

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الجليلي بونعامة - خميس مليانة

Université Djilali BOUNAAMA de Khemis-Miliana

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre

Département de la Biologie



*Mémoire de Fin d'Etudes*

*En vue de l'obtention du diplôme de Master*

*Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie*

*Filière : Sciences Biologiques*

*Spécialité : Physiologie Cellulaire et Physiopathologies*

*Amélioration de l'acceptation des implants  
en Titane (in vivo) par un procédé de  
stérilisation à la propolis.*

*Présenté par :*

*Melle BELDJERROU Naziha*

*Melle ABBAD Meriem*

*Soutenu le : Le 11-07-2018, Devant le jury:*

<i>Président :</i>	M <sup>r</sup> CHAOUAD .B	(MAA)	U DB_KM
<i>Promoteur :</i>	M <sup>r</sup> BOUSSOUBEL AEK	(MAA)	U DB_KM
<i>Co-Promotrice:</i>	M <sup>me</sup> ATHMANI. D	A Hâlée de recherche	CDTA
<i>Examineur :</i>	M <sup>r</sup> SAHRAOUI. H	(MCB)	U DB_KM
<i>Examineur :</i>	Mme BENKHEROUF. A	(MAA)	U DB_KM

*Année universitaire : 2017/2018*

## **Remerciement**

*On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté  
d'entamer et de*

*terminer ce mémoire*

*Tout d'abord, nous tenons tout particulièrement à témoigner notre profonde gratitude  
à notre promoteur, **M. BOUSSOUBEL ABDELKADER** pour la chance qu'il nous a  
donné, pour nous avoir guidé, encouragé, conseillé, tout en nous laissant une grande  
liberté dans la pratique de notre travail*

*Nous remercions notre Co-promotrice **M<sup>me</sup> ATHMANI. D** pour son confiance, son  
orientation et son encouragement*

*Nous tenons également à remercier tous les membres de notre jury d'avoir acceptées  
d'évaluer notre travail*

*Nous remercions **Mr CHAOUAD BILAL** d'avoir accepté de présider ce jury. Merci  
Monsieur pour votre disponibilité et orientation.*

*Nous remercions **Mr SAHRAOUI ABDELHAMID** d'avoir accepté d'examiner ce  
travail. Merci Monsieur pour votre assistance et conseils.*

*Nous remercions **Mme BENKHEROUF AMINA** d'avoir accepté d'examiner ce  
travail.*

*Nous témoignons nos gratitudee à l'ensemble de l'équipe de laboratoire de zoologie  
de l'université de Djilali Bounaama de Khemis-Miliana. Ainsi que de service d'ana-  
pathologie du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Chlef (DSP Chlef).*

*A tous les personnes qui ont aidé à la réalisation de ce travail et à toute la promotion  
2ème année Master, physiologie cellulaire et physiopathologie 2017/2018.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*A ma **chère mère** qui ma fait toujours le courage et ma donne tous l'amour de  
monde.*

*A mon **chère père** qui ma fait la confiance et ma donne tous les moyennes pour  
étudier.*

*A mon grand chère frère **Mohammed** qui toujours ma encourage pour étudier*

*Ames petites frères : **Mokhtar, Abderezak, zakaria** .*

*A ma seul et ma grand sœur **Amina** qui toujours avec moi et son petite enfants **Iyad,***

***Ayman** et son marie **Achour Boualam.***

*A mon binôme : **Naziha.***

*A mes chère amies : **Asmaa, Razika, Habiba, Halima, Naziha, Hayat.***

*a toutes les personnes qui ont aidé la réalisation de ce travail et a toute les promotion  
deuxième année master PCP 2017-2018.*

*Avec souhaits d'une longue vie pleine de bonheur et de succès.*

*Meriem*

## *Dédicaces*

*Je Dédie ce mémoire :*

*A mes parents pour leur soutien, leur aide, leur attention et leur patience au cours de ces années d'études.*

*A mes très chères sœurs : Nassima, Amina, Assia, Lina.*

*A mon très cher frère : Mohamed.*

*A mes Chères enfants : Aicha, Idriss, Hiba, Abdelrahmen*

*A toute ma famille .*

*A mes amis.*

*A tous les enseignants qui m'ont formé au cours de mon cursus*

*A mon binôme Meriem qui a contribué à la réalisation de ce modeste travail.*

---

# *Sommaire*

---

### Résumé

### Index

<b>Introduction</b>	01
<b><i>Partie 01: Synthèse bibliographique</i></b>	
I. Implantation biomédicale	02
I.1. Titane	02
I.1.1. Utilisation biomédicale	02
I.1.1.1. Les applications cardiaque et cardiovasculaires	03
a) Cœur artificiel	03
b) Valvules cardiaques prothétique	03
c) Prothèses vasculaire synthétique	04
I.1.1.2. Le remplacement de tissus durs	05
a) Les implants dentaires	05
b) Prothèse de la hanche	05
I.1.2. Le choix du matériau	06
I.1.2.1. Propriétés du titane	06
a) Propriété de la surface	06
b) Propriété corrosive	07
c) Propriété mécanique	07
d) Propriété biologique	07
I.1.2.2. Le comportement biologique du titane	07
II. Techniques de stérilisation	08
II.1. Stérilisation par agents thermiques	09
II.1.1. Stérilisation par chaleur humide	09
II.1.2. Stérilisation par chaleur sèche	09
II.2. Stérilisation par agents chimiques	10
II.2.1. Stérilisation à l'oxyde d'éthylène	10
II.2.2. Stérilisation par formaldéhyde	10
II.3. Stérilisation par agents physiques	10
III. Propolis	11
III.1. Composition	11
III.2. Propriétés	13
III.2.1. Propriétés antimicrobiennes	13
III.2.2. Propriétés anti-inflammatoires	13
III.2.3. Propriétés antioxydantes	13

## Sommaire

---

III.2.4. Propriétés anticorrosives	14
III.2.5. Propriétés cicatrisantes	14
<b>Partie 02 : Matériel et méthodes</b>	
I. Matériels	15
I. 1. Matériel Biologique	15
I. 2. Matériel non Biologique	15
II. Méthodes d'études	16
II.1. Etude comportementale	16
II.1. 1. Elevage des rats	16
II.1. 2. Préparation et introduction des implants	17
a) Traitement de surface des implants en Titane	17
b) Préparation de la solution stérilisante (alcoolat de propolis)	18
c) Stérilisation des implants	20
d) Introduction des implants dans les animaux	20
II. 2. Etude histologique	21
II.2.1. Collecte de tissus	21
II.2.2. Fixation	22
II.2.3. Déshydratation	22
II.2.4. Eclaircissement	23
II.2.5. Imprégnation	23
II.2.6. Inclusion et mise en bloc	23
II.2.7. Confection des coupes et étalement	24
II.2.8. Coloration des lames	24
a) Azan modifié	25
b) Trichrome de Masson	25
II.2.9. Montage	25
II.2.10. Observation des lames et prise des photos	25
II.3. Etude analytique	25
II.3.1. Validation et contrôle du stérilisateur (alcoolat de propolis)	25
a) Contrôle au moyen d'indicateurs physico-chimiques (Effet antioxydant)	26
b) Contrôle au moyen d'indicateurs biologiques (Effet antibactérien)	28
II.3.2. Etude morfo-histologique	28
II.4. Etude statistique	
<b>Partie 03 : Résultats et interprétations</b>	
	31

## Sommaire

---

I. Résultats et Interprétations	31
I.1. Etude comportementale	31
I.1. 1. Consommation des aliments	32
I.2. Résultats histologiques	33
I.2.1. Histologie du tissu musculaire et conjonctif des rats témoins	33
I.2.2. Histologie du conjonctif péri-implantaire des rats traités conventionnellement	33 40
I.2.3. Histologie du conjonctif péri-implantaire des rats traités à la propolis	40
I.3. Etude analytique	40
I.3.1. Validation et contrôle du stérilisateur (alcoolat de propolis)	41
a) Contrôle au moyen d'indicateurs physico-chimiques (Effet antioxydant)	42
b) Contrôle au moyen d'indicateurs biologiques (Effet antibactérien)	
I.3.2. Etude morpho-histologique	

### ***Partie 04 : Discussion et conclusion***

I. Discussion

II. Conclusion et perspectives

**Références Bibliographiques**

**Annexes**

---

# RESUME

---

## RESUME

La présente étude tente à dévoiler la capacité de la propolis à améliorer l'acceptation des implants en titane in vivo.

Pour ce faire, des rats blancs ont été répartis équitablement en 3 lots, un lot témoin et deux lots qui ont reçu des implants sous cutanés en titane et stérilisés par deux procédés. Le premier conventionnel avec le butanol comme substance désinfectante et le second expérimental en utilisant la teinture de propolis. 21 jours après l'implantation, des tissus péri et sub-implantaire ont été prélevés pour des analyses histo-morphométriques. Une étude complémentaire in vitro était effectuée, pour valider les caractéristiques antioxydante et antibactérienne de la propolis.

Les résultats obtenus montrent l'apparition d'un tissu conjonctif cicatriciel qui entoure les implants chez tous les animaux testés. L'inflammation est minime chez ceux dont l'implant est stérilisé à la propolis, cela peut être observé par une différence significative du nombre de cellules inflammatoires (macrophages, lymphocyte, granulocytes). Des augmentations de l'épaisseur du tissu conjonctif péri-implantaire et du taux de collagène étaient trouvés chez les animaux traités à la propolis, ce qui représentaient une bonne intégration de l'implant avec un effet supplémentaire anticorrosif. La néo-vascularisation mesurée dans les échantillons à propolis était moins importante par rapport à ceux du butanol. In vitro, l'expérimentation a prouvé la grande capacité anti-oxydative de la propolis avec un pouvoir inhibiteur du DPPH de 80%. L'effet antibactérien est grandement révélé chez *Bacillus subtilis* (Gram+), il l'est moins chez les *Escherichia coli* (Gram-) et *Staphylococcus aureus* (Gram+).

---

**Mots clés :** Implant en titane, intégrité implantaire, tissu péri-implantaire, propolis, stérilisation.

## **Abstract**

This study attempts to uncover the ability of propolis to improve acceptance titanium implants in vivo.

To do this, white rats were distributed equitably in 3 batches, a control batch and two lots that received subcutaneous titanium implants and sterilized by two methods. The first conventional with butanol as a disinfectant and the second experimental using propolis tincture. 21 days after implantation, peri-tissues and sub-implant were taken for histo-morphometric analyzes. A study complement was performed in vitro, to validate the antioxidant and antibacterial propolis effect.

The results obtained show the appearance of a scar tissue that surrounds implants in all animals tested. Inflammation is minimal for those whose the implant is sterilized with propolis, this can be observed by a significant difference in number of inflammatory cells (macrophages, lymphocyte, granulocytes). Of the Increases in peri-implant connective tissue thickness and collagen levels were found in animals treated with propolis, which represented a good integration of the implant with an additional anticorrosive effect. Neovascularization measured in the propolis samples was lower compared to those of butanol. In vitro, the experiment proved the great antioxidive capacity of propolis with an inhibitory capacity of DPPH (80%). The antibacterial effect is widely revealed in *Bacillus subtilus* (Gram +), it is less so in *Escherichia coli* (Gram-) and *Staphylococcus aureus* (Gram +).

---

Key words: Titanium implant, implant integrity, peri-implant tissue, propolis, sterilization

## ملخص

نحاول من خلال هذه الدراسة الكشف عن قدرة البروبوليس على تحسين قبول زرع التيتانيوم في الجسم الحي.

للقيام بذلك، تم توزيع فئران بيضاء بشكل منصف في 3 مجموعات، مجموعة شاهدة اما الاثنين الاخرين فتم زرع صفائح التيتانيوم في كل منهما وذلك تحت الجلد حيث تم تعقيم هذه الصفائح بواسطة طريقتي، الاولى تقليدية باستعمال البيتانول كمطهر والثانية تجريبية باستخدام صبغة البروبوليس. 21 يوما بعد زرع الأنسجة المحيطة بصفحة التيتان أخذت من اجل التحليلات النسيجية-المورفومترية. تم إجراء دراسة تكميلية في المختبر ، للتحقق من صحة ان الدنج مضاد للأكسدة و للجراثيم.

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها ظهور نسيج ندبي يحيط بصفائح التيتان المزروعة في جميع الحيوانات التي تم اختبارها، التهاب في الحد الأدنى لأولئك الذين استقبلوا صفائح التيتان المعقمة بواسطة البروبوليس ، ويمكن ملاحظة ذلك من خلال الاختلاف الكبير في عدد الخلايا الالتهابية (الخلايا البلعومية ، الخلايا الليمفاوية و الخلايا البيضاء المحببة) . زيادات في سمك النسيج الضام ومستويات الكولاجين تم العثور عليها في الحيوانات التي استقبلت صفائح التيتان المعقمة بالبروبوليس ، والتي تمثل الدمج الجيد للزرع مع تأثير إضافي ضد التآكل . عدد الأوعية الدموية لدى عينات البروبوليس كان أقل مقارنة مع عينات البيتانول. في المختبر، أثبتت التجربة قدرة البروبوليس المضادة مع الأكسدة مع (80%) كما تم الكشف عن تأثير مضاد للجراثيم على نطاق واسع في بكتريا *Bacillus subtilis* ، هو أقل من ذلك في *Escherichia coli* (Gram-) و *Staphylococcus aureus* (Gram +) (غرام +)

---

# *INDEX*

---

## *Liste des figures*

---

<b>Figure 1 :</b> photo d'un cœur artificiel	3
<b>Figure 2:</b> Prothèse valvulaire aortique	4
<b>Figure 3 :</b> a. Schéma d'une angioplastie (2) avec mise en place d'un Stent (3 et 4).	4
b. Schéma d'un pontage artériel	5
<b>Figure4:</b> implants dentaires	5
<b>Figure 5:</b> Articulation de la hanche avec et sans prothèse	6
<b>Figure 6:</b> Vue schématique du film d'oxyde sur titan pur	
<b>Figure 7:</b> Les processus interfaciaux qui ont lieu à l'interface entre l'oxyde de titane et le fluide biologique en contact avec l'implant de titane	8 11
<b>Figure 8:</b> Propolis brute	15
<b>Figure 9:</b> Rat Wistar ( <i>Rattus norvegicus</i> )	17
<b>Figure 10:</b> Lotissement des rats à l'animalerie	
<b>Figure 11:</b> a) les implants en titane. b) Schéma du montage expérimental de l'anodisation	17 19
<b>Figure 12:</b> Etapes de fabrication de la teinture de propolis	21
<b>Figure 13:</b> Etapes de l'introduction des implants	22
<b>Figure 14 :</b> Retrait de l'implant et les tissus adjacents après 21 jours d'implantation.	22 23
<b>Figure 15:</b> La batterie de Déshydratation (concentration croissante d'alcool)	23
<b>Figure 16:</b> Imprégnation à la paraffine	24
<b>Figure 17:</b> La mise en bloc de la paraffine	26
<b>Figure 18:</b> Confection et étalement des coupes	28
<b>Figure 19 :</b> Réaction du DPPH avec un antioxydant (Brand-williams <i>et al</i> , 1995)	29
<b>Figure 20:</b> dépôt de disque	

<b>Figure 21</b> : Mesure morpho métrique des sur l'image <i>J</i>	31
<b>Figure 22</b> : Relation entre le poids et la consommation de nourriture chez les rats expérimentés (Témoin : pas d'implantation, Gr1 : implantation + propolis, Gr2 : implantation + Butanol)	31
<b>Figure 23</b> : Rapport final entre le poids et la consommation de nourriture chez les rats expérimentés (témoin : pas d'implantation, Gr1 : implantation + propolis, Gr2 : implantation + Butanol)	32
<b>Figure 24</b> : Relation entre le poids et la consommation de nourriture chez les rats avant et après l'implantation (Témoin : pas d'implantation, Gr1 : implantation + propolis, Gr2 : implantation + Butanol)	40
<b>Figure 25</b> : Comparaison le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait de et la propolis	41
<b>Figure 26</b> : Comparaison de pouvoir antibactérien de la propolis et d'autres antibiotiques chez trois espèces de bactéries.	43
<b>Figure 27</b> : Quantification de l'intégrité de l'implant en titane stérilisé selon deux procédés (Butanol, Propolis).	44
<b>Figure 28</b> : Quantification de la biocompatibilité de l'implant en mesurant les cellules inflammatoires (Nb/1mm <sup>2</sup> ) au niveau du tissu conjonctif péri-implantaire selon le type de stérilisation.	45
<b>Figure 29</b> : Quantification de la biocompatibilité de l'implant en mesurant la néo-vascularisation (Nb de Vaisseau/4 mm <sup>2</sup> ) au niveau du tissu conjonctif péri-implantaire selon le type de stérilisation	46
<b>Figure 30</b> : Quantification de l'effet anticorrosif de l'implantation suivant les deux procédés de stérilisation	

## *Liste des tableaux*

---

<b>Tableau 1:</b> Principaux composants chimiques de propolis.	12
<b>Tableau 2:</b> Produits chimiques utilisés.	16
<b>Tableau 3:</b> Paramètres d'anodisation de TA6V.	18
<b>Tableau 4:</b> Les étapes des techniques de stérilisations utilisées pour les implants.	20
<b>Tableau 5 :</b> caractéristiques et origine des souches bactériennes.	27
<b>Tableau 6 :</b> Caractéristiques anti-oxydatives de la teinture de propolis.	40
<b>Tableau 7 :</b> Diamètre de zone d'inhibition en (cm) de propolis et certains antibiotiques.	41
<b>Tableau 8 :</b> Quantification des collagènes interstitiels du tissu conjonctif péri-implantaire chez les rats dont l'implant est stérilisé à la propolis et ceux au butanol.	42
<b>Tableau 9 :</b> Quantification des cellules inflammatoires (Nb/1mm <sup>2</sup> ) au niveau du tissu conjonctif péri-implantaire selon le type de stérilisation.	44
<b>Tableau 10 :</b> Quantification de la néo-vascularisation (Nb de Vaisseau/4mm <sup>2</sup> ) au niveau du tissu conjonctif péri-implantaire selon le type de stérilisation.	45
<b>Tableau11 :</b> Epaisseur des zones conjonctives péri-implantaires selon le type de stérilisation.	

## *Liste des planches*

---

- Planche I :** Coupes histologiques du muscle abdominal des rats Wistars 35  
témoins.
- Planche II :** Coupes histologiques du muscle abdominal sub-implantaire des 36  
rats  
Wistars dont l'implant du titane est stérilisé au butanol. 37
- Planche III :** Coupes histologiques du muscle abdominal sub-implantaire des  
rats  
Wistars dont l'implant du titane est stérilisé à la propolis (1, 2) et au butanol 38  
(3,4).
- Planche IV :** Coupes histologiques du tissu conjonctif péri-implantaire des rats 39  
Wistars dont l'implant de titane est stérilisé au butanol.
- Planche V :** Coupes histologiques du tissu conjonctif péri-implantaire des rats  
Wistars dont l'implant de titane est stérilisé à la propolis.

---

# *ABBREVIATIONS*

---

## *Abréviation*

---

**CAPE** : Composé Antioxydant Phénolique.

**DPPH**: 2,2 – diphényle -1-picrylhydrazyl.

**NaF**: Nomenclature d'Activités Française.

**OE**: oxyde d'éthylène.

**Ti 6 AL 4V**: Titanium – 6% Aluminum – 4 % Vanadium .

**VEGF**: Facteur de Croissance Endothéliale Vasculaire.

**Wt**: Weight Percentage.

---

# ***INTRODUCTION***

---

## Introduction :

Du fait de l'allongement de la durée de vie de la population, un accroissement considérable des besoins en biomatériaux se fait d'ores et déjà ressentir, notamment pour ceux utilisés comme implants médicaux en chirurgie orthopédique et dentaire. Dans ces domaines, le titane et ses alliages représentent des matériaux de choix pour l'implantologie (Guidoin., 2004). En raison de leurs caractéristiques physiques et biologiques, leur résistance à la corrosion ainsi que leur biocompatibilité, ces matériaux possèdent de bien meilleures propriétés mécaniques que leurs concurrents polymères, céramiques ou autres métaux (acier inoxydable, alliages base cobalt ou nickel...). Ce sont donc des alliages incontournables pour de multiples applications aussi bien dans le domaine de l'industrie automobile, que dans celui de l'aéronautique (Boyer., 1996). Quant au Ti-6Al-4V (Titanium : 6% Aluminium-4 % Vanadium), il est couramment utilisé pour les applications biomédicales (Asokamani., 2009).

Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressés à évaluer les degrés d'acceptation des implants en titane (Ti-6Al-4V) sur le plan histologique tout en utilisant deux procédés de stérilisation ; un conventionnel et l'autre avec l'alcoolat de propolis. Une série d'animaux répartis équitablement a reçu ces implants en position sous-cutanés ; de titane traité et stérilisé par les deux procédés.

Pour ce faire, le travail présent s'est structuré en trois parties, la première partie est consacrée à présenter l'utilisation biomédicale du titane et ses propriétés, les différentes techniques de stérilisation et des généralités sur la propolis. La deuxième partie est consacrée à l'exploration de l'ensemble des expériences faites *in vivo* et *in vitro* (activité antioxydante et antibactérien de propolis). La troisième partie illustre les résultats obtenus suivis par une discussion, conclusion et des perspectives.

---

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

## I. Implantation biomédicale :

Les progrès de la médecine sont étroitement liés au génie biomédical. Cette discipline tente à appliquer les sciences et les techniques les plus avancées à la conception d'appareils de diagnostic, de traitement et d'assistance (dispositifs médicaux) ainsi qu'à l'élaboration de systèmes d'information dans le but d'améliorer la qualité des soins aux patients et leur prise en charge (Feyerabend *et al.* , 2010).

Le champ d'activité du génie biomédical est très vaste : du scanner au scalpel en passant par les corps étrangers introduits volontairement dans l'organisme et qui sont encore appelés implants. Ces derniers ont qu'un seul intérêt, c'est de remplacer ou réparer le tissu abimé.

