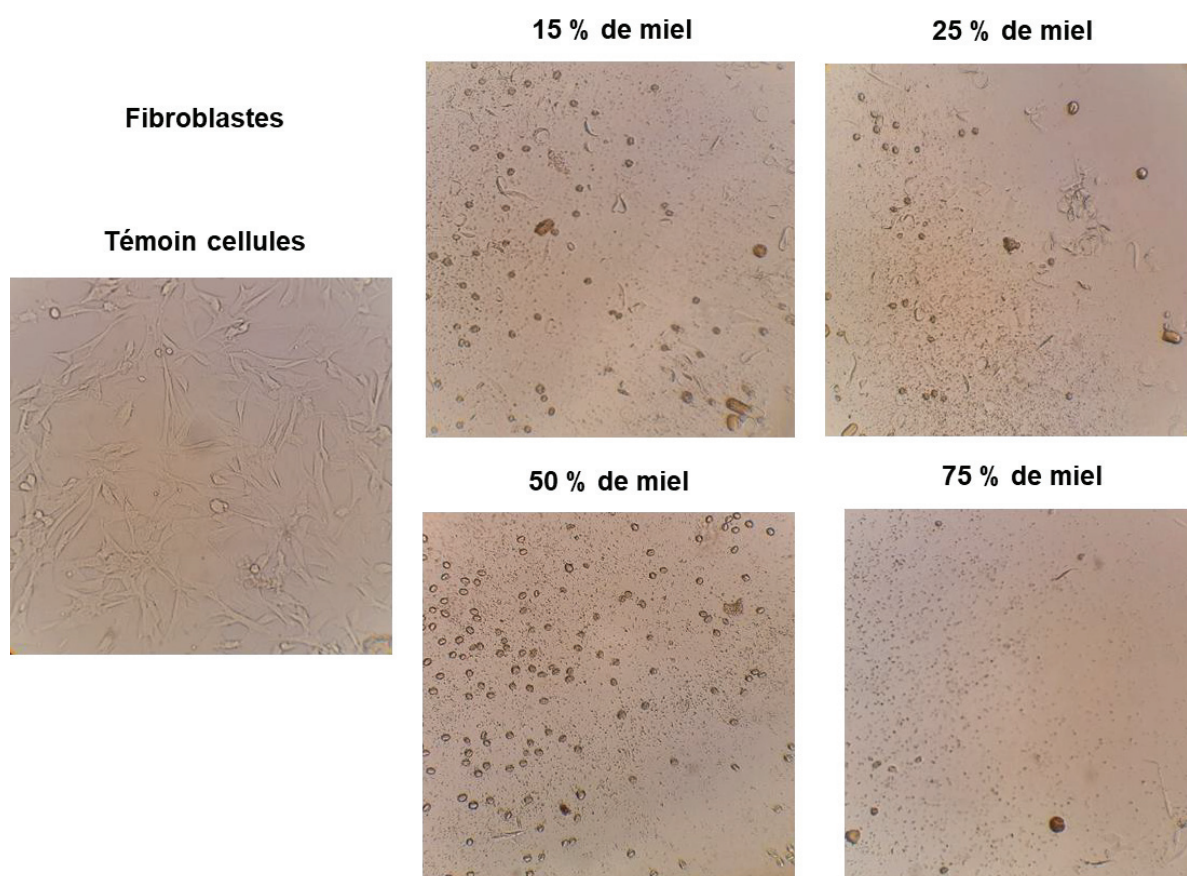


Figure 20 : Planche photographique de l'observation microscopique des fibroblastes après 6h de mise en contact avec le miel aux concentrations initiales (objectif x 20).

Source : Nadège Milhau.

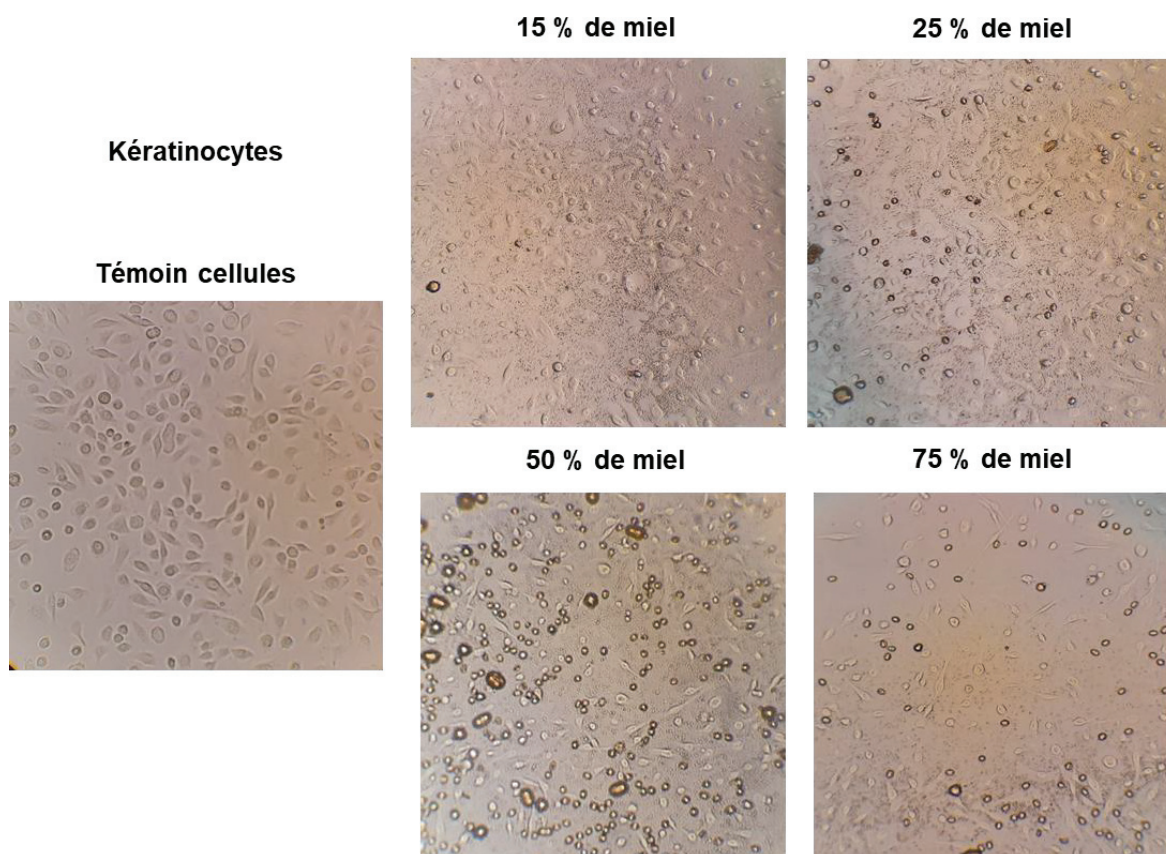


Figure 21 : Planche photographique de l'observation microscopique des kératinocytes après 6h de mise en contact avec le miel aux concentrations initiales (objectif x 20).

Source : Nadège Milhau.

b. Etude colorimétrique au CCK8

Les mesures de densité optique présentées dans les tableaux VII et VIII, montrent qu'il n'y a aucune différence de DO entre les puits témoins milieux seuls (sans cellules) et les puits de cellules incubées avec le miel, quelle que soit la concentration testée. Ce résultat confirme l'absence de cellules vivantes observées par microscope. Les quelques kératinocytes observés restants, qui étaient encore adhérents à la plaque, ne sont plus capables de métaboliser le CCK8, et par conséquent, sont également morts ou en cours d'apoptose. Ces résultats ont été obtenus après seulement six heures d'incubation.

Tableau VII : Tableau des densités optiques des fibroblastes obtenues après 6h de mise en contact avec le miel aux concentrations initiales. Source : Nadège Milhau.

Fibroblastes					
75%	50%	25%	15%	Te cellules	Te milieu
0,2169	0,2140	0,2131	0,2150	1,5806	0,2534
0,2272	0,2108	0,2243	0,2093	1,4467	0,2245
0,2103	0,2100	0,2115	0,2071	1,4139	0,2190
0,2050	0,2130	0,2128	0,2106	1,3011	0,2393
0,2068	0,2117	0,2136	0,1956	1,3069	0,2351
0,2110	0,2045	0,2059	0,1449	1,4231	0,2496
0,2064	0,2089	0,2031	0,1465	1,3853	0,2204
0,2074	0,1815	0,2067	0,2003	1,3789	0,2181
0,1880	0,2266	0,2257	0,1954	0,8471	0,2324

Tableau VIII : Tableau des densités optiques des kératinocytes obtenues après 6h de mise en contact avec le miel aux concentrations initiales. Source : Nadège Milhau.

Kératinocytes					
75%	50%	25%	15%	Te cellules	Te milieu
0,1672	0,1708	0,1584	0,1625	2,0537	0,2013
0,1764	0,1674	0,1826	0,1643	2,0724	0,2297
0,1682	0,1653	0,1593	0,1625	1,8479	0,1985
0,1695	0,1668	0,1673	0,1608	1,9250	0,1910
0,1674	0,1599	0,1594	0,1571	2,0715	0,2204
0,1690	0,1685	0,1641	0,1663	1,7560	0,2176
0,1716	0,1622	0,1601	0,1611	1,8142	0,2322
0,1553	0,1794	0,1573	0,1552	1,7618	0,2062
0,1713	0,2068	0,1897	0,1678	1,7488	0,2121

Dans les puits témoins cellules (cellules sans miel), les mesures de DO confirment la présence de cellules viables pour les deux types cellulaires.

