



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologies

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique
Option : Biotechnologie et Pathologies Moléculaires

Thème

**Activités pharmacologiques (antimicrobienne
et anti-inflammatoire) d'une huile essentielle
distillée d'une plante à parfum *in vitro*, *in
vivo* et *in silico***

Présenté par

MENAOUINE Hala & LARIBI Madina Leila

Devant le Jury composé de =

Mme MAKHLOUF C.	Maître de Conférences	Univ. Blida 1	Présidente
Mme LOUNACI S.	Maître de Conférences	Univ. Blida 1	Examinatrice
M. BOKATEM M.	Professeur	Univ. Blida 1	Promoteur
M. BAHA A.	Médecin spécialiste - Maître assistant	CHU Béni Messous, Alger	Copromoteur

Session 2021-2022

REMERCIEMENTS

Ce mémoire n'aurait pas pu être ce qu'il est, sans l'aide d'ALLAH source de toute connaissance qui nous a donné la force afin de l'accomplir.

Nous remercions vivement les membres de ce respectable jury :

- Monsieur BOKATEM (Professeur à l'Université Blida 1) de nous avoir encadré et orienté, ainsi que pour tous ses conseils et recommandations.
- Monsieur BAHA (Médecin spécialiste en anatomie pathologique au CHU Beni Messous d'Alger) : Nous tenons à vous remercier chaleureusement et vivement pour nous avoir accepté dans votre laboratoire et guider, en tant que co-promoteur, tous au long de notre stage avec toute l'équipe du laboratoire, ainsi que pour la bonne humeur et sympathie qu'il a présenté à notre égard tout au long de la période de stage
- Madame MAKHLOUF (Maître de Conférences à l'Université Blida 1): nous sommes très honorées que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.
- Madame LOUNACI (Maître de Conférences à l'Université Blida 1): Vous nous avez honoré d'avoir examiné notre mémoire de fin d'études ; nous vous sommes très reconnaissantes et nous vous adressons nos sincères remerciements et soyez assurée de notre profonde gratitude.

Un immense remerciement s'adresse aussi à M. SALI et M. NOUAS, pour leur précieuse aide et assistance dans la réalisation de l'expérimentation animale.

Nos vifs remerciements aussi pour Mme la Cheffe de service au CHU Beni Messous, pour tout le personnel du Laboratoire Anatomie Pathologique, ainsi qu'aux membres du Laboratoire de Microbiologie SAIDAL pour leur aide et contribution à la réalisation de l'activité antimicrobienne in vitro.

Nous adressons nos vifs remerciement et reconnaissance à tout le corps enseignant de la Faculté SNV et particulièrement toutes celles et tous ceux qui nous ont enseigné durant notre cursus universitaire dans notre formation de Biotechnologies et Pathologies Moléculaires.

Dédicaces

*C'est avec gratitude, respect et amour que je dédie ce modeste travail
A la mémoire de mon grand-père, que dieu t'accueil dans son vaste
paradis*

*A mes très chère parent et bien aimé grand parent Hanouna, Mima et
Djedji khelladi, pour l'amour, la tendresse et les sacrifices dont ils m'ont
fait preuve.*

*A ma grande sœur Anissa, mon exemple pour son soutien et
encouragement sans
limites.*

*A mes petites sœurs chéries Nihal et Selma que j'aime tant
A toute ma famille :*

*Oncles, Tantes, ainsi qu'à leur épouses et époux, cousins, cousines
spécialement Abdou et Asma pour leur contribution, et son mari Adel*

A mes bout de chou : momo, nounou, nisso et djodjo

A ma binôme et amie, Madina

Que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde

Hala

Dédicaces

Je remercie dieu le tout puissant qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail

Que je dédie :

A mes parents qui ont toujours cru en moi, qui ont toujours été présents avec leur soutien, leur patience et leur encouragement.

*A mes frères Sid Ahmed et Fares qui n'ont jamais arrêté de m'encourager.
A tous mes enseignants ainsi que mon binôme Hala.*

Salutations:

Madina leila.

RESUME

L'objectif assigné à notre travail consiste à valoriser l'huile essentielle (HE) distillée d'une plante à parfum, en aromathérapie. Le screening antimicrobien de l'HE a été réalisé, *in vitro*, sur cinq souches de référence, en comparaison avec des antimicrobiens de synthèse. Avec la technique de diffusion en milieu gélosé, *Staphylococcus aureus* a été fortement inhibé, suivi par *Aspergillus niger* et *Bacillus subtilis*. En phase vapeur (microatmosphère), l'essence a fortement inhibé *A. niger*. Sur le plan thérapeutique, le potentiel anti-inflammatoire topique de l'HE a été exploré, *in vivo* (souris *Mus musculus*) et à différentes doses, via la technique de l'induction de l'inflammation. Ces résultats prometteurs de l'inhibition *in vivo* de l'inflammation topique nous ont encouragés à effectuer des études d'amarrage moléculaire, *in silico*, pour établir et comprendre les interactions ligand-protéine. Le docking moléculaire entre les composés terpéniques présents dans l'HE et des anti-inflammatoires de synthèse a été réalisé séparément contre les enzymes. L'alcool monoterpénique oxygéné est le composé qui a présenté les meilleurs scores d'affinité. En définitive, les résultats obtenus laissent entrevoir, éventuellement, de nouvelles perspectives d'application pharmaceutique de l'essence dans la prévention-traitement des pathologies inflammatoires cutanées.

Mots-clés : Huile essentielle ; Antifongique naturel ; Anti-inflammatoire topique ; Docking moléculaire ; Monoterpènes oxygénés.

ABSTRACT

The aim of this study consists in valuing the essential oil (EO) in aromatherapy. The *in vitro* antimicrobial screening of EO was carried out against five reference strains, in comparison with antibiotics. Using the agar diffusion method, *Staphylococcus aureus* was strongly inhibited by EO with a diameter of inhibitory zone (DIZ), followed by *Aspergillus niger* and *Bacillus subtilis*. In the vapor phase (disc volatilization assay), EO strongly inhibited the growth of a fungal strain (*A. niger*) with a diameter of inhibitory zone (DIZ) followed by *S. aureus*. The *in vivo* topical anti-inflammatory effect of EO was evaluated through the xylene-induced ear edema and using different doses, in comparison with a nonsteroidal anti-inflammatory. These *in vivo* promising findings encouraged us to perform an *in silico* docking to establish and understand ligand-protein interactions. Molecular docking between the major terpenes presents in EO and anti-inflammatory drugs was carried out separately against enzymes. Oxygenated monoterpene alcohol presented the best binding affinity scores. Finally, current findings suggest new prospects for the pharmaceutical application of the EO in the prevention-treatment of skin inflammations.

Keywords: Essential oil; Natural Antifungal; anti-inflammatory; Molecular docking; Oxygenated monoterpenes.

يتمثل الهدف الرئيسي من خلال القيام بهذا البحث العلمي في تقييم فعالية الزيت العطري الأساسي المستخلص من نبتة طبية و عطرية في معالجة الالتهابات الجلدية الموضعية و الأمراض المعدية. تم إجراء فحص مضادات الميكروبات في المختبر على خمس سلالات مرجعية من البكتيريا والفطريات، مقارنة بمضادات الميكروبات الاصطناعية. و من خلال استخدام تقنية "Aromatogramme"، أثبتت الزيوت الأساسية المستخلصة عن فعاليتها في تثبيط نمو المكورات العنقودية الذهبية "*Staphylococcus aureus*" بصفة معتبرة ، تليها فطريات من نوع *Aspergillus niger* و بكتيريا *Bacillus subtilis*. من جهة أخرى، فقد قمنا أيضا باستخدام تقنية "microatmosphère" و التي أظهرت عن تثبيط معتبر لنمو فطر *Aspergillus niger* ، يليه بكتيريا من نوع *Staphylococcus aureus*. أما فيما يتعلق بالخصائص العلاجية للزيوت الأساسية المستخلصة، فقد تم دراسة فعاليتها في التخفيف من حدة الالتهابات الجلدية الموضعية المفتعلة. كذلك فقد شجعنا هذه النتائج الواعدة في القيام بدراسات الالتحام الجزيئية لتأسيس وفهم التفاعلات الكيميائية بين نوعين من البروتين المسؤول عن الالتهابات و المركبات الطبيعية التربينية الموجودة في الزيوت الأساسية المستخلصة. حيث كشفت هذه الدراسة على أن مركب هو الذي قدم أفضل درجات التقارب. أخيرا، تشير النتائج التي تم الحصول عليها الى آفاق جديدة للتطبيق الصيدلاني للزيت العطري الأساسي المستخلص وذلك من خلال الوقاية أو العلاج من الالتهابات الموضعية.

الكلمات المفتاحية: الزيوت العطرية الأساسية، مضاد طبيعي للفطريات، مضادات الالتهابات ، الالتحام الجزيئي، مونوترينينات مؤكسدة.

TABLE DES MATIERE

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des Abréviations

Introduction

Chapitre 1 = ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Définition et étiologie de la réaction inflammatoire

1.2. Inflammation aigue

1.2.1. Phase vasculo-exsudative

1.2.2. Phase cellulaire

1.2.3. Phase de résolution

1.3. Inflammation chronique

1.4. Cellules inflammatoires et médiateurs inflammatoires

1.4.1 Cellules de l'inflammation

1.4.2. Médiateurs de l'inflammation

1.5. Traitement de l'inflammation

1.5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

1.5.2. Anti-inflammatoire stéroïdiens

Chapitre 2 = MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel

2.1.1. Huile essentielle

2.1.2. Animaux de Laboratoire

2.1.3. Souches bactérienne et fongique

2.1.4. Milieux de cultures et réactifs

2.2 Méthodes

2.2.1. Evaluation du pouvoir antibactérien et antifongique de l'huile essentielle

2.2.1.1. Aromatogramme

2.2.1.2. Microatmosphère

2.2.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire topique *in vivo*

2.2.2.1. Principe

2.2.2.2. Déroulement de l'essai

2.2.2.3 Etude Statistique

2.2.3. Evaluation de l'effet anti-inflammatoire *in silico*

Chapitre 3 = RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle *in vitro*

3.1.1. Activité antimicrobienne en aromatoigramme

3.1.2. Activité antimicrobienne en microatmosphère

3.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

3.4. Activité anti-inflammatoire *in silico* par docking moléculaire

3.4.1. Énergie d'interaction et affinité

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Liste des Tableaux

Tableau 1.1. Différentes cellules inflammatoires de la réponse inflammatoire.

Tableau 1.2. Origines cellulaires et effets des médiateurs de la réaction inflammatoire.

Tableau 2.1. Souches microbiennes utilisées dans le screening antimicrobien *in vitro*.

Tableau 3.1. Screening antimicrobien de l'essence aromatique *in vitro*.

Tableau 3.2. Résultats du docking moléculaire et des interactions entre ligands.

Liste des Figures

Figure 1.1. Processus de migration des neutrophiles à travers les vaisseaux sanguins.