En fait, trois stratégies principales sont utilisées pour la réparation de tissus ou d'organes. L'approche par biomatériaux, par thérapie cellulaire ou par transplantation d'organes. Il est également possible de combiner biomatériaux et cellules, ou de construire des implants à partir de cellules, de tissus ou d'organes (Letourneur *et* Bordenave., 2017). Bien qu'il y'a manque de données sur la toxicologie systémique chez l'homme et l'animal et sur l'utilisation des biomatériaux dans le domaine médical, ce sont le plus souvent des « terres rares » telles que l'yttrium (Y), le néodyme (Nd), le praséodyme (Pr), le gadolinium (Gd), le lanthane (La), le cérium (Ce), l'euporium (Eu) , le lithium (Li) et le zirconium (Zr)) qui sont associés à un matériau biocompatible (magnésium) pour en améliorer les propriétés mécaniques et former des alliages « résorbables » (Yuen ., 2012), destinés à être chirurgicalement implantés dans le corps humain (Feyerabend *et al.* , 2010).

### I.1. Titane :

Le titane est le quatrième élément métallique abondant sur la terre après le fer, l'aluminium et le magnésium. C'est l'un des biomatériaux les plus biocompatibles (Mulligan.,1983).

#### I.1.1. Utilisation biomédicale :

Dans l'ingénierie biomédicale et l'industrie, le titane et ses alliages sont largement utilisés pour la fabrication de prothèses et d'implants, et cela pour sa bonne biocompatibilité. Les matériaux implantés doivent avoir une résistance élevée à la corrosion afin d'éviter la libération d'ions et de composés de corrosion dans l'environnement ou tissus environnants (Gordin *et al.*, 2012).

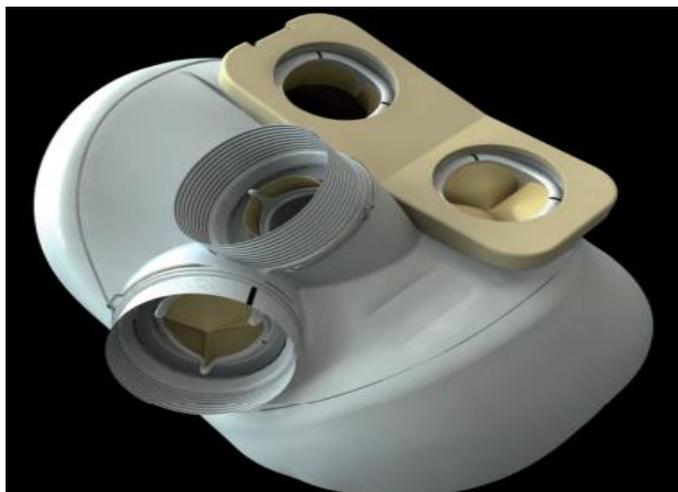
### I.1.1.2. Les applications cardiaque et cardiovasculaires

Le titane et ses alliages sont couramment utilisés en chirurgie cardiovasculaire. Leurs avantages sont immenses vu leurs robustesse, inertie et l'absence du caractère magnétique (Liu *et al.*, 2004).

#### a) Cœur artificiel

L'implantation du cœur artificiel total chez les êtres humains est récente, elle a été saluée de façon unanime comme une prouesse médico-chirurgicale et technologique. Cette intervention s'adresse à des patients en insuffisance cardiaque terminale, elle se veut comme une alternative crédible à la transplantation cardiaque (Jacques., 2014).

Les composantes en titane des boîtiers et des électrodes de stimulateurs cardiaques montrent une excellente biocompatibilité avec absence de génotoxicité (Guidoin *et* Guidoin., 2004) (Fig .1).



**Figure 1** : photo d'un cœur artificiel (Raguin *et al.*, 2017).

#### b) Valvules cardiaques prothétique

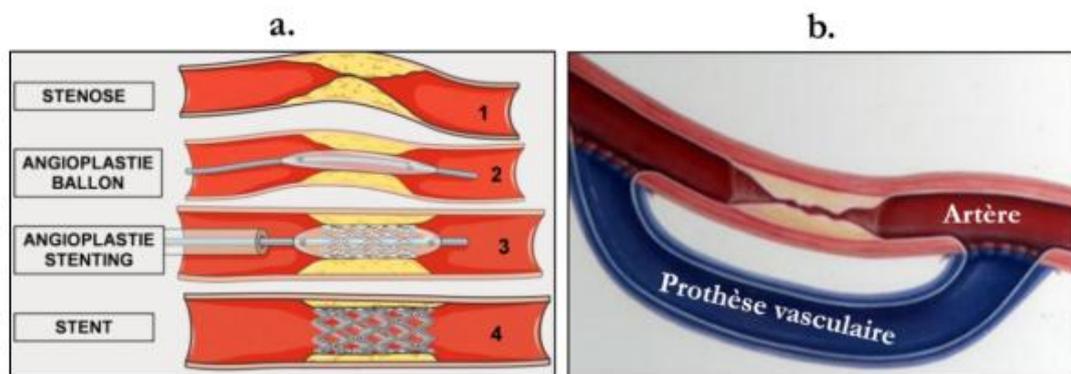
De nombreux types de valvules cardiaques prothétiques ont été utilisés en clinique. L'anneau et les jambes de force sont en titane ou en alliage de titane, tandis que le disque est en pyrolyse. Autour de l'anneau se trouve un anneau de contour en téflon tricoté où les points de suture ancrent l'anneau (Liu *et al.*, 2004) ( Fig. 2).



**Figure 2:** Prothèse valvulaire aortique (Corti *et* Biaggi., 2014).

### c) Prothèses vasculaire synthétique

Dans les maladies cardiovasculaires, première cause de décès dans les pays développés, les pathologies d'origine athérosclérotique sont liées à des complications dues à l'épaississement de la paroi des vaisseaux sanguins. Malgré le développement de techniques endovasculaires peu invasives telles que l'angioplastie (technique chirurgicale utilisant des petits ballonnets gonflables pour dilater l'artère à l'endroit du rétrécissement) et la pose de Stents (tuteur métallique tubulaire glissé dans l'artère pour la maintenir ouverte), l'implantation de substituts vasculaires par chirurgie reste nécessaire pour un nombre élevé de patients. Le remplacement vasculaire est réalisé soit de manière autologue, en employant une veine ou une artère prélevée chez le patient, soit à l'aide d'une prothèse, lorsque le patient n'a pas le capital vasculaire suffisant (Figure 9) (Letourneur *et* Bordenave., 2017) ( Fig.3).



**Figure 3:** a. Schéma d'une angioplastie (2) avec mise en place d'un Stent (3 et 4).

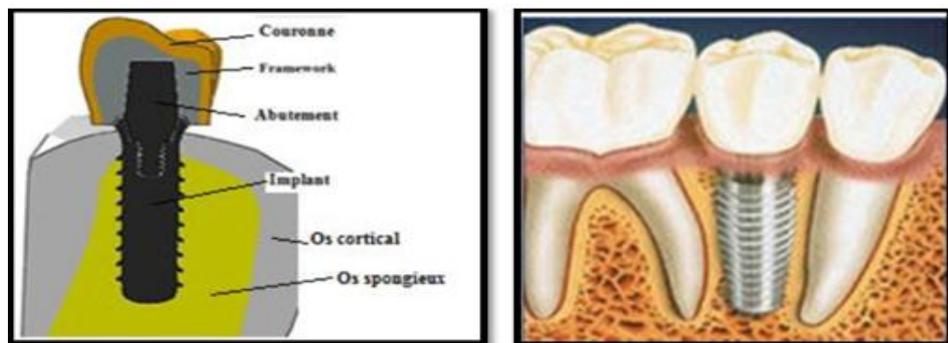
b. Schéma d'un pontage artériel (Alian., 2016).

### I.1.1.2. Le remplacement de tissus durs

Le titane et ses alliages sont largement utilisés comme remplacement de tissus durs dans les os artificiels, les articulations et les implants dentaires. L'une des applications les plus courantes du titane est l'articulation artificielle de la hanche (Liu *et al.*, 2004).

#### a) Les implants dentaires

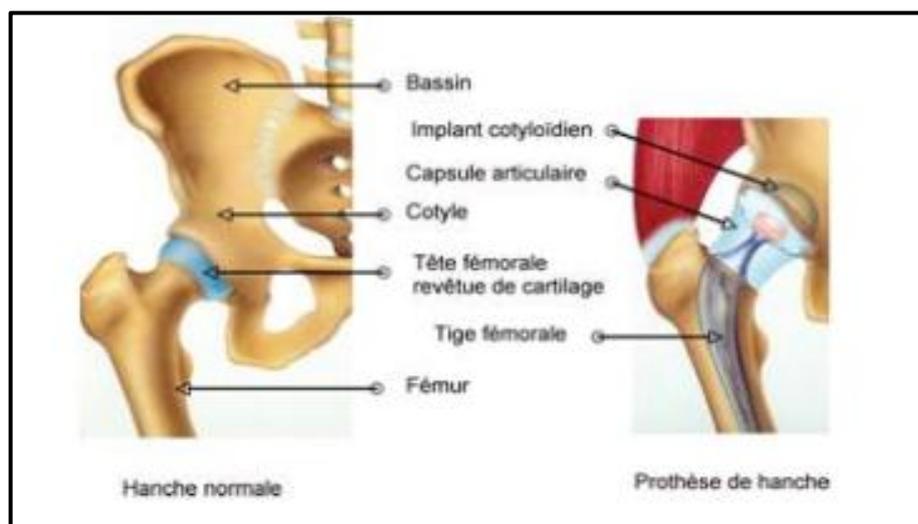
L'implantologie dentaire a un succès important ces derniers temps. Contrairement aux techniques classiques comme les bridges qui consistent à prendre appui sur les dents saines voisines, l'implant est directement fixé dans l'os mandibulaire ou le maxillaire supérieur pour remplacer la racine manquante et une dent de remplacement sera posée sur l'implant (Gouasmi *et al.*, 2017). La plupart des implants dentaires commerciaux sont fait de titane (Mei *et al.*, 2014) (Fig. 4).



**Figure 4:** implants dentaires (Gouasmi *et al.*, 2017).

#### b) Prothèse de la hanche

Une prothèse totale de la hanche est principalement constituée de trois composants :



**Figure 5:** Articulation de la hanche, avec et sans prothèse (Hamani *et al.*, 2016).

Soit une tige fémorale sur laquelle est montée la tête fémorale s'articulant avec le cotyle (Fig. 5). L'implant fémoral est inséré à l'intérieur de la cavité médullaire du fémur tandis que la cotyle est implantée dans l'acétabulum de l'os coxal (Bozic *et al.*, 2004) (Fig.5).

### I.1.2. Le choix du matériau

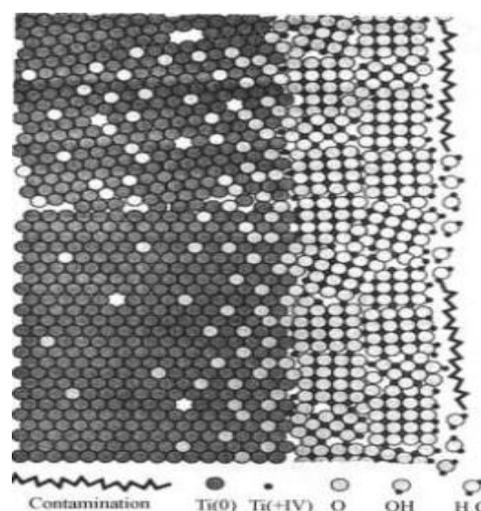
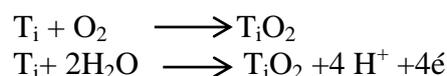
Le titane et ses alliages présentent de remarquables propriétés de résistance à la corrosion, à la piqûre et à la fracture, leur biocompatibilité et leur bio-résilience en font des matériaux de choix pour l'implantologie, particulièrement la dentisterie et l'orthopédie. Leur comportement en présence des tissus mous apparaît tout aussi exceptionnel (Guidoin *et Guidoin.*, 2004).

#### I.1.2.1. Propriétés du titane

##### a) Propriété du surface

Le titane à former spontanément à l'air une couche stable d'oxyde de passivation épaisse de 4 à 6nm, qui le protège contre la corrosion et ralentit la libération des ions titane, cette couche d'oxydation se compose d'un mélange des oxydes  $TiO_2$ ,  $Ti_2O$ ,  $Ti_2O_3$ , le composant majeur c'est le dioxyde de titane  $TiO_2$  (Brunette *et al.*, 2001).

Le mécanisme de formation de l'oxyde de titane est le suivant (Bearinger *et al.*, 2001) (Fig.6).



**Figure 6:** schéma représente le film d'oxyde sur titan pur (Liu *et al.*, 2004).

##### b) Propriété corrosive

Les métaux implantés *in vivo* entrent initialement en contact avec des fluides corporels extracellulaires comme le sang. La concentration des ions chlorure dans le

plasma sanguin est de 113mEq et dans les fluides interstitiel 117 mEq (Novaes *et al.*, 2002). Elle est suffisamment élevée pour corroder les matériaux métalliques. Quant aux acides aminés et les protéines, ils ont tendance à accélérer la corrosion (Peltola *et al.*, 1998).

L'utilisation intensive du titane et ses alliages dans le domaine biomédical (Fadlallah *et al.*, 2013) est dû en partie à la stabilité et à la résistance à la corrosion (Sul *et al.*, 2001), cette résistance revient au film de dioxyde de titane qui protège le métal d'une oxydation plus poussée (Samuneva *et al.*, 1993).

### c) Propriété mécanique

Le titane est très promoteur dans l'orthopédie en raison de sa haute force spécifique et de son faible module d'élasticité. Cependant le titane a une faible résistance à l'usure et à l'abrasion à cause de sa faible dureté (Brunette *et al.*, 2001).

### d) Propriété biologique

La biocompatibilité fait référence à la capacité d'un biomatériau à remplir sa fonction souhaitée par rapport à une thérapie médicale, sans qu'il n'y ait besoin d'induire des effets locaux ou systémiques indésirables chez le receveur ou le bénéficiaire de la cette thérapie, en générant une réponse cellulaire ou tissulaire la plus appropriée (Khan *et al.*, 2014).

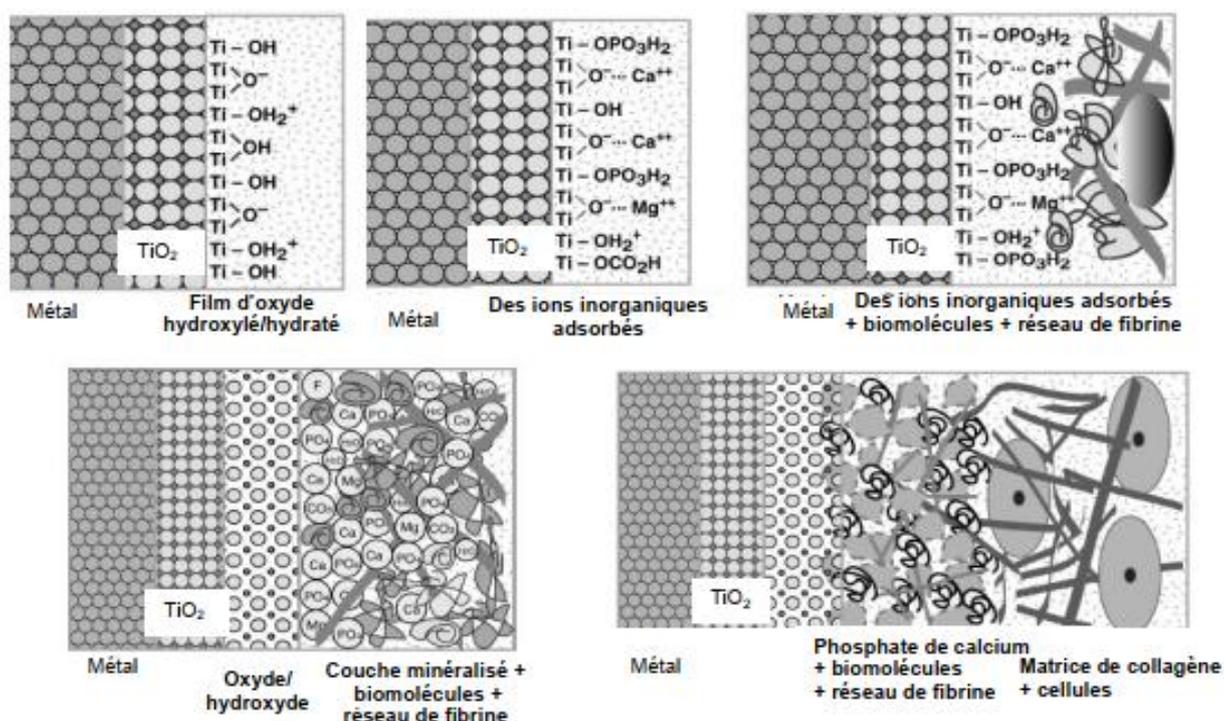
Le titane est bien connu pour son excellente biocompatibilité, ce qui s'exprime par deux observations majeures : l'effet du titane sur la santé et l'environnement s'exprimant par une réponse favorable des tissus vis-à-vis la surface de l'implant et l'absence de réactions allergiques au titane. Il interagit avec les fluides physiologiques à travers le film d'oxyde présent sur sa surface, et qui induit une réaction allant d'une corrosion à la résistance et passant par une biocompatibilité (Pohler., 2000).

## I.1.2.2. le comportement du titane dans le milieu biologique

Selon l'étude de Textor *et al* publiée en 2001, les différentes étapes des interactions chimiques et biochimiques qui se produisent lors de la première phase d'exposition duTiO2 à un milieu biologique se présentent comme suivant (Fig. 7):

- Hydroxylation et hydratation de TiO<sub>2</sub>, au contact avec le fluide aqueux.
- Adsorption de cations et d'anions provenant de l'électrolyte, spécialement les ions calcium et phosphate.
- Adsorption de biomolécules (protéines, glycoprotéines, protéoglycannes, polysaccharides) et formation d'un réseau de fibrine au contact avec le sang.

- Poursuite de la modification de surface : croissance d'une couche oxyde/hydroxyde et précipitation du phosphate de calcium et d'autres espèces (magnésium, carbonate, fluorure) présentes dans le fluide ; réactions de réorganisation et d'échange avec le biofilm.
- Formation d'une architecture d'interface active : dépôt de matrice, formation du réseau de collagène, minéralisation.



**Figure 7:** Les processus interfaciaux qui ont lieu à l'interface entre l'oxyde de titane et le fluide biologique en contact avec l'implant de titane (Brunette *et al.*, 2001).

## II. Techniques de stérilisation :

La stérilisation est un acte de soins indirect (Gouillet., 2003). Le but de la stérilisation d'un objet est donc la destruction ou l'inactivation irréversible de tous les microorganismes présent dans ou sur cet objet (Mayaux., 2006).

La norme AFNOR NF 72-101 définit la stérilisation comme étant (la mise en œuvre d'un ensemble de méthodes et de moyens visant à éliminer tous les microorganismes vivants de quelques nature que ce soit et sous quelques forme que ce soit portés par un objet parfaitement nettoyé) (Aggoune., 2000).

L'ensemble des agents stérilisants disponibles se divise en agents thermiques, chimiques, ou physiques. Aucun de ces agents n'est universel, c'est adire applicable à tous

les types de matériaux. Le choix de la technique de stérilisation sera fonction de la nature chimique, de la forme du dispositif médicale ainsi que de son emballage (Adige., 2001).

## **II.1. Stérilisation par agents thermiques :**

Les techniques faisant intervenir la chaleur ont été les premières méthodes mise en œuvre pour obtenir la stérilité. Les agents thermiques sont principalement utilisés dans les cas de dispositif médicaux métalliques (les instruments en verre tel que les ampoules et flaconnage (Guignot., 2001).

### **II.1.1. Stérilisation par chaleur humide :**

Stérilisation à la chaleur humide au moyen de vapeur d'eau saturée est le procédé de stérilisation à recommander car la plus fiable et le plus facile à valider et à contrôler. Elle représente donc le premier choix pour le matériel résistant au vide à humidité, aux températures et aux pressions élevées, l'autoclave est la méthode la plus économique (Lecherallier., 2008).

### **II.1.2. Stérilisation par chaleur sèche :**

Ce procédé ne convient qu'aux objets de matériau secs et anhydres résistante à des températures de 120 à 200 C°. ainsi qu'à certains application pharmaceutiques (stérilisation de matière huileuse ; de silicone, de verrerie.....). Etant donné que l'air sec est un faible conducteur de chaleur, le cycle de stérilisation est beaucoup plus long qu'un cycle de stérilisation à la vapeur saturée et sa fiabilité n'est pas garanti. Le thermomètre de contrôle placé dans la chambre du stérilisateur ne donne pas d'indication **réelle** quant à la température à l'intérieur des conditionnements.

C'est pourquoi il y a lieu d'éviter autant que possible ce mode de stérilisation à l'hôpital. La préférence doit être accordée à un stérilisateur muni d'un ventilateur interne, de manière à assurer une meilleure circulation de l'air chaud et d'atteindre des températures plus homogènes dans l'ensemble de la charge ( Marjaux., 2006 ).

## **II.2. Stérilisation par agents chimiques :**

Il existe de nombreux agents chimiques qui ont une fonction décontaminant ou un effet inactif sur certains germes pathogènes spécifiques. On trouve typiquement des composés phénoliques (phénol...); des alcools (éthanol ...); des composés halogènes (iode ,iodophore , chlore.....) des aldéhydes ( glutaraldéhyde ) et des gaz stérilisants ( oxyde d'éthylène ; formaldéhyde) (Omar., 2007 ).

### II.2.1. Stérilisation à l'oxyde d'éthylène :

Les procédés de stérilisation à l'oxyde d'éthylène doivent être réservés au matériel médical qui ne peut résister à des températures supérieures à 60 °C et ne peut donc être stérilisé à la vapeur d'eau saturée. L'oxyde d'éthylène pur comporte des risques importants d'explosion. Ces risques sont diminués lorsqu'il est en mélange avec le CO<sub>2</sub> (Marjau., 2006).