Afin de confirmer ce résultat, les plaques 24 heures ont été conservées et analysées. Après 24 heures d'incubation avec le miel, comme précédemment, aucune densité optique ne dépasse celle des puits témoins, confirmant ainsi les résultats de la veille. De ce fait, cette première expérimentation n'a pas été poursuivie jusqu'aux 48 heures d'incubation initialement prévues. De plus, il a été décidé de renouveler cette expérience avec des concentrations en miel très inférieures (1,0 %, 2,5 %, 5,0 %, 7,5 % et 10 %).

2. Concentrations en miel entre 0 et 10%

a. Observation microscopique

Pour les fibroblastes, il y a moins de cellules adhérentes observées dans les puits à 7,5 et 10 % de miel par rapport aux puits témoins. De plus, les cellules adhérentes visibles présentent des signes de souffrance, notamment avec la présence de vacuoles. Des cellules arrondies en suspension sont également observées dans le milieu de culture. Dans le puits à 5 % de miel, la morphologie cellulaire se rapproche de celle des témoins, bien que le nombre de cellules soit également réduit et que certaines présentent des vacuoles. À partir de 2,5 % de miel, la morphologie est comparable à celle des fibroblastes témoins viables. La figure 22 présente la planche photographique obtenue lors de ces observations.

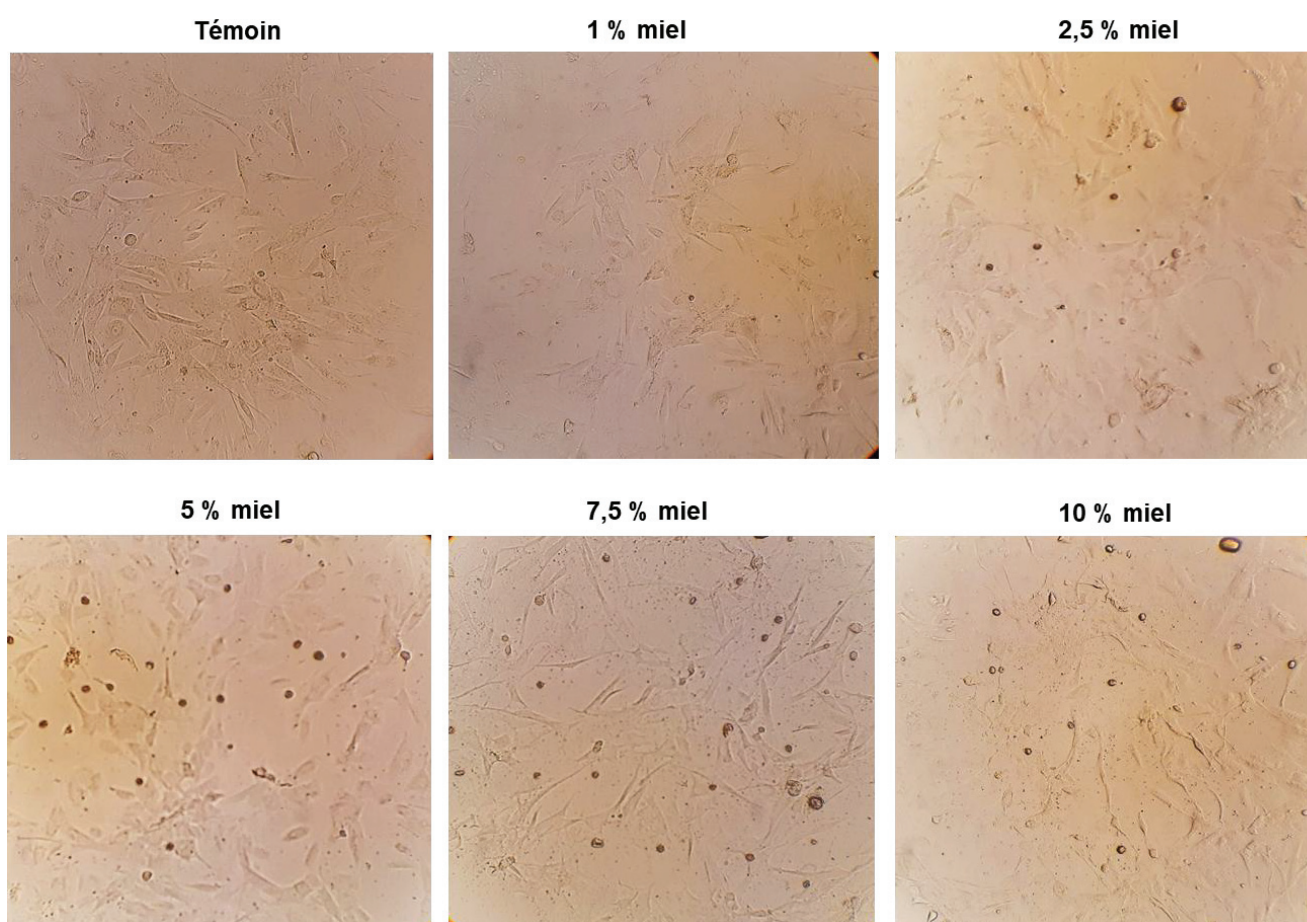


Figure 22 : Planche photographique de l'observation microscopique des fibroblastes après 6h de mise en contact avec le miel aux concentrations diminuées (objectif x20).

Source : Nadège Milhau.

Pour les kératinocytes, l'exposition à 10 % de miel entraîne une souffrance cellulaire marquée, caractérisée par des cellules de formes arrondies et la présence de nombreuses vacuoles. Dans le puits à 7,5 %, la morphologie est plus proche de celle des témoins, mais quelques cellules arrondies persistent. À partir de 5 % de miel, la morphologie observée est similaire à celle des kératinocytes témoins, suggérant une bonne viabilité cellulaire. Les illustrations correspondantes sont présentées en figure 23.

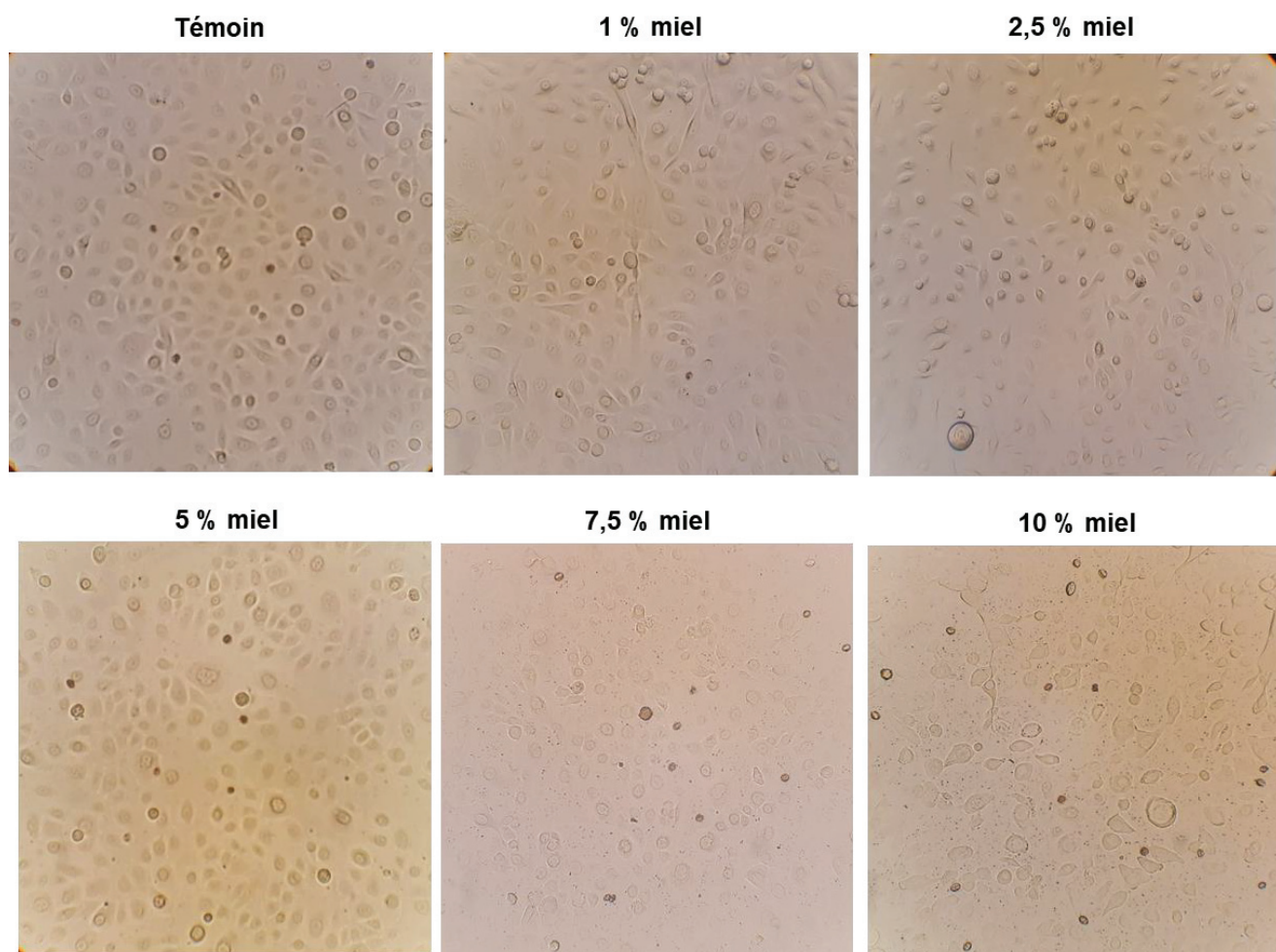


Figure 23 : Planche photographique de l'observation microscopique des kératinocytes après 6h de mise en contact avec le miel aux concentrations diminuées (objectif x20).

