



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

**Evaluation des propriétés antimicrobienne,
anti-inflammatoire et analgésique de
l'essence aromatique distillée *in vitro*, *in vivo*
et *in silico***

Présenté par

ADJA Bouchra Ikram & HAMIA Abderrahmane

Devant le Jury composé de =

Mme CHELGHOUM H.	Maître de Conférences	Univ. Blida 1	Présidente
Mme BOKRETA S.	Maître de Conférences	Univ. Blida 1	Examinatrice
M BOKHATEM M.	Professeur	Univ. Blida 1	Promoteur

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 :

- Madame CHELGHOUM (Maître de Conférences à l'Université Blida 1): nous sommes très honorés que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.
- Madame BOKRETA (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.
- Monsieur BOKHATM (Professeur à l'Université Blida 1) de nous avoir encadré et orienté, ainsi que pour tous ses précieux conseils.
- Nous tenons à présenter notre profonde gratitude à notre chef d'option Mme DJAZOULI ALIM pour sa grande disponibilité, et ses encouragements.
- Nous remercions Dr BOUDIS pour sa présence, nous sommes très honorés que vous ayez acceptés de nous diriger au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique au niveau de l'hôpital de KOLEA. Soyez assurés de nos profondes grâces.
- Dr BELKADI, Mr SALI, Mme BOUMZIRA, Mme EL KACHEAI et AKILA qui nous a fait l'honneur de nous accueillir dans leur laboratoire, et de nous encourager ; on vous adresse nos très vifs remerciements.
- Un grand merci à vous et à tout le personnel de l'hôpital de KOLEA.
- Nous adressons nos vifs remerciements 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.

Dédicaces

— A vous mes très chers parents : Abdelhamid et Djenaci fatiha

Aucune dédicace ne peut exprimer mon respect, ma considération et mon amour éternel pour mon instruction et mon éducation ce travail et le fruit de votre dévouement, de votre patience et ma gratitude envers vous.

— A mes très chères sœurs et mes frères mon beau-frère et mon ami « lamine » décédé on ce mois sacré et à mon cousin Abdelkarim.

Vous m'avez beaucoup soutenu dans mon chemin je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de réussite.

— A mes amis Djallal, Morad, Ismail, Zino, Ghanou, krimo, Nacer ainsi que Ahlem, Nessrine, Hadjer, Nada et Manal merci pour votre soutien.

Abderrahmane

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

— A mon très cher père : ADJA BELKACEM

Je vous dédie ce modeste travail au moins comme un cadeau pour vous, j'apprécie toujours et je n'oublierai jamais vos sacrifices pour mon succès, et ce n'est que le début que je vous rendrai fier de moi, espérons-le, Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir. Vous m'avez enseigné le sens des responsabilités et de la persévérance et de travailler sincèrement dans mes études, en particulier en travaillant consciencieusement pour faire le chemin pour nous, merci et mille merci à mon premier et dernier amour, Je vais me battre jour et nuit pour réaliser notre rêve, papa, Vous ne serez pas déçu de moi tant que vous et ma mère serez avec moi.

— A ma très chère mère : REBHI OUMELKHEIR

Maman, Vous êtes la bougie qui illumine ma vie et mes jours. Peu importe à quel point j'ai traversé et écrit des livres et des romans, vous ne décrierez pas la profondeur et la sincérité de mes sentiments envers vous, Vos prières quotidiennes pour moi me protègent de tout mal et de tout mauvais qui m'arrive.

Si ce n'était pas pour vous, je n'aurais pas étudié ces cinq ans. Si ce n'était pas pour vous, je ne choisirais pas ma spécialité. J'aimais chaque jour la façon dont je vous expliquais chaque leçon et chaque nouvelle information et vous m'écoutez avec amour et réflexion. Que Dieu vous protège pour moi et vous donne la santé pour que vous puissiez continuer le voyage avec moi. Je n'oublierai pas vos sacrifices pour moi et les larmes que vous avez pleurées pour moi quand je m'inquiétais pour les examens. Mes quelques mots ne suffiront pas à exprimer à quel point j'apprécie ce que vous faites pour moi. Je vous aime jusqu'à l'infinité.

— A ma très chère sœur : NADA CHOUROUK

Mon ange, ma petite princesse, Je n'oublierai jamais ton encouragement et ton soutien le long de mes études, je t'estime beaucoup et je t'aime beaucoup ma petite fille. Juillet 2022 c'est une date très spéciale car c'est l'année de ma soutenance et ton succès au bac inchallah.

— A ma très chère tante REBHI Mouza :

Pour votre soutien tout au long de mon parcours universitaire, et surtout pour vos prières quotidiennes, Vous êtes la meilleure tante au monde, je vous considère ma deuxième mère, Je vous aime beaucoup, votre fille BOUCHRA

— A monsieur AMEUR merci de m'avoir soutenu, Je n'oublierai jamais l'encouragement que tu m'accordé dans les moments les plus difficiles.

— A ma cousine CHAHAT ASMA pour ton soutien moral, ton amour et ton encouragement continu. A mes très chères tantes, oncles, et cousines. A toute la famille ADJA ET REBHI, ainsi que pour toutes mes amies ANISSA, CHAIMA, WIAM, SAHAR, BOUCHRA, FATIMA ZOHRA KARA, MERIEM, KHAOULA.

— Toutes mes salutations à mes collègues de la promotion de master 2 biotechnologie et pathologie moléculaire pour les agréables moments que nous avons passés.

MLLE ADJA BOUCHRA IKRAM

RESUME

L'objectif assigné à notre étude consiste à évaluer les propriétés antibactériennes (*in vitro*) et anti-inflammatoires de l'huile essentielle (HE) distillée d'une plante à parfum. Le screening antibactérien de l'HE a été réalisé par technique de diffusion en milieu gélosé sur 3 souches isolées cliniquement de prélèvements urinaires. En aromagramme et à faible dose en HE, le diamètre de la zone d'inhibition (DZI) varie. Et à forte dose, *Escherichia coli* a présenté le DZI le plus élevé, suivie par *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Aucune action dos-dépendante n'est à signaler. Et afin de mieux établir et comprendre les interactions ligand-protéine impliquée dans le processus inflammatoire, un docking moléculaire, entre les composés terpéniques présents dans l'HE et des anti-inflammatoires de synthèse, a été réalisé séparément contre les enzymes. L'ester monoterpénique oxygéné (acétate) est le composé qui a présenté les meilleurs scores d'affinité. Au final, nos résultats prometteurs laissent entrevoir, éventuellement, de nouvelles perspectives d'application pharmaceutique des extraits aromatiques en aromathérapie anti-inflammatoire.

Mots-clés : Activité anti-inflammatoire ; Pharmacognosie ; Huile essentielle ; Docking moléculaire ; Acétate.

ABSTRACT

The aims of our study were to assess the *in vitro* antibacterial, *in vivo* and *in silico* anti-inflammatory activities of essential oil (MEO). The *in vitro* antibacterial effect of MEO was carried out using agar disc diffusion technique against 3 bacterial strains isolated from urine samples. Using agar diffusion assay, the diameter of the zone of inhibition (DZI) varies between 22 mm and 24 mm of MEO per disc. And at high dose, it has been reported that *Escherichia coli* presented the highest DZI, followed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The *in silico* molecular docking was carried out between several terpenes detected in MEO and anti-inflammatory drugs separately, in order to better understand the ligand-protein interactions involved in the inflammatory process. The oxygenated monoterpene ester (acetate) was found to be the molecule that presented the best energy affinity scores. Finally, our promising findings suggest new prospects for the pharmaceutical application of plant-derived essential oil (MEO) in the management of topical inflammatory diseases.

Keywords: Anti-inflammatory effect; Essential oil; Molecular docking; acetate.

TABLE DES MATIERE

Résumé

Abstract

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des Abréviations

Introduction

Chapitre 1 = ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Huiles essentielles : Historique

1.2. Définition de l'huile essentielle

1.3. Types des huiles essentielles

1.4. Localisation et rendement

1.5. Biosynthèse et composition chimique

1.6. Toxicité

1.7. Domaines d'utilisation des Huiles essentielles

1.7.1. Aromathérapie

1.7.2. Aéro-ionisation et désinfection des ambiances

1.7.3. Industrie agro-alimentaire

1.7.4. Parfumerie et cosmétologie

Chapitre 2 = MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel

2.1.1. Huile essentielle

2.1.2. Animaux de laboratoire

2.1.3. Souches bactériennes

2.1.4. Milieux de cultures et réactifs

2.2 Méthodes

2.2.1. Evaluation du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle par aromatogramme

Chapitre 3 = RESULTATS ET DISCUSSION

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

3.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire topique

3.4.1. Énergie d'interaction et affinité

Conclusion

Référence bibliographique

Annexes

Liste des Figures

Figure 1.1. Procédé d'entraînement à la vapeur d'eau dans un alambic.

Figure 1.2. Procédé d'extraction assistée par micro-ondes.

Figure 1.3. Poche sécrétrice de la feuille de rue.

Figure 1.4. Dessin schématique d'un trichome glandulaire sphérique des Lamiaceae.

Figure 1.5. Quelques composés chimiques retrouvés dans les huiles essentielles.

Figure 2.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé.

Figure 2.2. Constitution des différents lots des souris.

Figure 2.3. Conservation des coupes auriculaires animales dans des flacons de formol.

Figure 2.5. Structure chimique 2D de quelques ligands téléchargés de PubChem.

Figure 2.6. Structure tridimensionnelle des enzymes téléchargées de la base PDB.

Figure 2.7. Différentes étapes du docking moléculaire *in silico*.