L'oxyde d'éthylène est peu coûteux et permet de stériliser les produits thermosensibles. Un cycle de stérilisation par l'OE présente en effet l'avantage de se dérouler à une température relativement faible (50°C), en comparaison avec les techniques présentées précédemment. De plus, cette méthode est efficace, non corrosive, facile d'emploi et permet la stérilisation de nombreux éléments même complexes, en profondeur (Chaigneau., 1986).

### II.2.2. Stérilisation par formaldéhyde :

La stérilisation au moyen de la vapeur-formaldéhyde est réservée au matériel qui ne résiste pas à plus de 80 °C et qui ne peut donc être traité par la vapeur d'eau sous pression. La stérilisation repose sur la double action du gaz formaldéhyde et de la vapeur d'eau, en dépression (Marjau., 2006).

### II.3. Stérilisation par agents physiques :

Cette méthode est aujourd'hui largement utilisée dans l'industrie pour la stérilisation du matériel médico-chirurgical (Postair., 1991). La radio stérilisation est un procédé fiable, facilement contrôlable, pouvant être réalisé à température ambiante ; il peut être intégré dans une chaîne de production industrielle d'articles préemballés. Mais cette technique a l'inconvénient d'être très coûteuse car elle nécessite l'installation de structures particulières, résistant à ces rayonnements. Elle est notamment trop lourde et trop coûteuse pour être utilisée à l'hôpital (Omar., 2007).

## III. Propolis :

Le mot propolis vient du grec « pro »= devant « polis »= ville, ce qui signifie « devant la ville » décrit le rôle de propolis dans le ciment des ouvertures de la ruche d'abeille. Les abeilles recueillent des exsudats résineux prévenant principalement des bourgeons, mais aussi des feuilles des branches et des écorces. En mélangeant cette résine à de la cire et à des enzymes sécrétées par leur système glandulaire, elle obtient une sorte de glu que l'on nomme : propolis, son rôle principal est de maintenir un environnement

antiseptique dans la ruche et de permettre à la colonie d'abeilles d'être en bonne santé. Il Promut l'immunité sociale des abeilles et les aide à combattre les infections (Henry., 2014) (Fig.8)



**Figure 8:** Propolis brute (Sauvager., 2018).

### III.1. Composition

L'origine botanique dont sera issue la propolis constitue le principal facteur responsable de sa composition spécifique. L'autre facteur sera les modifications générées à travers les sécrétions hypo-pharyngiennes de l'abeille qui vont apporter d'autres éléments spécifiques en plus de certaines transformations (hydrolyse des hétérosides de flavonoïdes en aglycone). De manière générale, la propolis est constituée de 50 à 55 % de résines et baumes, de 30 % de cires et acides gras, de 10 % d'huiles essentielles, de 5 % de pollen et de 5 % de substances organiques et minérales. Parmi ces dernières, on retrouvera beaucoup de flavonoïdes et autres dérivés phénoliques ainsi que leurs esters, des dérivés aromatiques volatils, des minéraux (fer, calcium, zinc, cuivre, manganèse) et des vitamines (C, E et du groupe B) (Cardinault *et al.*, 2014).

**Tableau 2:** Principaux composants chimiques de propolis (Ghedira *et* Le Jeune., 2010)

<b>Substances principales</b>	<b>Constituants chimiques.</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résine et baume 50 à 55 %.</li> <li>- Cire 30 %.</li> <li>- Pollen 5 %.</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Huiles essentielles 10 %.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prédominances pour le bornéol et le menthol à côté d'un mélange variable de terpène et sesquiterpène : B bisabolol. , 1,8 -cinéol, copaene, cymène, limonène, etc.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Autre substances 5 %.</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Flavonoïdes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Flavones : apigénine, chrysine, tectochrysin, artepiline, etc.</li> <li>- Flavonols : galangine, apéginine, quercétine,-3-méthyléther, quercétine – 3,3diméthyléther, fisétine.</li> <li>- Dihydroflavone : pinobanksine , acétate -3 – O pinobanksine etc .</li> <li>- Flavanones : naringinine – 4',7 diéthyléther, pinocembrine, pinostrobin , sakuranétine etc .</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Acides phénol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acide benzoïques , acide P hydroxy benzoïques , acide furéliques , acide cinnamique , acide hydroxycinnamique , acide a- coumarique ,acide p coumarique ,acide p – anisique , acide gentique ,acide caféiques ,et l'ester phényléthyliques de l'acide caféiques ( CAPE ) .</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Divers</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acides est aster aliphatiques coumarine, esculéto.</li> <li>- Sucre simple (glucose, fructose) et polysaccharides stérol : acétate de calinastérol, acétate.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Vitamine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Complexes vitaminiques B, provitamine A, Vitamine pp.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Minéraux</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- AL , Ar , Ba , Bo , Cr ,Co , Cu , St , Fe , Mg , Mn , Mo , Ni , Se ,Ti , Va ,Zn , Silice .</li> </ul>

## III.2. Propriétés

De nombreuses propriétés sont attribuées à la propolis, parmi celles qui ont fait l'objet de plusieurs d'études scientifiques on trouve :

### III.2.1. Propriétés antimicrobiennes :

L'action antimicrobienne comprend l'action antibactérienne, antifongique et antivirale. L'une des produits antimicrobiens les plus importants est la propolis. Elle présente une forte activité antimicrobienne et utilisée comme agent chimio thérapeutique depuis l'antiquité (Ramanauskien., 2009).

La propolis est l'un des antibiotiques naturels les plus puissants, caractérisé par un très large spectre d'effet. L'application thérapeutique n'induit pas de résistance aux germes et ne détruit pas la microflore utile. La propolis a été efficace contre les souches de bactéries qui résistent aux antibiotiques chimiques et possède également des propriétés antivirales prometteuses contre les herpès virus. La recherche *in vitro* a montré que la propolis à une activité contre le virus de l'herpès simplex de type 1, L'activité antimicrobienne de la propolis d'abeille (y compris son activité antivirale) est très élevée. Attribués aux composés phénoliques tels que les flavonoïdes. Parmi les composés microbicides les plus puissants de la propolis sont la flavanone pinocembrine (5,7dihydroxyflavanone) et son analogue 3-OH flavonolgalangine (3,5,7 trihydroxyflavon). L'acide caféique (acide 3,4-dihydroxycinnamique) et ses esters, fractions volatiles avec phénols et/ou terpénoïdes et chrysine. (5, 7-dihydroxyflavone). Elle possèdent également des activités antimicrobiennes notables (Boukraâ *et al.*, 2013).

### III.2.2. Propriétés anti-inflammatoires :

Sur des modèles *in vivo* d'arthrite, d'œdème de la patte ou d'inflammation chronique et aiguë, la propolis exerce un effet anti-inflammatoire significatif (Ramos *et Miranda.*, 2007) plusieurs mécanismes d'actions ont été proposés : inhibition de l'activation de certaines molécules du système immunitaire (IL-6) et inhibition de certaines enzymes impliquées dans la voie métabolique de l'inflammation (cyclo-oxygénase, lipo-oxygénase, myéloperoxidase, NADPH-oxydase, ornithine décarboxylase) (Cardinault *et al.*, 2014).

### III.2.3. Propriétés antioxydantes :

Un antioxydant est une molécule capable de ralentir ou d'empêcher l'oxydation d'autres molécules et ainsi d'empêcher de tels changements. L'effet antioxydant est en corrélation avec l'activité anti-inflammatoire. La propolis est remarquable pour ses

propriétés antioxydantes et qui est plus actif que le reste des produits de la ruche en ce qui concerne cette propriété (Volpi *et* Bergonzini., 2006). Les effets antioxydants relativement puissants de l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) provenant de différentes origines géographiques (Argentine, Australie, Chine, Hongrie et Nouvelle-Zélande) ont été corrélés avec des teneurs élevées en polyphénols et flavonoïdes, en particulier le kaempferol et le phénéthyl caffeate (Kumazawa *et al.*, 2004). D'autres échantillons de propolis provenant de Turquie et de différentes régions de Corée ont donnés des résultats similaires (Ahn *et al.*, 2004).

#### **III.2.4. Propriétés anticorrosives :**

L'utilisation d'inhibiteurs de corrosion est l'une des méthodes les plus pratiques pour la protection des métaux dans l'industrie. Les inhibiteurs de corrosion sont des substances qui réduisent efficacement la vitesse de corrosion d'un métal exposé à des environnements fluides agressifs (Ladislav *et al.*, 2005 ; Njoku *et al.*, 2016).

Les structures chimiques de certains constituants représentatifs de la propolis ont permis de mettre en évidence un certain nombre de constituants ayant des structures moléculaires ressemblant à celles des inhibiteurs de corrosion conventionnels (Vrsalo *et al.*, 2018). Des études récentes ont montré que l'extrait de propolis inhibe la corrosion des aciers et de l'aluminium en solutions aqueuses (Fouda., 2013 ; Huang *et al.*, 2014 ; Dolabella *et al.*, 2016).

#### **III.2.5. Propriétés cicatrisantes :**

Les vertus cicatrisantes de la propolis sont connues depuis l'antiquité. Utilisé au cours des âges la propolis a démontré qu'elle possède un effet stimulant sur le métabolisme cellulaire épidermique, vaisseaux, la formation de collagène grâce à un phénomène de stimulation fibroblastiques (Almas., 2001).

En effet, la propolis accélère la régénération de différents tissus abimés, c'est le cas notamment de la pulpe dentaire, des tissus hépatiques ou de tissus osseux comme l'ont suggère des études réalisé sur l'animal (Bankova., 2000).

.

---

**MATÉRIEL**  
**&**  
**MÉTHODES**

---

## I. Matériels :

Le but de cette étude est de déterminer les changements histologiques survenus lors d'une implantation de matériau biomédical traité et stérilisé par deux procédés, un conventionnel et l'autre expérimental (teinture de propolis).

La réalisation de nos manipulations a été départagée entre le laboratoire de zoologie de l'université Djilali Bounaama de Khemis Miliana et le service d'anatomo-pathologie du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Chlef entre la période d'avril et juin 2018.

La préparation des implants en Titane était assurée par le laboratoire de chimie du Centre de Développement des Technologies Avancées (CTDA, Baba-Hassen).

### I. 1. Matériel Biologique :

A cette issue, des rats Wistars (Fig.9) ont été choisis comme hôte biologique. C'est le model le plus adapté à ce type d'étude car sa faculté de récupération après intervention chirurgicale (petite chirurgie) est très rapide.

#### Classification systématique de *rattus norvegicus*

**Règne :** Animalia

**Sous-règne :** Metazoa

**Classe:** Mammalia

**Ordre:** Rodentia

**Famille :** Muridae

**Genre:** Rattus

**Espèce:** *Rattus norvegicus* (**Berkenhout, 1769**)



**Figure 9:** Rat Wistar (*Rattus norvegicus*)

### I. 2. Matériel non Biologique:

**Appareils utilisés:** Incubateur, Microscope photonique primo Star, Microtome de type LAB-KITS, Etuve, Balance de précision, Bain marie, Plaque chauffante, Agitateur, Appareil photo numérique *Fujifilm*.

**Outils utilisés :** Implants en dioxyde de Titane (TiO<sub>2</sub>), fils résorbables et aiguilles, seringues, Pincés, Spatules, Verrerie, Papier Filtre, Lames et Lamelles, Cassettes, Micropipette, Bécher, Eprouvettes graduées, Pipettes pasteur, Moules et Support de lames, Béchers, Passoire.

**Produits chimiques utilisés :** Dans le cadre de ce travail, les produits de toutes les manipulations sont regroupés dans le tableau suivant.

**Tableau 2:** Produits chimiques utilisés.

Produits histologiques	Constitution du Rouge Nucléaire	Constitution de trichome de MASSON	Technique de stérilisation	Petite chirurgie
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bouin aqueux</li> <li>▪ Ethanol</li> <li>▪ Paraffine</li> <li>▪ Xylène</li> <li>▪ Cyclohexane</li> <li>▪ Gélatine</li> <li>▪ Histo-kit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rouge nucléaire</li> <li>▪ Bleu d'aniline</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Acide acétique,</li> <li>▪ Acide phosphotungstique</li> <li>▪ Fuchsine acide,</li> <li>▪ Hématoxyline de Mayer</li> <li>▪ Ponceau</li> <li>▪ Bleu d'aniline</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Butanol</li> <li>▪ alcoolat de propolis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ kétamine</li> <li>▪ Bétadine</li> <li>▪ Madécassol</li> </ul>

**Programmes informatiques utilisés :**

- XLSTAT 2017
- Excel 2010 de *Microsoft*
- Axio Vision 4.8 de *CARL ZEISS*
- Image J 1.47u de *National institutes of health. USA*

**II. Méthodes d'études :****II.1. Protocol experimental:****II.1. 1. : Étude experimental:**

Nous avons utilisé des rats mâles adultes, des Wistars Albinos qui proviennent de l'institut Pasteur d'Alger. Ces rats pèsent entre (130-210g). Dès leur réception, les rats ont été classés aléatoirement en 3 groupes (témoin et traités) dans des cages en plastiques (3 rats par lot). Une épaisse couche de sciure est déposée au fond des cages, renouvelée tous les 2 à 3 jours. Les animaux ont libre accès à l'eau et à la nourriture qui se compose de bouchon fournies aussi par l'institut Pasteur d'Alger. Avant leur utilisation les rats subissent une période d'adaptation de 2 semaines au niveau de l'animalerie à température constante ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), la durée de notre expérimentation est 5 semaines.



**Figure 10:** Lotissement des rats à l'animalerie.

## II.1. 2. Préparation et introduction des implants :

Dans cette étude, nous avons tentés d'implanter des surfaces carrés (10mm x 10mm x 0,5mm) (Fig.11a) de titane traitées chimiquement probablement entre la peau et les muscles abdominaux chez des rats Wistar. Avant cette opération, les implants subissent une désinfection préalable en utilisant deux procédés de stérilisation, un conventionnel et l'autre avec l'alcoolat de propolis.

Notre but, c'est de relever les degrés d'acceptation de cette implantation sur le plan histologique tout en utilisant deux procédés de stérilisation.

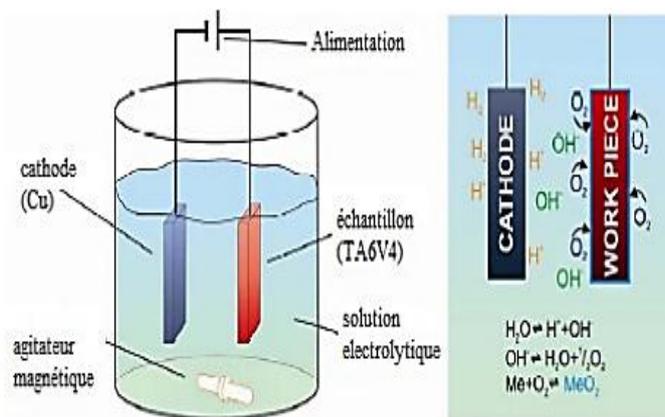
### a) Traitement de surface des implants en Titane :

Les techniques d'élaboration des dioxydes de Titane (TiO<sub>2</sub>) sont des méthodes de traitement de surface où la modification de la surface est réalisée grâce à des réactions chimiques ; soit entre le titane et la solution utilisée, soit entre les différents composants de la solution.



**Figure 11:** a) les implants en titane.

b) Schéma du montage expérimental de l'anodisation



Parmi ces techniques de formation l'oxydation anodique qui présente beaucoup d'avantages tels que : Le faible coût, la bonne force d'adhésion mécanique et la bonne conductivité électronique puisque la couche croît directement sur le substrat métallique de titane ce qui permet de contrôler facilement l'épaisseur et la morphologie des films de TiO<sub>2</sub>.

Les oxydes de titanes TiO<sub>2</sub> nanopores sont préparés par anodisation (Oxydation anodique) de substrat de titane grade 5 (Ti6Al4V) dans un électrolyte alcalin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M contenant 0,5 Wt% de NaF. Les substrats d'épaisseur 1 mm sont fournis par la société Française du Titane. Après un nettoyage et un polissage mécanique à l'aide du papier abrasif de différente granulométrie allant de 400 à 2000, suivie d'un rinçage à l'eau et séchage à l'air comprimé, les échantillons sont directement immergés dans le bain d'oxydation (Fig.11b). L'oxydation s'effectue dans une cellule électrochimique à deux électrodes distant de 3 cm et relié à un générateur de courant continu (DC power) à différent voltage (10, 20 et 30 V) et un temps constant de 1 heure. Le substrat de titane est placé en anode et la cathode est en Cuivre. Tous le système est sous agitation magnétique pendant tout le traitement. Après un nettoyage dans un bain à ultrason, les échantillons ont subi un recuit à 500°C pendant 2 heures pour la cristallisation.

**Tableau 3:** Paramètres d'anodisation de TA6V.

Voltage/temps	alcalin (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
10V	1H
20V	1H
30V	1H

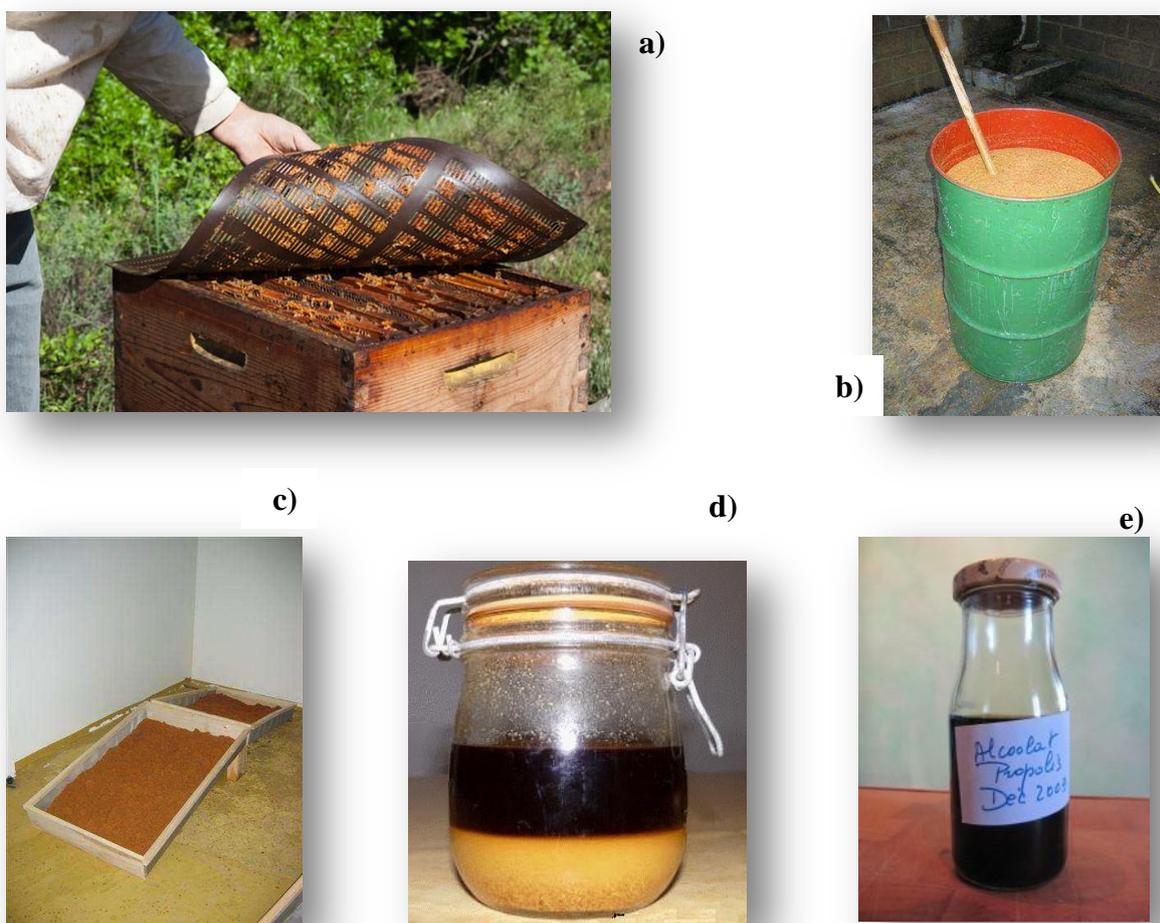
### b) Préparation de la solution stérilisante (alcoolat de propolis)

La propolis utilisée est une propolis de grille (Fig. 12a). Sa récolte se fait en mois d'aout/septembre à partir de grilles en plastique alimentaire souples qu'on dépose au-dessus des cadres de ruches d'abeille (en mois de mai/juin). Après une étape de lavage puis séchage (Fig. 12b, c), on procède à l'extraction de la propolis avec de l'alcool (alcoolat de propolis ou teinture-mère) (Fig. 12d).

L'extrait de propolis à l'éthanol est la méthode la plus efficace pour extraire de la propolis ; pour cela on :

- Mélange la propolis (30%) avec du solvant (70%) à 70° ou 90°.
- Mettre l'alcool et la propolis dans un récipient fermé.

- Agiter la préparation une ou deux fois par jour et laissez le mélange dans un endroit sombre. La propolis doit être laissée trempée dans l'alcool au moins une semaine (laisser macérer).
- Puis filtrer à travers un filtre très fin et propre en tissu, en papier ou en boules de coton.
- Renouveler si nécessaire.
- A conservé dans des bouteilles propres, hermétiques et sombres (Fig. 12e).
- Entreposer le tout dans un endroit frais et sombre.



**Figure 12:** Etapes de fabrication de la teinture de propolis

- a) Retrait des grilles en plastique alimentaire chargées de propolis brute,
- b) Lavage de la propolis brute.
- c) Séchage de la propolis.
- d) Macération de la propolis (30 % propolis/70 % alcool).
- e) Résultat final (teinture ou alcoolat de propolis).

### c) Stérilisation des implants :

Deux techniques de stérilisations sont utilisées. Une première conventionnelle et une expérimentale avec l'utilisation de l'alcoolat de propolis comme une solution d'immersion désinfectante (tableau 4).