Source : Nadège Milhau.

b. Etude colorimétrique au CCK8

Les résultats du test CCK8 confirment les observations microscopiques. Les fibroblastes des puits à 10 % et 7,5 % de miel ne métabolisent plus le réactif, témoignant d'une mortalité cellulaire ou d'un processus d'apoptose en cours, tout comme les kératinocytes du puits à 10 % où la viabilité est inférieure à 5 %. Les fibroblastes des puits à 5 % de miel et les kératinocytes des puits à 7,5 % de miel présentent une viabilité inférieure à 50 % (respectivement 40 % et 30 %), confirmant l'effet cytotoxique du miel dès 6 heures de contact à des concentrations supérieures ou égales à 5 %. Une viabilité proche ou supérieure à 70 % n'est observée qu'à partir de 2,5 % de miel. Les valeurs correspondantes de viabilité cellulaire sont présentées dans le tableau IX.

Tableau IX : Tableau de viabilité des fibroblastes et des kératinocytes après 6h de contact avec le miel aux concentrations entre 0 et 10 %. Source : Solène Bacconnier.

	Fibroblastes					Kératinocytes				
Concentration en miel (%)	10	7,5	5	2,5	1	10	7,5	5	2,5	1
Viabilité moyenne (%)	2,7	4,6	39,6	67,4	81,0	5,1	28,2	62,4	73,5	91,2

Tous les résultats suivants concernent les concentrations en miel entre 0 et 10 %.

C. Après 24 heures d'incubation

1. Observation microscopique

L'observation des cultures de fibroblastes exposées au miel montre l'absence totale de cellules adhérentes à la concentration de 10 %. À 7,5 %, quelques cellules adhérentes restent visibles, mais la majorité sont en suspension dans le milieu de culture. À 5 %, la morphologie cellulaire est comparable à celle observée à 7,5 % après 6 heures : présence de quelques cellules adhérentes, accompagnées de nombreuses vacuoles. À partir de 2,5 % de miel, la morphologie des fibroblastes est similaire à celle des témoins, traduisant une bonne viabilité. Les images issues de cette observation sont regroupées dans la figure 24.

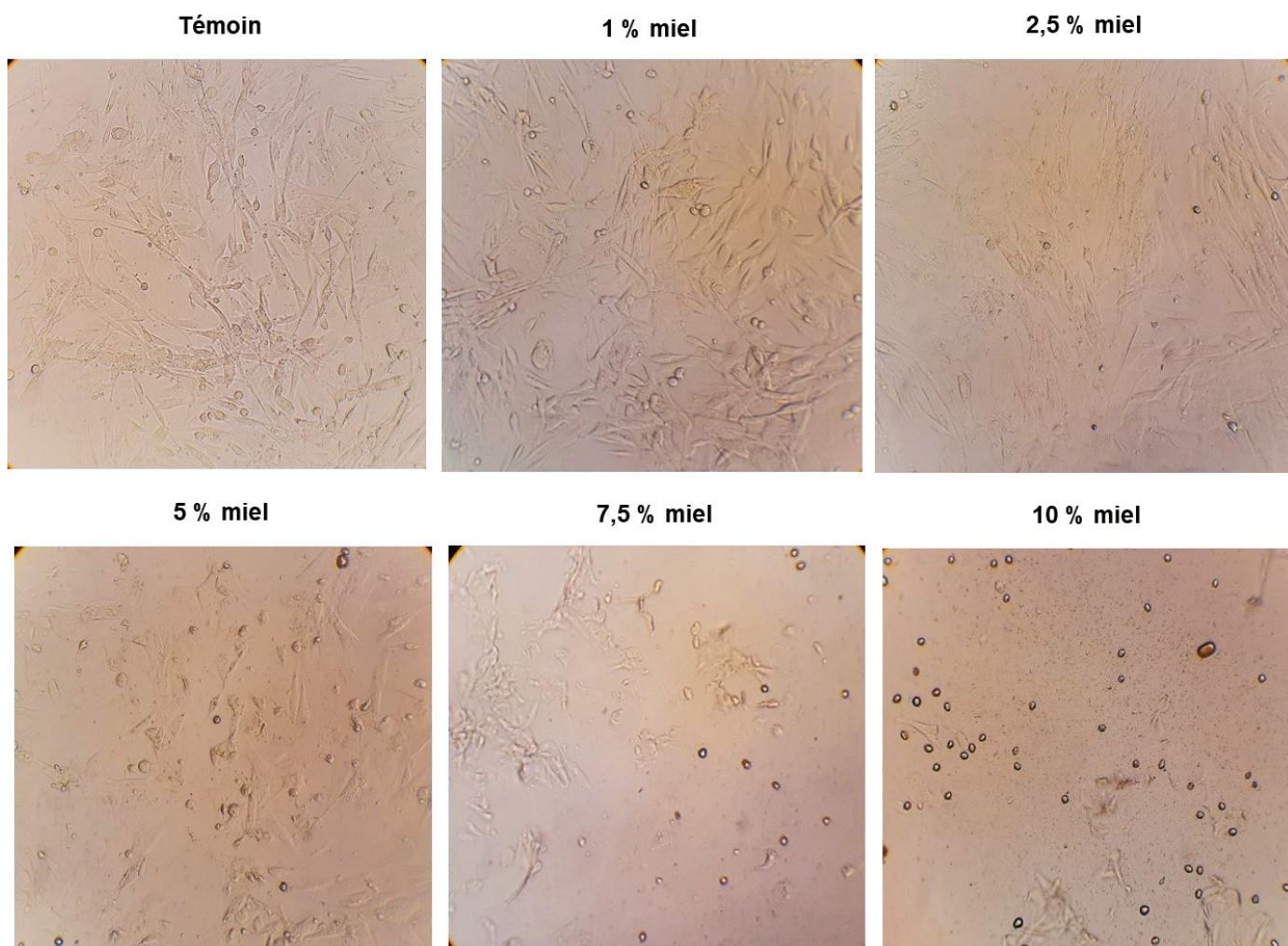


Figure 24 : Planche photographique de l'observation microscopique des fibroblastes après 24h de mise en contact avec le miel entre 0 et 10 % (objectif x20).

Source : Nadège Milhau.

Dans les cultures de kératinocytes, la concentration de 10 % de miel entraîne une diminution marquée de la densité de cellules adhérentes semblant viables. La grande majorité des kératinocytes présente une morphologie arrondie et de nombreuses vacuoles. À 7,5 %, les cellules présentent également une souffrance importante, se traduisant à nouveau par un aspect arrondi et des vacuoles. À partir de 5 %, la morphologie est proche de celle observée dans les cultures témoins. Les clichés représentatifs sont fournis en figure 25.