Liste des Tableaux

Tableau 3.1. Screening antimicrobien de l'essence distillée.

Tableau 3.2. Résultats du docking moléculaire et des interactions ligands

Liste des Abréviations

®	Marque enregistrée.
AFNOR	Association Française de Normalisation
AFSSAPS	Association Française de Sécurité Sanitaire des Produits de la Santé
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien.
AIS	Anti-inflammatoire stéroïdien.
ANOVA	Analyse des variances.
ATB	Antibiotique.
ATP	Adénosine triphosphate
CMI	Concentration minimale inhibitrice.
DZI	Diamètre de zone d'inhibition.
HE	Huile essentielle.
HEBBD	Botaniquement et biochimiquement définis
HSV-1	Virus Herpes simple de type 1
IL8	Interleukine 8.
LPS	Lipopolysaccharide
MH	Gélose Mueller-Hinton.
NF	Norme Française.
NMRI	Naval Medical Research Institute.
NO	Oxyde nitrique
ONAB	Office National des Aliments du Bétail.
PAM	Plantes aromatiques et médicinales.
PDB	Protein Data Bank
PG	Prostaglandines
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline.
SFE	Extraction par fluide supercritique
SFME	Solvent Free Microwave Extraction.
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale

INTRODUCTION

Sur le plan physique, la réaction inflammatoire se caractérise par une rougeur et/ou un gonflement, de même qu'une sensation de chaleur ou une douleur. Elle est néanmoins indispensable à l'organisme, puisque c'est elle qui permet d'éliminer l'agent responsable de l'agression (le cas échéant) et de réparer les tissus (**Dujardin et al., 2010**).

Les médicaments de la famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont utilisés chaque jour par des centaines de millions de personnes pour réduire les douleurs articulaires tendineuses ou musculaires et bien entendu pour réduire les maux de tête. Mais ces AINS génèrent paradoxalement beaucoup d'effets secondaires régulièrement pointés du doigt sans que pour autant les habitudes de consommation ou de prescription ne changent (**Muster, 2005 ; Fournier et al., 2008 ; Mrozovski, 2022**).

Connue de façon empirique depuis des siècles, leur efficacité anti-infectieuse et thérapeutique a été scientifiquement démontrée *in vitro* et *in vivo* (**Goetz et Ghedira, 2012 ; Islam et al., 2016**). De nombreux travaux, essentiellement de laboratoire, sont venus renforcer les résultats des bienfaits thérapeutiques des HE et expliquer les modes d'actions de certains de leurs composants (**De Billerbeck, 2007**). Depuis plus d'une vingtaine d'années, une sérieuse alternative à la médication de synthèse (**Tabari et al., 2019 ; Bouyahya et al., 2019**).

Parfois utilisée en cuisine dans les salades ou les desserts, elle fait partie de la pharmacopée universelle. Depuis l'Antiquité, elle a toujours été cultivée pour ses usages médicaux contre les troubles digestifs, et les tensions nerveuses (**Babulka, 2005 ; Shakeri et al., 2016 ; Petrisor et al., 2022**).

Des travaux se sont également intéressés à son action dans le traitement des troubles gastro-intestinaux, de l'anxiété et de l'agitation. Les propriétés de l'HE s'expliquent par la présence de composés actifs à l'origine présents dans les feuilles et parties aériennes (plante fraîche entière non fleurie) (**Draginic et al., 2021**).

De ce fait, l'objectif assigné à notre travail consiste à asseoir, *in vitro*, le pouvoir antibactérien de la fraction aromatique, en utilisant la technique de diffusion en milieu gélosé en comparaison avec un antibiotique. Enfin, un docking moléculaire *in silico* sera abordé 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. Huiles essentielles : historique

Dans le passé, les anciens assimilaient la distillation et l'évaporation, comme des procédés permettant d'extraire l'esprit de la plante. Cette dernière qualification fait, une fois de plus, référence au concept d'extraction de la force vitale de la plante. Au cours de la Renaissance, un médecin réformateur suisse, du nom de Paracelse (1493-1541), donna un sens particulier au terme HE. L'isolation de cet extrait devrait être, selon lui, le but de la pharmacie (**Garreta, 2007 ; Lardry et Haberkorn, 2007 ; Bardeau, 2009**).

La science des HE prit ensuite le large pour gagner l'Europe au cours des croisades durant le XIII^e siècle. Beaucoup de savants se passionnèrent pour la science de la distillation. Les premières universités Européennes furent à l'origine du démarrage de la Pharmacopée.

Durant les siècles qui suivirent, les HE été principalement utilisées pour leurs vertus thérapeutiques et ne nécessitaient qu'une production minimale, ce qui n'est plus le cas de nos jours. Avec Paracelse se développèrent l'Alchimie et la notion de "Quintessence" des plantes tomba aussitôt dans l'oubli (**Gilly, 1997**).

Les HE font désormais partie de notre quotidien. Leurs utilisations s'étant généralisées dans de nombreux domaines, des industries pharmaceutiques et cosmétiques à l'agro-alimentaire, en passant par l'aromathérapie et les parfums d'ambiance (**Scimeca et Tétou, 2005 ; Anton et Lobstein, 2005 ; Roux, 2008**).

1.2. Définition de l'Huile Essentielle

Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ces composés à se solubiliser dans les graisses par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante (**Zhiri et Baudoux, 2005 ; Grosjean, 2011**).

Cette définition, basée sur les procédés d'extraction, est restrictive et exclut aussi bien les produits obtenus par extraction à l'aide de solvants (concrètes et absolues) que ceux obtenus par tout autre procédé (extraction par fluide supercritique (SFE) et extraction par micro-ondes sans solvant (Solvent Free Microwave Extraction)) (**Figure 1.2**) (**Roux et Catier, 2007**).

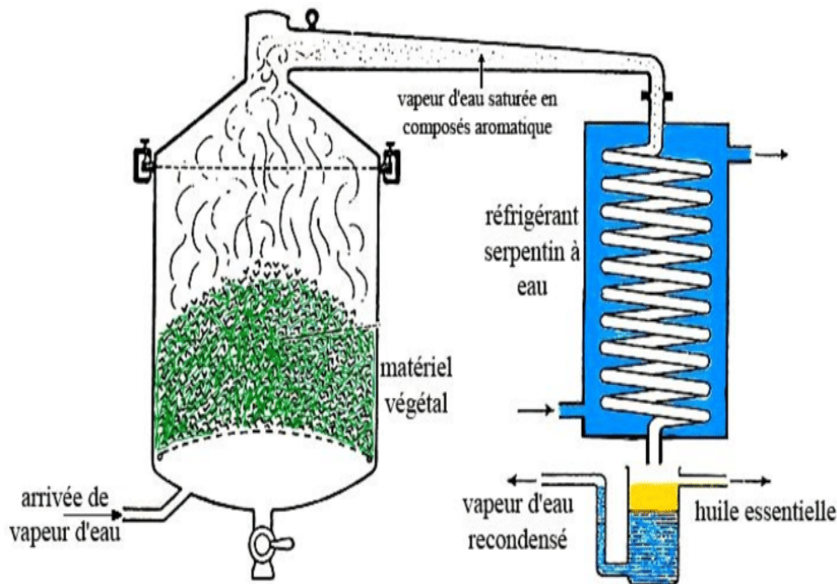


Figure 1.1. Procédé d'entraînement à la vapeur d'eau dans un alambic.

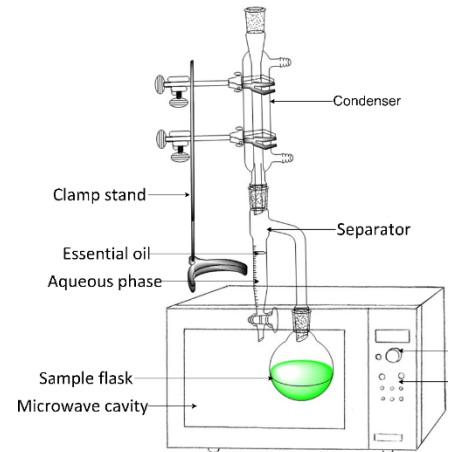


Figure 1.2. Procédé d'extraction assistée par micro-ondes (**Tran et al., 2018**).

Pour certains auteurs (**Roux et Catier, 2007**), il est important de distinguer HE et essence ; cette dernière est une sécrétion naturelle élaborée par l'organisme végétal, contenue dans divers types d'organes producteurs, variable selon la partie de la plante considérée.

1.3. Types des huiles essentielles

Au niveau commercial, différents types d'HE existent (**AFSSAPS, 2008**) :

- HE déterpénée, partiellement ou totalement privée des hydrocarbures monoterpéniques ;
- HE rectifiée, ayant subi une distillation fractionnée afin de supprimer des composants toxiques ;
- HE privée de « X », ayant subi une séparation partielle ou totale d'un composant « X », par un moyen physique.

1.4. Localisation et rendement

Les HE sont des sécrétions naturelles élaborées par le végétal et contenues dans les cellules ou parties de la plante comme celles des fleurs (rose), sommités fleuries (lavande), feuilles (citronnelle), écorces (cannelier), racines (iris), ou graines (muscade). Pour certaines HE comme celles de lavande ou de sauge, c'est la plante entière qui est utilisée (**Parthasarathy et al., 2008**).

Seules les parties sécrétrices ou les plus concentrées de la plante sont récoltées à la période de rendement optimum : avant la floraison (menthes), et après celle-ci (plantes à graines) ou encore après la rosée du matin (fleurs fragiles) (**Sallé, 1991**).