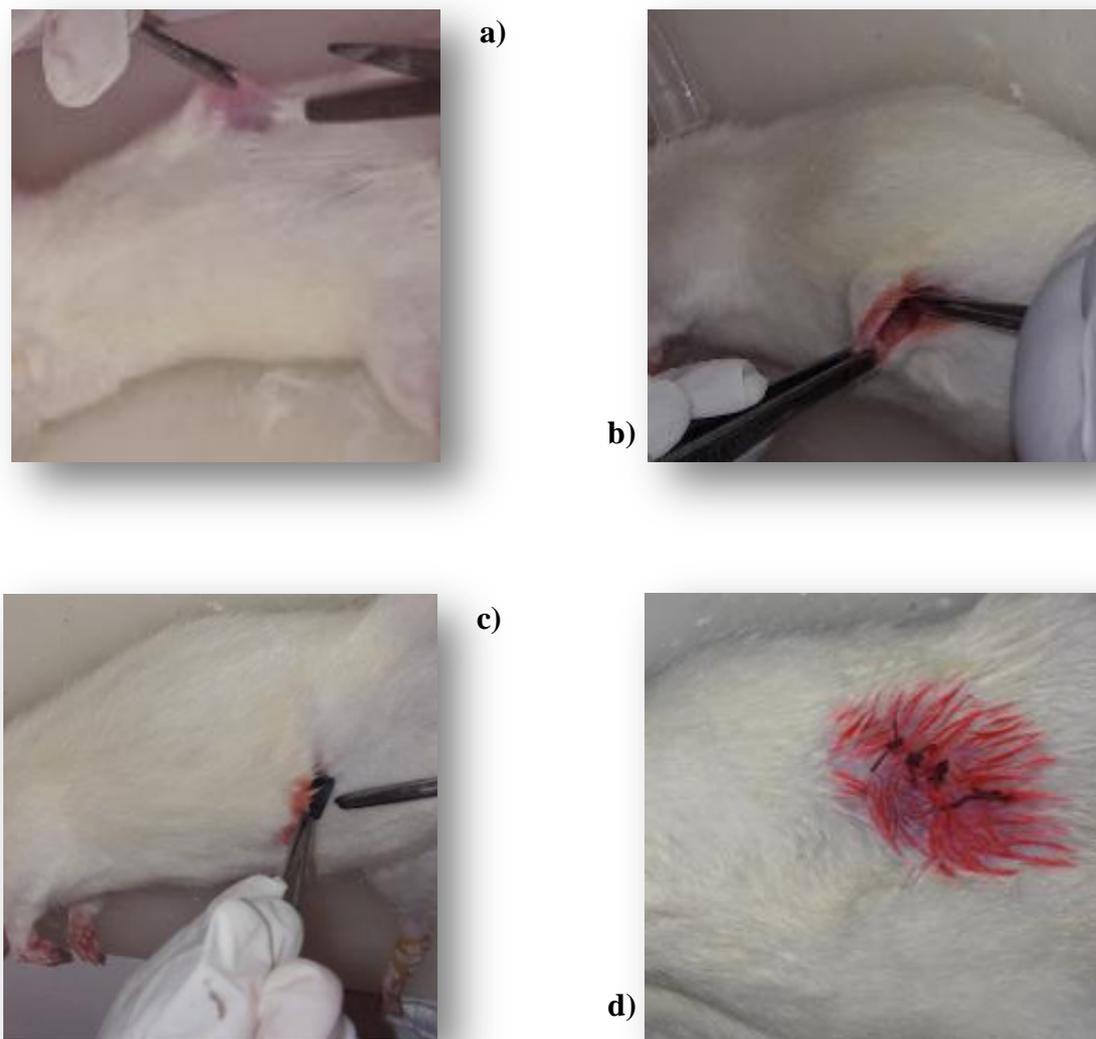
**Tableau 4:** Les étapes des techniques de stérilisations utilisées pour les implants.

Conventionnelle	Alcoolat de Propolis
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Mettre les implants dans deux bains de butanol 10 minute pour chacun.</li> <li>– Rincer les implants trois fois au butanol.</li> <li>– Conserver dans une boîte en verre.</li> <li>– Mettre dans l'étuve pendant 40 minutes à 136 °C.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Mettre les implants dans deux bains d'alcoolat de propolis 10 minute pour chacun.</li> <li>– Rincer les implants trois fois à l'alcoolat de propolis.</li> <li>– Conserver dans une boîte en verre.</li> <li>– Mettre dans l'étuve pendant 40 minutes à 136 °C.</li> </ul>

### d) Introduction des implants dans les animaux:

Après l'adaptation des trois lots d'animaux aux conditions de l'animalerie, deux lots ont reçu des implants sous-cutanés en Titane et cela dans région de l'abdomen. Les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'une solution de kétamine (0.1ml pour 100 g de poids corporel) (Fig. 13a). La peau des rats a été rasée et nettoyée à la bétadine avant ouverture.

Après incision de la peau (Fig. 13b), une petite ouverture à la taille de l'implant est dégagée pour y placer ce dernier (Fig. 13c). La fermeture de la plaie est réalisée grâce à une suture à points simples et cela à l'aide d'un fil résorbable (Fig. 13d). Une poudre de Madécassole sera appliquée à la fin de l'opération pour accélérer la cicatrisation.



**Figure 13:** Etapes de l'introduction des implants.

- a) Anesthésie et préparation de l'animal.
- b) Incision et ouverture de la peau.
- c) Introduction de l'implant.
- d) Suture et fermeture de la plaie.

## II. 2. Etude histologique :

Le tissu musculaire et le tissu conjonctif ont été prélevés directement sur les animaux anesthésiés puis soumis aux techniques histologiques classiques qui comportent la fixation, la déshydratation, l'éclaircissement, l'imprégnation, l'inclusion et la coloration.

### II.2.1. Collecte de tissus :

Après 21 jours d'implantation, les rats ont été anesthésiés avec la même procédure que celle utilisée pour la chirurgie implantaire. Les plaques en titane sont retirées après être

trouvées enrobées par un dépôt de matrice (**Fig. 14**). Celui-ci est séparé de l'implant et déposé pour fixation avec une partie du muscle abdominal qui est directement en contact avec l'implant. Tous les spécimens sont passés à l'eau physiologique et plongés dans le fixateur.



**Figure 14 :** Retrait de l'implant et les tissus adjacents après 21 jours d'implantation.

### II.2.2. Fixation

La fixation est une opération qui a pour but de stabiliser et de conserver l'échantillon dans un état le plus proche possible de l'état in vivo. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement. Les tissus sont fixés dans le Bouin aqueux pendant 48h ensuite lavée à l'eau courante pendant 24h.

### II.2.3. Déshydratation

Elle s'effectue par un passage successif des échantillons dans des bains d'alcool de concentration croissantes (50°, 70°, 90°,100°) (**Fig. 15**) pendant 30 minutes pour chaque bain. L'intérêt de la déshydratation c'est l'élimination de l'eau contenue dans les cellules pour une bonne pénétration de la paraffine qui est très hydrophobe.



**Figure 15:** La batterie de Déshydratation (concentration croissante d'alcool).

#### II.2.4. Eclaircissement

Se fait grâce à un passage des échantillons dans deux bains de butanol de 2 heures chacun pour assurer l'élimination complète des traces d'alcool.

#### II.2.5. Imprégnation

Les tissus sont imprégnés dans deux bains de paraffine liquéfiée à 60°C dans l'étuve et cela pendant 2 heures pour chacun (**Fig. 16**). La procédure a pour but l'entrée progressive de la paraffine dans les tissus.



**Figure 16:** Imprégnation à la paraffine.

#### II.2.6. Inclusion et mise en bloc

Les tissus imprégnés de paraffine sont prélevés à l'aide d'une pince chauffée puis immergés dans des moules spéciaux remplis de paraffine. Le moulage sera ensuite étiqueté.



**Figure 17:** La mise en bloc de la paraffine.

### II.2.7. Confection des coupes et étalement

Des coupes de 5 $\mu$ m d'épaisseur ont été obtenus à l'aide d'un microtome de type LAB-KITS après avoir taillé, fixé et coupé les blocs. Les coupes sont ensuite étalées dans un bain-marie réglé à 39C° afin de les déposer sur des lames en verre. Un séchage de 24 h est nécessaire avant de procéder à la coloration (Figure 18).



**Figure 18:** Confection et étalement des coupes.

### II.2.8. Coloration des lames

L'intérêt de la coloration est d'augmenter le contraste entre les structures, afin de mettre en évidence les divers constituants présents dans la coupe histologique. Cela permet l'analyse de l'architecture du tissu, des cellules, de leur noyau, de leur cytoplasme et des constituants extracellulaires.

Avant la coloration, les coupes doivent subir les étapes suivantes : le déparaffinage et la réhydratation.

✓ **Déparaffinage**

Le déparaffinage des coupes se fait dans des bains de xylène ou des bains de cyclohexane pendant 15 minutes chacun pour éliminer la paraffine du tissu.

✓ **Réhydratation**

Les coupes sont passées dans des bains d'alcool à concentration décroissante (100, 90, 70, 50) pendant 5 minutes, suivies d'un bain d'eau.

Les colorations qui ont été effectuées dans cette étude sont toutes topographiques :

### A. Trichrome de Masson

Cette coloration facilite l'identification de la topographie des tissus par une coloration nucléaire avec l'hématoxyline, une coloration cytoplasmique par un mélange de colorants acides (Fushine acides + ponceau) et une coloration du collagène par le bleu d'aniline ou le vert lumière. (Ganter *et* Jollés ;1970, Siou *et* Guffroy ; 1990).

Cette coloration permet de colorer en bleu violet ou brun les noyaux des cellules, en rose les cytoplasmes et en vert ou bleu le collagène (**annexe 4**).

### B. Azan modifié

C'est une coloration topographique, associant à une coloration nucléaire (rouge nucléaire), une coloration cytoplasmique par un colorant acide (l'Orangé G) et une coloration sélective du collagène par un autre colorant acide (le bleu d'aniline).

Cette coloration permet de colorer en bleu violet ou brun les noyaux des cellules, en rose les cytoplasmes et en bleu le collagène (**annexe 05**).

## II.2.9. Montage

Le montage entre lame et lamelle se fait à l'aide de l'histo-kit qui améliore l'observation des lames et les conserve.

## II.2.10. Observation des lames et prise des photos

Après séchage de l'histo-kit, les lames sont observées grâce au microscope optique primo Star aux différents grossissements. La prise des photos se fait à l'aide d'un appareil photo de type Fujifilm.

## II.3. Etude analytique :

### II.3.1. Validation et contrôle du stérilisateur (alcoolat de propolis) :

#### c) Contrôle au moyen d'indicateurs physico-chimiques (Effet antioxydant) :

La méthode de DPPH (2,2- diphenyl-1- picrylhydrazyl) est utilisée pour l'évaluation de l'activité antioxydant de nos extraits.

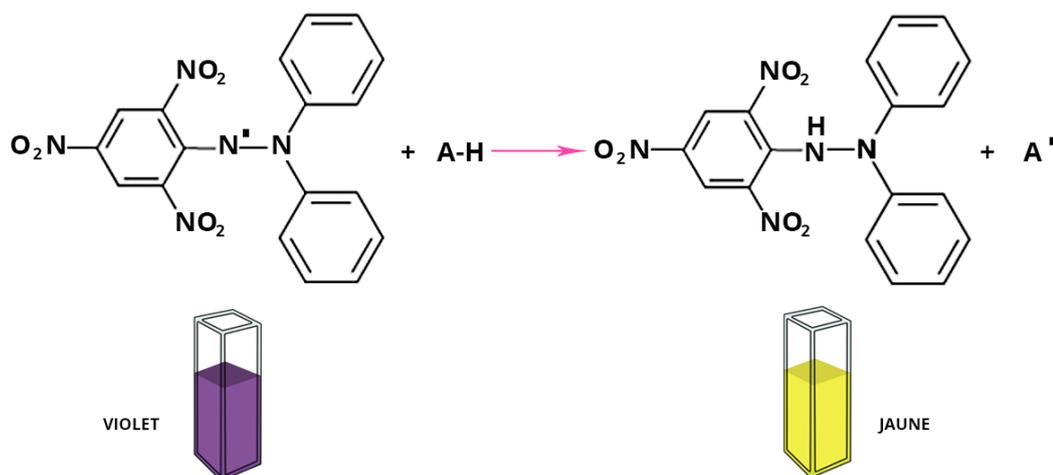
#### ▪ Principe :

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Brand-williams *et al*, 1995).

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation:



Où: (RH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune) (Fig. 19) (Yang *et al* 2010).



**Figure 19 :** Réaction du DPPH avec un antioxydant (Brand-williams *et al*, 1995).

#### ▪ Mode opératoire :

L'effet «scavenger» de (DPPH) est déterminé selon la méthode de (Grant *et al*, 2009). Un volume de 2700µl de la solution DPPH a été mélangé avec 300µl d'extrait. Après une heure d'incubation à l'obscurité l'absorbance a été mesurée à 517nm. Le pourcentage d'inhibition de radicale DPPH est calculé comme suit :

$$\% = \left[ \frac{(A_{\text{tém}} - A_{\text{éch}})}{A_{\text{tém}}} \right] \times 100$$

- $A_{\text{tém}}$  : Absorbance de témoins (300µl de méthanol +2700µl de DPPH).
- $A_{\text{éch}}$  : Absorbance de l'extrait (300µl de l'extrait +2700µl de DPPH).

#### d) Contrôle au moyen d'indicateurs biologiques (Effet antibactérien) :

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne de la propolis, nous avons testés trois souches bactériennes (*Bacillus subtilus* , *Escherchia coli* , *Staphylococcus aureus* ) (tableau5). Pour mettre en évidence ce pouvoir antibactérien, une comparaison avec trois antibiotiques (pénicilline, Gentamicine, Amoxiciline) est faite in vitro. Pour ce faire, la technique de diffusion sur Muller Hinton est utilisée :

**Tableau 5 :** caractéristiques et origine des souches bactériennes

Les souches bactériennes	Origine de la souche	Caractères bactériologiques	Habitats	Pouvoir pathogène
<b>Escherichia coli</b>	Laboratoire de microbiologie de l'Université Djilali Bouaama de Khemis-Miliana	Gram +	Le tube digestif	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Septicémie méningite du nourrisson, de plaies opératoires et gastro-entérites.</li> <li>– Douleurs abdominales et des diarrhées sanglantes.</li> </ul>
<b>Bacillus subtilis</b>		Gram –	Espèce ubiquitaire surtout les sols	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Un contaminant des aliments d'origine végétale.</li> <li>– Un contaminant des drogues et de médicaments.</li> <li>– Toxi-infection alimentaire</li> </ul>
<b>Staphylococcus aureus</b>		Gram +	Les fosses nasales La gorge Le tube digestif	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Infection hospitalière.</li> <li>– Responsable des abcès, des plaies, des septicémies, de pneumonie et de l'intoxication alimentaire</li> </ul>

▪ **Technique de diffusion sur Muller Hinton :**

Le principe de la méthode repose sur la diffusion des composés antimicrobiens en milieu solide dans une boîte de pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produits et le microorganisme cible.

L'effet d'un produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (Rota *et al*, 2004).

Les souches bactériennes utilisées dans le présent travail ont été choisies pour leur pathogénicité. Les travaux ont été réalisés sur trois souches bactériennes (tableau 5) et comparés avec l'activité de certains antibiotiques (tableau 5).

- **Protocol expérimental :**

Couler aseptiquement le milieu de culture Muller Hinton (le milieu standard pour l'activité anti bactériennes) dans des boites de pétri à raison de 20ml par boite (Fig. 20). On laisse refroidir et solidifier sur la paillasse, puis on a ajouté la suspension bactériennes chacune dans un boite a pétrie puis étaler avec celui-ci de façon à avoir une croissance répartie de façon homogène sur toute la boite.



**Figure 20:** dépôt de disque

- **Dépôt des disques :**

Des disques stérile de papier filtre ont été individuellement imprégné dans propolis dissoute dans d'éthanol et ensuite placés à l'aide d'une pince stérile à la surface des boites de pétri. Laissés pour une période de pré-diffusion pendant une 20minute à température ambiante, et incubées à 37°C pendant 24 h.

- **La lecture:**

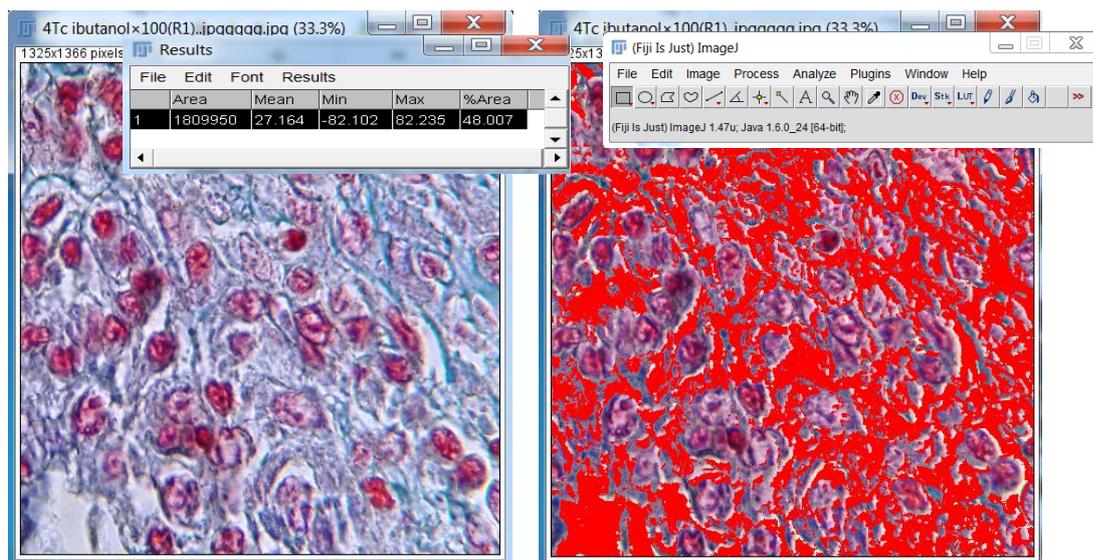
Les diamètres des zones d'inhibition résultants ont été mesurés en cm incluant le diamètre du disque de papier (**annexe11**).

### II.3.2. Etude morpho-histologique :

Pour l'étude histologique, des relevés morpho-métriques ont été pris sur certains paramètres cellulaires, à savoir l'épaisseur du tissu conjonctif, le dénombrement des cellules inflammatoires, le collagène et la néo-vascularisation. Toutes les photos histologiques sont prises par le même appareil à différents grossissements. L'intérêt de ces mesures consiste à vérifier:

- ✓ **L'intégrité et adhérence de l'implant :** L'intégrité du titane comme un biomatériau est mesurée en quantifiant le collagène conjonctif . En effet, nous avons effectué 30 mesures concernant le pourcentage de la surface occupée par les fibres de collagènes par rapport à la surface globale du tissu conjonctif nouvellement formé (Fig. 21).
- ✓ **La biocompatibilité de l'implant :** Elle peut être exprimée par l'absence de réactions allergiques au titane (Pohler, 2000). Sur le plan histologique cette allergie sera démontrée par le dénombrement des cellules inflammatoires dans les différents environnements et la néo-vascularisation.
- ✓ **L'effet anticorrosif :** l'épaisseur du tissu conjonctif nous donne une idée sur l'étanchéité de ce tissu vis-à-vis la déperdition des molécules chimiques qui constituent l'implant de titane.

Toutes ces mesures sont possibles grâce à l'image *J*, qui est un logiciel morphométrique convertisseur de toutes données physiques caractéristiques de l'image, en données scientifiquement exploitables.



**Figure 21 :** Mesure morpho métrique des sur l'image *J*.

Une comparaison de moyenne est faite entre les tissus témoins et traités dans des milieux de stérilisation.

#### II.4. Etude statistique :

L'analyse statistique a été réalisée avec XLSTAT. En utilisant les différents tests de comparaison entre deux échantillons. L'utilisation des tests non paramétriques de Mann-Whitney pour la comparaison des moyennes entre les 2 populations témoin et traitée (avec un

niveau de signification statistique fixé à  $p < 0,05$ . Et aussi les tests de corrélation simple entre les différents paramètres morfo-métriques.

Pour la comparaison des variances, nous avons utilisé le test non paramétrique de comparaison de K échantillon similaire au test ANOVA (test de Kruskal-Wallis).

Pour chaque série d'analyse, la moyenne et l'écart type sont calculés. Les paramètres statistiques sont donnés par les relations suivantes :

$$\text{Moyenne} = \frac{\sum x_i n_i}{N}$$

$$\text{Ecarttype} = \sqrt{\delta^2}$$

- ✓  $n_i$  : désigne la fréquence.
- ✓  $x_i$  : la valeur individuelle.
- ✓  $N$  : effectif.

La variance  $\delta^2$  : est la moyenne des carrés des écarts types entre les valeurs de l'échantillon et la moyenne arithmétique

$$\delta^2 = \frac{\sum n_i (x_i - x_a)^2 + \sum n_i (x_i - x_b)^2}{(Na - Nb) - 2}$$

$$SEM = \frac{\text{Ecarttype}}{\sqrt{N - 1}}$$

$N-1$  : désigne le degré de liberté (ddl)

$$t = \frac{Xa - Xb}{\sqrt{\delta^2 / Na + \delta^2 / Nb}}$$

Pour une ddl de  $(Na + Nb) - 2$  et à 5% d'erreur, la valeur de  $t$  nous donne le degré de signification  $P$ , la différence entre deux moyennes est :

- ✓... Peu significative si  $P < 0,05$  (\*).
- ✓... Significative si  $P < 0,01$  (\*\*).
- ✓... Très significative si  $P < 0,001$  (\*\*\*)).
- ✓... Hautement significative si  $P < 0,0001$  (\*\*\*\*).