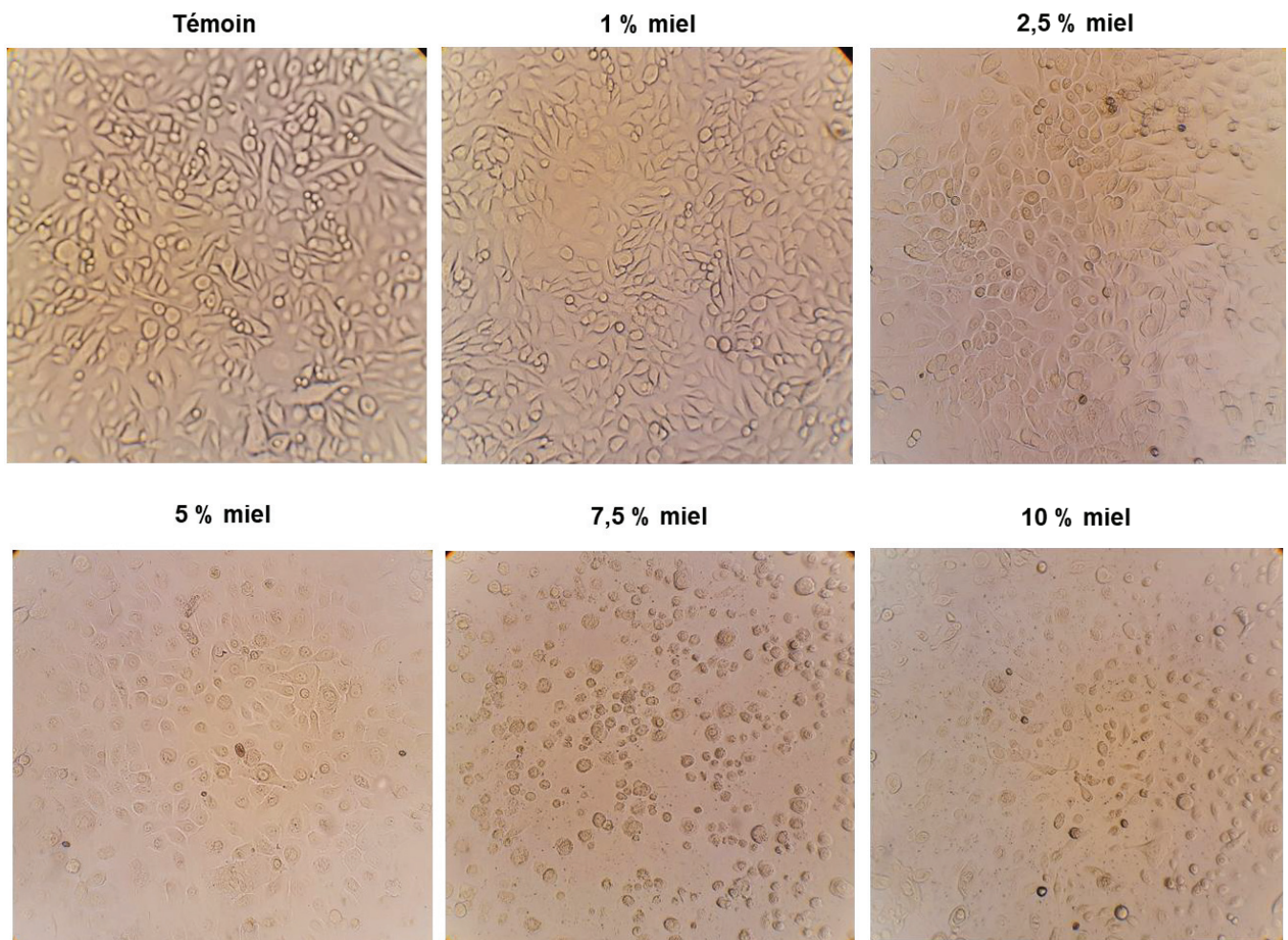


Figure 25 : Planche photographique de l'observation microscopique des kératinocytes après 24h de mise en contact avec le miel entre 0 et 10% (objectif x20).

Source : Nadège Milhau.

2. Etude colorimétrique au CCK8

Les résultats du test CCK8 corroborent ces observations. Les fibroblastes exposés à 10 % et 7,5 % de miel présentent une viabilité très faible ($< 5\%$), tout comme les kératinocytes à 10 % (viabilité = 0). Les fibroblastes exposés à 5 % conservent une viabilité de 40 %, identique à celle mesurée à six heures. Les kératinocytes exposés à 7,5 % présentent une viabilité d'environ 15 %, inférieure à celle observée à six heures (30 %), tandis que ceux exposés à 5 % affichent une diminution d'environ 10 % par rapport à la valeur à six heures. Comme précédemment, il est nécessaire de réduire la concentration à 2,5 % pour atteindre une

viabilité voisine ou supérieure de 70 % pour les deux types cellulaires. Le tableau X rassemble l'ensemble des données de viabilité cellulaire obtenues.

Tableau X : Tableau de viabilité des fibroblastes et des kératinocytes après 24h de contact avec le miel entre 0 et 10 %. Source : Solène Bacconnier.

	Fibroblastes					Kératinocytes				
Concentration en miel (%)	10	7,5	5	2,5	1	10	7,5	5	2,5	1
Viabilité moyenne (%)	2,7	4,6	39,5	67,2	83,3	0,0	13,4	57,5	78,9	84,5

D. Après 30 heures d'incubation

1. Observation microscopique

Les observations faites après 30 heures d'incubation sont similaires à celles faites après 24 heures, aussi bien pour les fibroblastes que pour les kératinocytes. Les figures 26 et 27 synthétisent les observations réalisées au microscope.

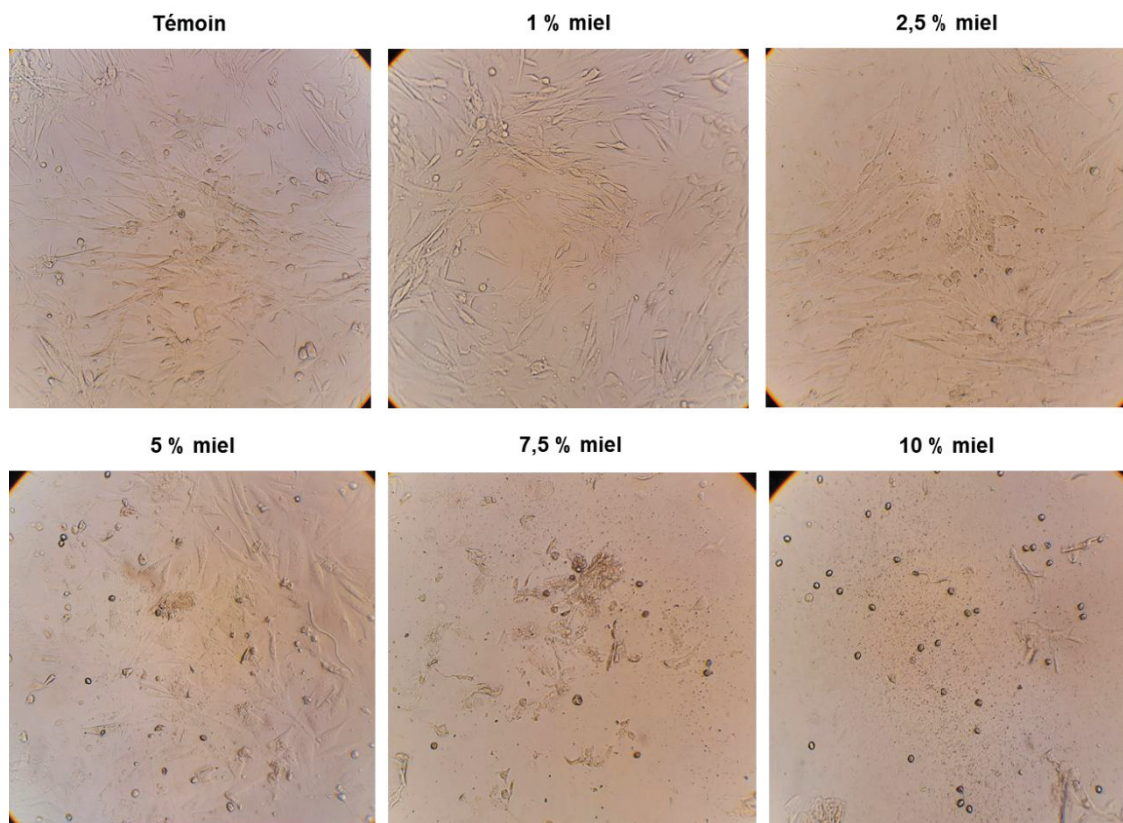


Figure 26 : Planche photographique de l'observation microscopique des fibroblastes après 30h de mise en contact avec le miel entre 0 et 10 % (objectif x20). Source : Nadège Milhau.

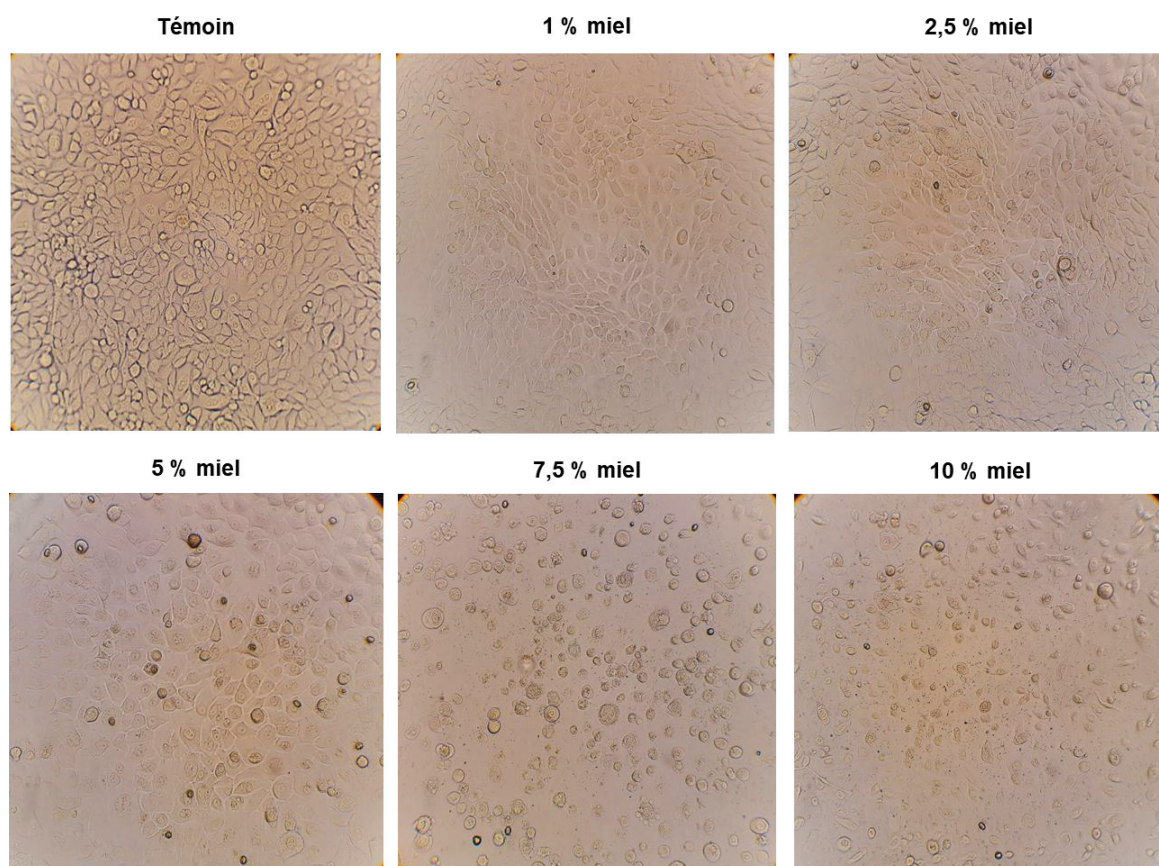


Figure 27 : Planche photographique de l'observation microscopique des kératinocytes après 30h de mise en contact avec le miel entre 0 et 10 % (objectif x20).