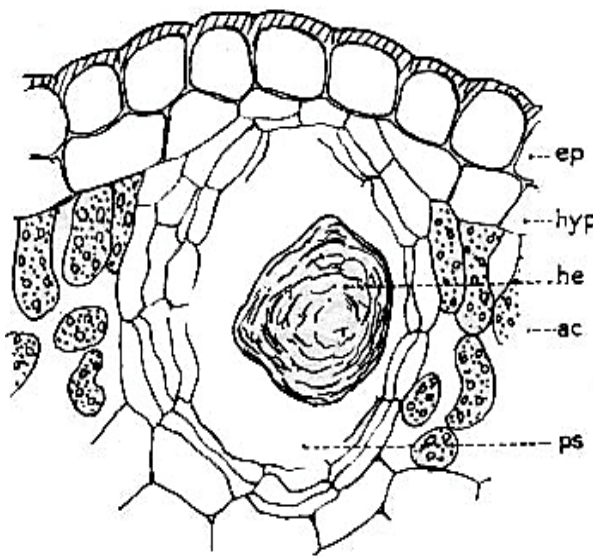


Figure 1.3. Poche sécrétrice de la feuille de rue.
(ep : épiderme ; hyp : hypoderme ; he : huile essentielle; ac : cellules chlorophylliennes)

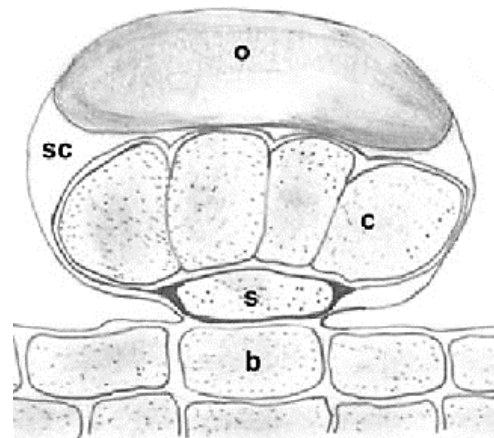


Figure 1.4. Dessin schématique d'un trichome glandulaire sphérique des Lamiaceae.
b : cellules basales ; c : cellules sécrétrices ; sc : cavité sous-cuticulaire ; o : HE.

Les HE sont produits dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des structures histologiques ou glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule (**Bruneton, 1999 ; Anton et Lobstein, 2005 ; Festy, 2009**).

Le rendement le plus faible est observé pour l'iris qui demande environ 4 kg de poudre pour obtenir 1 g d'absolue, ce qui explique le tarif exorbitant de cette huile (**Gilly, 1997 ; Bardeau, 2009**).

1.5. Biosynthèse et composition chimique

Leur masse moléculaire, relativement faible, leur confère un caractère volatil à la base des propriétés olfactives.

La majorité des constituants des HE appartiennent, de façon quasi-exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (**Figure 1.5**). Actuellement, plus de 3000 constituants ont été isolés à partir des essences (**Bruneton, 1999 ; Baser et Buchbauer, 2010**).

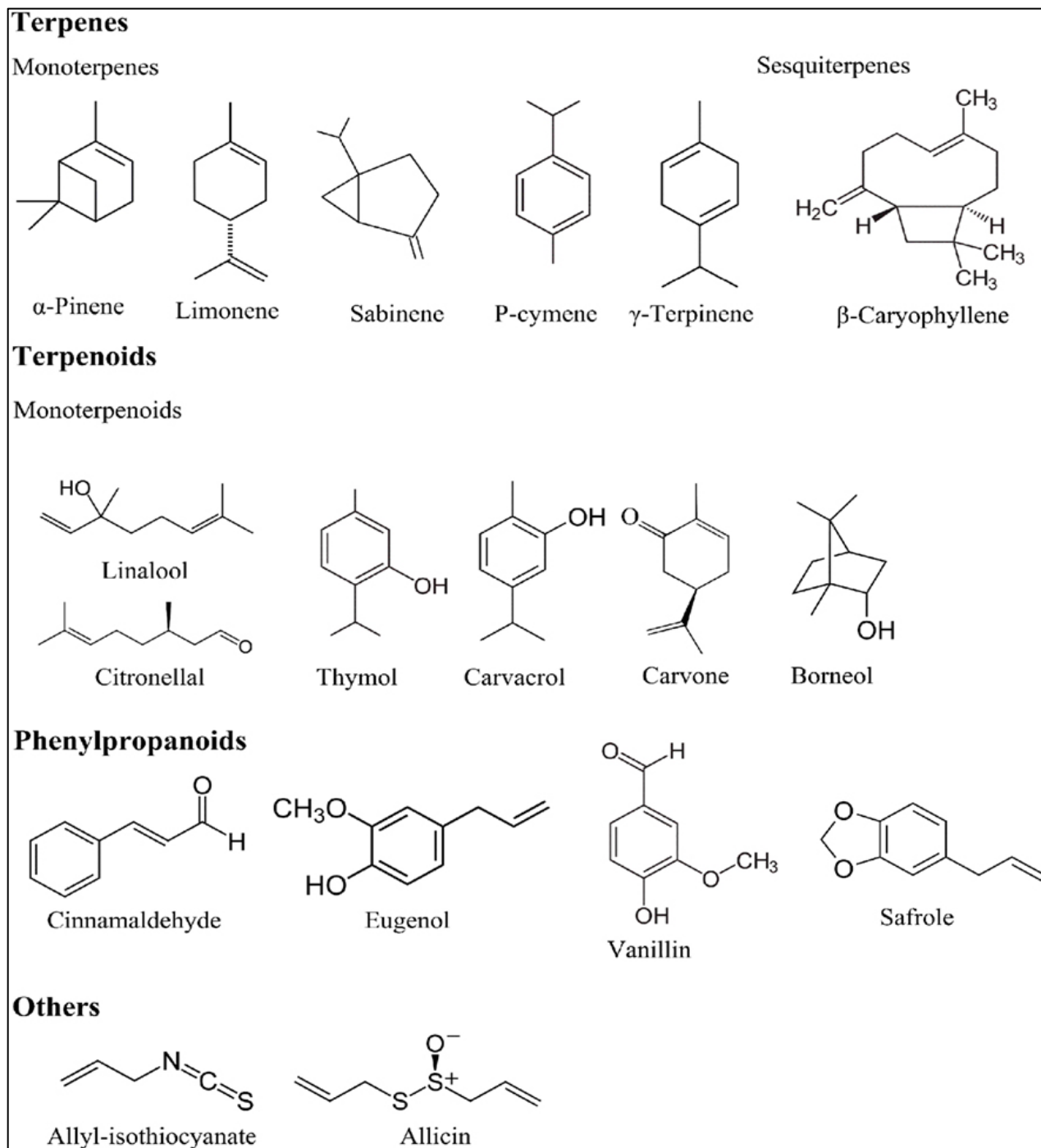


Figure 1.5. Quelques composés chimiques retrouvés dans les huiles essentielles (**Burt, 2004**).

1.6. Toxicité

Les risques allergiques dépendent bien évidemment du terrain allergique du patient, chacun est unique face à ce genre de phénomène. Il est donc important de toujours réaliser un test allergique au creux du coude lors d'une utilisation d'une nouvelle HE.

De plus, un usage prolongé des huiles favorise l'apparition d'un phénomène allergique, c'est pourquoi il est important de réaliser des pauses dans leur utilisation. Des irritations cutanées et des allergies ont été décrites chez des professionnels utilisant des produits pour massage à base d'HE.

Parmi ces molécules, on parle notamment des cétones monoterpéniques comme la menthone, la carvone, la verbénone, le camphre. Cette molécule reconnaissable par son parfum boisé, pourra causer des dommages au niveau des reins si elle est assimilée sur de longues périodes.

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits phytopharmaceutiques, celle des HE est moins investiguée (**Roux et Catier, 2007 ; Bruneton, 1999 ; Pibiri, 2005 ; Martini, 2011**).

1.7. Domaines d'utilisation des Huiles essentielles

La composition chimique des HE leur confère aussi bien des propriétés odorantes qu'antimicrobiennes. Ces caractéristiques offrent des exploitations dans de nombreux domaines.

1.7.1. Aromathérapie

1.7.1.1. Définition de l'aromathérapie

Les HE et les essences extraites des plantes odoriférantes, qui possèdent des vertus médicinales, sont administrées par les différentes voies compatibles avec leur nature huileuse ». L'aromathérapie est donc moins "douce" qu'il n'y paraît. Les HE diffèrent des antibiotiques qui sont, par définition, des substances mortes, hostiles à la vie et perturbatrices des métabolismes vitaux (**Baudoux, 2000**).

1.7.1.2. Intérêt de l'aromathérapie

Deux récepteurs offrent un abord évident quant à la puissance des huiles : la peau et les sphères oto-rhino laryngologique et broncho-pulmonaire. Cette efficacité est due au fait qu'elles contiennent plus de 20 molécules actives différentes, tandis que dans le médicament de synthèse, on ne peut évaluer les interactions de plus de trois molécules.

Beaucoup soulageront diverses douleurs (action anticancéreuse, anti-inflammatoire, antalgique et antispasmodique). Certaines possèdent des propriétés stimulantes et ré-équilibrantes de grandes fonctions : de la digestion et de la circulation (**Zhiri et Baudoux, 2005 ; Goetz, 2007**).

Mais il serait dommage de restreindre l'utilisation des HE sur le plan physique et de ne voir en elles qu'une action moléculaire (**Festy, 2009**).

1.7.2. Aéro-ionisation et désinfection des ambiances

Etant volatiles, les HE sont utilisées en tant qu'agents de préservation pour le contrôle de l'hygiène de l'air des systèmes de climatisation (**De Billerbeck et al., 2002 ; Pibiri, 2005**).