Figure 1.2. Mécanisme d'action et effet des anti-inflammatoire non stéroïdiens.

Figure 2.1. Illustration de la méthode de microatmosphère.

Figure 2.2. Structure de quelques ligands téléchargés de PubChem.

Figure 2.3. Différentes étapes du docking moléculaire.

Figure 3.1. Pouvoir anti-inflammatoire topique de l'essence.

Figure 3.3. Structure 3D des interactions entre les 5 meilleurs ligands.

Liste des Abréviations

®	Marque enregistrée.
2D	2 dimension.
3D	3 dimension.
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien.
AIS	Anti-inflammatoire stéroïdien.
ANOVA	Analyse des variances.
ATB	Antibiotique.
CMI	Concentration minimale inhibitrice.
CRD	Centre de Recherche et de Développement.
DZI	Diamètre de zone d'inhibition.
HD	Hydrodistillation.
HE	Huile essentielle.
IL8	Interleukine 8.
iNOS	Oxyde nitrique synthase
LTB4	Leucotriène B ₄ .
MH	Gélose Mueller-Hinton.
MPO	Myéloperoxydase.
NMRI	Naval Medical Research Institute.
NO	Oxyde nitrique.
PAM	Plantes aromatiques et médicinales.
PDB	Banque de données des protéines.
PG	Prostaglandines PG.
PNN	Polynucléaires neutrophiles.
ONAB	Office National des Aliment du Bétail.
ROS	Espèces réactives de l'oxygène.
SAB	Sabouraud-Chloramphénicol.
SER	Sérine.
TYR	Tyrosine.
TRP	Tryptophane.
VAL	Valine.

INTRODUCTION

La thérapeutique des pathologies humaines se base principalement sur l'usage des médicaments de synthèse. A titre d'exemple, la principale indication des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) est l'inflammation en bloquant la formation des prostaglandines. D'autres médicaments tels que les antibiotiques (ATB) perturbent la flore intestinale, qu'ils détruisent de manière plus ou moins accentuée. Cela peut provoquer des maux de ventre, des diarrhées ou des ballonnements (**Dahmani et al., 2016**).

Partant de ce constat amer, les scientifiques recherchent et explorent, depuis de nombreuses années dans l'industrie pharmaceutique, de nouvelles substances ou molécules bioactives permettant de traiter les infections microbiennes et les pathologies inflammatoires.

Le règne végétal est une source présumée inépuisable d'une immense variété de médicaments potentiels, tout en étant accessible, y compris dans les pays en voie de développement (**Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2013**).

Dans le contexte socio-économique des pays en voie de développement comme l'Algérie, l'étude des PAM en général peut aboutir à l'obtention de nouvelles réponses thérapeutiques adéquates et de faibles prix.

De nombreuses études traitent des propriétés pharmacologiques de l'essence aromatique de cette plante aromatique, qu'elles soient citées dans des ouvrages, dans des journaux spécialisés ou encore présentées lors des congrès d'aromathérapie scientifique (**Lis-Balchin, 2012 ; Prusinowska et Smigielski, 2014 ; Diass et al., 2021**). Utilisée pour ses vertus médicinales, notamment cicatrisante et anxiolytique, l'essence de cette plante n'en a pas moins des propriétés antitussives et expectorantes, vasodilatatrices et analgésique, et vermifuges (**Nikfarjam et al., 2013 ; Couic-Marinier et al., 2014 ; Yaghoobi et al., 2016 ; Lobstein et Couic-Marinier, 2017**).

De ce fait, l'objectif assigné à notre travail consiste à asseoir, *in vitro*, le pouvoir antimicrobien de la fraction aromatique, et ce en utilisant deux méthodes complémentaires (aromatogramme et microatmosphère) vis-à-vis de différentes souches microbiennes de référence. Enfin, un docking moléculaire *in silico* sera abordée entre les composés terpéniques présents dans l'HE et des anti-inflammatoires de synthèse séparément contre les sites actifs des protéines enzymatiques.

Chapitre I

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Etude Bibliographique

1.1. Définition et étiologie de la réaction inflammatoire

L'inflammation est la première réponse défensive du corps définie par les signes cardinaux rougeur et gonflement avec chaleur et douleur et ayant pour rôle d'éliminer l'agent agresseur et de permettre au plus vite la réparation des tissus. Elle permet donc de maintenir l'intégrité du « soi ».

La réaction inflammatoire peut être déclenchée par des :

- Infections ou contaminations par des micro-organismes (bactérie, virus, parasites, champignons);
- Agents physiques : traumatisme, chaleur, froid, radiations;
- Agents chimiques : caustiques, toxines, venin;
- Corps étrangers : exogènes ou endogènes;
- Défaut de vascularisation: réaction inflammatoire secondaire à une nécrose par ischémie;
- Agression dysimmunitaire (anomalie de la réponse immunitaire, allergies, auto-immunité) (**Lacavé-Lapalun, 2013**).

La réponse inflammatoire est une réponse adaptative engendrée en réponse à des stimuli nocifs telle qu'une infection ou une agression tissulaire. Elle nécessite une régulation fine, généralement bénéfique, elle conduit à l'élimination d'éventuels pathogènes et au retour à l'homéostasie du tissu lésé (**Nathan, 2002 ; Barton, 2008**). Alors que l'aspect négatif de l'inflammation intervient quand cette dernière se pérennise et devient une inflammation chronique (**Weill et al., 2003**).

Le déroulement d'une réaction inflammatoire présente des caractères morphologiques généraux et des mécanismes communs. Néanmoins, les différentes étapes présentent des variations liées à la nature de l'agent pathogène, l'organe où elle se déroule, le terrain physiologique de l'hôte : tous ces éléments conditionnent l'intensité, la durée de la réaction inflammatoire et l'aspect lésionnel (**Rousselet, 2005 ; Sugimoto et al., 2019**).

1.2. Inflammation aigue

Elle comporte trois phases et est illustrée dans la figure 1.1.

1.2.1. Phase vasculo-exsudative

Elle se traduit cliniquement par les quatre signes cardinaux classiques de l'inflammation aiguë: rougeur, chaleur, tuméfaction, douleur. Elle comporte trois phénomènes : une congestion active, un œdème inflammatoire (l'exsudat), une diapédèse leucocytaire (**Rousselet et al., 2005**).

Cette phase est déclenchée par l'activation des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, suivie d'une vasodilatation des vaisseaux, entraînant une augmentation de l'apport sanguin. Survient ensuite un œdème inflammatoire permettant l'apport des moyens de défenses jusqu'à la lésion et l'initiation du foyer inflammatoire.

➤ Congestion active

Il s'agit d'une modification du calibre vasculaire qui apparaît très rapidement, après une brève vasoconstriction, et consiste en une vasodilatation artériolaire puis capillaire dans la zone atteinte. Localement, il en résulte une augmentation de l'apport sanguin et un ralentissement du courant circulatoire.

➤ Œdème inflammatoire

Il s'agit du passage dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses d'un liquide appelé exsudat fait d'eau et de protéines plasmatiques. Sa traduction clinique est un gonflement des tissus qui, en comprimant des terminaisons nerveuses, est responsable de la douleur (également provoquée par certains médiateurs chimiques). Sa traduction microscopique est un aspect pâle, peu colorable et distendu du tissu conjonctif.

➤ Diapédèse leucocytaire

C'est la migration des leucocytes en dehors de la microcirculation et leur accumulation dans le foyer lésionnel. Elle intéresse d'abord les polynucléaires (pendant les 6 à 24 premières heures), puis un peu plus tard (en 24 à 48 heures) les monocytes et les lymphocytes. Il s'agit d'une traversée active des parois vasculaires. (**Toussaints et al., 2003 ; Rousselet et al., 2005**).

1.2.2. Phase cellulaire

Elle se caractérise par la formation du granulome inflammatoire ou tissu de granulation (**Rousselet et al., 2005**). Les phénomènes vasculo-exsudatifs initiaux permettent l'arrivée dans le foyer inflammatoire des leucocytes. Les premiers arrivés sur place (environ 6 h) sont les polynucléaires.

L'afflux des cellules fait que celles-ci vont d'abord se marginaliser sur le site de l'agression environ 30 minutes. C'est à ce moment qu'on pourra constater « *in situ* » la présence de polynucléaires neutrophiles, lesquelles sont plaqués le long des cellules endothéliales de l'endroit concerné. Ces cellules vont traverser la paroi, grâce à de nombreux facteurs attractants comme l'IL8 (cytokines), et LTB4 (rôle chimiotactique pour les leucocytes sur le site inflammatoire). Ces cellules vont en effet ingérer les éléments lésés. Cette fonction n'est pas simple.

1.2.3. Phase de résolution

La phase de résolution, dite de réparation, dépend du degré des lésions tissulaires. En effet, dans les conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les polynucléaires neutrophiles, et les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaires sont phagocytés par les macrophages. Les macrophages vont alors sécréter des cytokines et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire (Weill et Batteux, 2003).