Source : Nadège Milhau.

2. Etude colorimétrique au CCK8

Les résultats du test colorimétrique indiquent que les solutions de miel, de concentrations supérieures à 5 %, ont une toxicité importante et entraînent une mortalité complète pour les fibroblastes après 24 heures d'incubation. À 5 %, la viabilité cellulaire est d'environ 50 %. Les concentrations inférieures ou égales à 2,5 % n'exercent que peu ou pas d'effet délétère, avec une viabilité supérieure à 80 %.

Pour les kératinocytes, une concentration de 7,5 % induit également un effet toxique marqué, sans toutefois provoquer une mortalité totale comme observé chez les fibroblastes (viabilité avoisinant les 15 %). En revanche, à partir de 5 %, les résultats sont comparables entre les deux types cellulaires. Une viabilité d'environ 50 % est observée à une concentration 5 % de miel. De plus, les concentrations inférieures ou égales à 2,5 % n'exercent que peu ou pas

d'effet délétère, avec une viabilité cellulaire supérieure à 80 %. Les résultats de viabilité cellulaire sont reportés dans le tableau XI.

Tableau XI : Tableau de viabilité des fibroblastes et des kératinocytes après 30h de contact avec le miel entre 0 et 10 %. Source : Solène Bacconnier.

	Fibroblastes					Kératinocytes				
Concentration en miel (%)	10	7,5	5	2,5	1	10	7,5	5	2,5	1
Viabilité moyenne (%)	0,0	0,0	49,6	84,3	88,9	0,0	13,4	46,9	71,7	86,4

E. Après 48 heures d'incubation

1. Observation microscopique

À 48 heures, l'aspect général des cellules reste similaire à celui observé à 24 heures, à l'exception des puits contenant des kératinocytes, dans lesquels les cellules ont atteint la confluence. La coloration du milieu de culture, contenant un indicateur de pH, suggère un appauvrissement en nutriments. De plus, les cellules apparaissent étroitement accolées et commencent à se superposer. Les clichés observés sont présentés en figures 28 et 29.

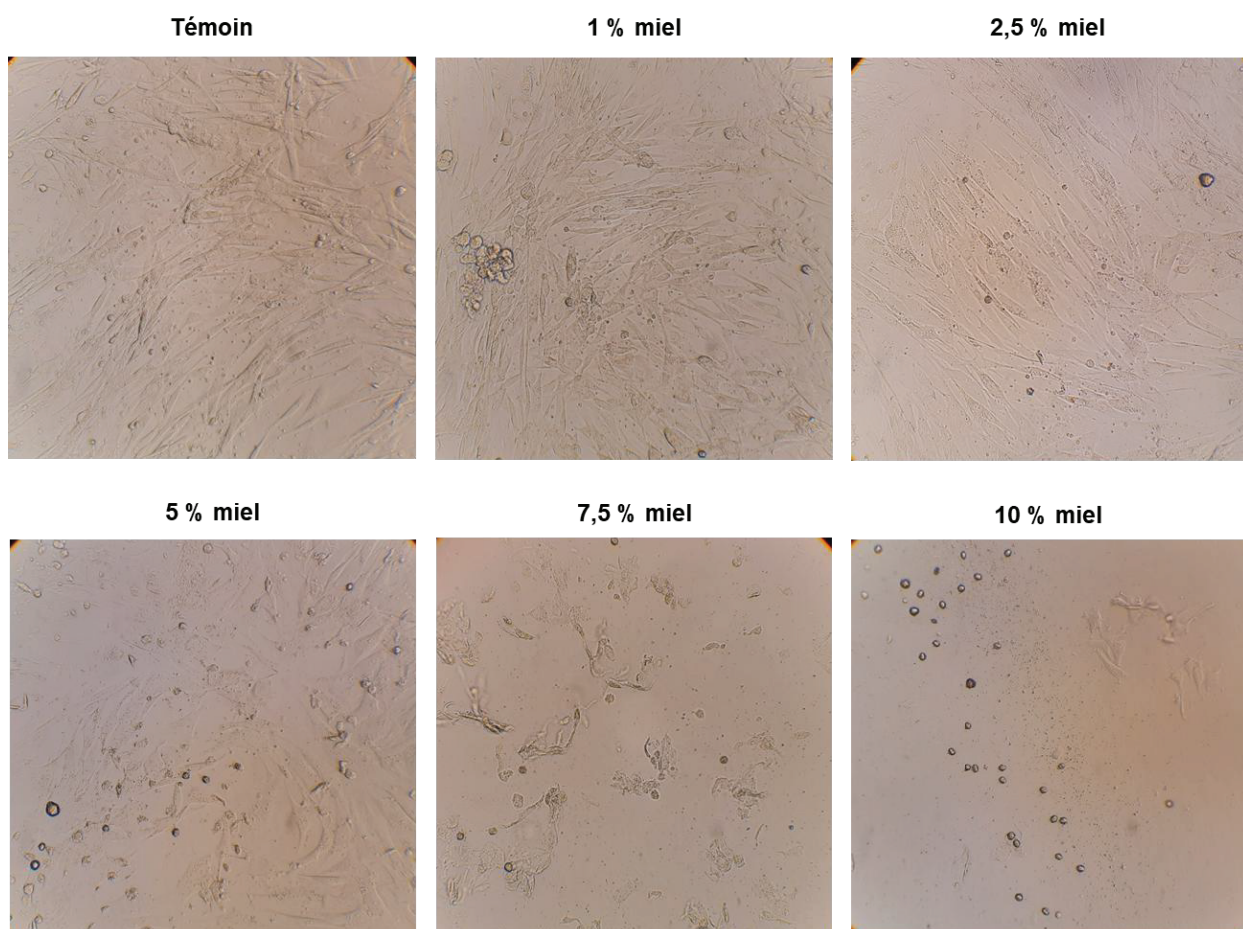


Figure 28 : Planche photographique de l'observation microscopique des fibroblastes après 48h de mise en contact avec le miel entre 0 et 10 % (objectif x20).

Source : Nadège Milhau.