Bien conduite, la diffusion atmosphérique devient un procédé idéal visant à la protection et à la prévention contre les infections nosocomiales et les pathologies hivernales. Cependant, il est important de souligner que l'on ne doit jamais diffuser des HE en continu, ce qui aurait pour effet de saturer l'atmosphère en molécules aromatiques, en le rendant irritant pour les muqueuses des bronches, voire potentiellement toxique (**Pibiri, 2005**).

1.7.3. Industrie agro-alimentaire

Cette application, déjà bien développée, se renforce ces dernières années grâce à des décisions de sécurité importantes. De plus, la tendance actuelle à consommer du « naturel » pousse les industriels à utiliser, de plus en plus, les HE en tant qu'additifs aromatisants. Dans ce contexte, les HE constituent, une fois de plus, une voie d'intérêt et de recherche (**Zaika, 1988 ; Burt, 2004 ; Fisher et Phillips, 2008**).

A titre d'exemple, le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros consommateur d'HE. Aussi, les fabricants d'aliments préparés en utilisent, de plus en plus, car le consommateur recherche davantage les produits avec des ingrédients naturels (**Holley et Patel, 2005**).

1.7.4. Parfumerie et cosmétologie

De même, certains constituants chimiques isolés à partir d'HE peuvent faire l'objet de transformations chimiques donnant naissance à de nouvelles odeurs. Ainsi, à partir de l'eugénol tiré de l'essence de girofle, on aboutira à l'isogénol qui a une odeur d'œillet (**AFSSAPS, 2008**).

C'est le cas du « 1,8-cinéol » connu commercialement sous le nom d'eucalyptol, principal constituant de la majorité des HE d'*Eucalyptus*.

Toutefois, dans le cas où la substance utilisée fait partie de la liste des molécules identifiées comme étant susceptibles d'entraîner des réactions allergiques, telles que le citral, ou le linalool, sa dénomination chimique doit être inscrite parmi la liste des ingrédients (**AFSSAPS, 2008**).

Chapitre II

MATERIEL & METHODES

Chapitre 2 : MATERIEL & METHODES

2.1. Matériel

2.1.1. Huile essentielle

L'HE a été fournie par l'entreprise spécialisée dans la distillation des huiles. L'HE a été extraite à partir de la partie aérienne fraîche de la plante. 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.

2.1.2. Animaux de laboratoire

Nous avons utilisé des souris, de sexe mâle avec un poids qui varie entre 20-28 g.

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*.

2.1.3. Souches bactériennes

Le pouvoir antibactérien a été évalué sur des souches bactériennes isolées des patients, et identifiées dans un laboratoire d'analyses médicales privé. Des bactéries à Gram – (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) et une bactérie à Gram + (*Staphylococcus aureus*) ont été identifiées en utilisant une galerie biochimique.

2.1.4. Milieux de cultures et réactifs

Au cours de notre étude microbiologique, nous avons utilisé des milieux de culture solides pour les bactéries. Un disque de d'antibiotique a été utilisé comme contrôle positif pour les espèces bactériennes.

2.2 Méthodes

2.2.1. Evaluation du pouvoir antibactérien par aromatoگرامme

Dans cette méthode (**Figure 3.1**), nous avons utilisé des disques stériles, de 6 mm de diamètre, imprégnés avec des quantités croissantes en HE. Le disque sera déposé au centre d'une boîte contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé. L'évaluation du pouvoir antibactérien est identique à celui de l'antibiogramme.

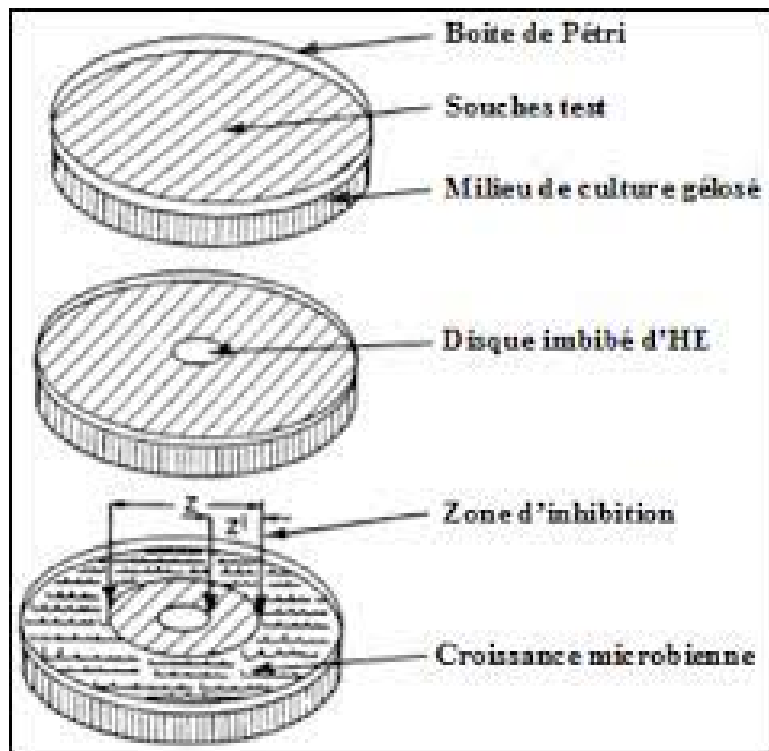


Figure 2.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé (aromatogramme).

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

2.2.2.2. Déroulement de l'essai

Nous avons constitué des lots contenant chacun 3 souris (**Figure 2.2**). Les différents traitements ont été appliqués 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 ;
- Un second lot Contrôle + qui recevra une quantité d'une pommade contenant comme principe actif un anti-inflammatoire stéroïdien ;
- Lot du Contrôle négatif recevra une quantité d'huile d'amande.
- Lot Témoin où aucun traitement n'a été appliqué.



Figure 2.2. Constitution des différents lots des souris (Originale, 2022).

2.2.2.3 Etude Statistique

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

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

La partie *in silico* de notre étude s'est focalisée sur l'étude des différentes interactions entre le site actif de deux protéines enzymatiques impliquées dans le processus inflammatoire, ainsi que les composés majoritaires et caractéristiques de l'HE (Figure 2.5) référencés dans la littérature scientifique (Allahverdiyev et al., 2004 ; Babulka et al., 2005 ; Hăncianu et al., 2008 ; Moradkhani et al., 2010 ; Bounihi et al., 2013 ; Abdellatif et al., 2014 ; Abdel-Naime et al., 2019 ; Petrisor et al., 2022), en comparaison avec de plusieurs médicaments anti-inflammatoires.

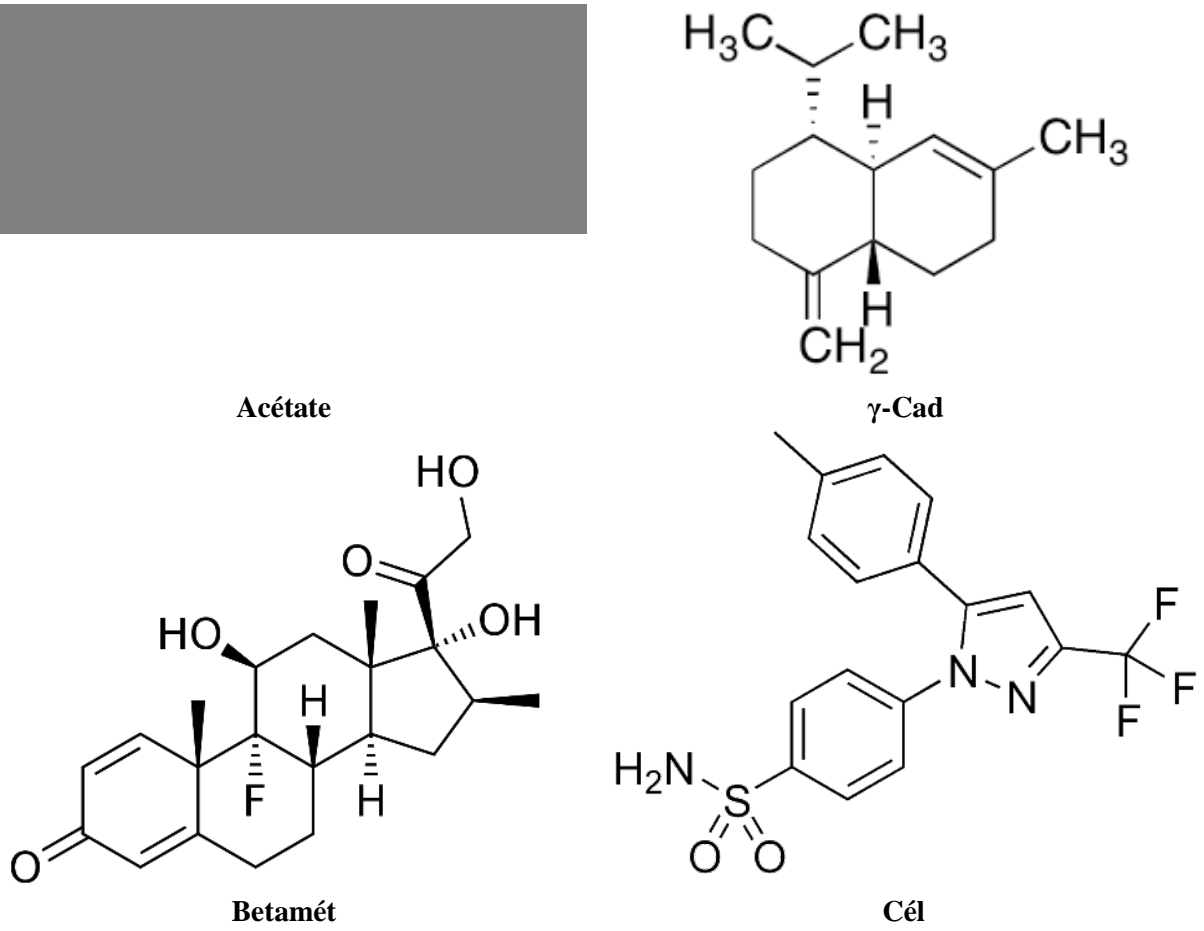


Figure 2.5. Structure chimique 2D de quelques ligands téléchargés de la base de données PubChem.