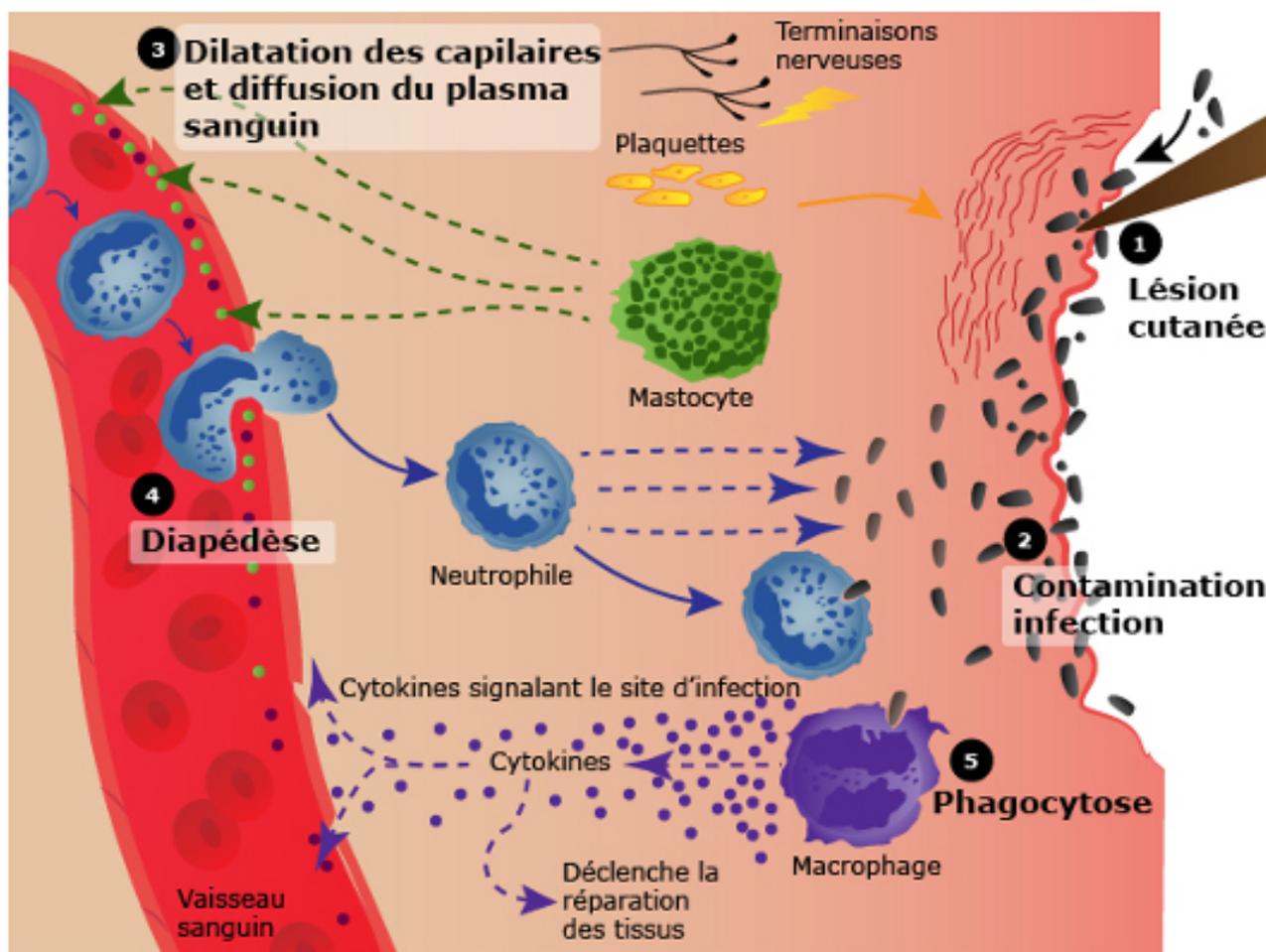


Figure 1.1. Processus de migration des neutrophiles à travers les vaisseaux sanguins (in Lambrecht et Hammad, 2010).

La réparation peut aboutir à une restitution intégrale du tissu : il ne persiste alors plus aucune trace de l'agression initiale et de l'inflammation qui a suivi. Cette évolution très favorable est observée lors d'agression limitée, brève, peu destructrice dans un tissu capable de régénération cellulaire (**Rousselet et al., 2005**).

1.3. Inflammation chronique

Morphologiquement, l'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus. Dans de nombreux cas, la réponse inflammatoire chronique peut persister pendant de longues périodes (plusieurs mois ou années). Elle est considérée comme être causé par l'engagement persistant des réponses de l'immunité innée et acquise. La persistance de la réaction inflammatoire et la perturbation de son contrôle physiologique conduisent à la chronicité de l'inflammation (**Serhan et al., 2010**).

L'inflammation chronique est initialement déclenchée par des réponses vasculaires qui impliquent l'apparition de molécules d'adhésion sur la surface des cellules endothéliales qui vont spécifiquement entraîner l'adhésion des lymphocytes et des monocytes, et permettent leur transmigration dans le compartiment extravasculaire.

1.4. Cellules inflammatoires et médiateurs inflammatoires

1.4.1 Cellules de l'inflammation

Les cellules de l'inflammation comprennent les lymphocytes, les cellules phagocytaires (polynucléaires principalement neutrophiles et monocytes), les mastocytes et les polynucléaires basophiles, les éosinophiles et les fibroblastes (Tableau 1.1).

Tableau 1.1. Différentes cellules inflammatoires intervenant au cours de la réponse inflammatoire (Botting et Botting, 2000 ; Rankin, 2004).

Type cellulaire	Fonction dans l'inflammation
Neutrophiles	Migrent vers le tissu extravasculaire, ont des propriétés phagocytaires et sont activés par des chimio-attracteurs dans le site de l'agression.
Mastocytes	Cellules phagocytaires, résidentes dans les tissus de connexions et dans les muqueuses. Libèrent de médiateurs inflammatoires (essentiellement anaphylactiques).
Plaquettes	Sources initiales de médiateurs inflammatoires et interviennent aussi dans la cascade de coagulation.
Monocytes	Se différencient en macrophages tissulaires, dans le foie et les poumons où ils peuvent y survivre pendant des années. Ce sont de puissants phagocytes, ils sont impliqués dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T et B et dans la libération des médiateurs inflammatoires.
Fibroblastes	Cellules ubiquitaires et principales du tissu conjonctif ; elles interviennent dans la production de la matrice extracellulaire qui offre une résistance mécanique aux cellules. Ils produisent au cours de la réaction inflammatoire des enzymes de destruction de la matrice : collagénases, gélatinases, cathepsines, sérine protéases.
Lymphocytes	Deux types de lymphocytes impliqués dans l'inflammation : lymphocytes T qui se différencient dans le thymus, et lymphocytes B acquièrent leur maturation dans la moelle osseuse. Ils interviennent dans les mécanismes de l'immunité mais ils participent à la réaction inflammatoire par la production de différentes cytokines

1.4.2. Médiateurs de l'inflammation

La réponse inflammatoire provoque la libération de divers médiateurs inflammatoires. Ces médiateurs affectent le développement et la résolution de l'inflammation en agissant sur les différentes cellules impliquées dans la réaction inflammatoire (Rankin, 2004). Le tableau 1.2 résume l'origine et les effets des plus importants médiateurs de l'inflammation.

Tableau 1.2. Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs impliqués dans le développement de la réaction inflammatoire (**Rankin, 2004 ; Abdulkhaleq et al., 2018**).

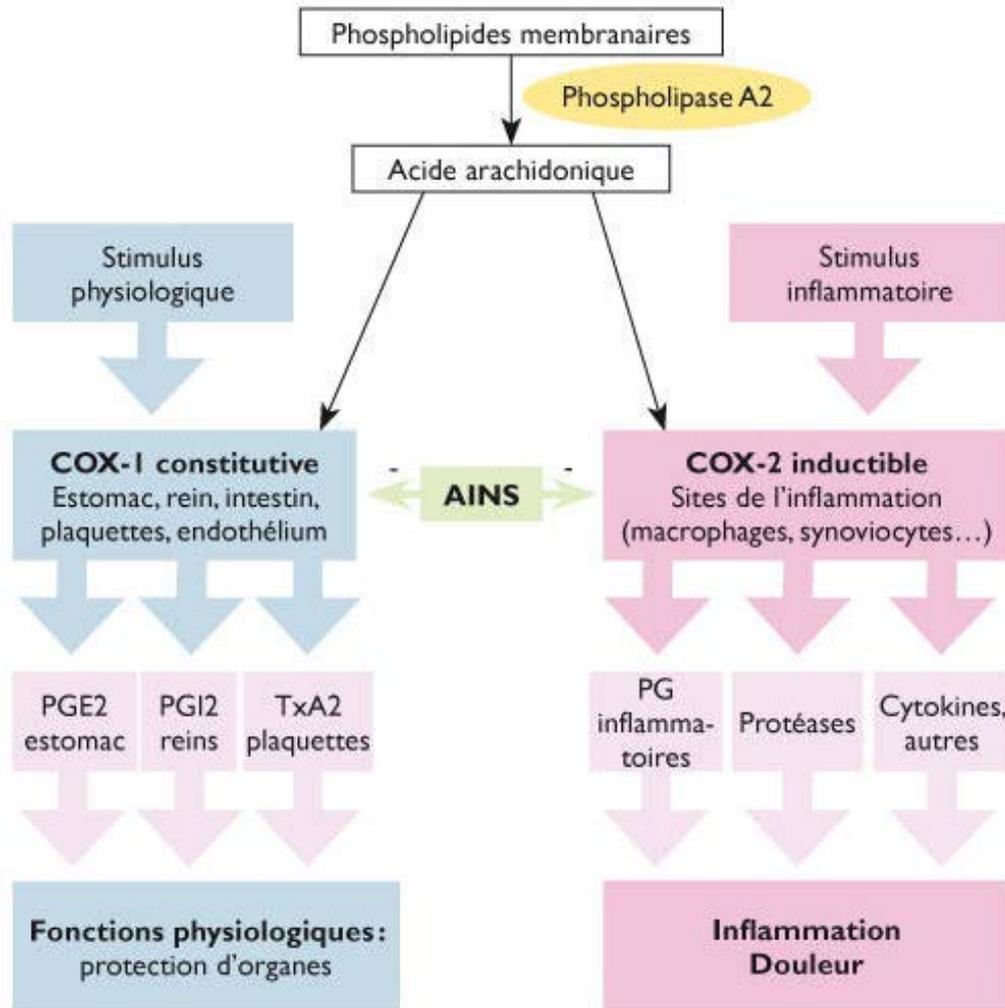
Médiateurs	Origines	Effets
Histamine	Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes	Assure la vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire, induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire.
Sérotonine	Mastocytes et plaquettes	Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction musculaire.
Prostaglandine	Essentiellement par les leucocytes	Vasodilatation, renforce l'action de l'histamine, augmente la sensibilité des neurones et est responsable de la douleur.

1.5. Traitement de l'inflammation

La thérapie anti-inflammatoire est destinée à contrôler l'excès de réaction spécifique des tissus et à éviter la transformation de la phase aiguë de l'inflammation en phase chronique. Le traitement des anomalies inflammatoires se fait par des molécules de type anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) ou stéroïdien (AIS) (corticoïdes) qui sont des médicaments très utilisés mais dont les effets secondaires sont parfois graves (**Muster, 2005 ; Haley et von Recum, 2019**).

1.5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les AINS sont les produits les plus fréquemment utilisés pour traiter l'inflammation. Ils sont définis comme étant la classe de médicaments qui possède les mêmes propriétés pharmacologiques (anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques) de l'acide acétylsalicylique (Aspirine). Le traitement par les AINS provoque l'inhibition de la voie du COX (cyclo-oxygénase, enzyme permet la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique) (Figure 2.1) et, par conséquent, la réduction de la production des prostaglandines et la diminution de la perméabilité vasculaire (**Lüllman et al., 2001**).



AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens ; COX-1 : cyclo-oxygénase 1 ; COX-2 : cyclo-oxygénase 2 ;
PG : prostaglandine ; Tx : thromboxane.

Figure 1.2. Mécanisme d'action et effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens
(Brandstätter et al., 2010).

1.5.2. Anti-inflammatoire stéroïdiens (AIS)

Les AIS constituent une vaste famille de médicaments dérivés de cortisol, principalement les glucocorticoïdes. Ils sont capables d'inhiber toutes les phases de la réaction inflammatoire, qui résulte de leur capacité d'action sur la majeure partie des cellules impliqués dans la réaction inflammatoire et sur la synthèse de nombreux médiateurs de l'inflammation (Muster, 2005).

Chapitre II

MATERIEL & METHODES

Chapitre 2 : MATERIEL & METHODES

2.1. Matériel

2.1.1. Huile essentielle

Nous avons acheté l'huile essentielle d'une société spécialisée dans la distillation des huiles. L'essence aromatique a été conservée dans des flacons stériles teintés à 4°C et à l'abri de l'air et de la lumière, pendant toute la durée de notre travail.