---

**RESULTATS**  
**&**  
**INTERPRETATIONS**

---

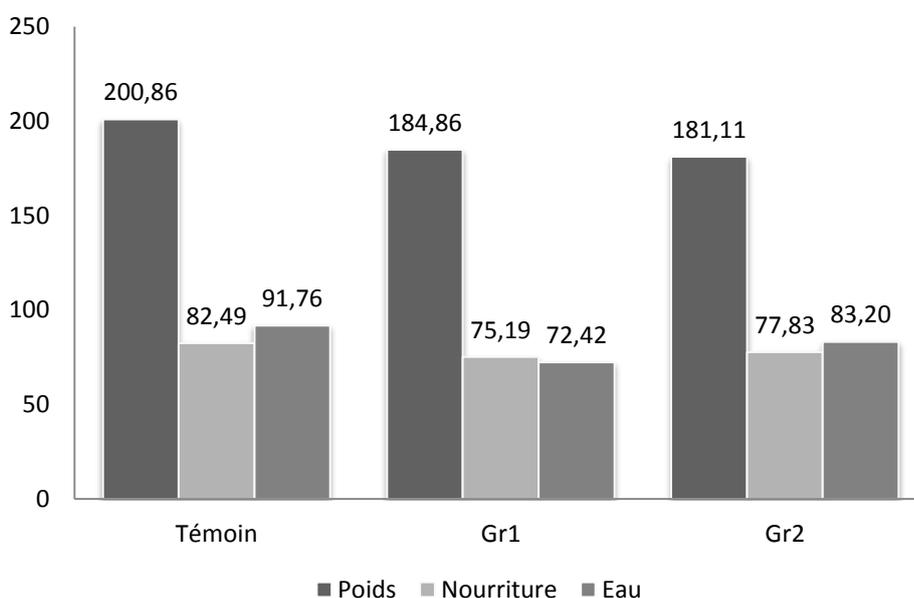
## I. Résultats et Interprétations

### I.1. Etude comportementale

#### I.1. 1. Consommation des aliments

Après cinq semaines de captivité, un répertoire alimentaire des différents lots de rats a été enregistré. Les consommations journalières d'eau et d'aliment sont mentionnées par rapport au gain de poids des animaux, et cela avant et après l'implantation (Fig.22).

	Témoin	Gr1(propolis)	Gr2(butanol)
<b>Poids (gr)</b>	200,86 ± 4,61	184,86 ± 14,59	181,11 ± 13
<b>Aliment (mg)</b>	82,49 ± 17,67	75,19 ± 21,48	77,83 ± 15,17
<b>Eau (ml)</b>	91,76 ± 22,63	72,42 ± 18,39	83,20 ± 14,62



**Figure 22 :** Relation entre le poids et la consommation de nourriture chez les rats expérimentés (Témoin : pas d'implantation, Gr1 : implantation + propolis, Gr2 : implantation + Butanol).

Le rapport obtenu entre le poids des rats et leur consommation en eau et en aliment montre bien que ces rats conservent la même dynamique dans le gain du poids par rapport à ceux qu'ils consomment, sauf exception, sur la consommation de l'eau chez le groupe à propolis, le rapport trouvé est supérieur aux autres groupes (2,55).

		Témoin	Gr1(propolis)	Gr2(butanol)
<b>Rapport</b>	<b>Poids/Aliment</b>	2,43	2,46	2,33
	<b>Poids/Eau</b>	2,19	<b>2,55</b>	2,18

**Figure 23 :** Rapport final entre le poids et la consommation de nourriture chez les rats expérimentés (témoin : pas d'implantation, Gr1 : implantation + propolis, Gr2 : implantation + Butanol).

La figure 24 illustre cette cinétique trouvée dans le gain du poids avant et après l'installation de l'implant en titane. La consommation d'eau a effectivement baissée après l'intervention, sans que leur poids ou la consommation d'aliments ne soient altérés.



**Figure 24 :** Relation entre le poids et la consommation de nourriture chez les rats avant et après l'implantation (Témoin : pas d'implantation, Gr1 : implantation + propolis, Gr2 : implantation + Butanol)

## I.2. Résultats histologiques:

La partie histologique s'intéresse à la comparaison des structures topographiques du tissu obtenu après implantation et stérilisation dans deux milieux ; le premier utilisé conventionnellement avec le butanol comme solution désinfectante, et le deuxième expérimental où le butanol est substitué par la propolis.

Pour cela, nous avons utilisé des colorations topographiques pour mettre en évidence :

- ✓ Les noyaux des cellules colorés en bleu/violet, le cytoplasme en rose et les autres éléments cellulaires (vacuoles) ± basiques en rose/rouge par la coloration à l'azan modifié / trichrome de Masson.
- ✓ Les collagènes colorés en bleu par la coloration au trichrome de Masson.

- ✓ Les collagènes colorés en bleu par la coloration à l'azan modifié.

### **I.2.1. Histologie du tissu musculaire et conjonctif des rats témoins :**

#### **a) Au faible grossissement :**

L'observation des coupes histologiques à faible grossissement du tissu musculaire des rats qui n'ont pas subi d'implantation et colorés au trichrome de Masson (**Planche I**) montre que ce tissu est formé de couches obliques et transverse bordées d'un tissu conjonctif.

#### **b) Au fort Grossissement :**

##### ✓ **Tissu musculaire**

Il est formé pour sa majorité de cellules musculaires squelettiques. Ces dernières ont un aspect fusiforme à cytoplasme rose, avec un noyau périphérique sombre à la coloration topographique. Les muscles sont couverts d'un tissu conjonctif du coté dermique.

##### ✓ **Tissu conjonctif**

Le tissu conjonctif est de type lâche, celui qu'on trouve sous le derme. Les cellules de ce tissu sont éparpillées et séparées les unes des autres par des fibres et de la substance fondamentale dont l'ensemble forme la matrice extracellulaire. Ces cellules sont des fibroblastes à cytoplasme peu visible où seul leur noyau, ovoïde, allongé, avec un ou deux nucléoles, est bien visible.

Les fibres de collagènes sont les plus abondantes. A la coloration de trichrome de Masson, elles sont bleues. Elles sont groupées en faisceaux entre les cellules. Ces fibres sont des assemblages de nombreuses fibrilles provenant elles-mêmes de l'association de molécules, les protofibrilles de tropocollagène.

Ce tissu possède un rôle de soutien et d'emballage ; il assure le passage de nombreuses substances entre le sang et le tissu musculaire ; siège des cellules libres du système immunitaire (lymphocytes et plasmocytes, monocytes et macrophages, granulocytes, mastocytes), il joue un rôle majeur dans les réactions inflammatoires et dans les phénomènes immunitaires ainsi que dans les processus de cicatrisation (par prolifération des fibroblastes et production des macromolécules de la MEC).

### **I.2.2. Histologie du tissu conjonctif péri-implantaire des rats traités conventionnellement :**

Au niveau tissulaire, la structure de ce tissu néoformé est considérée comme cicatricielle (**Planche II, IV**). Elle est responsable de la défense par la formation de cellules inflammatoire et aussi de soutien par le renforcement des fibres de collagènes. Après l'implantation et la période de convalescence de trois semaines, nous avons pu observer avec l'analyse histologique les points suivant :

- ✓ Apparition de tissu conjonctif cicatriciel,
- ✓ Augmentation du nombre de vaisseaux sanguins et des cellules inflammatoires spécialement les macrophages, les lymphocytes et les neutrophiles.
- ✓ Persistante de la durée d'inflammation au-delà de deux semaines.

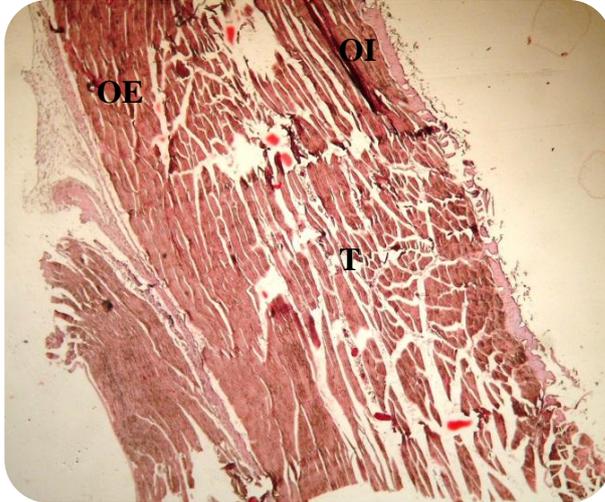
### **I.2.3. Histologie du tissu conjonctif péri-implantaire des rats traités à la propolis :**

Au niveau tissulaire, la structure de ce tissu diffère de celui des animaux dont l'implant est stérilisé au butanol. Après l'implantation et la période de convalescence de trois semaines (**Planche III, V**), nous avons pu observer avec l'analyse histologique les points suivant :

- ✓ Apparition de tissu conjonctif cicatriciel.
- ✓ Augmentation du nombre de vaisseaux sanguins et des cellules inflammatoires, spécialement les macrophages, et une augmentation légère de lymphocytes et les neutrophiles.
- ✓ Augmentation de l'épaisseur du tissu conjonctif péri-implantaire, ce qui donne de qualité d'étanchéité pour l'implant de titane. Cela pourrait minimiser la déperdition des molécules d'alliage du titane.
- ✓ Courte durée inflammatoire par rapport aux animaux dont l'implant est traité conventionnellement.

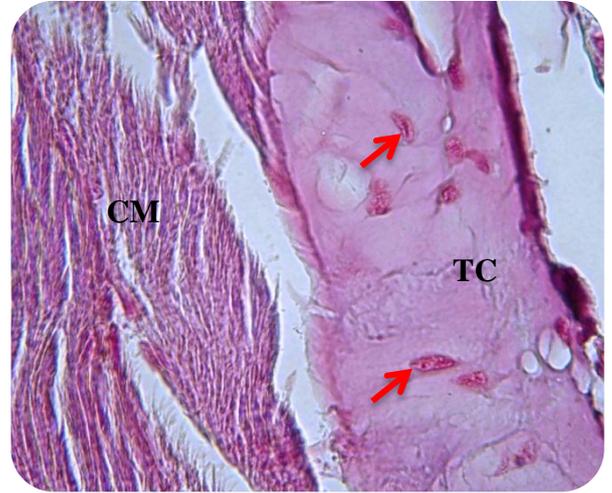
**Planche I : Coupes histologiques du muscle abdominal des rats Wistars témoins**

**Figure 1 :** Coupe histologique du muscle abdominal des rats Wistars témoins. Coloration au trichrome de Masson. **G. 40.**



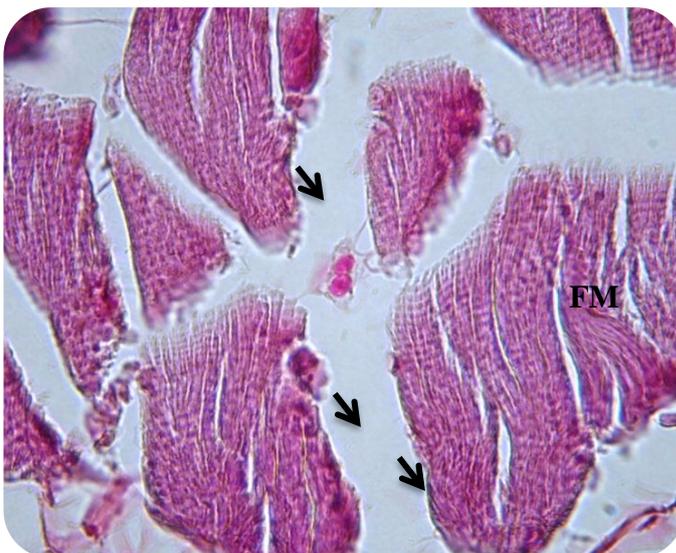
Cette figure au faible grossissement nous montre que le muscle abdominal est composé (obliques (externe (OE), interne (OI)) et transverse (T)).

**Figure 2 :** Coupe histologique du muscle abdominal des rats Wistars témoins. Coloration au trichrome de Masson. **G. 1000.**



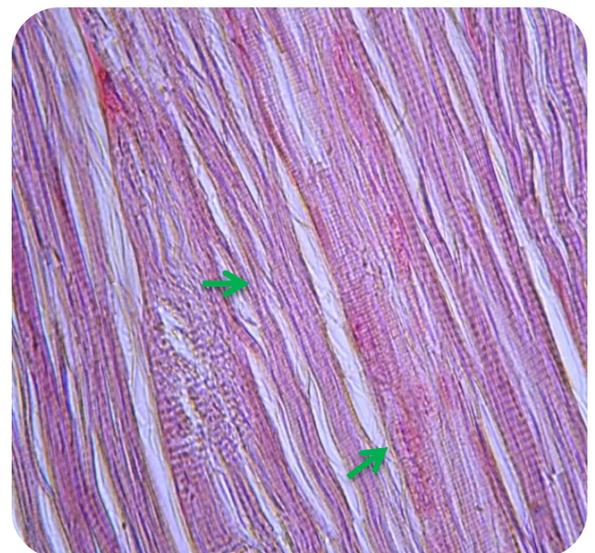
Dans cette figure, on observe que le tissu conjonctif (TC) vascularisé (flèche rouge) associé au muscle abdominal (CM) est une extension à celui du derme. C'est l'emplacement de l'implant de titane

**Figure 3 :** Coupe histologique du muscle abdominal des rats Wistars témoins. Coloration au trichrome de Masson. **G. 1000.**



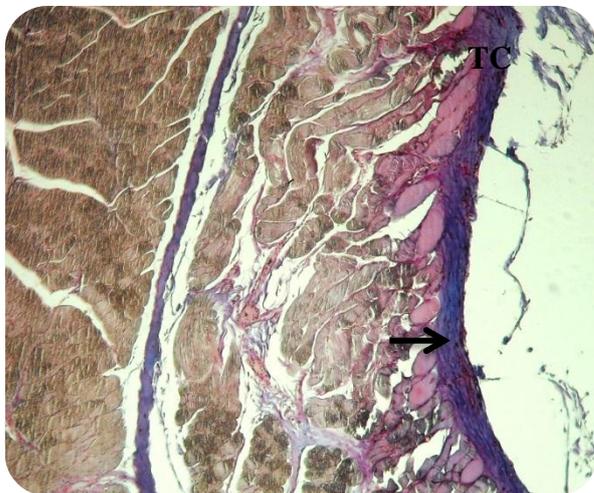
Au fort grossissement, nous observons les septa (flèche noire) qui séparent les fuseaux musculaire (FM). Au grossissement 1000, les cellules musculaires sont longiformes à noyaux périphériques (flèches vertes).

**Figure 4 :** Coupe histologique du muscle abdominal des rats Wistars témoins. Coloration au trichrome de Masson. **1000.**

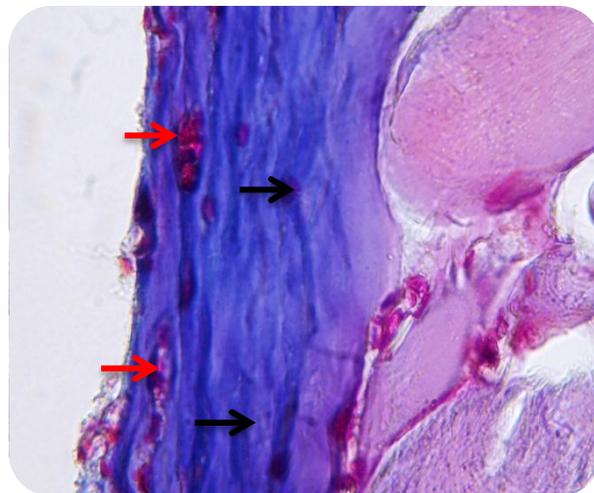


**Planche II :** Coupes histologiques du muscle abdominal sub-implantaire des rats Wistars dont l'implant du titane est stérilisé au butanol.

**Figure 1 :** Coupe histologique du muscle abdominal des rats Wistars traités. Coloration au trichrome de Masson. **G. 100.**

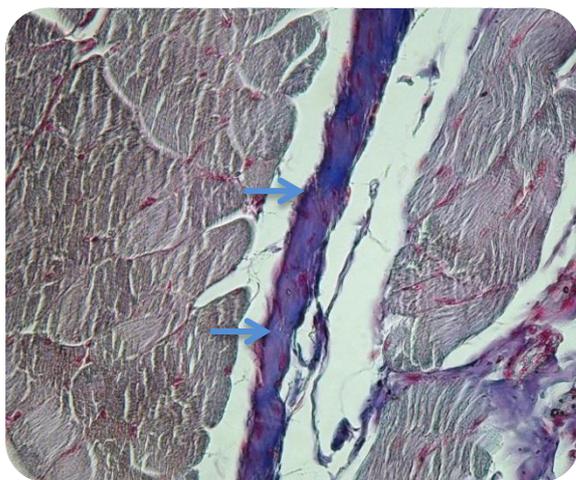


**Figure 2 :** Coupe histologique du muscle abdominal des rats Wistars traités. Coloration au trichrome de Masson. **G.1000.**

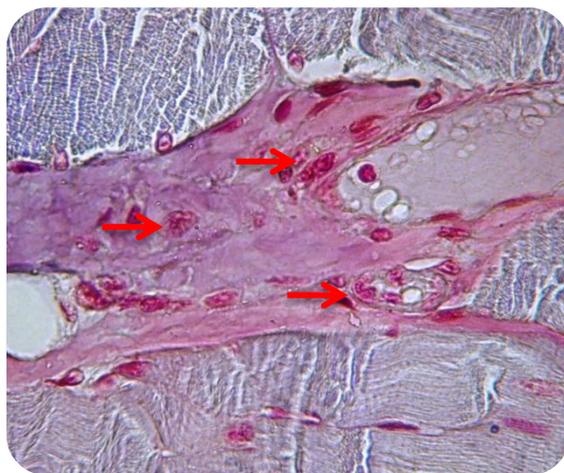


L'implant de titane est prélevé en laissant un tissu conjonctif (TC) cicatriciel plus dense que celui du témoin et riche en collagène (flèches noires). La vascularisation devient plus abondante (flèches rouges) d'où la possibilité de présence de cellules inflammatoires.

**Figure 3 :** Coupe histologique du muscle abdominal des rats Wistars traités. Coloration au trichrome de Masson. **G. 400.**



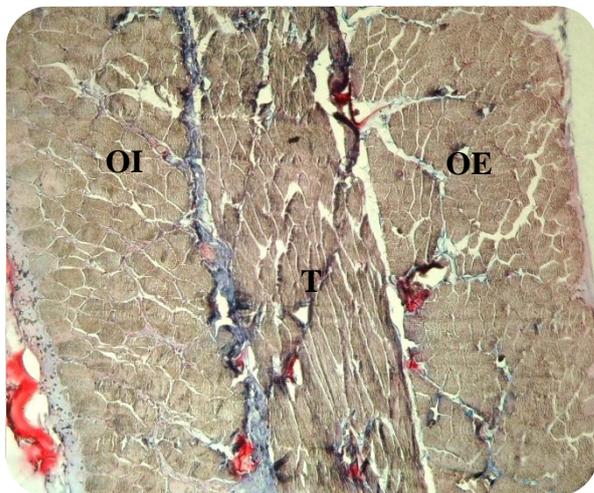
**Figure 4 :** Coupe histologique du muscle abdominal des rats Wistars traités. Coloration au trichrome de Masson. **G. 1000.**



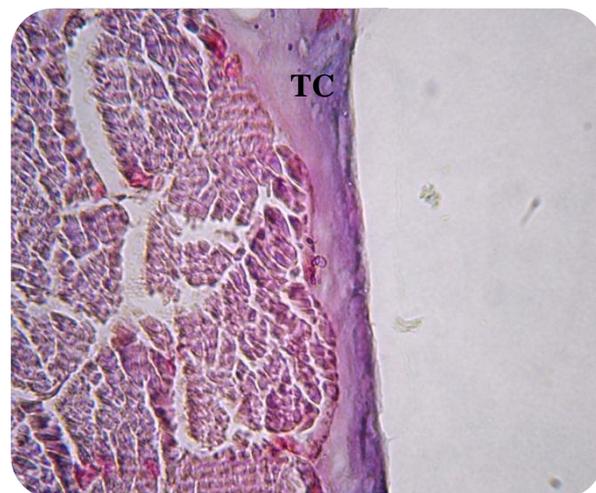
Le tissu conjonctif cicatriciel s'infiltré dans le muscle abdominal en augmentant l'angiogenèse (flèche rouges). Les cellules fibroblastiques synthétisent le collagène (flèche bleues).

**Planche III :** Coupes histologiques du muscle abdominal sub-implantaire des rats Wistars dont l'implant du titane est stérilisé à la propolis (1 et 2) et au butanol (3 et 4) .

**Figure 1 :** Coupe histologique du muscle abdominal des rats Wistars traités. Coloration au trichrome de Masson. **G. 400.**



**Figure 2 :** Coupe histologique du muscle abdominal des rats Wistars traités. Coloration au trichrome de Masson. **G. 1000.**

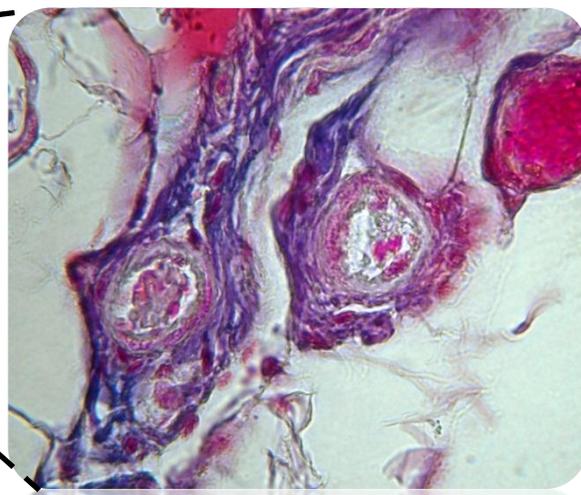


Les couches musculaires apparaissent sans altération (oblique externe (OE), oblique interne (OI) et transverse (T). le tissu conjonctif (TC) sub-implantaire paraît moins vascularisé et moins épais.