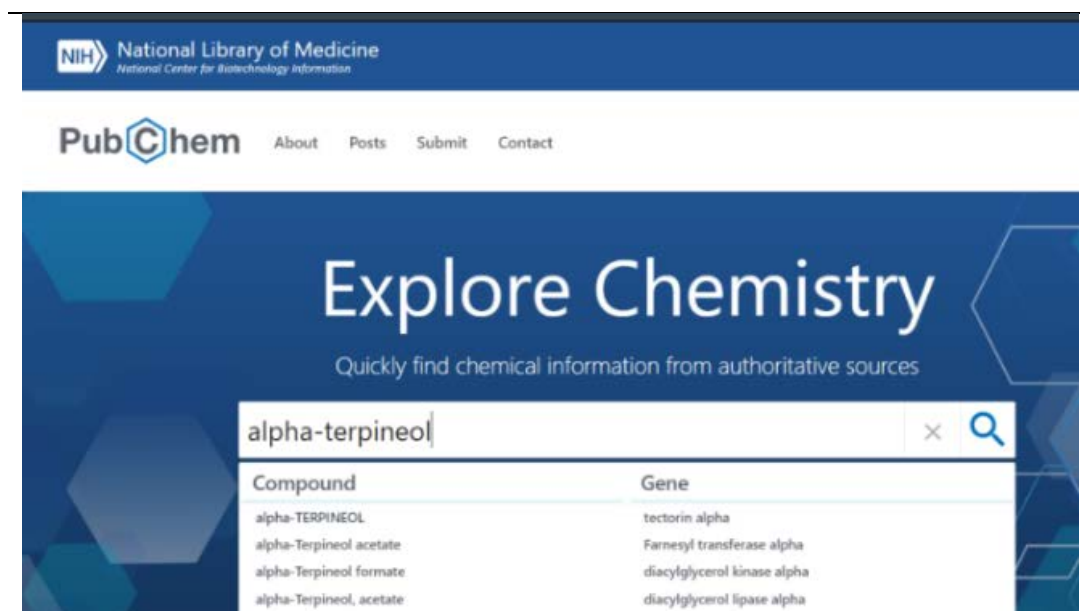
Figure 2.6. Structure tridimensionnelle téléchargés de la base PDB.

Les molécules d'eau et les inhibiteurs déjà amarrés ainsi que chaînes peptidiques supplémentaires ont été supprimés de la protéine, et qui sera par la suite convertie au format PDBQT. Les ligands (structure 3D) ont été téléchargés de la base des données nommée PubChem (<https://pubchem.com>). Plusieurs complexes amarrés ont été obtenus et évalués sur la base de valeurs énergétiques et comparés séparément. Enfin, les interactions ont été visualisées (**Figure 2.7**).

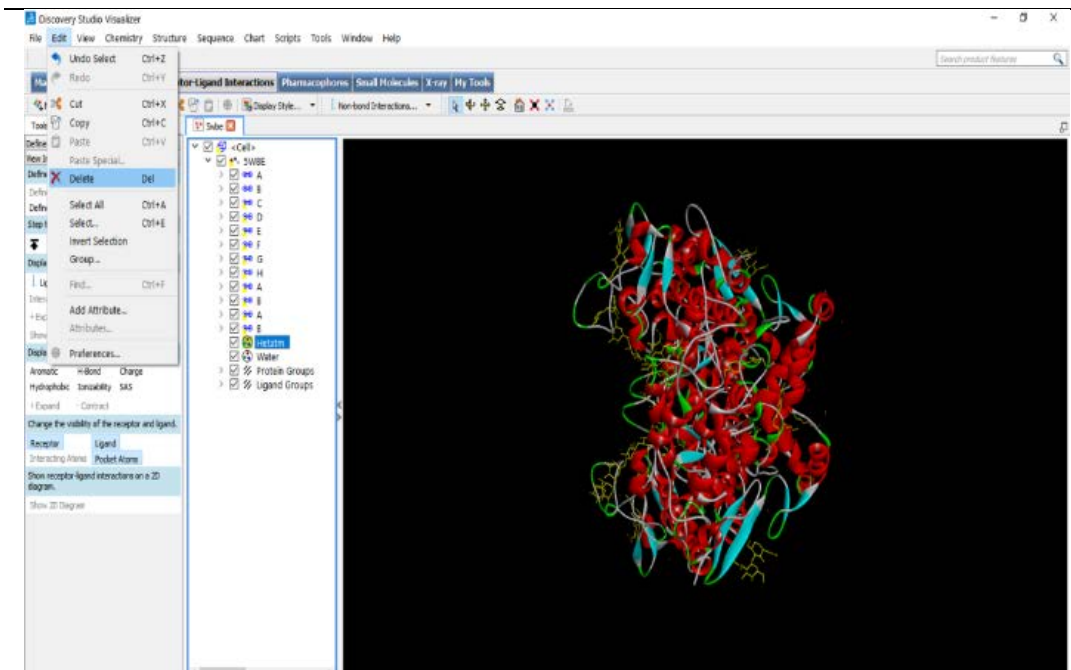


Accès à la Banque de Données des Protéines (Protein Data Bank)

[<https://www.rcsb.org/>]



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



Traitement des protéines

Figure 2.7. Différentes étapes du docking moléculaire multiple *in silico*.

Chapitre III

RESULTATS & DISCUSSION

Chapitre 3 : RESULTATS & DISCUSSION

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

L'activité antimicrobienne de l'HE a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, *in vitro*, sur plusieurs 3 souches bactériennes incriminées dans les infections urinaires. Les résultats de cette étude antimicrobienne sont rapportés dans le Tableau 3.1. A noter que le diamètre du disque (6 mm) a été inclus dans le calcul de la zone d'inhibition.

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

Souches bactériennes	Aromatogramme			ATB
	Quantité HE (µL/disque)			
	1	5	10	
<i>S. aureus</i>	-	-	-	6
<i>P. aeruginosa</i>	12	17	-	6
<i>E. coli</i>	1	15	14	6

HE : Huile essentielle ; ATB : Antibiotique.

L'activité antimicrobienne de l'essence aromatique a été effectuée en utilisant la technique de diffusion en milieu gélosé (aromatogramme) avec l'application de différents volumes et ce vis-à-vis de 3 souches microbiennes isolées des urines des patients.

Plusieurs études se sont intéressées aux propriétés anti-infectieuses de l'HE (Abdellatif et al., 2014 ; Astani).

Les micro-organismes cibles sont considérés comme appartenant à des souches pathogènes humaines (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*) et à un agent pathogène d'origine alimentaire commun (*Listeria monocytogenes*).

L'huile a montré une forte activité contre toutes les souches testées avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) très faibles. Les zones d'inhibition variaient entre (17 et 18 mm) pour les bactéries à Gram positif et (14-21 mm) pour les bactéries pathogènes à Gram négatif.

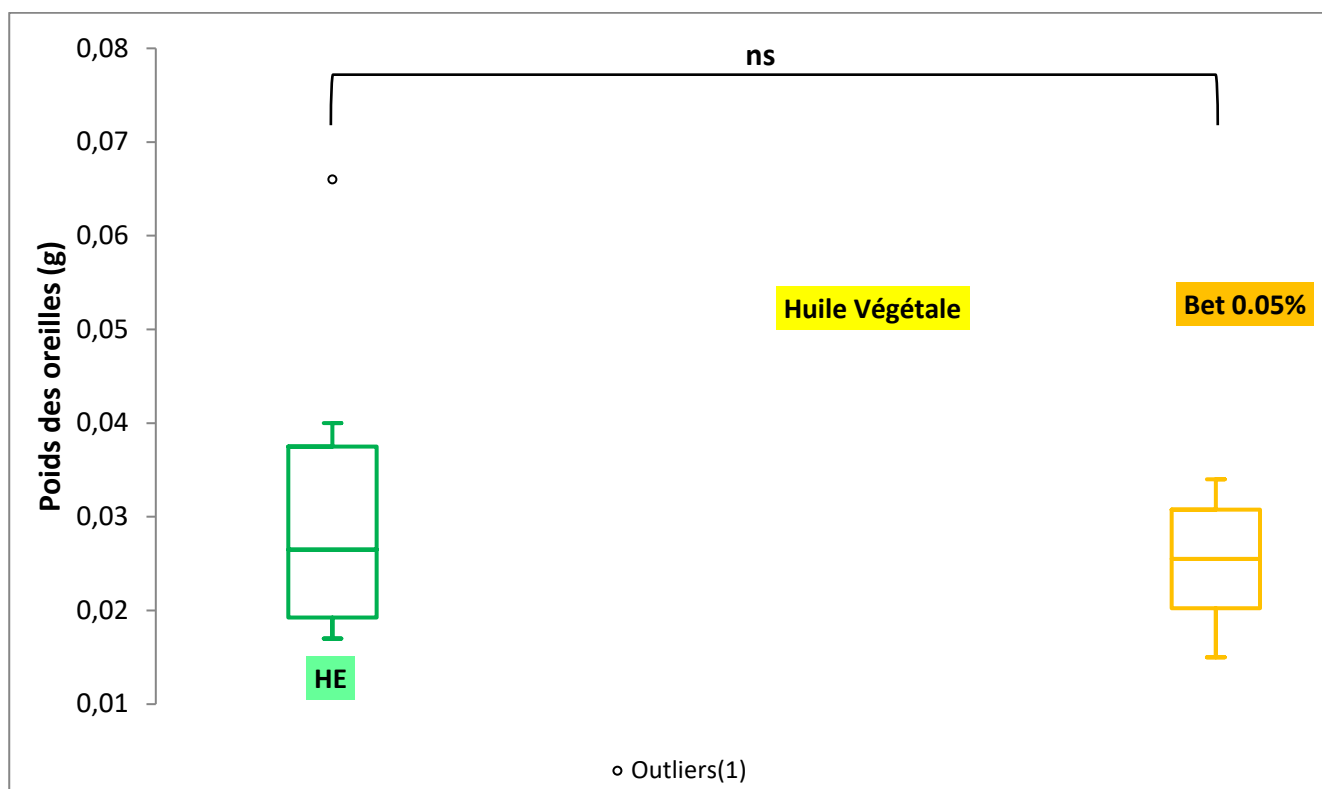
Généralement, les huiles essentielles sont plus actives contre les bactéries à Gram positif que contre les bactéries à Gram négatif.