2.1.2. Animaux de Laboratoire

Tous ces animaux de laboratoire ont été stabulés dans des cages en plastique, à une température ambiante, un taux d'humidité et un éclairage avec un régime alimentaire de granulés d'origine ONAB, de l'eau de manière *ad-libitum*. L'expérimentation a porté sur des souris saines et adultes et misent à jeun 18 heures avant les expériences.

2.1.3. Souches bactériennes et fongiques

Les activités antibactérienne et antifongique ont été évaluées sur des souches bactériennes ATCC (**Tableau 2.1**) et isolats fongiques de référence. Toutes les souches microbiennes ont été identifiées au niveau du Laboratoire de Microbiologie.

Tableau 2.1. Souches microbiennes utilisées dans le screening antimicrobien *in vitro*.

Souches microbiennes	Famille
Bactéries à Gram –	
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
Bactéries à Gram +	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
Souches fongiques	
<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcaceae</i>

2.1.4. Milieux de cultures et réactifs

Nous avons utilisé des milieux de culture solides, en l'occurrence la gélose Muller-Hinton (MH) pour les bactéries et la gélose Sabouraud-Chloramphénicol (SAB) pour les champignons. Un disque a été utilisé comme contrôle positif pour les espèces bactériennes. Et concernant les souches fongiques, nous avons utilisé une solution comme contrôle positif.

2.2 Méthodes

2.2.2. Evaluation du pouvoir antibactérien et antifongique de l'huile essentielle

2.2.2.1. Aromatogramme

Dans cette méthode (Figure 2.1), nous avons utilisé des disques de 9 mm de diamètre imprégnés d'une quantité d'HE. Le disque sera déposé au centre d'une boîte contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé. L'évaluation du pouvoir antibactérien et antifongique est identique à celui de l'antibiogramme. L'huile aromatique diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance se traduit par un halo translucide autour du disque et dont le diamètre de la zone d'inhibition (DZI) est mesuré et exprimé en millimètres (mm).

2.2.2.2. Microatmosphère

La différence entre cette technique et l'aromatogramme réside dans la position du disque imprégné en HE (Figure 2.1).

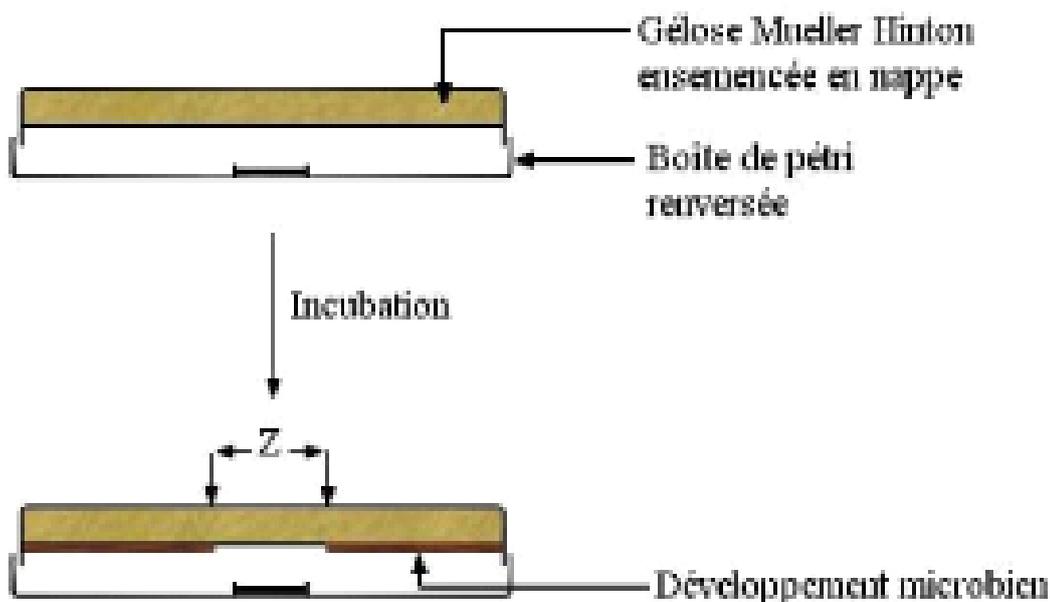


Figure 2.1. Illustration de la méthode de microatmosphère (images.google.com).

Le disque imprégné en HE sera déposé sur couvercle de la boîte de Pétri et n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. La boîte est fermée avec le couvercle en bas et mise à l'étuve dans les mêmes conditions citées précédemment. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus ou moins nette, à tendance circulaire.

2.2.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire topique *in vivo*

2.2.3.1. Principe

Le pouvoir anti-inflammatoire locale de l'huile aromatique a été évalué *in vivo* sur des souris de souche NMRI. L'œdème a été provoqué au niveau des oreilles de chaque souris, par application d'une solution comme agent irritant. La méthodologie suivie est celle décrite par **Hosseinzadeh et Younesi (2002)**.

IV.2.3.2. Déroulement de l'essai

Nous avons constitué 9 lots contenant chacun 2 souris. Les différents traitements ont été administrés aux souris par voie locale auriculaire. Ces lots sont répartis de la façon suivante :

- Lot du Contrôle + recevra une quantité d'un gel dermique anti-inflammatoire non stéroïdien ;
- Lot du Contrôle négatif recevra une quantité de 20 µL d'huile d'amande douce ;
- Lot Témoin où aucun traitement n'a été appliqué.

Tous les animaux ont été sacrifiés par une forte dose de l'éther et des pièces circulaires, de 5 mm de diamètre, ont été coupées et retirées des oreilles traitées et non traitées.

IV.2.3.3 Etude Statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm Ecart-Moyen. La signification statistique a été déterminée au moyen du test d'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivi par le test *post-hoc* de Tukey pour comparaison par paire. Une $p < 0,05$ a été considérée comme différence significative.

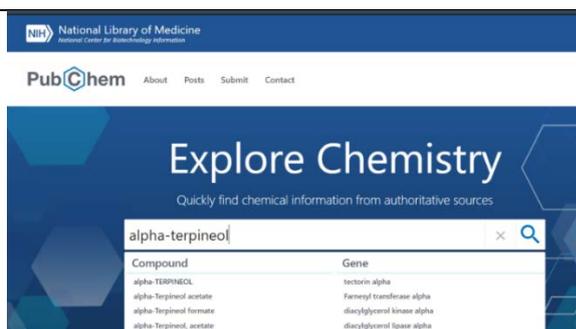
2.2.4. Evaluation de l'effet anti-inflammatoire *in silico* (Docking moléculaire)

La partie *in silico* de notre travail s'est axée sur l'étude des différentes interactions entre le site actif de deux enzymes, les composés majoritaires et caractéristiques de l'HE en comparaison avec de plusieurs médicaments anti-inflammatoires.

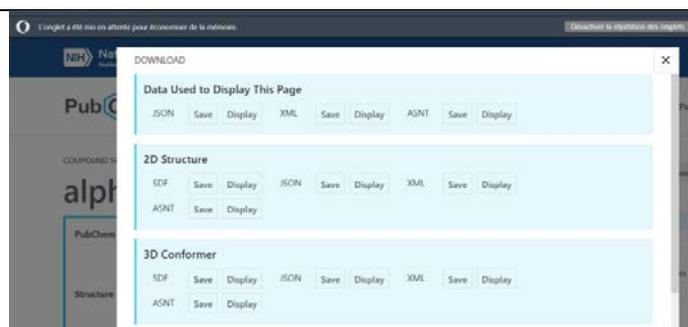
Les ligands ont été entrés dans Open Babel et soumis à des réductions d'énergie. Les produits ont été convertis au format PDBQT. Ensuite, la boîte de grille a été formée avec des dimensions spécifiques (X=22,87, Y=22,03 et Z=-60,85). Plusieurs complexes amarrés ont été obtenus et évalués sur la base de valeurs énergétiques. Enfin, les interactions ont été visualisées.



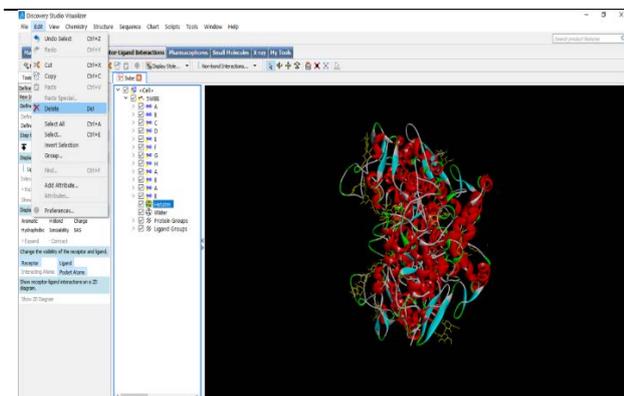
Accès à la PDB [<https://www.rcsb.org/>]



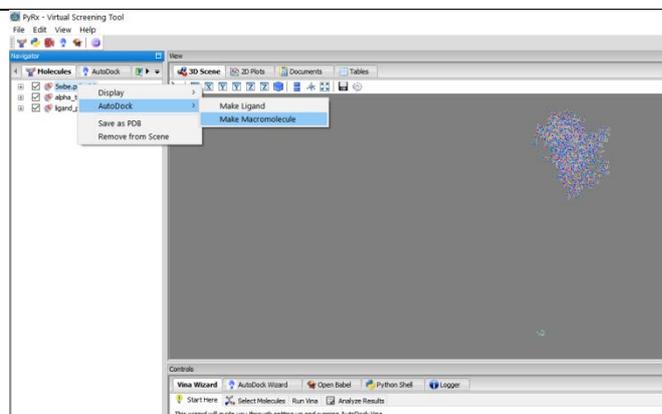
Accès au site web des ligand (PubChem)
[<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>]



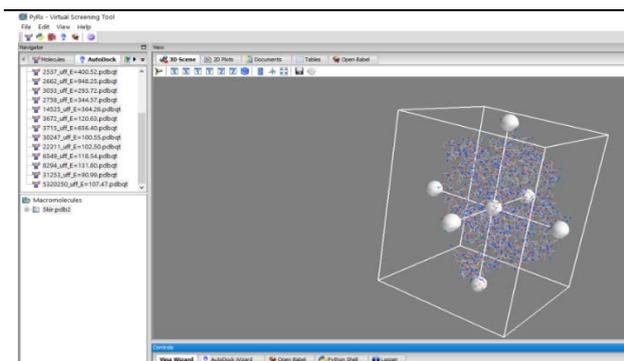
Téléchargement des différentes structures 3D des ligands sous format sdf.