**Figure 3 :** Coupe histologique du muscle abdominal des rats Wistars traités. Coloration au trichrome de Masson. **G. 40.**



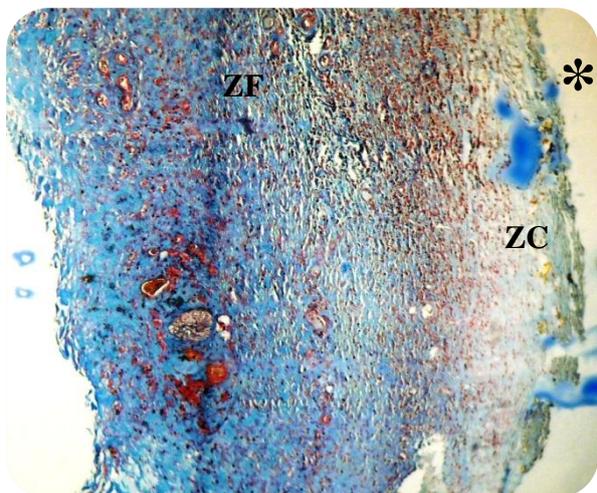
**Figure 4 :** Coupe histologique du muscle abdominal des rats Wistars traités. Coloration au trichrome de Masson. **G. 1000.**



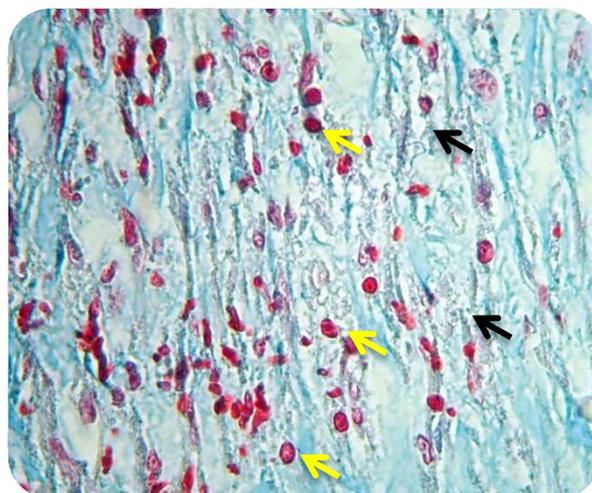
Dans ces essais où l'implant de titane est stérilisé au butanol, on trouve moins collagènes (flèches bleues), plus de vaisseaux sanguins (flèches rouges) et plus de cellules inflammatoires (flèches noires).

**Planche IV :** Coupes histologiques du tissu conjonctif péri-implantaire des rats Wistars dont l'implant de titane est stérilisé au butanol

**Figure 1 :** Coupe histologique du tissu conjonctif péri-implantaire des rats Wistars traités. Coloration Azan modifié. **G. 100.**

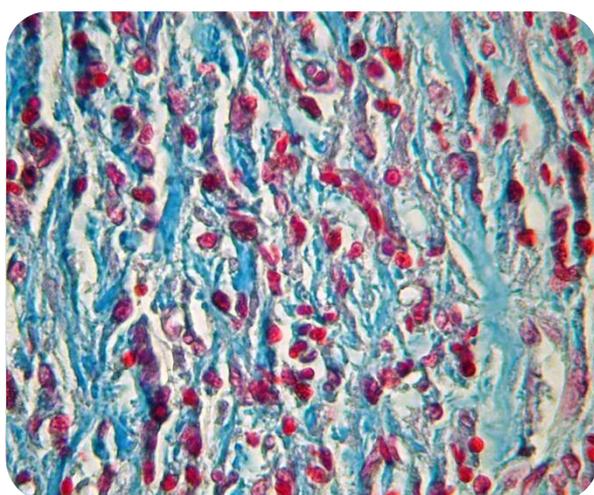


**Figure 2 :** Coupe histologique du tissu conjonctif péri-implantaire des rats Wistars traités. Coloration Azan modifié. **G. 1000.**

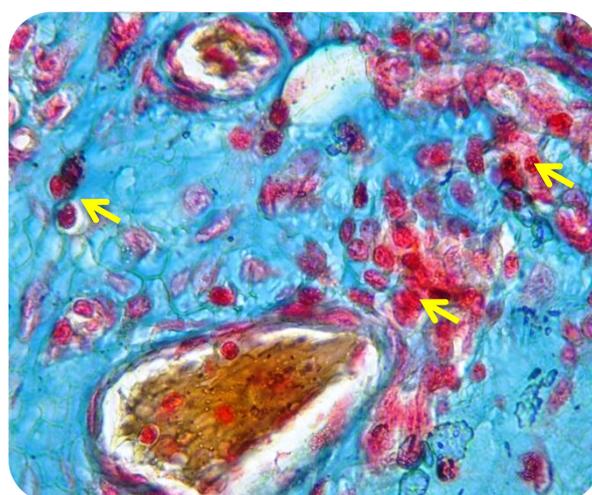


La coloration d'Azan modifié montre une régionalisation du tissu conjonctif avec des zones claires (ZC) qui apparaissent à partir de l'implant(\*) suivi par des zones foncées (ZF). Il y'a présence d'une importante vascularisation (flèches rouges). Le nombre de cellules inflammatoires (flèches jaunes) augmente lui aussi. Le collagène (flèches noires) est orienté de façon parallèle avec l'implant.

**Figure 3 :** Coupe histologique du tissu conjonctif péri-implantaire des rats Wistars traités. Coloration Azan modifié. **G. 1000.**



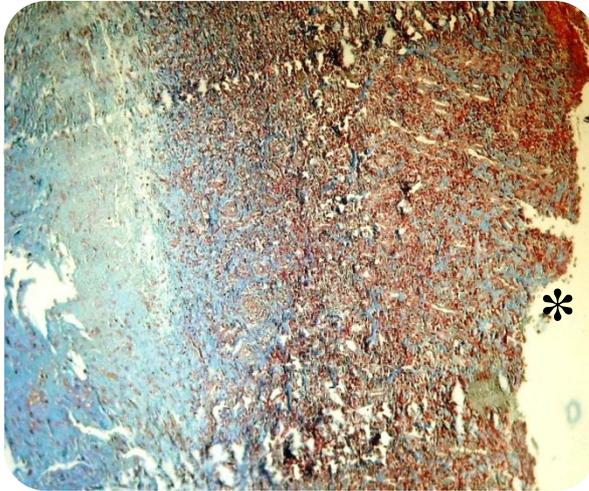
**Figure 4 :** Coupe histologique du tissu conjonctif péri-implantaire des rats Wistars traités. Coloration Azan modifié. **G. 1000.**



En outre, les vaisseaux sanguins qui apparaissent laissent passer les cellules inflammatoires périvasculaires dans l'image de droite (flèches jaunes)

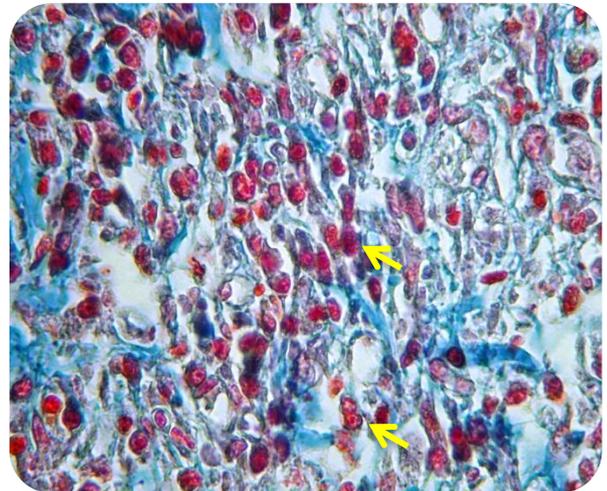
**Planche V :** Coupes histologiques du tissu conjonctif péri-implantaire des rats Wistars dont l'implant de titane est stérilisé à la propolis

**Figure 1 :** Coupe histologique du tissu conjonctif péri-implantaire des rats Wistars traités. Coloration Azan modifié. **G. 100.**



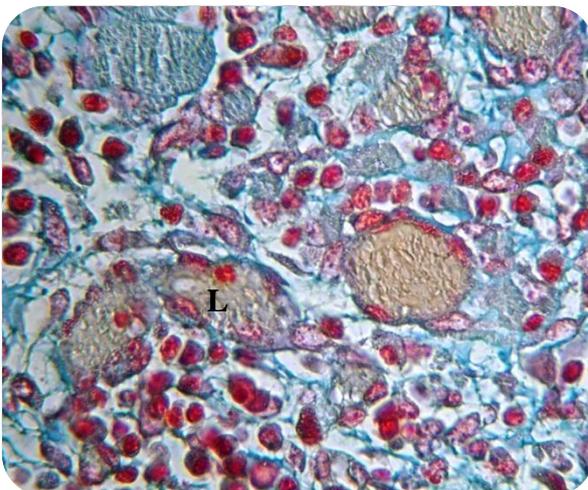
Nous avons signalé une augmentation dans l'épaisseur du TC péri vasculaire traité à la propolis. (\*) représente le coté d'implant

**Figure 2 :** Coupe histologique du tissu conjonctif péri-implantaire des rats Wistars traités. Coloration Azan modifié. **G. 1000.**



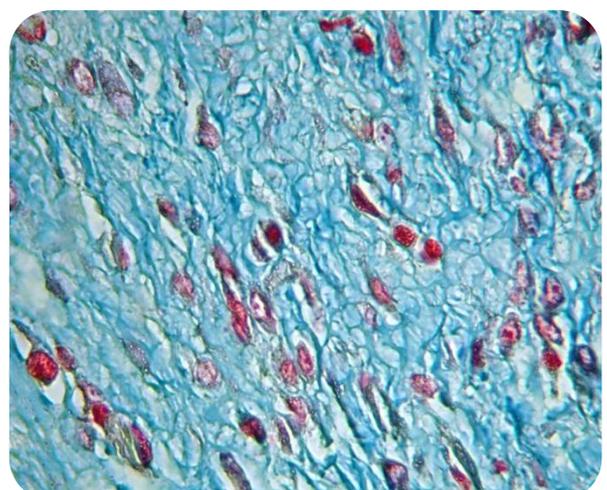
L'inflammation semble aussi diminuée avec un nombre moindre de ces cellules (flèches jaunes).

**Figure 3 :** Coupe histologique du tissu conjonctif péri-implantaire des rats Wistars traités. Coloration Azan modifié. **G. 1000.**



Cette coupe met en évidence la néo vascularisation avec des globules rouges (GB) présents dans la lumière du vaisseau (L). Le collagène interstitiel semble primé par rapport à l'inflammation.

**Figure 4 :** Coupe histologique du tissu conjonctif péri-implantaire des rats Wistars traités. Coloration Azan modifié. **G. 1000**



### I.3. Etude analytique :

#### I.3.1. Validation et contrôle du stérilisateur (alcoolat de propolis) :

##### a) Contrôle au moyen d'indicateurs physico-chimiques (Effet antioxydant) :

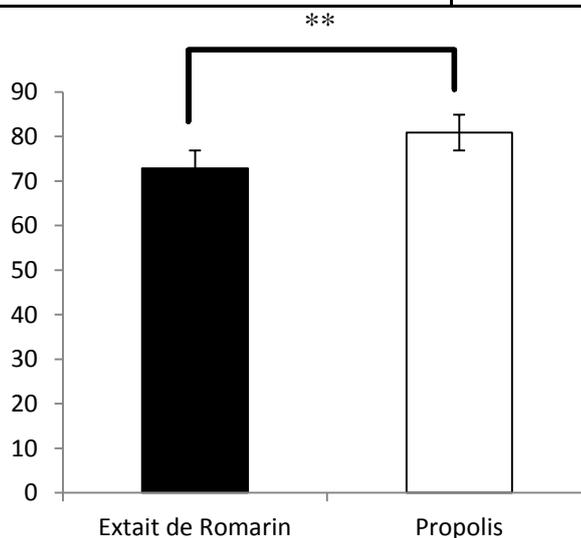
La méthode appliquée pour mesurer l'activité antioxydant est celle du piégeage des radicaux libres à l'aide du DPPH, l'inhibition obtenue est de  $80,87 \pm 0,31$  %.

**Tableau 6 :** Caractéristiques anti-oxydatives de la teinture de propolis.

Nombre d'essai	Absorbance de propolis	% inhibition du DPPH
1	0,30	80,76
2	0,29	81,22
3	0,30	80,63
<b>Moyenne</b>	0,30	<b>80,87</b>
<b>Ecart type</b>	0,00	0,31

Afin d'établir une comparaison démontrant cet énorme pouvoir anti-radicalaire de la propolis, un autre composé présumé antioxydant fut tester. Il s'agit d'extrait de Romarin (*Rosmarinus officinalis*) récupéré au niveau du laboratoire de biochimie et dont les essais étaient en cours.

	Pouvoir d'inhibition d'extrait de Romarin	Pouvoir d'inhibition de la Propolis
<b>Moyenne</b>	72,83	<b>80,87</b>
<b>Ecart type</b>	0,04	0,31



**Figure 25 :** Comparaison le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait de et la propolis.

Le test non paramétrique de Mann-Withney révèle bien cette grande capacité antioxydative de la teinture de propolis avec une p-value inférieure à 0,05.

**a) Contrôle au moyen d'indicateurs biologiques (Effet antibactérien) :**

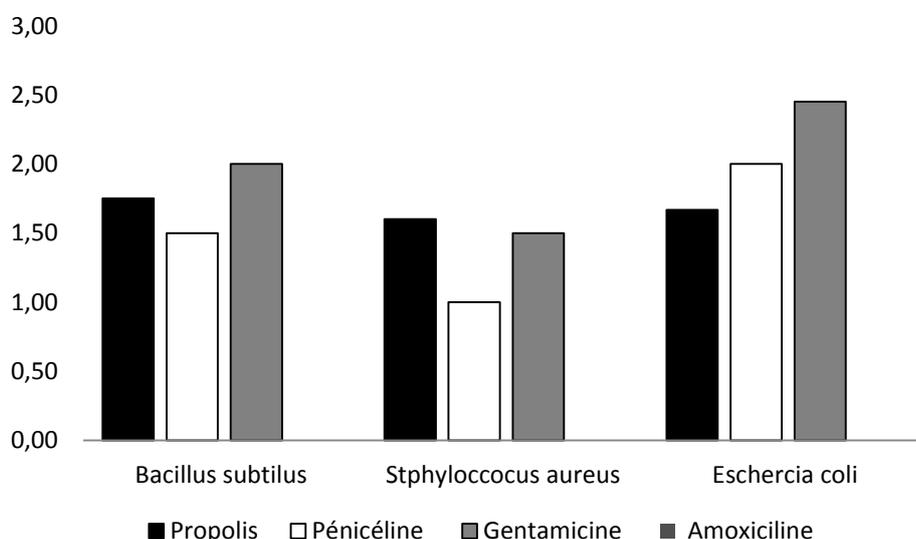
Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne de la propolis, nous avons testés trois souches bactériennes (*Bacillus subtilus*, *Escherchia coli*, *Staphylococcus aureus*) (tableau7). Pour mettre en évidence ce pouvoir antibactérien, une comparaison avec trois antibiotiques (pénicilline, Gentamicine, Amoxiciline) est faite in vitro.

Cette étude antibactérienne a été faite par la méthode de diffusion sur Muller Hinton où la mesure des zones d'inhibition les disques imbibés de l'alcoolat de propolis a permis de déterminer cette activité.

Le tableau suivant indique les résultats des tests antibactériens de la propolis sur les souches bactériennes étudiées :

**Tableau 7 :** Diamètre de zone d'inhibition en (cm) de propolis et certains antibiotiques.

	Diamètre de zone d'inhibition (cm)			
	Propolis	Pénicéline	Gentamicine	Amoxiciline
<b>Bacillus subtilus</b>	1,75 ± 0,18	1,50	2,00	pas de zone
<b>Staphylococcus aureus</b>	1,60 ± 0,30	1,00	1,50	pas de zone
<b>Escherichia coli</b>	1,67 ± 0,25	2,00	2,45	pas de zone



**Figure 26 :** Comparaison de pouvoir antibactérien de la propolis et d'autres antibiotiques chez trois espèces de bactéries.

Ces résultats montrent que le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre, il est plus important chez *Bacillus subtilus* (Gram+) et moindre chez les *Escherchia coli* (Gram-) et *Stphylococcus aureus* (Gram+). Chez *Bacillus subtilus* et *Stphylococcus aureus*,

ce pouvoir antibactérien est plus important que la pénicilline elle-même et presque égal à celui de la Gentamicine. Chez *Eschericia coli*, il l'est moins par rapport aux autres antibiotiques.

### I.3.2. Etude morpho-histologique :

Les coupes histologiques nous ont permis de faire des mesures les parametres suivants :

- ✓ Quantification du collagène dans les deux milieux de stérilisation (ce qui permet d'avoir une idée sur l'intégrité et adhérence de l'implant.
- ✓ Dénombrement des cellules inflammatoires (macrophage et cellules lymphocytaires). L'intérêt est d'apprécier la biocompatibilité de l'implant.
- ✓ L'effet corrosif est obtenu grâce à la mesure de l'épaisseur du tissu conjonctif des deux milieux.

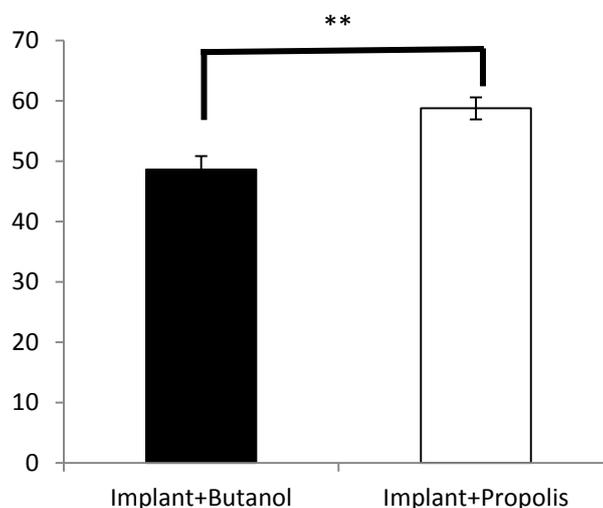
#### a) Quantification des collagènes interstitiels:

L'implant de titane est utilisé comme biomatériau, sa bonne intégration au tissu animal est synonyme de son efficacité. Nous tentons dans cette présente mesure de quantifier les collagènes générées par le tissu conjonctif péri-implantaire. La formation de ce dernier est le moyen de se défendre contre ce corps étranger. Le renforcement de ce tissu avec absence de réaction inflammatoires aigues est une preuve de sa bonne intégrité et adhérence. Pour ce faire, nous avons utilisé l'imageJ afin de mesurer le pourcentage de la surface occupée par les collagènes par apport à la surface totale du tissu conjonctif. Les résultats de cette étude sont renvoyés dans le tableau 8 et la figure 27.

**Tableau 8 :** Quantification des collagènes interstitiels du tissu conjonctif péri-implantaire chez les rats dont l'implant est stérilisé à la propolis et ceux au butanol.

		Surface de collagènes / surface globale (%)
<b>Implant + Butanol</b>	<b>Moyenne</b>	48,65
	Ecart type	11,91
	Min	32,01
	Max	71,70
<b>Implant + Propolis</b>	<b>Moyenne</b>	58,78
	Ecart type	9,90
	Min	46,52
	Max	77,43

Nos résultats montrent une augmentation de 10% de la surface occupée par les collagènes entre le mésenchyme conjonctif des animaux traités à la propolis et ceux au butanol ( $58,78 \pm 9,9\%$  VS  $48,65 \pm 11,91\%$ ).



**Figure 27 :** Quantification de l'intégrité de l'implant en titane stérilisé selon deux procédés (Butanol, Propolis).

Le test de Mann-Whitney indique qu'il y'a une différence très significative entre le pourcentage de collagène conjonctif péri-implantaire chez les rats dont l'implant était stérilisé à la propolis et celui qui a été stérilisé au butanol (0,001).

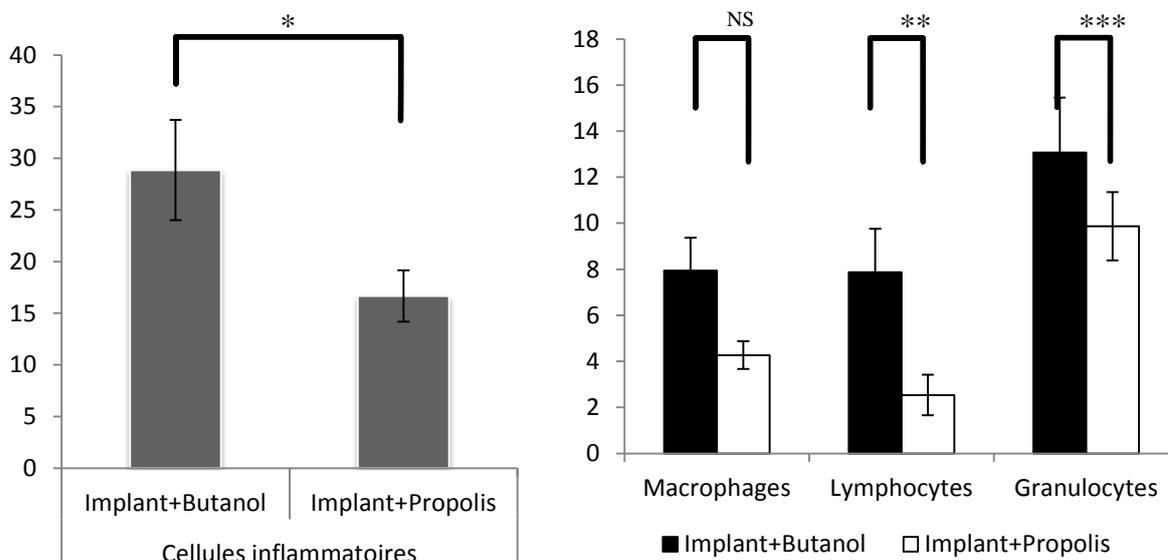
**b) dénombrement des cellules inflammatoires et néo-vascularisation :**

- Le dénombrement des cellules inflammatoires et des vaisseaux sanguins dans le tissu conjonctif péri-implantaire nous donne une idée sur le degré d'intégrité de l'implant. En effet, une bonne intégrité se manifeste par diminution de cellules inflammatoires, ces dernières ont comme origine les vaisseaux sanguins nouvellement formés, d'où l'intérêt de cette étape.