La plante possède des propriétés antimicrobiennes contre certaines souches bactériennes et fongiques (notamment *candida albicans*, *staphylocoque aureus*, *listeria monocytogenes*), ce qui provoque l'arrêt de leur prolifération (Hăncianu et al., 2008).

Dans l'ensemble, les échantillons testés ont démontré des puissances inhibitrices variables contre *S. aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* avec des CMI comprises entre 1,65 et 191,40 µg/mL, alors qu'aucune action antibactérienne n'a été enregistrée contre *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*.

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, sont présentés 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 les médicaments de synthèse.

De plus, aucune différence ($p > 0.05$) sur le plan statistique (**Annexe 2**), au test de Tukey de comparaison par paires, n'a été enregistrée entre tous les traitements, ce qui suggère que cet examen macroscopique ne peut être objectif. En outre, le nombre d'animaux utilisé pour chaque lot (3) est faible, ne pouvant pas suggérer une réelle exactitude des résultats.

Dans l'œdème expérimental induit par un traumatisme chez le rat, l'extrait a également été réduit et inhibé de manière significative ($p < 0,001$) l'œdème dans les différentes phases de la réponse inflammatoire.

Cela indique que l'extrait de cette herbe aromatique a une activité anti-inflammatoire importante pouvant être en relation avec l'inhibition de la libération des médiateurs inflammatoires (**Bounihi et al., 2013**).

L'utilisation d'herbes aromatiques pour soulager la douleur a une longue histoire dans le monde de la médecine. Le fait que l'HE ait des propriétés anti-inflammatoires soutient l'utilisation traditionnelle de cette herbe dans le traitement de nombreuses maladies associées à l'inflammation ou à la douleur (**Bounihi et al., 2013**).

De cette façon, l'utilisation traditionnelle de l'HE est absolument justifiée dans le traitement des maladies inflammatoires (**Zarei et al., 2015**).

Fait intéressant, plusieurs travaux de recherche ont démontré l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles et/ou de leurs constituants, soulignant leur capacité à piéger les radicaux libres, à moduler le métabolisme de l'acide arachidonique et la production de cytokines ainsi que l'expression de gènes pro-inflammatoires (**Miguel, 2010; de Lavor et al., 2018**).

Si certaines huiles sont capables d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), certaines d'entre elles, leurs principaux composants (citrал, géraniol et citronellol), peuvent également supprimer les réponses d'adhésion aux neutrophiles induites par le TNF- α (**Abe et al., 2003**).

Plusieurs composants phénoliques présents se sont révélés bénéfiques dans des modèles animaux de myocardite, tels que les flavonoïdes quercétine, lutéoline et apigénine, car ils modulent la réponse immunitaire, diminuent l'inflammation et peuvent par la suite supprimer le remodelage des tissus cardiaques, ce qui se produit dans la cardiomyopathie caractéristique de la phase chronique de la myocardite (**Milenković et al., 2010; Zhang et al., 2016; Wu et al., 2020**).

D'après l'étude de **Zarei et al. (2014)**, la plante active les enzymes qui décomposent les acides gras et semble être capable de traiter la stéatose hépatique. De plus, elle exerce un effet anti-inflammatoire en diminuant l'activité des cytokines inflammatoires (**Kim et al., 2017**).

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).

D'après les résultats obtenus, il apparaît clairement que l'acétate de géranyle, un composé de la famille des esters monoterpéniques oxygénés, a présenté le meilleur score d'affinité, suivi par les deux anti-inflammatoires étudiés qui ont présenté un score d'affinité. Deux autres composés de la famille des sesquiterpènes hydrocarbonées ont présenté aussi des meilleurs scores avec des valeurs. Par ailleurs, l'acétate est impliqué dans des liaisons H avec l'Aspartate et la Cystéine, et dans des liaisons hydrophobiques avec plusieurs acides aminés (Cystéine Arginine et Cystéine).

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

LIGAND	Pubchem ID	Acide Aminé	Distance Å	Catégorie	Type de Liaison	
	5492	SER154		Liaison H		
		ASP158				
		ASN34, ASP158				
		ASN34	4,2359			
			5,04353			
			5,40332			
			5,63333			
Cél	2662	ASP158	4,85733			
		ARG374		Liaison H		
		ASN375				
		ASN375				
		ARG374		Electrostatique		
		VAL145		Hydrophobe	Pi-Sigma	
		PHE142		/	Pi-Sulfur	
			6,43268	Hydrophobe	Alkyl	
			6,66854		Alkyl	
			6,35906		Alkyl	
	VAL145	6,71503		Pi-Alkyl		
Acétate	91750110	ASP158		Liaison H	Liaison H	
		CYS36			Alkyl	
		CYS47			Alkyl	
		CYS47			Alkyl	
		PRO153				
		PRO153	4,04609			
			5,18631			
			4,42772			
			4,50651			
			ARG157	4,52885		Pi-Alkyl
	92313	CYS36				
		CYS36				
		CYS47				
		PRO153			Alkyl	
			3,39972		Alkyl	
			4,59806		Alkyl	
			2,32613		Alkyl	
			2,19833		Alkyl	
			PRO156	2,40488		Alkyl
		Gène D	5317570	ILE89		
LEU115				Hydrophobe	Alkyl	

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

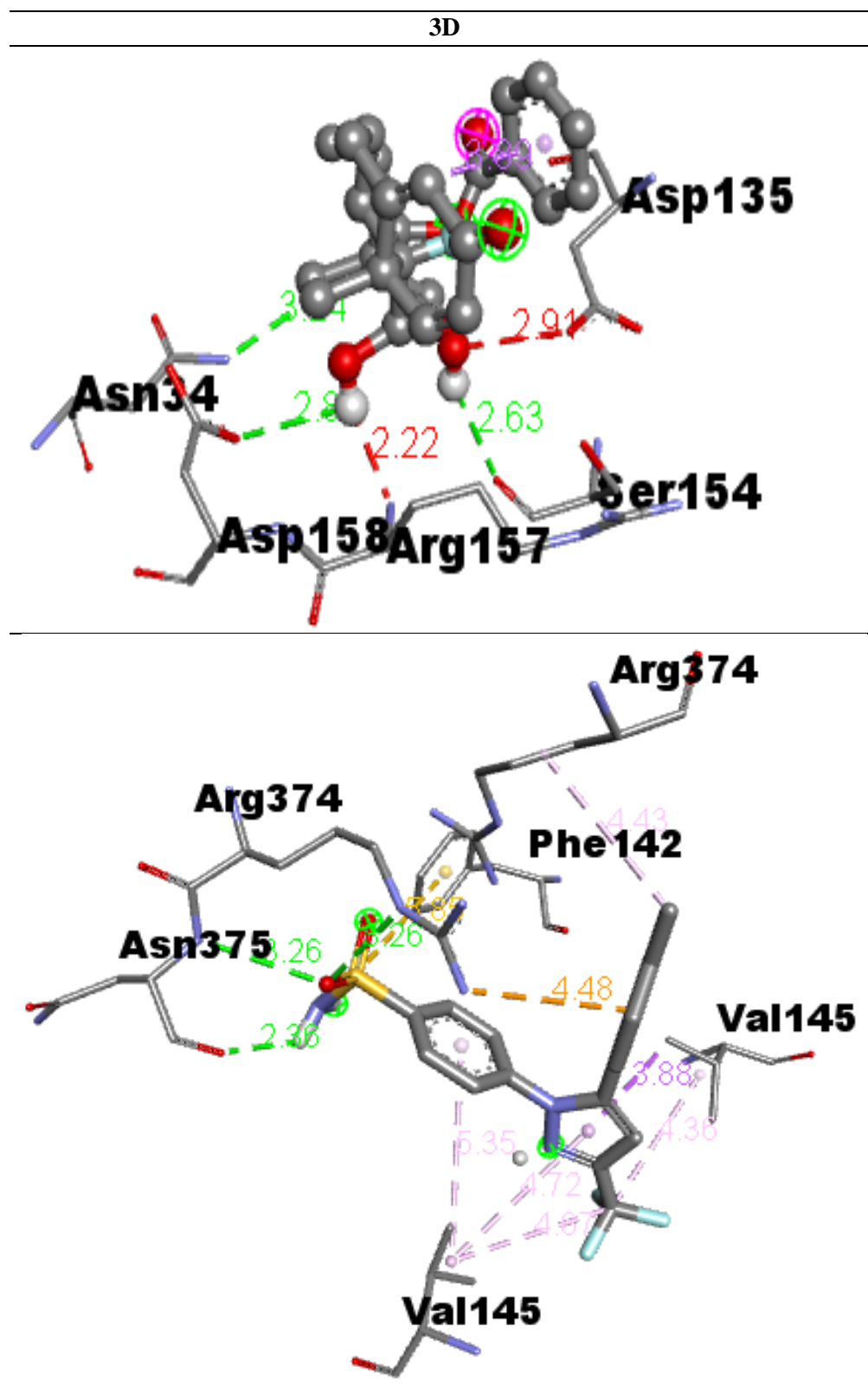


Figure 3.3. Structures 3D des interactions entre les 5 meilleurs ligands avec le site actif.