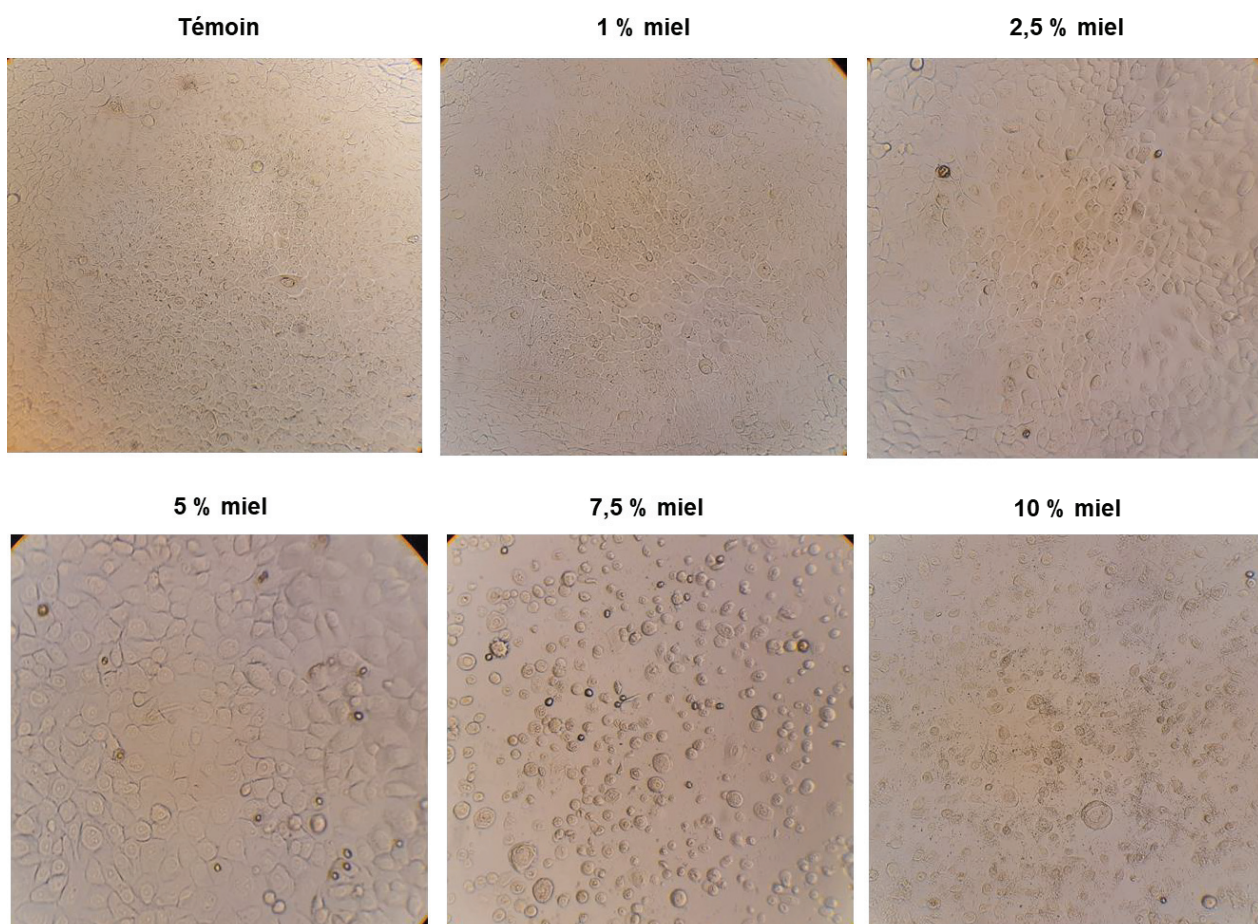


Figure 29 : Planche photographique de l'observation microscopique des kératinocytes après 48h de mise en contact avec le miel entre 0 et 10 % (objectif x20).

Source : Nadège Milhau.

2. Etude colorimétrique au CCK8

Les valeurs obtenues sont comparables à celles mesurées à 30 heures pour les fibroblastes. En revanche, pour les kératinocytes, les concentrations supérieures à 5 % présentent une toxicité très importante avec une mortalité complète. À 5 %, la viabilité est d'environ 25 %, et à 2,5 %, elle avoisine les 65 %, soit une valeur inférieure à celle observée à 30 heures. À 1 %, le miel n'entraîne pas ou peu d'effet délétère sur les kératinocytes après 48 heures d'incubation. Les valeurs correspondantes de viabilité cellulaire sont présentées dans le tableau XII.

Tableau XII : Tableau de viabilité des fibroblastes et des kératinocytes après 48h de contact avec le miel entre 0 et 10 % (objectif x20). Source : Solène Bacconnier.

	Fibroblastes					Kératinocytes				
Concentration en miel (%)	10	7,5	5	2,5	1	10	7,5	5	2,5	1
Viabilité moyenne (%)	0,0	0,0	41,2	87,5	93,5	0,0	1,4	26,7	63,8	89,3

L'ensemble des valeurs de viabilité cellulaire obtenues à six heures, 24 heures, 30 heures et 48 heures de mise en contact avec les différentes concentrations de miel est présenté dans le tableau XIII. Ce tableau permet de comparer directement l'évolution de la viabilité des fibroblastes et des kératinocytes au cours du temps, pour chaque concentration testée.

Tableau XIII : Tableau de synthèse de la viabilité des fibroblastes et des kératinocytes après contact avec le miel aux concentrations diminuées. Source : Solène Bacconnier.

		Fibroblastes					Kératinocytes				
Concentration en miel (%)		10	7,5	5	2,5	1	10	7,5	5	2,5	1
Temps de contact (h)	6	2,7	4,6	39,6	67,4	81,0	5,1	28,2	62,4	73,5	91,2
	24	2,7	4,6	39,5	67,2	83,3	0,0	13,4	57,5	78,9	84,5
	30	0,0	0,0	49,6	84,3	88,9	0,0	13,4	46,9	71,7	86,4
	48	0,0	0,0	41,2	87,5	93,5	0,0	1,4	26,7	63,8	89,3

Les figures 30 et 31 illustrent graphiquement ces résultats, afin de faciliter la visualisation des tendances générales et des différences entre lignées cellulaires. Cette représentation met en évidence les variations de viabilité en fonction de la concentration en miel et de la durée d'exposition, et permet d'apprécier plus clairement les effets cytotoxiques observés aux concentrations les plus élevées.

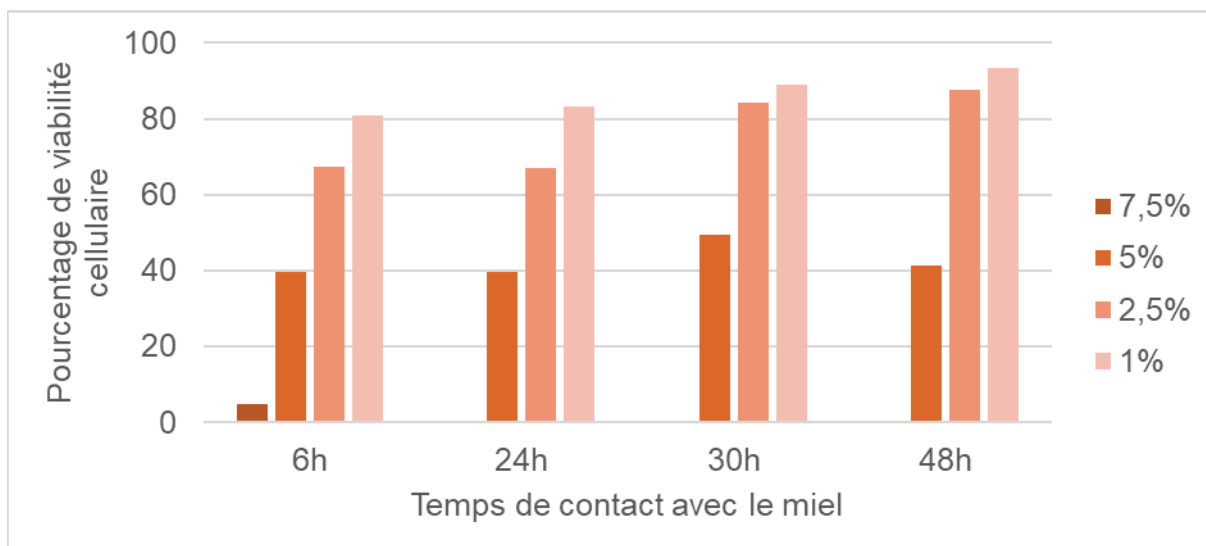


Figure 30 : Diagramme de synthèse de la viabilité des fibroblastes après contact avec le miel entre 0 et 10 %. Source : Solène Bacconnier.

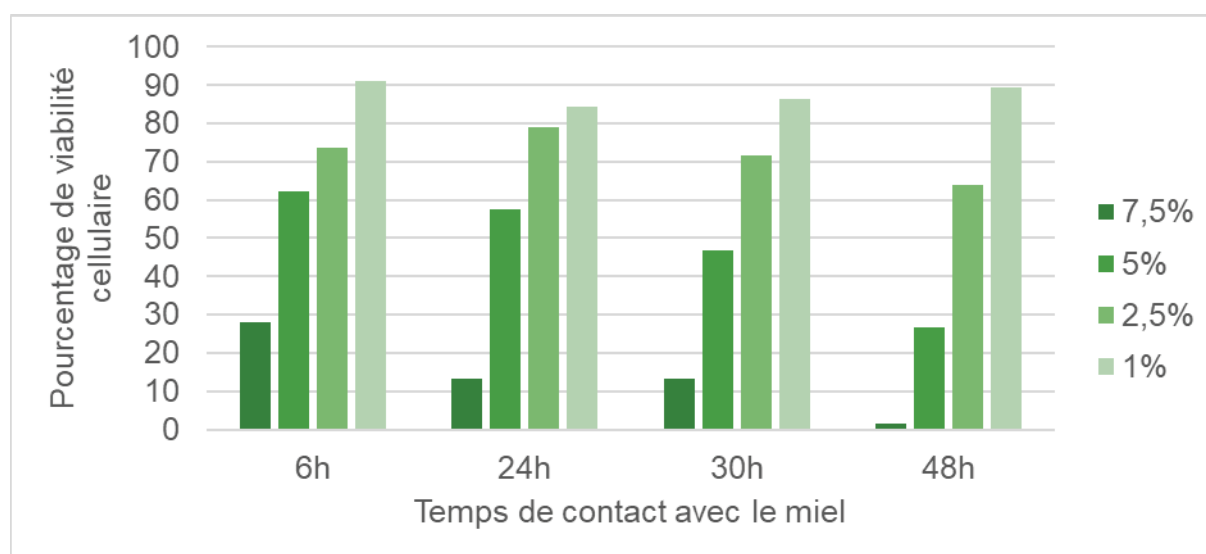


Figure 31 : Diagramme de synthèse de la viabilité des kératinocytes après contact avec le miel entre 0 et 10 %. Source : Solène Bacconnier.