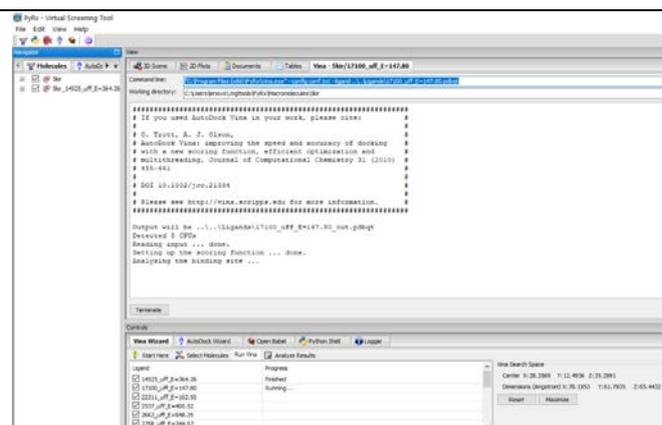
Traitement des protéines



Conversion des récepteurs protéiques et ligands au format pdbqt.



Paramétrage de la boîte de grille.



Docking moléculaire multiple.

Figure 2.3. Différentes étapes du docking moléculaire multiple.

Chapitre III

RESULTATS & DISCUSSION

Chapitre 3 : RESULTATS & DISCUSSION

3.1. Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle *in vitro*

3.1.1. Activité antimicrobienne en aromatoigramme

L'activité antimicrobienne de l'HE a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, *in vitro*, sur plusieurs souches microbiennes ATCC. Les résultats de cette étude antimicrobienne sont rapportés dans le Tableau 3.1. A noter que le diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans le calcul de la zone d'inhibition.

Tableau 3.1. Screening antimicrobien de l'essence aromatique distillée *in vitro*.

	Aromatoigramme			Microatmosphère			ATB	ATF
	Quantité HE (µL/disque)							
Souches	2	3	4	2	3	4		
Souches bactériennes								
<i>S. aureus</i>	-	-	31,33	-	-	-	42	nd
<i>E. coli</i>	-	11±1	12,66	-	-	-	-	nd
Souches fongiques								
<i>C. albicans</i>	-	10±0,57	15,66	-	-	32±1,1	nd	20

(-) Aucune zone d'inhibition ; HE : Huile essentielle ; ATB : Antibiotique ; nd : non déterminé.

L'activité antimicrobienne de l'essence aromatique a été effectuée en utilisant la technique de diffusion en milieu gélosé (aromatoigramme) avec l'application de différents volumes et ce vis-à-vis de plusieurs souches microbiennes de référence (ATCC). A la dose la plus faible. En utilisant la dose la plus élevée, c'est la souche de *S. aureus* qui a été le plus fortement inhibée, suivie par *A. niger*.

Une étude comparative a été faite avec un antibiotique de large spectre de la famille des diaminopyrimidines et qui a révélé que la bactérie à Gram + (*S. aureus*) est le germe le plus sensible, suivi par *B. subtilis* et *E. coli*. Pour les deux souches fongiques (*C. albicans*), un antifongique à large spectre de la classe des allylamine a été utilisé dans l'optique de comparer son action avec celle de l'HE.

Ainsi une étude publiée en 2014 par Yaps et son équipe dans la revue « Journal of Applied Microbiology » a permis de démontrer l'efficacité de l'HE utilisée en synergie avec un traitement antibiotique sur une souche multi-résistante (**Yaps et al., 2014**).

En outre et dans la même étude, il a été décrit que le l'HE peut augmenter l'activité phagocytaire et modifier la prolifération bactérienne intracellulaire dans les macrophages humains en augmentant la production d'espèces réactives de l'oxygène en cas d'infection à *Staphylococcus aureus*.

Une étude publiée en 2014 par Panahi et son équipe a testé l'efficacité d'une combinaison de gouttes à base de plantes (Lamigex®) composée d'HE du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), et du géranium (*Geranium robertianum*) dans le soulagement des symptômes de l'otite externe et a comparé ses effets à ceux de la ciprofloxacine 0,3 % en gouttes (**Panahi et al., 2014**).

Nos résultats sont en concordance avec ceux de plusieurs travaux antérieurs. Le mécanisme d'action des extraits aromatiques sur les souches fongiques n'a pas été totalement élucidé.

3.1.2. Activité antimicrobienne en microatmosphère

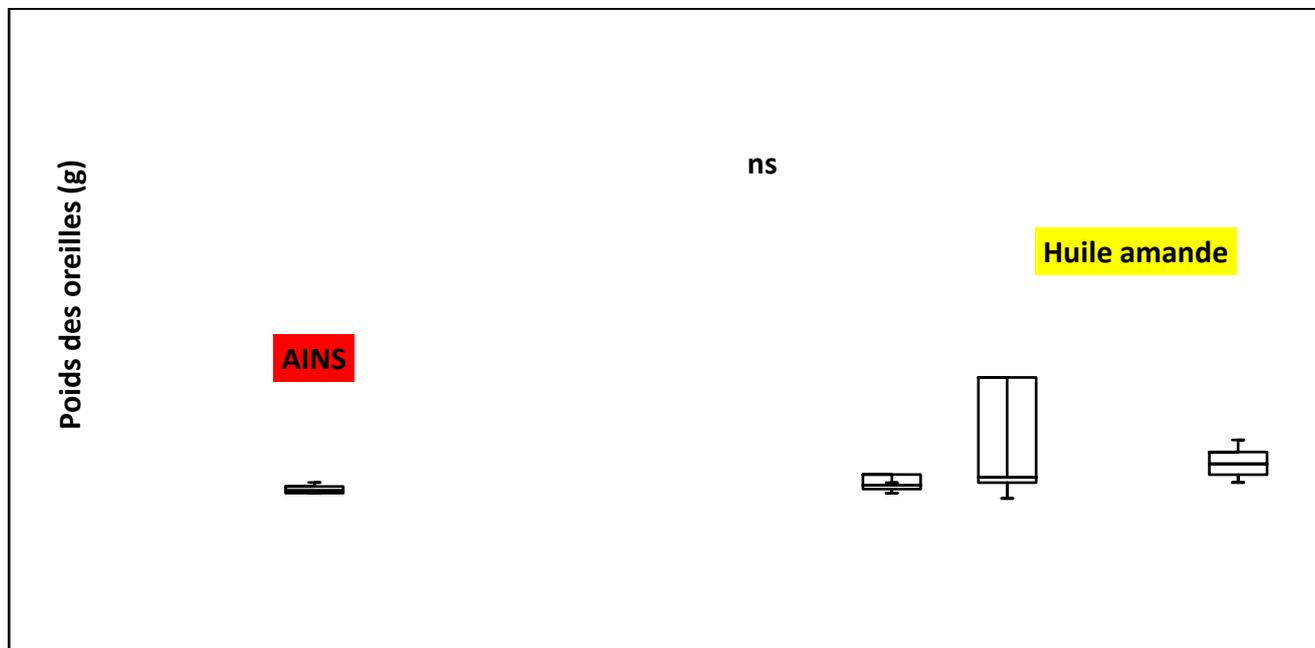
Une seconde méthode complémentaire à celle de l'aromatogramme a été appliquée pour les différentes souches microbiennes et a consisté à évaluer l'effet inhibiteur de la phase vapeur de l'HE. Les résultats de ce screening sont rapportés dans le Tableau 3.1.

En revanche, *E. coli* demeure le germe le plus résistant au pouvoir inhibiteur de l'HE du moment qu'aucune zone d'inhibition n'a été constatée lors de ce screening.

Par contre et en microatmosphère, l'HE est très volatile et, de ce fait, aura une bonne diffusion sur une gélose préalablementensemencée (**Pibiri, 2006 ; Laird et Phillips, 2012**). Il faut cependant considérer ces données avec prudence car ce sont des résultats obtenus en laboratoire et l'application en conditions réelles soulèvent de nombreuses interrogations.

3.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

En premier temps, l'activité anti-inflammatoire de l'essence a été effectuée, *in vivo*. Les résultats de ce screening anti-inflammatoire, à travers la mesure de la moyenne du poids des oreilles, sont illustrés dans la figure 3.1.



HE : Huile essentielle ; AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien ; Contrôle – (sans traitement) ; ns : différence non significative ($p > 0,05$) entre tous les lots avec le test ANOVA suivi par un test de comparaison par paire de Tukey.

Figure 3.1. Pouvoir anti-inflammatoire topique de l'essence, en comparaison avec un médicament de synthèse.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire montrent les variations des poids des oreilles. De plus, aucune différence ($p > 0.05$) sur le plan statistique, au test de Tukey de comparaison par paires (Annexe 2), n'a été enregistrée entre tous les traitements, ce qui suggère que cet examen macroscopique ne peut objectiver que s'il sera suivi par une étude histologique et/ou immuno-histochimique.

D'un point de vue physiopathologique, l'état inflammatoire tissulaire est souvent marquée par une suractivation des macrophages responsables de la production de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires (Medzhitov, 2008).

Une autre étude récente, publiée en 2018 par Cardia et son équipe dans la revue « Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine », a évalué l'effet de l'application topique de l'HE sur la réponse inflammatoire aiguë (Cardia et al., 2018).

Bien que dans une moindre étendue, d'autres espèces également montré un potentiel anti-inflammatoire. Par exemple, la fraction éthanolique a montré des effets inhibiteurs *in silico* (Shaikh et al., 2014).

Les extraits éthanoliques et aqueux inhibaient l'œdème de l'oreille chez la souris (Sosa et al., 2005) et l'extrait hydroalcoolique exerçait des effets anti-inflammatoires sur un modèle animal de colite induite par TNBS (Antoniou et coll., 2016).

Les constituants présents dans l'huile essentielle s'oxydent lorsqu'ils sont exposés à l'air et peuvent provoquer une irritation de la peau (Hagvall et al., 2008).

3.4. Activité anti-inflammatoire *in silico* par docking moléculaire

3.4.1. Énergie d'interaction et affinité

Les études d'amarrage des composés terpéniques présents dans l'HE et des anti-inflammatoires de synthèse ont été réalisées séparément contre les protéines afin de trouver les affinités de liaison de ces ligands contre les protéines.

Les valeurs énergétiques prédites pour les protéines sont énumérées dans Tableau 3.2. A noter que nous avons rapporté uniquement les 5 ligands qui ont donné le meilleur score (ayant l'affinité de liaison la plus faible).

Tableau 3.2. Résultats du docking moléculaire et des différentes interactions entre ligands.

Nom du ligand	Acides aminés	Distances (Å)	Catégories	Types
pinéol	TYR355		Hydrogène	Liaison H conventionnelle
	LEU352			
	ILE523			
	ALA527	2,94414		
		2,22774		
		2,28017	Hydrophobe	
	LEU352	2,16708	Hydrophobe	Alkyl
	ILE523	3,42083		
	ALA527	3,99456		
	PHE518	3,46545		Pi-Alkyl
	LEU352	5,31011	Hydrophobe	Alkyl
	ILE523	3,97147		
	ALA527	2,24149		
	LEU352	1,16308		
				Pi-Alkyl
Myr		3,73278	Hydrophobe	
		3,19791		
		3,42905		
	LEU352			
	TYR355			
	TYR385			
	TRP387			
Acétate		5,06255	Hydrophobe	Pi-Alkyl
		5,41081		
		5,17858		
	VAL116			
	LEU93			
	LEU112			
	TRP100			

Les différentes interactions obtenues entre les ligands présentant le meilleur score et le site actif sont illustrées dans la Figure 3.3.