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, l'acétate de géranyle est impliqué dans différents types de liaison avec le site actif où nous avons noté la présence de plusieurs liaisons hydrophobes avec différents acides aminés (Sérine, Tryptophane, Méthionine, Glycine, Cystéine) (Figure 3.4).

En outre et pour le même composé, des liaisons H ont été établies avec d'autres acides aminés (Sérine, Tryptophane) du site actif de l'enzyme. Le ligand est l'AINS qui a établi le plus d'interaction avec le site actif avec la présence des liaisons hydrogène, hydrophobe et halogène entre différents acides aminés.

Pour cette étude, les structures cristallines des complexes enzymatiques des deux enzymes avec un cocrystal (<http://www.pdb.org>) ont été choisies comme cible protéique utilisée pour l'étude d'amarrage moléculaire.

A noter que ces deux protéines enzymatiques présentent une grande ressemblance, mais ont des fonctions légèrement différentes. La différence majeure entre la structure est une substitution de ILE par VAL. 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.

Au stade actuel des connaissances, dans lequel les sites de liaison pour des inhibiteurs spécifiques des enzymes ont déjà été décrits et la structure protéique tridimensionnelle de ces enzymes est clairement établie, l'utilisation de techniques modernes de modélisation moléculaire devrait permettre de trier de nouveaux composés de haute affinité et spécificité.

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

LIGAND	Affinité de liaison (kcal/mol)	Acide Aminé	Distance	Catégorie	Type de liaison	
Bétamét			3,58342	Liaison H	Liaison carbone-hydrogène	
		PRO156				
			2,11538	Liaison H; Halogène	Liaison carbone-hydrogène	
			1,88321			
			2,83036			
			2,64458			
			2,51179			
		PHE371			Liaison H; Halogène	Carbone-H; Halogène (fluor)
					Liaison H	
		LYS532				
		SER121			Halogène	
		SER121				
				4,97143		Pi-Pi T-shaped
				4,185		Alkyl
				5,33808		Alkyl
				5,099	Hydrophobe	Pi-Alkyl
				5,08984		
				4,38191		
				4,63898		
Acétate		SER49				
		TRP323		Liaison H		
		MET48				Carbone-hydrogène
				2,63318		
				5,13692		
				4,6805		
				5,04307		
				5,15636		
		PRO153				
		PRO156				Pi-Alkyl
Gamma		PRO153				
		PRO153				
				5,32643		
				4,32877		Alkyl
			4,82096		Alkyl	
sodique			2,36804		Hydrogène classique	
			2,14143			
		CYS47			Liaison H	
		GLN327				
		CYS47				H Pi-Donneur
		PRO156				Pi-Alkyl
				4,63042		Pi-Alkyl
			4,29614		Pi-Alkyl	

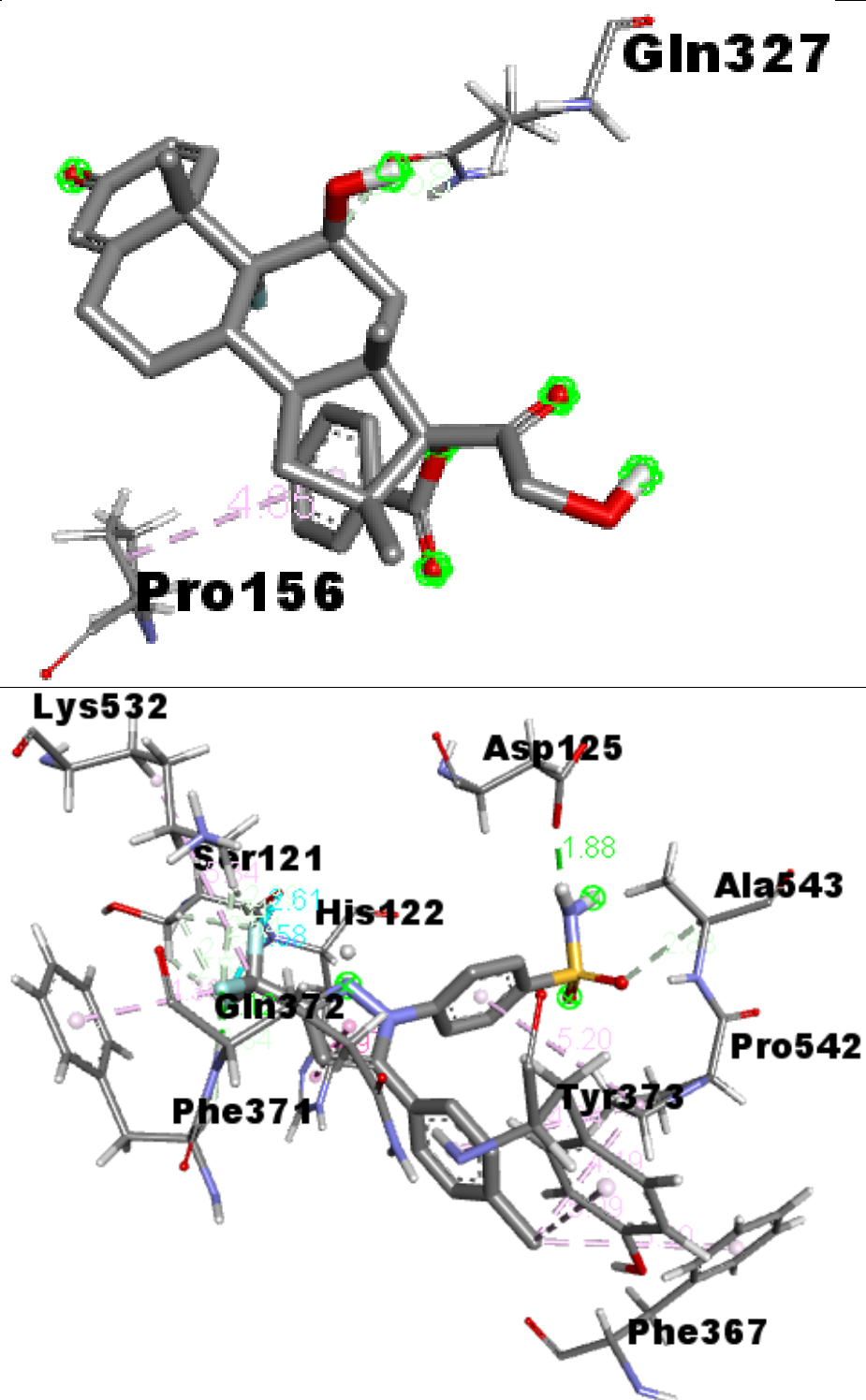


Figure 3.4. Structure 3D des différentes interactions ligand avec le site actif.

Les analyses mathématiques accompagnent les études *in silico* afin de permettre la réduction des coûts et du temps pour obtenir des résultats positifs, en observant les structures moléculaires et leurs affinités possibles.

Dans ce contexte, l'un des principaux types d'études en cours par la communauté scientifique est l'étude *in silico* et *in vivo* des inhibiteurs des processus inflammatoires pour la recherche de nouvelles molécules sélectives.

L'ester monoterpénique oxygéné s'est distingué pour sa meilleure affinité pour le site catalytique. Dans le même sillage, **Goncalves et al. (2012)** ont démontré que l'HE de *Thapsia minor* et son constituant principal, l'acétate, inhibaient de manière significative la production d'oxyde nitrique induite par le LPS, démontrant des propriétés anti-inflammatoires *in vitro*, à une concentration qui n'affectait pas la viabilité des cellules de mammifères, telles que les macrophages et les kératinocytes.

En outre, une étude a révélé que l'acétate est doué de propriétés anti-inflammatoires, donnant une puissante inhibition de la réponse inflammatoire cutanée (**Pérez et al., 2011**). Malheureusement, en raison du nombre limité d'études sur l'acétate, la recherche dans ce domaine en est à ses débuts, avec seulement des études précliniques *in vitro* ou des expérimentations animales.

CONCLUSION

La thérapeutique des pathologies humaines se base principalement sur l'usage des médicaments de synthèse. En aromathérapie scientifique, il s'agit de mettre en valeur les propriétés pharmacologiques des PAM en s'appuyant sur leurs profils chimiques.

L'objectif assigné à ce travail était l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle distillée, *in vitro*, sur des souches bactériennes isolées des infections humaines urinaires. Cependant, aucune conclusion ne peut être dégagée de notre résultat eu égard du manque de répétition et de la gamme restreinte de souches utilisées.

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

Cette étude a démontré une grande affinité d'interaction entre les monoterpènes oxygénés, particulièrement l'acétate de géranyle, une ester terpénique caractéristique de l'essence vis-à-vis des enzymes.

Dans ce contexte, l'un des principaux types d'études en cours par la communauté scientifique est l'étude *in silico* des inhibiteurs des processus inflammatoires pour la recherche de nouvelles molécules sélectives pouvant inhiber un récepteur protéique.