III. Discussion

L'observation microscopique des fibroblastes et des kératinocytes, en culture, après exposition aux solutions de miel de châtaignier, montre une cytotoxicité dépendante de la concentration et du temps de contact. Les fibroblastes apparaissent plus sensibles, avec une mortalité totale observée à des concentrations supérieures à 5 % dès 24 heures, tandis que les kératinocytes conservent une viabilité partielle à 7,5 %. Ces données sont confirmées par les résultats du test CCK-8, qui montrent une viabilité cellulaire inférieure à 50 % à la concentration de 5 % de miel et inférieure à 20 % à la concentration 7,5 % de miel, pour les fibroblastes, avec un profil similaire mais légèrement décalé pour les kératinocytes.

La différence de viabilité observée entre les fibroblastes et les kératinocytes peut s'expliquer par la nature des cellules utilisées. Les fibroblastes proviennent d'une culture primaire, tandis que les kératinocytes appartiennent à une lignée cellulaire établie. Les cellules primaires, bien qu'elles reproduisent plus fidèlement les caractéristiques physiologiques du tissu d'origine, sont décrites comme plus sensibles aux contraintes environnementales et aux agents exogènes que les lignées cellulaires, plus stables et adaptées à la culture prolongée (Pipiya *et al.*, 2024). Elles présentent cependant l'avantage de présenter des caractéristiques plus proches des cellules *in vivo*. Dans ce travail, le choix d'une lignée de kératinocytes à la place de kératinocytes primaires a été réalisé du fait de la difficulté de culture des cellules primaires canines. Les CPEK sont de plus couramment utilisées dans la littérature pour représenter des épidermes canins en 2D et en 3D.

Les résultats de viabilité obtenus avec les fortes concentrations de miel étaient peu attendus compte tenu de l'usage répandu du miel, tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, où il est généralement considéré comme sûr en application topique. Dans certaines études de la littérature, un effet bénéfique de stimulation cellulaire ou de viabilité est observé à des concentrations très faibles de miel (par exemple 0,04 % à 0,25 %) dans des cultures de fibroblastes ou kératinocytes (Priyono *et al.*, 2024). Ce contraste renforce l'idée que la cytotoxicité observée ici n'est pas un effet universel mais dépend fortement du type de miel, de la lignée cellulaire et du modèle expérimental. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées : une hypoxie cellulaire liée à la forte viscosité du miel, limitant la diffusion d'oxygène jusqu'au tapis cellulaire, ou une déshydratation massive des cellules par effet osmotique. Ces mécanismes pourraient, par ailleurs, contribuer à ses propriétés antibactériennes, mais leur rôle précis dans la cytotoxicité observée *in vitro* reste à déterminer. Des études antérieures ont également mis

en évidence une induction de la voie apoptotique mitochondriale (activation des caspases, effondrement du potentiel mitochondrial) par des miels ou leurs composants phénoliques dans des lignées tumorales (par exemple, dans une lignée ovarienne SKOV-3 exposée à miel multi floral) (Rasulova *et al.*, 2025). Il ne peut être exclu non plus que certains constituants en quantité spécifique du miel de châtaignier, tels que des composés phénoliques ou flavonoïdes (Özcan & Ölmez, 2014), puissent contribuer à la cytotoxicité observée. Ce point souligne la nécessité d'étudier d'autres types de miel afin de déterminer si cet effet est spécifique au miel de châtaignier ou commun à l'ensemble des miels.

Toutefois, ces hypothèses doivent être interprétées avec prudence au regard du modèle choisi. En effet, la principale limite de cette étude réside dans le modèle utilisé : cultures cellulaires en monocouche, dépourvues de vascularisation et d'exsudat, recouvertes d'une solution statique de miel. Ce contexte accentue probablement l'effet de privation en oxygène et de stress osmotique, et ne reflète pas fidèlement la situation *in vivo*, où le miel appliqué sur une plaie est dilué par les fluides tissulaires et renouvelé par les soins. De plus, une autre limite de ce travail concerne le faible nombre de répétitions expérimentales, ce qui peut accroître la variabilité inter-puits et réduire la robustesse des résultats. Ce facteur méthodologique peut introduire un biais de représentativité et limiter la reproductibilité de l'étude.

En outre, ces résultats doivent être mis en perspective avec l'existence de produits vétérinaires commercialisés contenant des concentrations élevées de miel, tels que Honeyderm® avec 70 % de miel. L'utilisation clinique de ces formulations, validées et bien tolérées chez l'animal, confirme que le modèle *in vitro* utilisé dans cette étude ne reflète pas la réalité physiologique. Si le miel exerçait une cytotoxicité comparable à celle observée dans nos conditions expérimentales, il ne pourrait pas être employé de manière aussi répandue et sécurisée. Cette divergence renforce l'idée que les conditions expérimentales, notamment l'absence de vascularisation et la monocouche cellulaire, amplifient les effets cytotoxiques. Pour pallier cette limitation, il serait pertinent d'utiliser des modèles cutanés tridimensionnels ou des explants de peau (*ex vivo*), qui conservent l'architecture tissulaire (kératinocytes et fibroblastes en matrice) et une diffusion plus réaliste des nutriments et de l'oxygène (Mathes *et al.*, 2014). Ces modèles 3D sont déjà largement décrits dans le contexte du développement de médicaments dermatologiques (Mathes *et al.*, 2014).

Enfin, ces observations ouvrent plusieurs perspectives : confirmer ou infirmer ces résultats sur des modèles plus proches du tissu cutané, tels que des épidermes reconstitués ou

des modèles animaux (Parasuraman *et al.*, 2020). Il serait également pertinent de préciser le mode d'action du miel dans le processus de cicatrisation cutanée chez les animaux de compagnie.

IV. Conclusion

En conclusion, le miel de châtaignier présente une cytotoxicité *in vitro*, à partir de la concentration de 5 %, en particulier sur les fibroblastes, dans les conditions expérimentales de cette étude. Ces données ne permettent pas d'exclure son utilisation clinique, mais incitent à la prudence dans l'extrapolation directe des résultats *in vitro* à l'*in vivo*, et soulignent la nécessité de travaux complémentaires pour préciser son mode d'action et déterminer les conditions d'emploi les plus sûres.

Conclusion

La cicatrisation cutanée est un processus dynamique et hautement régulé qui illustre la capacité des tissus à restaurer leur intégrité face à une agression. Elle possède une importance particulière en pratique vétérinaire, où les plaies cutanées constituent un motif fréquent de consultation. Dans un contexte mondial marqué par la progression de l'antibiorésistance, la recherche d'alternatives naturelles capables de soutenir la réparation tissulaire tout en limitant le recours aux antibiotiques représente un enjeu majeur pour la médecine vétérinaire moderne. Parmi les solutions envisagées, le miel se distingue par ses propriétés biologiques multiples et par l'intérêt croissant qu'il suscite dans la prise en charge des plaies.

L'étude bibliographique a permis de préciser les propriétés du miel susceptibles d'intervenir favorablement dans ce processus et de rappeler les principaux mécanismes de la cicatrisation cutanée. Les effets antimicrobiens, antioxydants et pro-cicatrisants du miel, largement documentés en médecine humaine, en font un agent thérapeutique polyvalent. Toutefois, les données spécifiques aux espèces animales de compagnie demeurent limitées, ce qui justifie pleinement la réalisation d'études expérimentales du sujet.

L'étude *in vitro* de l'activité antibactérienne a permis de confirmer le potentiel du miel de châtaignier vis-à-vis de bactéries fréquemment rencontrées en pratique vétérinaire : *Staphylococcus pseudintermedius* et *Pseudomonas aeruginosa*. Un effet bactéricide a été observé à des concentrations comprises entre 25 % et 35 %, selon la souche testée. Le miel de châtaignier s'est montré globalement plus efficace que le miel de lavande, tout en présentant des caractéristiques physiques favorables à une application clinique. Ces résultats confirment l'intérêt thérapeutique de l'application topique du miel dans la gestion des plaies cutanées, en complément des approches conventionnelles.

L'étude de cytotoxicité a, quant à elle, mis en évidence une toxicité cellulaire à partir de la concentration de 5 %, en particulier sur les fibroblastes. Cependant, les conditions *in vivo* étant très différentes de celles du modèle expérimental, ces effets ne remettent pas en cause son potentiel d'utilisation clinique. Ces résultats invitent à la prudence dans l'interprétation des données *in vitro* et rappellent l'importance de prendre en compte la complexité du microenvironnement cutané. En effet, le modèle *in vitro* ne reproduit pas fidèlement les conditions physiologiques d'une plaie en cours de cicatrisation, où la diffusion des substances,

les interactions cellulaires et la présence d'exsudat peuvent considérablement moduler les effets observés.

Ainsi, ce travail met en lumière le potentiel thérapeutique du miel de châtaignier dans la lutte contre les infections cutanées, tout en soulignant la nécessité de mieux définir les concentrations et les modalités d'application, avant toute utilisation clinique. Il ouvre la voie à des recherches complémentaires, notamment sur des modèles *in vitro* complémentaires, *ex vivo* ou *in vivo*, afin de confirmer les effets bénéfiques observés et de mieux comprendre les mécanismes d'action du miel sur les tissus cutanés.