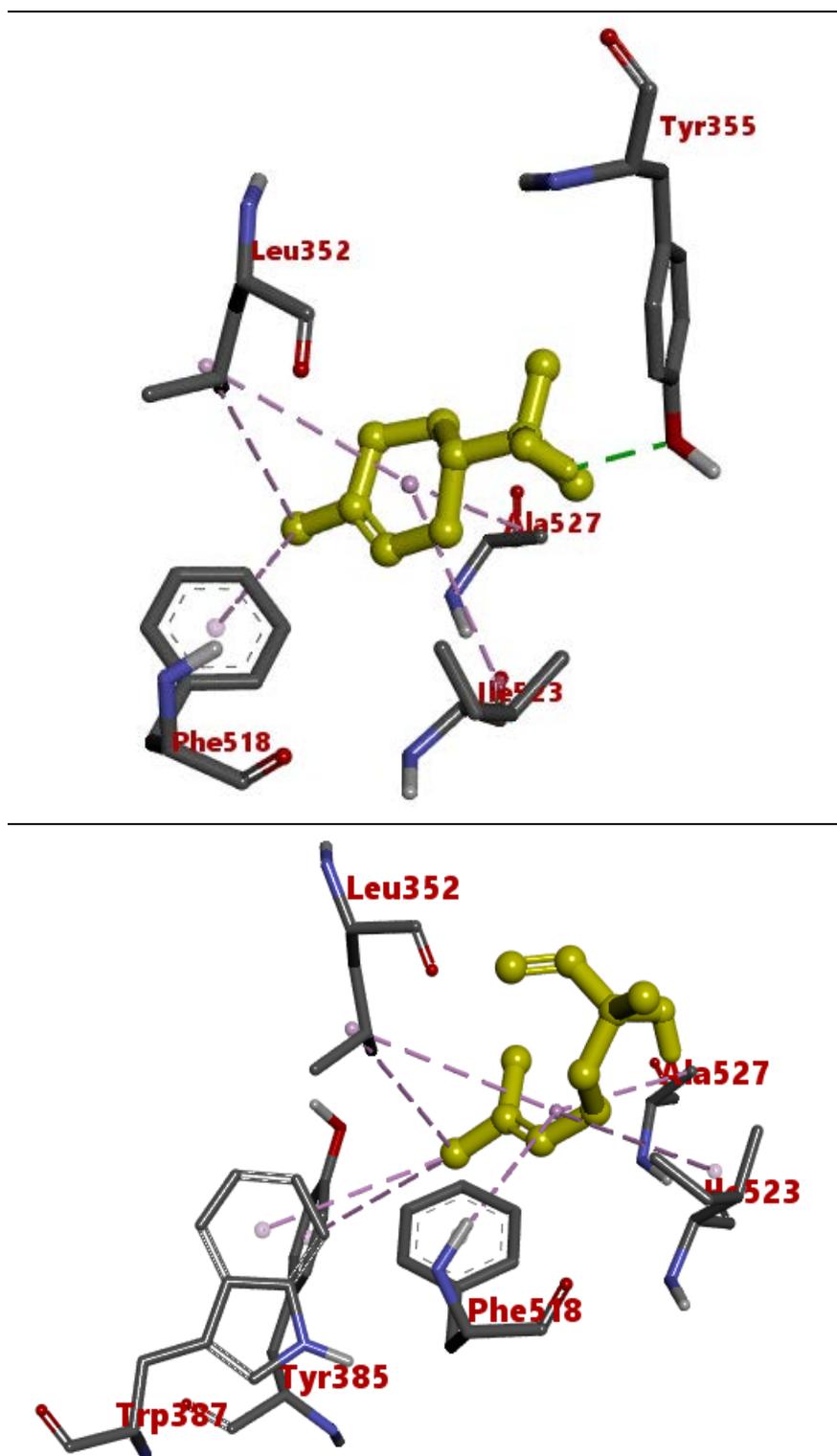


Figure 3.3. Structures 3D des interactions entre les 5 meilleurs ligands avec le site actif.

Concernant le récepteur protéique, les résultats de cet amarrage sont consignés dans le Tableau 3.3. A noter que nous avons rapporté uniquement les 5 ligands qui ont donné le meilleur score. Et d'un point de vue interactions, le alpha est impliqué dans différents types de liaison avec le site actif où nous avons noté la présence de deux liaisons hydrogènes, ainsi que la présence de plusieurs liaisons hydrophobes avec différents acides aminés.

Tableau 3.3. Résultats du docking moléculaire et des différentes interactions entre ligands.

Nom du ligand	Acides aminés	Distances (Å)	Catégories	Types
α-Ter		4,03246		Liaison H conventionnelle
		5,00198	Liaison H	
	LEU352			
	LEU384			Alkyl
	TYR385			
	TRP387		Hydrophobe	Pi-Alkyl
Acétate		4,20142		
		3,89146		
		4,45729		
		6,28467		
	MET522			Alkyl
	TRP387			
	TRP387			
	PHE518			Pi-Alkyl
		1,14522		
		3,38537		
	ALA527			Alkyl
Linalool		2,85932		
		2,2364		
		2,24546		
			Hydrophobe	

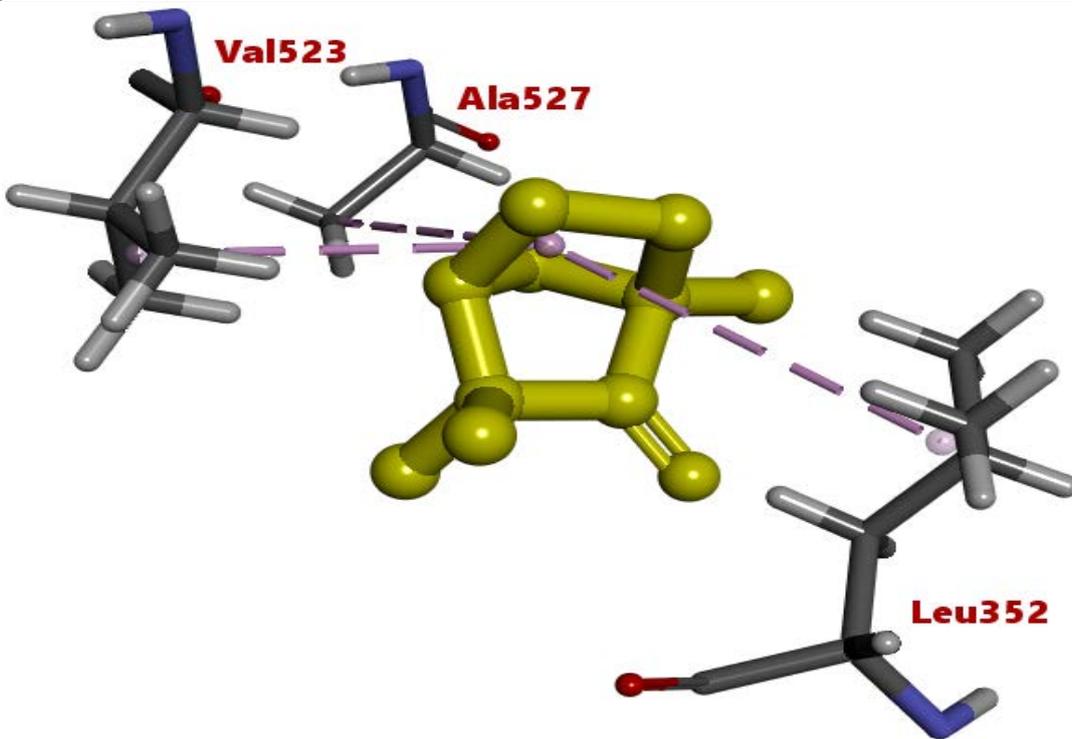
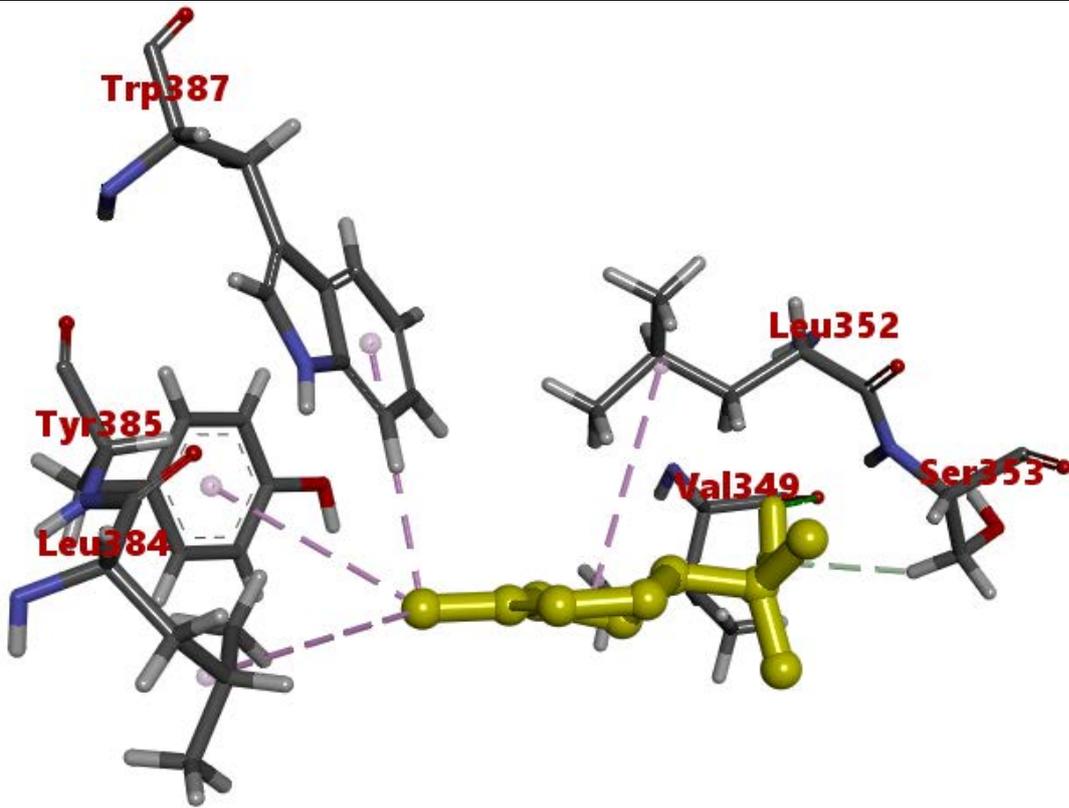


Figure 3.4. Structure 3D des différentes interactions ligand avec le site actif.