La quantification des majeures cellules responsables de l'inflammation et qui se trouvent dans une surface de  $1000 \times 1000 \mu\text{m}^2$ , indique que ce nombre est significativement réduit chez les rats dont les implants sont stérilisés à la propolis. Il est presque le double pour les macrophages et les granulocytes (1,86 et 1,32 fois respectivement) et plus que le triple pour les lymphocytes (3,11 fois).

**Tableau 9 :** Quantification des cellules inflammatoires (Nb/1mm<sup>2</sup>) au niveau du tissu conjonctif péri-implantaire selon le type de stérilisation.

Nombre de cellules inflammatoires dans une surface conjonctive de 1000 × 1000 μm <sup>2</sup>					
		Macrophages	Lymphocytes	Granulocytes	Total
<b>Implant + Butanol</b>	<b>Moyenne</b>	7,93	7,87	13,07	28,87
	SEM	1,43	1,89	2,38	4,85
<b>Implant + Propolis</b>	<b>Moyenne</b>	4,27	2,53	9,87	16,67
	SEM	0,60	0,88	1,48	2,50

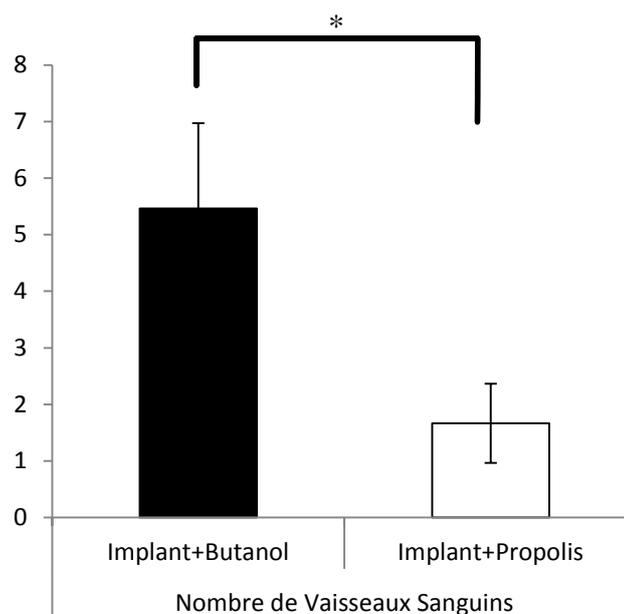


**Figure28 :** Quantification de la biocompatibilité de l'implant en mesurant les cellules inflammatoires (Nb/1mm<sup>2</sup>) au niveau du tissu conjonctif péri-implantaire selon le type de stérilisation.

- La quantification de la néo-vascularisation montre que la différence entre le tissu conjonctif développé autour des implants stérilisés à la propolis est peu significative par rapport à ceux du butanol.

**Tableau 10 :** Quantification de la néo-vascularisation (Nb de Vaisseaux/4mm<sup>2</sup>) au niveau du tissu conjonctif péri-implantaire selon le type de stérilisation.

Nombre de Vaisseaux sanguins dans une surface conjonctive de 4 mm <sup>2</sup>		
<b>Implant + Butanol</b>	<b>Moyenne</b>	5,47
	SEM	1,50
<b>Implant + Propolis</b>	<b>Moyenne</b>	1,67
	SEM	0,70



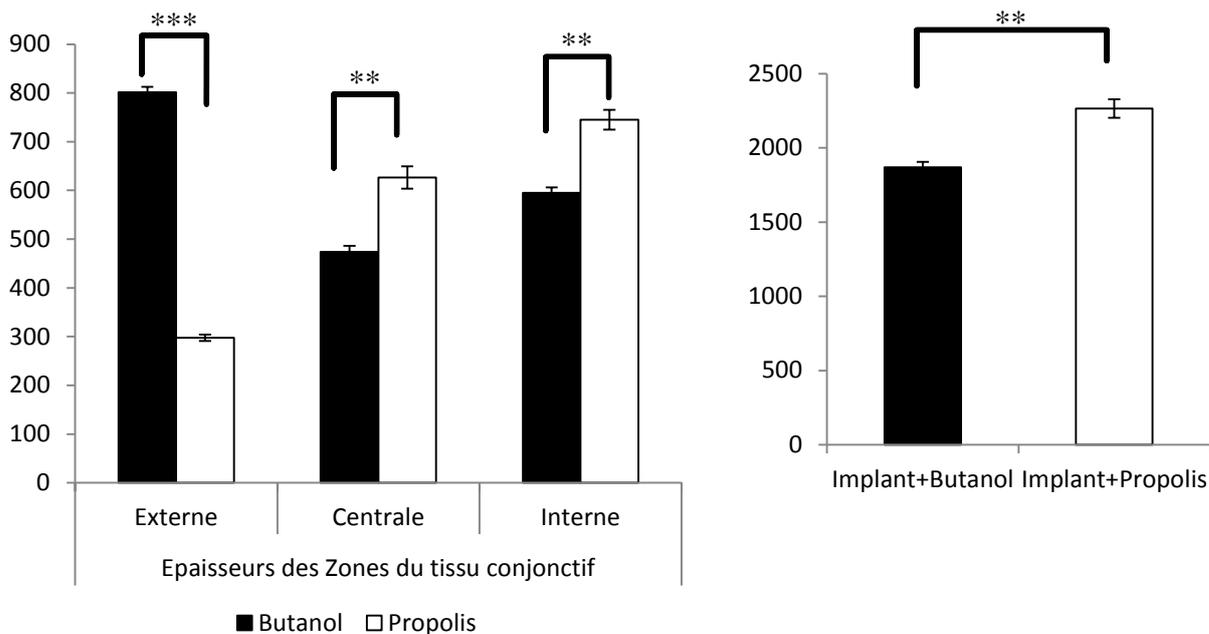
**Figure29 :** Quantification de la biocompatibilité de l’implant en mesurant la néo-vascularisation (Nb de Vaisseau/4 mm<sup>2</sup>) au niveau du tissu conjonctif péri-implantaire selon le type de stérilisation.

**c) Epaisseur du tissu conjonctif :**

Le tissu conjonctif est formé d’une alternance régulière de zones sombres et claires, dans notre cas on trouve que ce tissu lâche est formé de l’extérieur à l’intérieur, d’une zone corticale claire où les cellules inflammatoires prédominent, une zone centrale sombre à parité cellulaire, et une zone interne claire où les fibroblastes à sécrétion de collagène l’emportent.

**Tableau11 :** Epaisseur des zones conjonctives péri-implantaires selon le type de stérilisation

		Epaisseur des zones conjonctives (µm)			
		Externe	Centrale	Interne	Total
<b>Implant + Butanol</b>	<b>Moyenne</b>	801,25	473,66	594,91	1869,83
	SEM	11,25	12,92	11,35	35,52
<b>Implant + Propolis</b>	<b>Moyenne</b>	297,53	626,49	744,80	2263,88
	SEM	6,39	22,72	20,28	62,16



**Figure 30** : Quantification de l'effet anticorrosif de l'implantation suivant les deux procédés de stérilisation.

Les tests statistiques montrent que les épaisseurs conjonctives de toutes les zones diffèrent significativement selon le procédé de stérilisation. Celui de la stérilisation à la propolis diffère significativement de celui au butanol. Il faut citer que c'est la zone externe qui est adossée à l'implant de titane et la région interne au muscle abdominal.

---

# ***DISCUSSION***

---

Dans cette approche d'optimisation de l'intégration de l'implant en titane dans le milieu biologique, cette étude était faite, en utilisant la substance de propolis comme intermédiaire entre le biomatériau et l'organisme.

Dans nos premiers résultats, nous avons obtenus la formation d'un tissu conjonctif péri-implantaire enflammé, et cela, chez les rats dont les implants ont été stérilisés par les deux procédés (à la propolis et au butanol). Une telle inflammation est une manifestation ordinaire lors d'une riposte de l'organisme contre les corps étrangers ou injures, d'ailleurs le tissu conjonctif formé est de type cicatriciel : il est moins vascularisé, plus riche en fibres de collagène (85% contre 70%), et contient moins de fibroblastes (8% à 20%) (Abrahamsson *et al.*, 2007).

Ce type de tissu se forme en 3 phases ; la première est dite inflammatoire, elle initie la cicatrisation de la plaie par le biais de l'hémostase, de la coagulation, de l'augmentation de la perméabilité vasculaire pour les cellules spécialisées et du chimiotactisme. La libération de médiateurs inflammatoires et de facteurs de croissance active des granulocytes neutrophiles et des macrophages. Par la suite, les thrombocytes libèrent leur contenu dans la lésion. La coagulation et l'activation des thrombocytes limitent ainsi l'hémorragie. Les monocytes envahissent le site implantaire et se différencient en macrophages. En plus de la phagocytose des débris, les macrophages activés par les cytokines sécrètent à leur tour des cytokines stimulant l'angiogenèse, ainsi que les fibroblastes. La deuxième phase c'est la phase proliférative où il y'a la formation d'un tissu de granulation. Des fibroblastes mobiles, stimulés par des cytokines, migrent dans la lésion. Les fibroblastes sécrètent les composants de la matrice extracellulaire, à savoir principalement la fibrine, la fibronectine, les glycosaminoglycanes et le collagène. Trois jours après la mise en place de l'implant, des fibres de collagène sont visibles, et de nouveaux capillaires migrent depuis des veinules intactes jusque dans la plaie. La dernière phase c'est la Phase de remodelage, le remodelage de la matrice provisoire de tissu conjonctif aboutit à la formation d'une matrice mucopériostée. Le dépôt de collagène dans la plaie continue, ce qui change la composition de la matrice. Les FIR (Fibroblastic Integrin-Receptor) initient d'autres interactions entre les cellules et la matrice. Ce sont les cytokines qui régulent l'expression des récepteurs à l'intégrine. Il s'agit de la phase la plus importante de la cicatrisation, d'un point de vue clinique, car c'est à ce stade que la qualité du tissu régénéré est déterminée (Schultze-Mosgau *et al.*, 2005).

L'espace biologique péri-implantaire a aussi une fonction protectrice du tissu sous-jacent. Dans une étude chez le singe, la migration de leucocytes à travers l'épithélium de jonction, afin de lutter contre la plaque bactérienne, a été observée. Ceci permet de mettre en évidence les mécanismes de défense de l'espace biologique péri-implantaire (Linkevicius *et* Apse., 2008).

Les études histologiques qui portaient sur des patients suivant leur traitement orthodontique et chez lesquels des minivis d'ancrage ont été placés a révélé que les échantillons prélevés présentent des signes d'inflammation. Le tissu conjonctif contient des fibres de collagène avec un infiltrat inflammatoire qui constitue de structures vasculaires et des cellules inflammatoires en quantités différentes selon l'intensité de l'inflammation. Ces cellules inflammatoires sont représentées par des lymphocytes de granulocytes et d'autres (Zahar *et* Sultan., 2012).

Dans cette présente étude, nous avons trouvé que le nombre de cellules inflammatoires (macrophages, lymphocyte, granulocytes) est significativement réduit chez les rats dont les implants sont stérilisés à la propolis, ce qui implique l'effet anti-inflammatoire de la propolis.

Des résultats similaires ont montré que les solutions hydroalcooliques de propolis possèdent une activité anti-inflammatoire après une administration topique, injectable ou même orale (Marcucci., 1994).

En effet, les flavonoïdes jouent le rôle principal dans l'inflammation, ils inhibent la synthèse des prostaglandines, ainsi que la prolifération des lymphocytes B et T. Plusieurs flavonoïdes (cirsiol, hyalactine...) sont de puissants inhibiteurs de la 5-lipoxygénase et donc de la production des leucotriènes médiateurs de l'inflammation et des manifestations allergiques. D'autres flavonoïdes (lutéoline, apigénine, chrysin...) inhibent la cyclooxygénase et l'agrégation plaquettaire. Ces propriétés démontrées *in vitro*, pourraient expliquer en partie les activités anti-inflammatoires et antiallergiques (Bruneton., 1993).

Une augmentation de l'épaisseur du tissu conjonctif péri-implantaire avec un taux élevé de collagène étaient trouvés chez les animaux traités à la propolis et qui représentaient une bonne intégration des implants en titane ce qui reflétait une bonne cicatrisation.

Effectivement, Les vertus cicatrisantes de la propolis sont connues depuis l'antiquité. Utilisé au cours des âges la propolis a démontré qu'elle possède un effet stimulant sur le

métabolisme cellulaire épidermique, Vaisseaux, la formation de collagène grâce à un phénomène de Stimulation fibroblastiques (Almas., 2001).

En effet, la propolis accélère la régénération de différents tissus (Bankova., 2000). Ce sont les flavonoïdes qui sont, en partie, responsables de leurs bienfaits réparateurs. En effet, grâce à leurs propriétés antioxydantes, ils vont tendre un piège aux radicaux libres, responsables d'un stress oxydatif, qui endommage les cellules. La propolis joue également un rôle important au niveau de la stimulation métabolique cellulaire, circulatoire et sur la synthèse des fibres de collagène pour un renouvellement plus rapide des tissus et une meilleure élasticité (Krell., 1996).

La néo-vascularisation mesurée dans cette étude est moins importante dans le tissu conjonctif développé autour des implants stérilisés à la propolis par rapport à ceux du butanol. Apparemment, la propolis réduit l'angiogenèse in vitro et in vivo via une limitation de la néo-vascularisation, une inhibition de la prolifération et de la migration cellulaires (Ahn *et al.*, 2009).

La propolis et son constituant CAPE (un antioxydant phénolique) supprimaient l'angiogenèse induite par le VEGF (vascular endothelial growth factor : Le facteur de croissance endothéliale vasculaire). Le CAPE empêcherait l'expression du VEGF (Izuta *et al.*, 2009).

Afin de valider les caractéristiques antioxydantes et antibactériennes de la propolis, une étude complémentaire était effectuée in vitro. Nos résultats ont montré que la propolis a une grande capacité anti-oxydative. L'inhibition du DPPH obtenue est de  $80,87 \pm 0,31$  %.

Toutes les études qui ont été faites dans ce volet ont montré que la propolis a une activité antioxydant qu'est positivement corrélée avec son contenu en polyphénol (Gregoris *et al.*, 2010).

La propolis est remarquable pour ses propriétés antioxydants et qui est plus active que le reste des produits de la ruche en ce qui concerne cette propriété (Volpi *et Bergonzini.*, 2006). C'est une substance constituée de nombreux composés antioxydants : vitamine E et vitamine C et des polyphénols (Ahn *et al.*, 2004).

Nos résultats révèlent aussi l'important effet antibactérien chez *Bacillus subtilus* (Gram+) et qui est moins chez les *Escherichia coli* (Gram-) et *Staphylococcus aureus* (Gram+).

C'est vers les années 1950 qu'ont été découvertes les propriétés antibactériennes de la propolis. De là, découle une multitude de tests qui permettent la mise en évidence des souches sensibles à la propolis. Les essais montrent que les différentes propolis ont un spectre antibactérien très large, avec une forte activité sur les GRAM positif, tels que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Paenibacillus alvei*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* ou encore sur les GRAM négatifs comme les salmonelles, *protéus mirabilis* ou *Helicobacter pylori*, responsable d'ulcère gastroduodéal. En revanche, on note une faible activité de la propolis sur *E. Coli* et les *Pseudomonas* (Ghedira., 2009).

D'après une étude menée au japon, la propolis inhibe la division cellulaire des bactéries et agit au niveau de la paroi bactérienne en la détruisant. La propolis doit ses propriétés antibactériennes à sa composition, avec entre autre, des flavonoïdes (pinocembrine, galangine), des molécules aromatiques et phénoliques (acide cinnamique, acide caféique, acide férulique). La galangine serait un des composés les plus importants, car elle aurait une action anti staphylococcique (Cushnie., 2007).

Les structures chimiques de certains constituants représentatifs de la propolis ont permis de mettre en évidence un certain nombre de constituants ayant des structures moléculaires ressemblant à celles des inhibiteurs de corrosion conventionnels (Vrsalo *et al.*, 2018). Des études récentes ont montré que l'extrait de propolis inhibe la corrosion des aciers et de l'aluminium en solutions aqueuses (Fouda., 2013 ; Huang *et al.*, 2014 ; Dolabella *et al.*, 2016).

---

***CONCLUSION  
ET PERSPECTIVES***

---

Dans la présente étude, une tentative de confortement du taux d'acceptation des implants en titane par un organisme vivant a été testée. Le confortement consistait à stériliser les implants avec de la teinture de propolis avant l'implantation. Nos résultats montraient la formation d'un tissu conjonctif péri-implantaire enflammé, et cela, chez les rats dont les implants ont été stérilisés par deux procédés (à la propolis et au butanol). Dans l'environnement à propolis, ce tissu dit cicatriciel est moins vascularisé, plus riche en fibres de collagène (60 %) et contient moins de cellules inflammatoires si nous le comparant avec celui généré à partir du butanol.

L'augmentation du pourcentage de collagène dans le tissu péri-implantaire renforce l'intégrité et l'adhérence de l'implant de titane. Cette biocompatibilité est encore meilleure, quand on sait que l'inflammation diminue par la diminution des cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes et granulocytes), et cela lorsque nous utilisons la propolis comme stérilisant. Nous supposons aussi que la corrosion de l'implant sera ralentie, car l'épaisseur du tissu conjonctif qui l'entoure est trouvée plus importante chez les implants dont la stérilisation est faite par la propolis.

Afin de valider les caractéristiques antioxydante et antibactérienne de la propolis, une étude complémentaire était effectuée *in vitro*. Nos résultats ont montré que la propolis a une grande capacité anti-oxydative. L'inhibition du DPPH obtenue est de  $80,87 \pm 0,31$  %. Cette même propolis révèle aussi d'important effet antibactérien chez *Bacillus subtilis* (Gram+). Cet effet est moindre chez *Escherichia coli* (Gram-) et *Staphylococcus aureus* (Gram+).

A l'insu de tous ces résultats, nous pouvons dire que l'objectif fixé au départ est atteint, avec une amélioration de l'acceptation de l'implant en titane par un prétraitement à la propolis.

Nous envisageons, enfin, quelques perspectives qui nous semblent nécessaires pour une meilleure compréhension du sujet. Donc ce travail mériterait d'être complété par :

- ✓ Tester les différentes dilutions de la teinture de propolis dans la stérilisation.
- ✓ Observer l'effet d'une propolis à différentes origines (Espèce d'abeilles, Espèce florale).
- ✓ Impliquer la propolis dans les procédés de traitement de surface des implants de titane.

---

# REFERENCES

---

## A

**Aggoune M; Chalumeau M-T; Duval H; Lamory J. (2000).** *la désinfection des surfaces des locaux ed. pratiques* (Vol. 41). Paris Nord: centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales de l'interégion.

**Adigue S (2001)** .Etude comparative des effets de la radiostérilisation et de la stérilisation par échange plasma .Faculté de pharmacie de Chatnery Malaby. Université Paris .

**Ahn, M.-R., Kunimasa, K., Kumazawa, S., Nakayama, T., Kaji, K., Uto, Y., ... Ohta, T. (2009).** Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(5), 643–651.

**Ahn Mr, Kumazawa S , Hamasaka Tet coll. (2004).** Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J agric food chem* ;52 (24) : 7286-7292.

**Ahn, M. R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K. S., & Nakayama, T. (2004).** Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), 329–339p.

**Alian, A. (2016).** angioplasties-stents. *Médecine Vasculaire*, 1p.

## B

**Bankova V; Castrosi D; Marcucci MC. (2000).** propolis : recent advance in chemistry and plant origin . *Apidologie*.

**Bearinger, J. P., Orme, C. A., & Gilbert, J. L. (2001).** Direct observation of hydration of TiO<sub>2</sub> on Ti using electrochemical AFM: Freely corroding versus potentiostatically held. *Surface Science*, 491(3), 381–383p.

Bruneton, J (1993). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Techniques et documentation. Edition : Lavoisier (2<sup>ème</sup> édition) Paris.

**Berglundh, T., Abrahamsson, I., Welander, M., Lang, N. P., & Lindhe, J. (2007).** Morphogenesis of the peri-implant mucosa: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*, 18(1), 1-8.

**Boukraâ, L., Abdellah, F., & Ait-Abderrahim, L. (2013).** Antimicrobial Properties of Bee Products and Medicinal Plants. *Formatex*, (Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education), 960–961p.

**Bozic, K. J., Saleh, K. J., Rosenberg, A. G., & Rubash, H. E. (2004).** Economic Evaluation in Total Hip Arthroplasty: Analysis and Review of the Literature. *Journal of Arthroplasty*, 19(2), 180–189.

**Brunette, D. M., Tengvall, P., Textor, M., & T. (2001).** Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications (engineering materials), 25–737p.

## C

**Cardinault, N., Cayeux, M., & Sert, P. P. (2014).** La propolis : origine, composition et propriétés. *Springer*, (October 2012).

**Corti, R., & Biaggi, P. (2014).** Le remplacement valvulaire aortique moderne : approche mini-invasive ou « TAVI ». *Forum Med Suisse*, 14(38), 704p. 20

Cushnie TP, Hamilton VE, Chapman DG, Taylor PW, Lamb AJ.( 2007).

**Aggregation of Staphylococcus aureus following treatment with the antibacterial flavonol galangin.** *Journal of Applied microbiology*. p1562.

## D

**D.Mayaux. (2006).** *Recommandation en matière de stérilisation.* ( de la sécurité de la chaîne alimentaire et de l'environnement . Service publique Fédéral de la Santé publique, Ed.).