Au-delà de ses résultats expérimentaux, cette étude s'inscrit dans une démarche de valorisation des ressources naturelles locales et de promotion d'une médecine vétérinaire durable. En explorant les propriétés d'un produit simple et accessible, ce travail contribue à la réflexion sur l'intégration raisonnée de solutions naturelles dans la pratique clinique contemporaine.

Bibliographie

Almasaudi, S. (2021). The antibacterial activities of honey. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(4), 2188-2196. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.017>

Bohling, M. W., & Henderson, R. A. (2006). Differences in cutaneous wound healing between dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 36(4), 687-692. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.02.001>

Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>

Dai, T., Kharkwal, G. B., Tanaka, M., Huang, Y.-Y., Bil de Arce, V. J., & Hamblin, M. R. (2011). Animal models of external traumatic wound infections. *Virulence*, 2(4), 296-315. <https://doi.org/10.4161/viru.2.4.16840>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2001). *Norme pour le miel (CXS 12-1981)*. Codex Alimentarius. Adoptée en 1981 ; révisée en 1987 et 2001 ; amendée en 2019 et 2022. Consulté le 10 août 2025, à l'adresse : https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012f.pdf

Grego, E., Robino, P., Tramuta, C., Giusto, G., Boi, M., Colombo, R., Serra, G., Chiadò-Cutin, S., Gandini, M., & Nebbia, P. (2016). Evaluation of antimicrobial activity of Italian honey for wound healing application in veterinary medicine. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 158(7), 521-527. <https://doi.org/10.17236/sat00075>

Hammond, E. N., & Donkor, E. S. (2013). Antibacterial effect of *Manuka* honey on *Clostridium difficile*. *BMC Research Notes*, 6, 188. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-188>

International Organization for Standardization. (2019). *ISO 20776-1:2019 — Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes — Partie 1 : Méthode de référence de microdilution en bouillon pour la*

détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies infectieuses. Genève : ISO.

Johnston, M., McBride, M., Dahiya, D., Owusu-Apenten, R., & Singh Nigam, P. (2018). Antibacterial activity of *Manuka* honey and its components. *AIMS Microbiology*, 4(4), 655-664. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.655>

Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Balwierz, R., & Stojko, J. (2020). Bee products in dermatology and skin care. *Molecules*, 25(2), 556. <https://doi.org/10.3390/molecules25030556>

Lux, C. N. (2022). Wound healing in animals: A review of physiology and clinical evaluation. *Veterinary Dermatology*, 33(1), 91–e27. <https://doi.org/10.1111/vde.13032>

Martinotti, S., & Ranzato, E. (2018). Honey, wound repair and regenerative medicine. *Journal of Functional Biomaterials*, 9(2), 34. <https://doi.org/10.3390/jfb9020034>

Mathes, S. H., Ruffner, H., & Graf-Hausner, U. (2014). The use of skin models in drug development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 69-70, 81-102. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.006>

McGavin, M. D., & Zachary, J. F. (Eds.). (2007). *Pathologic basis of veterinary disease* (4^e éd.). St. Louis, MO : Elsevier Mosby. ISBN 978-0-323-02870-7, 1600 p.

McLoone, P., Tabys, D., & Fyfe, L. (2020). Honey combination therapies for skin and wound infections: A systematic review of the literature. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 13, 875-888. <https://doi.org/10.2147/CCID.S282143>

Miller, W. H., Griffin, C. E., & Campbell, K. L. (Eds.). (2013). *Muller and Kirk's small animal dermatology* (7^e éd.). St. Louis, MO : Elsevier Mosby. ISBN 978-1-4377-0860-0, 948 p.

Negut, I., Grumezescu, V., & Grumezescu, A. M. (2018). Treatment strategies for infected wounds. *Molecules*, 23(9), 2392. <https://doi.org/10.3390/molecules23092392>

Olaitan, P. B., Adeleke, O. E., & Ola, I. O. (2007). Honey: A reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*, 7(3), 159–165. <https://doi.org/10.5555/afhs.2007.7.3.159>

Özcan, M. M., & Ölmez, C. (2014). Some qualitative properties of different monofloral honeys. *Food Chemistry*, 163, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.072>

Parasuraman, S., Balamurugan, S., & Vanishya, R. (2020). Overview of safety assessment and toxicological screening of dermal formulations. *SBV Journal of Basic, Clinical and Applied Health Science*, 3(3), 96–103. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10082-02258>

Parlement européen & Conseil de l'Union européenne. (2014, 15 mai). *Directive 2014/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 15 mai 2014 modifiant la directive 2001/110/CE du Conseil relative au miel*. Journal officiel de l'Union européenne, L 164, 1-5. Consulté le 10 août 2025, à l'adresse : <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014L0063&from=MT>

Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: A comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, Article ID 1259510, 21 p. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>

Pipiya, V. V., Gilazieva, Z. E., Issa, S. S., Rizvanov, A. A., & Solovyeva, V. V. (2024). Comparison of primary and passaged tumor cell cultures and their application in personalized medicine. *Exploration of Targeted Anti-Tumor Therapy*, 5, 581–599. <https://doi.org/10.37349/etat.2024.00237>

Priyono, H., Restuti, R. D., Kusuma, I., & Harahap, A. (2024). *In vitro* activity of Manuka and Trigona honey on fibroblast and keratinocyte cultures. *Oto Rhino Laryngologica Indonesiana*, 54(1), 1–10. <https://doi.org/10.32637/orli.v54i1.669>

Rasulova, K., Kavak, D. E., Irtegun Kandemir, S., Kavak, F. F., & Kizildag, S. (2025). The effect of multifloral honey on cytotoxicity and the mitochondrial apoptotic pathway in ovarian cancer cells. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1177/1973798X251318580>

Rosadi, I., Az Zahra, T. F., & Hariani, N. (2023). The effectivity of honey bee towards mesenchymal stem cells proliferation: A systematic review. *Journal of Skin and Stem Cell*, 10(1), e118960. <https://doi.org/10.5812/jssc-118960>

Stevanović, J., Glavinić, U., Ristanić, M., Erjavec, V., Denk, B., Dolašević, S., & Stanimirović, Z. (2024). Bee-inspired healing: Apitherapy in veterinary medicine for maintenance and improvement of animal health and well-being. *Pharmaceuticals*, 17(8), 1050. <https://doi.org/10.3390/ph17081050>

Tashkandi, H. (2021). Honey in wound healing: An updated review. *Open Life Sciences*, 16(1), 1091–1100. <https://doi.org/10.1515/biol-2021-0084>

Tomczak, C. (2010). *Utilisation du miel dans le traitement des plaies : revue bibliographique* [Thèse d'exercice vétérinaire]. École nationale vétérinaire de Lyon, 98 p.

Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528–1542. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>

Vogt, N. A., Vriezen, E., Nwosu, A., & Sargeant, J. M. (2021). A scoping review of the evidence for the medicinal use of natural honey in animals. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 618301. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.618301>

Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: Cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology*, 10(9), 200223. <https://doi.org/10.1098/rsob.200223>

World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance: Global report on surveillance*. Geneva : World Health Organization. ISBN 978-92-4-156474-8, 232 p. Consulté le 24 septembre 2025, à l'adresse : https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112647/WHO_HSE_PED_AIP_2014.2_eng.pdf

LE MIEL ET SON EMPLOI THÉRAPEUTIQUE DANS LA CICATRISATION CUTANÉE CHEZ LE CHIEN : ÉTUDES BIBLIOGRAPHIQUE ET *IN VITRO*.

Auteur

BACCONNIER Solène

Résumé

Les plaies cutanées constituent un motif fréquent de consultation en médecine vétérinaire et leur prise en charge représente un enjeu clinique majeur. Dans un contexte d'antibiorésistance croissante, l'identification d'alternatives naturelles favorisant la cicatrisation, tout en limitant le recours aux antibiotiques, apparaît essentielle. Parmi celles-ci, le miel suscite un intérêt croissant en raison de ses propriétés antibactériennes, antioxydantes et pro-cicatrisantes.

Le but de cette thèse est d'évaluer le potentiel du miel de châtaignier, utilisé sous forme topique, sur la cicatrisation cutanée. Une première étude *in vitro* a permis de démontrer son activité antibactérienne vis-à-vis de bactéries fréquemment isolées en dermatologie vétérinaire, *Staphylococcus pseudintermedius* et *Pseudomonas aeruginosa*. Un effet bactéricide a été observé à des concentrations comprises entre 25 % et 35 %.

Une seconde étude a évalué la cytotoxicité du miel de châtaignier sur des fibroblastes primaires et des kératinocytes canins. Les résultats montrent une toxicité cellulaire à partir de la concentration de 5 %, plus marquée sur les fibroblastes que sur les kératinocytes. Ces résultats, bien qu'encourageants, méritent d'être approfondis afin de préciser les mécanismes d'action du miel de châtaignier et de confirmer son innocuité avant toute application clinique.

Ainsi, ce travail met en évidence le potentiel thérapeutique du miel de châtaignier dans la gestion des plaies cutanées, tout en soulignant les limites du modèle *in vitro* et la nécessité d'études complémentaires *in vivo* pour confirmer ces observations et optimiser ses modalités d'utilisation.

Mots-clés

Miel, cicatrisation, peau, chien

Jury

Président du jury : **Pr ABITBOL Marie**
Directeur de thèse : **Pr PIN Didier**
2ème assesseur : **Dr BLONDEL Margaux**