Les résultats prometteurs de l'inhibition *in vitro* de l'inflammation topique de l'essence aromatique nous ont encouragés à effectuer des études d'amarrage moléculaire pour établir et comprendre les interactions ligand-protéine.

La protéine joue un rôle important dans la coagulation et la protection de la paroi de l'estomac. Elle est fabriquée localement en cas d'inflammation et est directement responsable de l'apparition de la douleur. Cette différence structurelle rend les inhibiteurs accessibles pour le site actif. D'autres différences dans la structure apportent des changements qui se traduisent par un site actif légèrement agrandi.

L'amarrage moléculaire permet donc d'explorer un ensemble de conformations d'un ou plusieurs ligands dans le site de fixation de la cible afin de classer dans un second temps les ligands selon leur capacité à interagir dans la cavité d'intérêt.

Le processus d'un projet de cible biologique à la découverte d'un nouveau médicament peut prendre en moyenne 10 ans ou plus, et la chimie computationnelle vient avec une excellente direction dans la planification rationnelle des médicaments.

CONCLUSION

La thérapeutique des pathologies humaines se base principalement sur l'usage des médicaments de synthèse.

Produites comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques, les huiles essentielles sont toujours utilisées comme substances aromatiques en parfumeries, en industrie cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine alternative.

L'objectif assigné à ce travail était l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'essence *in vitro* sur des souches bactérienne et mycéliennes de référence. En aromagramme, l'huile a démontré un pouvoir fongistatique intéressant, particulièrement à forte dose. Aussi, une action inhibitrice dose-dépendante a été remarquée. Le même constat a été rapporté en utilisant la technique de micro-atmosphère où la phase vapeur est aussi douée d'un pouvoir inhibiteur, parfois plus élevé que la phase liquide.

L'autre volet abordé, lors de cette étude, était la détermination du pouvoir anti-inflammatoire topique de l'essence *in vivo*. Les résultats ont établi l'efficacité de l'huile dans la réduction de l'inflammation topique et la résorption de l'œdème, particulièrement à faible dose, et ce en comparaison avec les médicaments de synthèse.

Les résultats prometteurs de l'inhibition, *in vitro*, de l'inflammation topique de l'essence aromatique nous ont encouragés à effectuer des études d'amarrage moléculaire pour établir et comprendre les interactions ligand-protéine. Cette étude a démontré une grande affinité d'interaction entre les monoterpènes oxygénés caractéristiques de l'essence vis-à-vis des enzymes protéiques.

Comme perspectives, il serait intéressant de combiner l'utilisation des métabolites terpéniques avec des antibiotiques ou antifongiques de synthèse. C'est là une nouvelle stratégie pour surmonter les problèmes de résistance et des effets secondaires inhérents aux médicaments synthétiques.

En définitive, l'objectif premier de notre travail a été atteint puisque nous avons contribué à valoriser la fraction aromatique en aromathérapie anti-infectieuse ou comme ingrédient actif dans la réduction de l'inflammation locale. En plus de cet apport thérapeutique, le gain économique ne serait pas négligeable puis qu'il s'agit de valoriser le patrimoine végétal de notre pays.

Références Bibliographiques

1. Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y. H., & Hezmee, M. N. M. (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary World*, 11(5), 627.
2. Alam, A., Jawaid, T., & Alam, P. (2021). *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of green cardamom essential oil and *in silico* molecular docking of its major bioactives. *Journal of Taibah University for Science*, 15(1), 757-768.
3. Amira, S., Dade, M., Schinella, G., & Ríos, J. L. (2012). Anti-inflammatory, anti-oxidant, and apoptotic activities of four plant species used in folk medicine in the Mediterranean basin. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(1), 65-72.
4. Antoniou, E., Margonis, G. A., Angelou, A., Pikouli, A., Argiri, P., Karavokyros, I., & Pikoulis, E. (2016). The TNBS-induced colitis animal model: An overview. *Annals of Medicine and Surgery*, 11, 9-15.
5. Anzai, T., Yoshikawa, T., Kaneko, H., Maekawa, Y., Iwanaga, S., Asakura, Y., & Ogawa, S. (2004). Association between serum C-reactive protein elevation and left ventricular thrombus formation after first anterior myocardial infarction. *Chest*, 125(2), 384-389.
6. Barton, G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 413-420.
7. Borges, R. S., Lima, E. S., Keita, H., Ferreira, I. M., Fernandes, C. P., Cruz, R. A. S., & Carvalho, J. C. T. (2018). Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. *Inflammopharmacology*, 26(1), 183-195.
8. Botting, R. M., & Botting, J. H. (2000). Pathogenesis and mechanisms of inflammation and pain. *Clinical Drug Investigation*, 19(2), 1-7.
9. Brandstätter, H., Samer, C. F., Ribl, C., & Piguet, V. (2010). Réactions d'hypersensibilité. *Revue Médicale Suisse*, 6, 1345-50.
10. Cardia, G. F. E., Silva-Filho, S. E., Silva, E. L., Uchida, N. S., Cavalcante, H. A. O., Cassarotti, L. L., & Cuman, R. K. N. (2018). Effect of essential oil on acute inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.
11. Carlet, J., & Shlemmer, B. (2015). Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France: nécessité d'une mobilisation déterminée et durable.

12. Charles, D. J. (2013). Saffron. In antioxidant properties of spices, herbs and other sources. Springer Science & Business Media.
13. Chen, X., Zhang, L., Qian, C., Du, Z., Xu, P., & Xiang, Z. (2020). Chemical compositions of essential oil extracted and its prevention of TPA-induced inflammation. *Microchemical Journal*, 153, 104458.
14. Cohen, Y., & Jacquot, C. (2008). *Pharmacologie*. Maison d'édition Elsevier Masson. France.
15. Couic-Marinier, F., Harnist, F., & Lobstein, A. (2014). En savoir plus sur l'huile essentielle . *Actualités Pharmaceutiques*, 53(535), 37-40.
16. Da Silva, G. L., Luft, C., Lunardelli, A., Amaral, R. H., MELO, D. A., Donadio, M. V., & Oliveira, J. R. (2015). Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects essential oil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87, 1397-1408.
17. Dahmani, B., Amarani, N., Stambouli, O. B., Yelles, N., Benchouk, A., & Dib, M. (2016). Vascularite induite par la pristinamycine. *Revue Française d'Allergologie*, 56(1), 43-45.
18. Dallakyan, S., & Olson, A. J. (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx. In *Chemical biology* (pp. 243-250). Humana Press, New York, USA.
19. De Lavor, É. M., Fernandes, A. W. C., de Andrade Teles, R. B., Leal, A. E. B. P., de Oliveira Júnior, R. G., Gama e Silva, M., & da Silva Almeida, J. R. G. (2018). Essential oils and their major compounds in the treatment of chronic inflammation: A review of antioxidant potential in preclinical studies and molecular mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
20. Diass, K., Brahmi, F., Mokhtari, O., Abdellaoui, S., & Hammouti, B. (2021). Biological and pharmaceutical properties of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. *Materials Today: Proceedings*, 45, 7768-7773.
21. Diebold, J., Molina, T., Bigorgne, C., Audouin, J., & Le Tourneau, A. (1995). Les expressions morphologiques de la réaction inflammatoire. *Revue Française des Laboratoires*, 1995(276), 21-26.
22. Dorward, D. A., Lucas, C. D., Rossi, A. G., Haslett, C., & Dhaliwal, K. (2012). Imaging inflammation: molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharmacology & Therapeutics*, 135(2), 182-199.
23. Duan, L., Rao, X., & Sigdel, K. R. (2019). Regulation of inflammation in autoimmune disease. *Journal of Immunology Research*, 2019.
24. Duyckaerts, C., Fouret, P., & Jacques-Hauw, J. (2002). Chapitre 13: l'inflammation. *Cours Anatomie Pathologique PCEM2, Université Paris VI, faculté de médecine Pierre et Marie Curie*, 2003, 60-98.
25. Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., & Slavich, G. M. (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature medicine*, 25(12), 1822-1832.

26. Giovannini, D., Gismondi, A., Basso, A., Canuti, L., Braglia, R., Canini, A., & Cappelli, G. (2016). *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil exerts antibacterial and anti-inflammatory effect in macrophage mediated immune response to *Staphylococcus aureus*. *Immunological Investigations*, 45(1), 11-28.
27. Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). *Phytothérapie anti-infectieuse*. Springer Science & Business Media.
28. Hagvall, L., Sköld, M., Bråred-Christensson, J., Börje, A., & Karlberg, A. T. (2008). Lavender oil lacks natural protection against autoxidation, forming strong contact allergens on air exposure. *Contact dermatitis*, 59(3), 143-150.
29. Hajhashemi, V., Ghannadi, A., & Sharif, B. (2003). Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil Mill. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1), 67-71.
30. Haley, R. M., & von Recum, H. A. (2019). Localized and targeted delivery of NSAIDs for treatment of inflammation: A review. *Experimental Biology and Medicine*, 244(6), 433-444.
31. Hosseinzadeh, H., & Younesi, H. M. (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacology*, 2(1), 1-8.
32. Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860.
33. Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2013). *La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie: Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée*. Springer Science & Business Media.
34. Kim, H. M., & Cho, S. H. (1999). Lavender oil inhibits immediate-type allergic reaction in mice and rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(2), 221-226.
35. Lacavé-Lapalun, J. V. (2013). *Réponse immunitaire induite par l'irradiation colorectale: manipulation thérapeutique des «toll like receptors»*. Thèse de Doctorat en immunologie (Physiologie Physiopathologie), Université Pierre et Marie-Curie, Paris, France.
36. Laird, K., & Phillips, C. (2012). Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?. *Letters in Applied Microbiology*, 54(3), 169-174.
37. Lambrecht, B.N., & Hammad, H. (2010). The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. *The Lancet*, 376(9743), 835-843.
38. Lis-Balchin, M. T. (2012). In *handbook of herbs and spices* (pp. 329-347). Woodhead Publishing.
39. Lobstein, A., & Couic-Marinier, F. (2017). Huile essentielle de Lavande officinale. *Actualités Pharmaceutiques*, 56(565), 57-60.
40. Lüllmann, H., Mohr, K. & Ziegler, A. (2001). *Atlas de poche de pharmacologie*. Edition Médecine-Science Flammarion (2ème édition), France.
41. Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435. Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.