**Dahian A; Almas k. (2001).** A comparative study of propolis and saline application on human dentin. *Indian Journal Dent Res.*

**Dolabella, L. M. P., Oliveira, J. G., Lins, V., Matencio, T., & Vasconcelos, W. L. (2016).** Ethanol extract of propolis as a protective coating for mild steel in chloride media. *Journal of Coatings Technology and Research*, 13(3), 534p.

## F

**Fadl-allah, S. A., Quahtany, M., & El-Shenawy, N. S. (2013).** Surface Modification of Titanium Plate with Anodic Oxidation and Its Application in Bone Growth. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4(1), 74–75p.

**Fouda, A. S., and A. H. B. (2013).** Aqueous extract of propolis as corrosion inhibitor for carbon steel in aqueous solutions. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 7(10), 350.

**Frank Feyerabend, Janine Fischer, Jakob Holtz, Frank Witte, Regine Willumeit, Heiko Drücker, Carla Vogt, N. H. (2005).** Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines. *Acta Biomaterialia*, 6(5), 1834–1842p.

## G

**Ghedira, K., & Le Jeune, R. (2010).** Huile de nigelle cultivée, *Nigella sativa* L.(Ranunculaceae). *Phytothérapie*, 8(2), 125p.

**Gordin, D. M., Gloriant, T., Chane-Pane, V., Busardo, D., Mitran, V., Höche, D., ... Cimpean, A. (2012).** Surface characterization and biocompatibility of titanium alloys implanted with nitrogen by Hardion+ technology. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(12), 2953–2966.

**Gouasmi, S., Megueni, A., Benzaama, H., Mécanique, D. G., Polytechnique, E. N., Audin, M., ... Algérie, O. (2017).** Analyse numérique du comportement biomécanique des implants dentaires. *S2-Biomécanique*, 1–2p.

**Goulet D , Valence B, D. C. (2003).** *la stérilisation des dispositifs médicaux à l'hôpital .* (anciennement SeRes, Ed.) (HEALTH .CO).

**Guidoin, M. F., & Guidoin, R. G. (2004).** Sélection des matériaux pour la conception et le développement du boîtier d'un cœur artificiel total implantable: Supériorité du titane et de ses alliages. *Itbm-Rbm*, 25(3), 127p.

**Guignot, C. (2000).** irradiation de polyuréthanes par électrons accélérés: évolution moléculaire et supra moléculaire , incidence sur les extraectibles et implication biomédicale(Thèse de doctorat ; faculté de pharmacie de Châtenary.Malabry).

Ghedira K., Goetz P. April (2009), Lejeune R. **Propolis.** *Phytothérapie Springer*, Volume 7, p 100-105 .

**Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK (2009)** Ti-based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review. *Prog Mater Sci.*;54:397–425 .

**Gregoris E et Stevanato R , (2010)** Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of venetian propolis. *Food chem toxicol* 2010;76-82.

## H

**Hamani, H., Belarbi, A., & Mansouri, B. (2016).** etude d'un modele biomecanique du manteau adhesif chirurgical de la prothese de hanche par la methode des elements finis pour les differents mouvements quotidiens. *Sciences & Technologie B*, 44(Décembre), 28–29p.

**Henry, K. (2014).** The Propolis Book. *Bee Product Sciences*, (February), 1–3 p.

Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F. L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610.

## I

**Izuta, H., Shimazawa, M., Tsuruma, K., Araki, Y., Mishima, S., & Hara, H. (2009).** Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9, 1–10.

## J

**Jacques, B. (2014).** Le cœur artificiel autonome total biocompatible CARMAT®: une innovation technologique exemplaire? *Revue de Métaphysique et de Morale*, 314p.

## K

**Khan, W., Muntimadugu, E., Jaffe, M., & Domb, A. J. (2014).** Implantable Medical Devices. *Springer*, 47 p.

**Kumazawa, S., Goto, H., Hamasaka, T., Fukumoto, S., Fujimoto, T., & Nakayama, T. (2004).** A New Prenylated Flavonoid from Propolis Collected in Okinawa, Japan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(1), 260–262.

**Krell, R. (1996).** *Value-added products from beekeeping* (No. 124). Food & Agriculture Org.

## L

**Ladislav Vrsalović Maja Kliškić Jagoda Radošević Senka Gudić. (2005).** The effect of electrolyte flow rate and temperature on corrosion and protection of Al–2.5 Mg alloy by (+)-catechin. *Electrochemistry*, 35, 1059p.

**Letourneur, D., & Bordenave, L. (2017).** Ingénierie tissulaire. *Medecine/Sciences*, 33(1), 48p.

**Linkevicius, T., & Apse, P. (2008).** Biologic width around implants. An evidence-based review. *Stomatologija*, 10(1), 27–35.

**Liu, X., Chu, P. K., & Ding, C. (2004).** Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering R: Reports*, 47(3–4), 51–60p.

## M

**Marcucci, M. C. (1994).** Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(1), 83–99. Mei, S., Wang, H., Wang, W., Tong, L., **Pan, H., Ruan, C., ... Chu, P. K. (2014).** Antibacterial effects and biocompatibility of titanium surfaces with graded silver incorporation in titania nanotubes. *Biomaterials*, 35(14), 4255–4265p.

**Mulligan, T. F. (1983).** Du bon usage de la mécanique en orthodontie. *Revue*

d'orthopédie dento-faciale, 17(2), 227-241. *Revue D'orthopédie Dento-Faciale*, 17(2), 227-241p.

## N

**Njoku, D. I., Ukaga, I., Ikenna, O. B., Oguzie, E. E., Oguzie, K. L., & Ibisi, N. (2016).** Natural products for materials protection: Corrosion protection of aluminium in hydrochloric acid by Kola nitida extract. *Journal of Molecular Liquids*, 219, 417p.

**Novaes Jr, A. B., Souza, S. L., de Oliveira, P. T., & Souza, A. M. (2002).** No Title Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 377-388p.

## P

**Peltola, T., Pätsi, M., Rahiala, H., Kangasniemi, I., & Yli-Urpo, A. (1998).** No Title Calcium phosphate induction by sol-gel-derived titania coatings on titanium substrates in vitro. *Journal Biomedical Materials*, 41, 504p.

**Pohler, O. E. M. (2000).** Unalloyed titanium for implants in bone surgery. *Injury*, 31(SUPPL. 4).

## R

**Raguin, T., Dupret-Bories, A., & Debry, C. (2017).** Les organes artificiels. *Medecine/Sciences*, 33(1), 70p.

**Ramauskien, K. (2009).** NATURAL DRUGS ANALYSIS OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PROPOLIS AND LYSOZYME IN SEMISOLID EMULSION SYSTEMS, 66(6), 681-688.

**Ramos, & Miranda. (2007).** Propolis: a Review of Its Anti-Inflammatory and Healing Actions. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* V, 13(4), 697-710.

**Rota C ., Carraminaana J.J ., Burillo J ., Herrera A . (2004).** In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 67 : p 1252- 1256.

**Boyer, R (1996).** Materials Science and Engineering a, Vol 213, 1-2, , p. 103 .

## S

**Samuneva, B., Kozhukharov, V., Trapalis, C., & Kranold, R. (1993).** Sol-gel processing of titanium-containing thin coatings - Part I Preparation and structure. *Journal of Materials Science*, 28(9), 2353p.

**Sauvager, F. (2018).** La propolis de la récolte à l'utilisation. *Syndicat d'Apiculture Du Rhône*.

**Schultze-Mosgau, S., Blatz, M. B., Wehrhan, F., Schlegel, K. A., Thorwart, M., & Holst, S. (2005).** Principles and mechanisms of peri-implant soft tissue healing. *Quintessence International (Berlin, Germany : 1985)*, 36(10), 759-769.

**Sul, Y. T., Johansson, C. B., Jeong, Y., & Albrektsson, T. (2001).** The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. *Medical Engineering and Physics*, 23(5), 329-346p.

## V

**Volpi, N., & Bergonzini, G. (2006).** Analysis of flavonoids from propolis by on-line

HPLC-electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42(3), 354–361.

Vrsalo, L., Gudić, S., Gracić, D., Smoljko, I., Ivanić, I., & Kliškić, M. (2018). Corrosion Protection of Copper in Sodium Chloride Solution using Propolis, *13*, 2103p.

y

Yuen, W. Y. (2010). Theoretical risk assessment of magnesium alloys as degradable biomedical implants. *Acta Biomaterialia*, 6(5), 1808–1812.

z

Zahar, A., & Sultan, M. (2012). Anchorage miniscrews : A histologic study of peri-implant soft tissue, 85–95.

---

# ANNEXES

---

---

## *Annexe 01*

### *Fixation : Bouin aqueux*

#### **Composition de Bouin aqueux**

- ❖ Solution aqueuse saturée de l'acide picrique..... 30ml.
- ❖ Formol commercial..... 10ml.
- ❖ Acide acétique .....02ml.

**Fixer 48 heures, puis laver dans l'eau courante pendant 24 heures.**

---

## *Annexe 02*

### *Préparation des dilutions d'alcools éthyliques*

- ❖ **Alcool 50°**: 100 ml d'alcool absolu (éthanol C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) + 107,44 ml d'eau distillée.
- ❖ **Alcool 70°**: 100 ml d'alcool absolu (éthanol C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) + 47,75 ml d'eau distillée.
- ❖ **Alcool 80°**: 100 ml d'alcool absolu (éthanol C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) + 28,59 ml d'eau distillée.
- ❖ **Alcool 90°**: 100 ml d'alcool absolu (éthanol C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) + 13,25 ml d'eau distillée.
- ❖ **Alcool 95°** : 100 ml d'alcool absolu (éthanol C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) + 6,5 ml d'eau distillée.

---

## *Annexe 03*

### *Préparation du liquide d'étalement, l'eau gélatinée (0,4 %)*

La préparation se fait à chaud par la mélange de :

- ❖ Gélatine..... 0.4g.
- ❖ Eau distillée .....100ml.

---

## *Annexe 04*

### *Coloration au trichrome de Masson*

#### **Réactifs**

1. Hématoxyline de Harris.
2. Fuchsine Ponceau
3. Alcool chlorhydrique.
4. Vert lumière ou Bleu d'aniline.
5. Acide phosphotungstique

6. Solution aqueuse à 1% d'acide acétique

### Préparation des réactifs :

**1. Hématoxyline de Harris** (solution préparée) : filtré avant utilisation.

**2. Fuchsine de Ponceau** : Préparer à froid.

- ❖ Fuchsine acide..... 0,1g.
- ❖ Ponceau .....0,2g.
- ❖ Eau distillée .....300ml.

Après dissolution, on ajoute :

- ❖ Acide acétique.....0,6ml.

**3. Alcool chlorhydrique :**

- ❖ Acide chlorhydrique 37% .....0.75ml.
- ❖ Alcool 70% .....100ml.

**4. Bleu d'aniline**

### Solution mère

- ❖ Bleu d'aniline.....(0.5g).
- ❖ L'eau distillée.....(100ml).

Porter à l'ébullition, laisser refroidir et filtrer.

### Solution de travail

- ❖ Solution mère..... (1vol).
- ❖ L'eau distillée.....(2vol).

**5. Acide phosphotungstique 3% :**

- ❖ Acide phosphotungstique .....3g.
- ❖ Eau distillée.....100ml.

**6. Eau acétifiée 1% :**

- ❖ Acide acétique..... 10 ml.
- ❖ Eau distillée.....99ml.

### Mode opératoire

- ❖ Déparaffinage dans deux bains de xylène.

xylène I..... 15min.

xylène 2 II.....15min.

- ❖ Hydratation dans les alcools (100°, 90°,70°).

Alcool 100°.....2min.

Alcool 90°.....	2min.
Alcool 70°.....	2min.
❖ Rincer à l'eau distillée.....	10min.
❖ Coloration avec l'Héματοxyline de Harris.....	12min.
❖ Rincer sous l'eau de robinet (1 ou 2 rinçages).	
❖ Laver à l'alcool chlorhydrique (2 secondes; quelques mouvements).	
❖ Différencier à l'eau courante .....	5 à 10min.
❖ Coloration avec la fuchsine ponceau.....	1min.
❖ Rincer à l'eau distillée.....	quelques secondes.
❖ Différencier dans l'acide phosphotungstique 3%.....	7min.
❖ Rincer (un peu) dans l'eau distillée.	
❖ Rinçage à deux bains de l'eau acétique.....	quelques secondes.
❖ Coloration avec le Blue d'aniline.....	4min.
❖ Rinçage à l'eau distillée (ou à l'eau acétique 1%).....	2min.
❖ Déshydratation (70°, 90°, 100°).	
Alcool 70°.....	2min.
Alcool 90°.....	2min.
Alcool 100°.....	2min.
❖ Mettre la lame dans le xylène.	
xylène I.....	2min.
xylène II.....	2min.
❖ Montage avec l'eukitt et Observation au microscope photonique.	

### Résultats :

Les noyaux sont colorés en bleu-violet plus ou moins foncé, et le cytoplasme en rose à rouge. Les hématies et kératines en rouge vifs. Les fibres de collagènes en bleu.

---

## *Annexe 05*

### *Coloration à l'Azan modifiée*

#### Réactifs

- ❖ rouge nucléaire
- ❖ Blue d'aniline

❖ Orangé G

**Mode opératoire**

- ❖ Déparaffinage dans deux bains de cyclohexane.

Cyclohexane I.....15min.

Cyclohexane II.....15min.

- ❖ Hydratation dans les alcools (100°, 90°,70°).

Alcool 96°.....2min.

Alcool 70°.....2min.

Alcool 50°.....2min.

- ❖ Rinçage à l'eau distillé.

- ❖ Coloration au Rouge Nucléaire. ....15min.

- ❖ Rinçage à l'eau courant.

- ❖ Coloration au Orangé G .....7min.

- ❖ Rinçage à l'eau courant.

- ❖ Coloration au Bleu d'aniline .....3min.

- ❖ Rinçage à l'eau distillé.

- ❖ Mettre dans un bain d'alcool 96°.....1min.

- ❖ Mettre dans deux bain de cyclohexane.

Cyclohexane III.....1min.

Cyclohexane III.....2min.

- ❖ Montage lame/lamelle avec l'Eukitt.

- ❖ Observation au microscope photonique.

**Résultats**

Cette coloration permet de colorer en bleu violet ou brun les noyaux de cellules, en rose les cytoplasmes et en vert ou bleu le collagène.

## Annexe 06

### Pourcentage de collagène chez les rats implantés à la propolis

Colonne1	surface	moyenne	Min	Max	%
1	2377170	49.239	-63.272	82.235	59.650
2	2025032	53.534	-77.297	82.235	67.911
3	1763460	46.533	-74.583	83.066	62.426
4	2532777	29.823	-66.740	82.235	64.488
5	1332760	41.811	-67.556	83.960	51.910
6	3102246	45.131	-71.976	91.090	59.187
7	2371161	37.347	-66.153	82.235	50.687
8	1624185	19.929	-67.441	82.235	60.143
9	2094508	26.357	-86.947	101.238	46.522
10	2123330	36.137	-74.175	84.803	51.469
11	2371161	27.043	-63.008	82.235	45.059
12	1624185	28.611	-51.502	82.235	50.800
13	1982931	52.807	-75.349	89.176	70.115
14	2123330	52.748	-58.680	84.803	67.292
15	1699731	35.214	-74.891	87.151	49.822
16	2285880	48.787	-69.742	97.116	64.261
17	1795850	54.334	-74.325	82.235	72.662
18	2115742	62.219	-70.283	82.235	77.427
19	1704471	49.587	-74.905	82.235	65.958
20	2619264	33.951	-82.636	82.235	48.803
21	2223143	46.192	-79.525	82.235	62.518
22	2223143	46.192	-79.525	82.235	62.518
23	1871999	34.098	-69.556	82.235	51.186
24	1934804	43.534	-81.061	82.235	58.461
25	2256561	39.448	-58.833	82.235	59.166
26	3723408	26.316	-78.237	82.235	57.472
27	3722760	17.066	-61.884	108.545	33.101
28	1317999	12.361	-55.243	82.235	76.689
29	2614183	26.521	-60.678	99.641	63.706
30	1509352	37.769	-69.782	83.818	51.910

## Annexe 07

### Pourcentage de collagène chez les rats implantés au butanol

Colonne1	surface	moyenne	Min	Max	%
1	1152158	26.983	-55.826	82.235	39.825
2	1228400	21.306	-86.042	89.645	38.859
3	2459812	51.141	-66.787	82.235	67.612
4	1212640	25.096	-82.002	82.235	41.896
5	1573928	34.521	-75.253	82.235	51.283
6	996840	44.794	-60.372	82.235	61.672
7	557280	43.896	-70.702	82.235	62.880
8	1852984	18.975	-78.028	108.517	36.506
9	1809950	26.446	-64.626	82.235	41.948
10	3294068	27.487	-61.027	84.207	55.324
11	1674781	27.350	-96.694	93.191	50.989
12	1516998	45.208	-90.818	82.235	65.831
13	4254000	32.193	-79.683	109.444	47.862
14	3164102	18.982	-90.204	85.863	41.612
15	3519652	27.337	-59.329	82.999	38.856
16	1502121	6.450	-80.013	82.235	24.491
17	1633200	18.289	-81.751	82.235	38.146
18	1718105	50.581	-73.899	82.235	68.390
19	2063712	36.700	-74.469	87.764	54.435
20	1862475	53.213	-77.183	82.235	71.709
21	1740145	27.409	-63.369	82.235	38.984
22	2331266	30.607	-90.380	82.235	54.040
23	1822008	30.732	-73.263	82.235	46.712
24	2229223	48.032	-61.546	82.235	65.061
25	1532520	28.464	-79.029	82.235	46.916
26	1408280	24.497	-79.724	91.175	40.481
27	3130902	13.888	-72.617	82.235	41.173
28	1569950	12.768	-93.311	82.235	32.013
29	1451742	38.245	-72.184	102.891	49.872
30	1795830	27.710	-77.501	104.453	44.124

---

## *Annexe 08*

*Dénombrement des cellules inflammatoire chez les rats  
implantés au butanol*

Colonne1	macrophage	lymphocyte	granulocyte
1	10	6	20
2	6	4	8
3	5	2	13
4	5	3	19
5	3	1	7
6	1	1	4
7	1	0	5
8	4	2	6
9	5	2	4
10	6	13	14
11	5	1	5
12	4	1	12
13	3	0	8
14	4	1	17
15	2	1	6

---

## *Annexe 09*

*Dénombrement des cellules inflammatoire chez les rats implantés à la propolis*

Colonne1	macrophage	lymphocyte	granulocyte
1	10	6	20
2	6	4	8
3	5	2	13
4	5	3	19
5	3	1	7
6	1	1	4
7	1	0	5
8	4	2	6
9	5	2	4
10	6	13	14
11	5	1	5
12	4	1	12
13	3	0	8
14	4	1	17
15	2	1	6

---

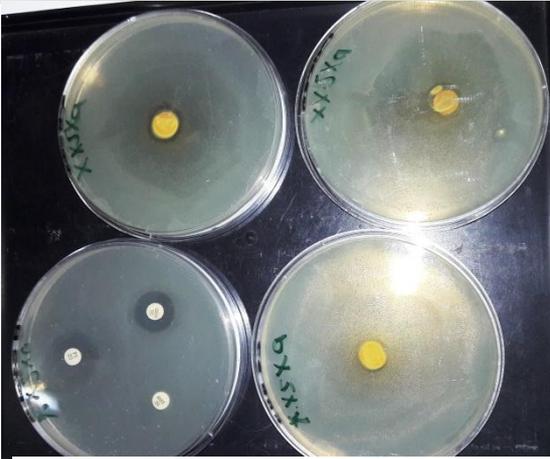
## *Annexe 10*

### *Dénombrement de la néo-vascularisation chez les rats implantés*

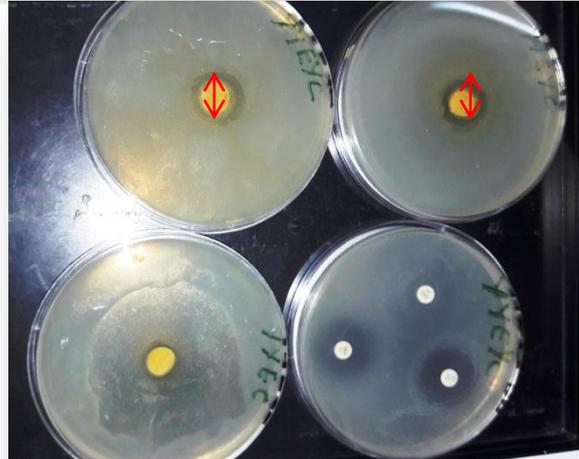
Colonne1	Vs butanol	Vs propolis
1	0	0
2	12	0
3	10	8
4	0	5
5	6	4
6	14	0
7	9	0
8	13	0
9	0	4
10	8	0
11	10	4
12	0	0
13	0	0
14	0	0
15	0	0

## Annexe 11

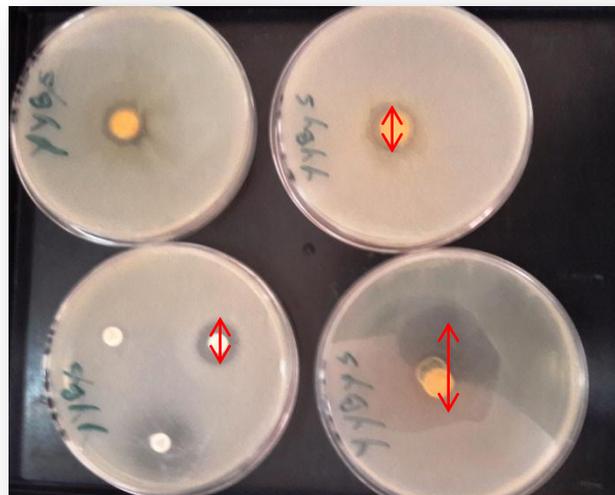
### Effet antibactérien de la propolis



*Staphylococcus aureus.*



*E. coli*



*Bacillus subtilis*