42. Morita, I. (2002). Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 68, 165-175.
43. Muster, D. (2005). Médicaments de l'inflammation. *EMC-Stomatologie*, 1(1), 21-29.
44. Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917), 846.
45. Nikfarjam, M., Parvin, N., Assarzadegan, N., & Asghari, S. (2013). The effects of infusion on depression in patients using citalopram: a comparison study. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 15(8), 734.
46. Panahi, Y., Akhavan, A., Sahebkar, A., Hosseini, S. M., Taghizadeh, M., Akbari, H., & Imani, S. (2014). Investigation of the effectiveness of *Syzygium aromaticum*, and *Geranium robertianum* essential oils in the treatment of acute external otitis: A comparative trial with ciprofloxacin. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 47(3), 211-216.
47. Pibiri, M. C., Goel, A., Vahekeni, N., & Roulet, C. A. (2006). Indoor air purification and ventilation systems sanitation with essential oils. *International Journal of Aromatherapy*, 16(3-4), 149-153.
48. Poissy, J. (2015). Physiopathologie des candidoses invasives. *Réanimation*, 24(3), 318-327.
49. Prusinowska, R., & Smigielski, K. B. (2014). Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender. A review. *Herba polonica*, 60(2).
50. Rademaker, M. (1994). Allergic contact dermatitis fragrance in Diffiam® gel. *Contact Dermatitis*, 31(1), 58-59.
51. Rankin, J. A. (2004). Biological mediators of acute inflammation. *AACN Advanced Critical Care*, 15(1), 3-17.
52. Refaey, M. S., Abouelela, M. E., El-Shoura, E. A., Alkhalidi, H. M., Fadil, S. A., Elhady, S. S., & Abdelhameed, R. F. (2022). *In vitro* anti-inflammatory activity of *Cotula anthemoides* essential oil and *in silico* molecular docking of its bioactives. *Molecules*, 27(6), 1994.
53. Rousselet, M. C., Vignaud, J. M., Hofman, P., & Chatelet, F. P. (2005). Inflammation et pathologie inflammatoire. *Association Française des Enseignants et Chercheurs en Anatomie Pathologie*, 1-57.
54. Rufino, A. T., Ribeiro, M., Judas, F., Salgueiro, L., Lopes, M. C., Cavaleiro, C., & Mendes, A. F. (2014). Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)- α -pinene: structural and enantiomeric selectivity. *Journal of Natural Products*, 77(2), 264-269.
55. Serhan, C. N., Ward, P. A., & Gilroy, D. W. (Eds.). (2010). *Fundamentals of inflammation*. Cambridge University Press.
56. Shaikh, R., Pund, M., Dawane, A., & Iliyas, S. (2014). Evaluation of anticancer, antioxidant, and possible anti-inflammatory properties of selected medicinal plants used in Indian traditional medication. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 4(4), 253-257.
57. Sosa, S., Altinier, G., Politi, M., Braca, A., Morelli, I., & Della Loggia, R. (2005). Extracts and constituents with topical anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*, 12(4), 271-277.

58. Sourì, F., Rakhshan, K., Erfani, S., Azizi, Y., Nasseri Maleki, S., & Aboutaleb, N. (2019). Natural oil exerts cardioprotective effects against myocardial infarction by targeting inflammation and oxidative stress. *Inflammopharmacology*, 27(4), 799-807.
59. Sugimoto, M. A., Vago, J. P., Perretti, M., & Teixeira, M. M. (2019). Mediators of the resolution of the inflammatory response. *Trends in Immunology*, 40(3), 212-227.
60. Suleyman, H., Demircan, B., & Karagoz, Y. (2007). Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacological Reports*, 59(3), 247.
61. Toussaint, J. F., Jacob, M. P., Lagrost, L., & Chapman, J. (2003). sous l'égide de la Société française d'athérosclérose. *L'athérosclérose: physiopathologie, diagnostics et thérapeutiques*. Edition Masson, Paris, France.
62. Tyagi, A. K., & Malik, A. (2010). Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 1-11.
63. Ulinski, T., & Bensman, A. (2004). Renal complications of non-steroidal anti-inflammatories. *Archives de Pédiatrie: Organe Officiel de la Société Française de Pédiatrie*, 11(7), 885-888.
64. Varma, S., Blackford, S., Statham, B. N., & Blackwell, A. (2000). Combined contact allergy to tea tree oil complicating chronic vulvovaginitis. *Contact Dermatitis*, 42(5), 309-310.
65. Velika, B., & Kron, I. (2012). Antioxidant properties of benzoic acid derivatives against superoxide radical. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(4), 62-67.
66. Wei, A., & Shibamoto, T. (2010). Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(12), 7218-7225.
67. Weill, B., & Batteux, F. (2003). *Immunopathologie et réactions inflammatoires*. De Boeck Supérieur.
68. Yaghoobi, K., Kaka, G. R., Sh, D., & Ashayeri, H. (2016). Therapeutic effects of *Lavandula*. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*, 17(4), 1-9.
69. Yap, P. S. X., Krishnan, T., Yiap, B. C., Hu, C. P., Chan, K. G., & Lim, S. H. E. (2014). Membrane disruption and anti-quorum sensing effects of synergistic interaction between oil in combination with antibiotic against plasmid-conferred multi-drug-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 116(5), 1119-1128.
70. Zeghal, K. M., & Sahnoun, Z. (2013). La réaction inflammatoire et le stress oxydant. In *Abrégé de physiologie à l'usage des acupuncteurs et des réflexothérapeutes* (pp. 47-53). Springer, Paris.

Annexe 1 =

Technique de coloration « Hématoxyline-Eosine »

Fixation: Doit se faire le plus rapidement possible Par immersion de l'échantillon, dans un volume 5 fois de la pièce dans le but de préserver l'organe dans un état aussi proche que possible de l'état vivant (aspect et structure du tissu). Elle s'oppose à l'autolyse et à la destruction par les microorganismes.



Seau contenant les échantillons dans du formol a 10%

Déshydrations et éclaircissement : Les échantillons seront plongés dans des bains à concentration croissante d'alcool, suivi de deux bains de xylène pour subir l'éclaircissement, puis dans la paraffine. La déshydratation sert à éliminer l'eau qui se trouve dans le tissu pour éviter que la paraffine (hydrophobe) ne soit réversée.

Arriver au dernier panier, les échantillons sont récupérés pour passer à l'étape de l'enrobage.



Automate de déshydratation

Inclusion : Elle a pour but d'obtenir un bloc de paraffine contenant notre échantillon solidifié prêt pour être découpé dans le microtome. Les échantillons récupérés du dernier bloc de paraffine sont placés dans le bac de préchauffage.

La partie supérieure de la cassette est remplacée au-dessus du tissu fixé dans la paraffine et une quantité de paraffine est ajoutée avec les grilles de la cassette.



Différentes étapes d'inclusion

Coupe au microtome : Les coupes sont réalisées avec un microtome permettant l'obtention de ruban de 3 à 5 μm . Les coupes sont disposées sur une lame gravée par les informations de chaque échantillon, puis séchées à plat sur une plaque chaude 37-65°C.

Réhydratation : Sert à éliminer la paraffine et réhydratation du tissu pour permettre l'entrée des colorants. Les lames sont placées dans l'étuve afin d'éliminer l'excès de la paraffine, ensuite elles sont déparaffinées complètement dans 3 bains de xylène, puis hydratées graduellement dans 3 bains d'alcool.

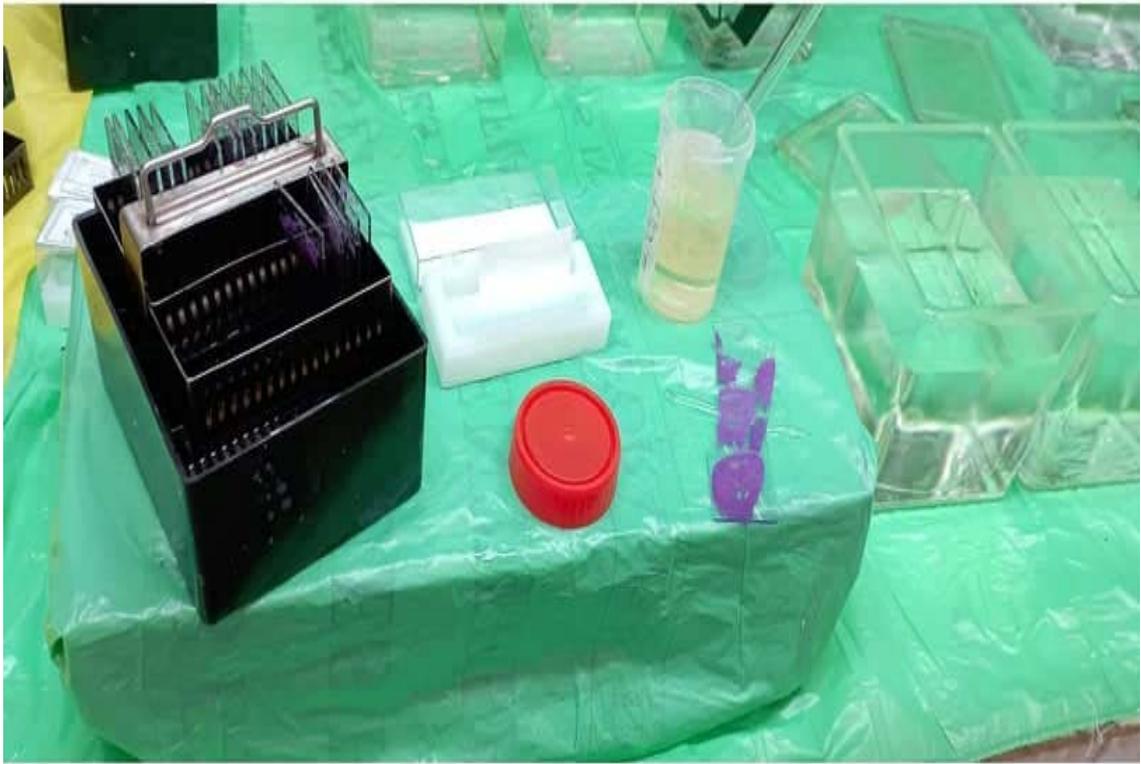


Bains de réhydratation

Coloration Hématoxyline-Eosine (H&E) : pour pouvoir visualiser et identifier les structures cellulaires. L'hématoxyline basique colore les structures acides en bleu violet, et l'éosine acide colore les structures cellulaires basiques en rose. Sachant que dans la cellule animale, le noyau présenté par l'ADN nucléaire est acide donc il va attirer l'hématoxyline et apparait bleu violet, alors que la majorité des composants cytoplasmiques sont de nature basique et apparaissent en rouge à rose.



Montage et observation : Montage entre lame et lamelle pour permettre la visualisation et la protection des coupes, et empêcher ainsi l'oxydation des colorants. Les échantillons sont plongés dans 2 bains d'alcool, ensuite passés dans un bain de xylène, puis une petite quantité du fixateur Eu-kit est étalée sur la lame, avant de pouvoir déposer la lamelle.



Annexe 2 =

Statistiques = Activité Anti-inflammatoire *in vivo*

Dose / Analysis of the differences between the categories with a confidence interval of 95%:

Contrast	Difference	Standardized	
		difference	Critical value
HE vs Control	0,0268		3,3990
	0,0200		3,3990
	0,0198		3,3990
	0,0068		3,3990
		0,5782	
		0,4804	
		0,4225	
	0,0088	0,6864	3,3990
Tukey's d critical value:			4,807

Category	LS means	Standard error	Lower bound	Upper bound
			(95%)	(95%)
				0,0479
	0,0195			0,0347
	0,0178			