Comme perspectives, il serait intéressant d'apprécier les actions antimicrobienne et anti-inflammatoire de cette huile aromatique, en comparaison avec les antibiotiques et/ou anti-inflammatoires de synthèse, afin de dégager des conclusions sur les possibles effets synergie-antagonisme.

Par ailleurs, élargir la gamme des micro-organismes testés sera aussi un autre créneau de recherche à privilégier, en testant l'effet inhibiteur de l'huile aromatique ou de ses composés majoritaires et minoritaires sur des germes multi-résistants.

La cytotoxicité de ces molécules devra également être explorée sur cultures cellulaires, avant d'être évaluée *in vivo*.

Références Bibliographiques

1. Abdellatif, F., Boudjella, H., Zitouni, A., & Hassani, A. (2014). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves L. EXCLI journal, 13, 772.
2. Abdel-Naime, W. A., Fahim, J. R., Fouad, M. A., & Kamel, M. S. (2019). Antibacterial, antifungal, and GC–MS studies. South African Journal of Botany, 124, 228-234.
3. Abe, S., Maruyama, N., Hayama, K., Ishibashi, H., Inoue, S., Oshima, H., & Yamaguchi, H. (2003). Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential oils. Mediators of inflammation, 12(6), 323-328.
4. AFNOR. (2000). Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles. AFNOR, Paris, France.
5. AFSSAPS (Agence Française de Sécurité des Produits Sanitaires) (2008). Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles : Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. Paris, France.
6. Allahverdiyev, A., Duran, N., Ozguven, M. & Koltas, S. (2004). Antiviral activity of the volatile oils against Herpes simplex virus type-2. Phytomedicine, 11(7-8), 657-661.
7. Astani, A., Heidary Navid, M., & Schnitzler, P. (2014). Attachment and penetration of acyclovir-resistant herpes simplex virus are inhibited Extract. Phytotherapy Research, 28(10), 1547-1552.
8. Babulka, P. (2005). La mélisse. Phytotherapie, 3(3), 114-117.
9. Bardeau, F. (2009). Les huiles essentielles: Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Edition Fernand Lanore.
10. Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (Eds.). (2010). Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC Press.
11. Baudoux, D. (2000). L'aromathérapie, se soigner par les huiles essentielles. Edition Douce Alternative, Biarritz, France.
12. 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.
13. Bounihi, A., Hajjaj, G., Alnamer, R., Cherrah, Y., & Zellou, A. (2013). *In vivo* potential anti-inflammatory activity of essential oil. Advances in Pharmacological Sciences, 2013.
14. Bouyahya, A., Assemian, I. C. C., Mouzount, H., Bourais, I., Et-Touys, A., Fellah, H., & Bakri, Y. (2019). Could volatile compounds from leaves and fruits of *Pistacia lentiscus* constitute a novel

source of anticancer, antioxidant, antiparasitic and antibacterial drugs?. *Industrial Crops and Products*, 128, 62-69.

15. Bruneton J. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Editions Tec & Doc, Paris, France.
16. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
17. Chandak, N., Kumar, P., Kaushik, P., Varshney, P., Sharma, C., Kaushik, D., & Sharma, P. K. (2014). Dual evaluation of some novel 2-amino-substituted coumarinylthiazoles as anti-inflammatory–antimicrobial agents and their docking studies with COX-1/COX-2 active sites. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(4), 476-484.
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 Billerbeck, V. G. (2002). Essais d'utilisation d'huiles essentielles en traitement de l'air. Les contaminants biologiques des biens culturels, 2, 345.
20. De Billerbeck, V. G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5(5), 249-253.
21. 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*.
22. Draginic, N., Jakovljevic, V., Andjic, M., Jeremic, J., Srejovic, I., Rankovic, M., & Milosavljevic, I. (2021). *Melissa* as a nutritional strategy for cardioprotection. *Frontiers in Physiology*, 12, 661778.
23. Drozd, J., & Anuszevska, E. (2003). The effect of the extract on immune response in mice. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 60(6), 467-470.
24. Dujardin, S., Charon, J., & Joachim, F. (2010). Données récentes sur la réaction inflammatoire. *Le Fil Dentaire*. Sous presse.
25. El Haib, A. (2011). Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse de Doctorat, Université Toulouse III-Paul Sabatier, France.
26. Festy, D. (2009). *Les huiles essentielles, ça marche! : Tous les bons gestes pour se soigner autrement*. Leduc. s Éditions.
27. Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Trends in Food Science & Technology*, 19(3), 156-164.
28. Fournier, P. E., Leal, S., & Ziltener, J. L. (2008). Anti-inflammatoires. *Rev Med Suisse*, 4, 1702-5.
29. Garreta, R. (2007). *Des simples à l'essentiel: de l'herboristerie à l'aromathérapie, pratiques et représentations des plantes médicinales*. Presses Univ. du Mirail.

30. Gilly, G. (1997). Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse: botanique, culture, chimie, production et marché. Editions Harmattan.
31. Goetz, P. (2007). Aromathérapie en pathologie digestive. *Phytothérapie*, 5(1), 21-24.
32. Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). *Phytothérapie anti-infectieuse*. Springer Science & Business Media.
33. Gokce, S., Tureyen, G. A., & Gokcimen, A. (2018). Effects of *Hypericum perforatum*, clinoptilolite and hydrocolloid dressing on wound healing in diabetic rats. *Wound Medicine*, 22, 14-22.
34. Goncalves, M. J., Cruz, M. T., Tavares, A. C., Cavaleiro, C., Lopes, M. C., Canhoto, J., & Salgueiro, L. (2012). Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. *Industrial Crops and Products*, 35(1), 166-171.
35. Grosjean, N. (2011). *Les huiles essentielles: Se soigner par l'aromathérapie*. Editions Eyrolles.
36. 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.
37. Hăncianu, M., Aprotosoiaie, A. C., Gille, E., Poiată, A., Tuchiluş, C., Spac, A., & Stănescu, U. (2008). Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of essential oil from Romania. *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*, 112(3), 843-847.
38. Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4), 273-292.
39. 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.
40. Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, 3, 12.
41. Inouye, S., & Abe, S. (2007). Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie*, 5(1), 2-4
42. Islam, M., Mata, A., Aguiar, R., Paz, M. F., Alencar, M. V., Ferreira, P., & Melo-Cavalcante, A. (2016). Therapeutic potential of essential oils focusing on diterpenes. *Phytotherapy Research*, 30(9), 1420-1444.
43. Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2012). *La connaissance des huiles essentielles : Qualitologie et aromathérapie : entre science et tradition pour une application médicale raisonnée*. Collection *Phytothérapie pratique*, Springer-Verlag, Paris, France.
44. Kim, J., Lee, H., Lim, J., Oh, J., Shin, S. S., & Yoon, M. (2017). The angiogenesis inhibitor ALS-L1023 from lemon-balm leaves attenuates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease through regulating the visceral adipose-tissue function. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 846.

45. Kowalski, R., Kowalska, G., Jankowska, M., Nawrocka, A., Kałwa, K., Pankiewicz, U., & Włodarczyk-Stasiak, M. (2019). Secretory structures and essential oil composition of selected industrial species of Lamiaceae. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 18, 53-69.
46. Lardry, J. M., & Haberkorn, V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinésithérapie, la revue*, 7(61), 14-17.
47. Lin, C. T., Chen, C. J., Lin, T. Y., Tung, J. C., & Wang, S. Y. (2008). Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata. *Bioresource Technology*, 99(18), 8783-8787.
48. Martoja, R., & Martoja-Pierson, M. (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale*.
49. Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.
50. Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.
51. Milenković, M., Arsenović-Ranin, N., Stojić-Vukanić, Z., Bufan, B., Vučićević, D., & Jančić, I. (2010). Quercetin ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 13(3), 311-319.
52. Moradkhani, H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri, B., Sadat-Hosseini, M., Fayazi-Barjin, A., & Meftahizade, H. (2010). *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(25), 2753-2759.
53. Mrozovski, J. M. (2022). Pour une utilisation raisonnée des anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Actualités Pharmaceutiques*, 61(615), 47-51.
54. Muster, D. (2005). Médicaments de l'inflammation. *EMC-Stomatologie*, 1(1), 21-29.
55. Parthasarathy, V. A., Chempakam, B., & Zachariah, T. J. (Eds.). (2008). *Chemistry of spices*. CABI.
56. Peiró, P. S., Galve, J. J. G., Lucas, M. O., & Tejero, S. S. (2011). *Melissa officinalis* L. *Medicina naturista*, 5(1), 36-38.
57. Pérez G, S., Zavala S, M., Arias G, L., & Ramos L, M. (2011). Anti-inflammatory activity of some essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 23(5), 38-44.
58. Petrisor, G., Motelica, L., Craciun, L. N., Oprea, O. C., Ficai, D., & Ficai, A. (2022). *Melissa*: Composition, pharmacological effects and derived release systems—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3591.
59. Pibiri, M. C., & Roulet, C. A. (2005). *Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles*. Thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique de Lausanne, Suisse.
60. Rademaker, M. (1994). Allergic contact dermatitis from lavender fragrance in Diffiam® gel. *Contact Dermatitis*, 31(1), 58-59.
61. Roux, D. (Ed.). (2008). *Conseil en aromathérapie*. Wolters Kluwer France.
62. Roux, D., & Catier, O. (2007). *Botanique Pharmacognosie Phytothérapie*. Wolters Kluwer France.

63. Salle JL. (1991). Le totum en phytothérapie : Approche de phyto-biothérapie. Edition Frison-Roche, Paris, France.
64. Scimeca, D., & Tétau, M. (2005). Votre santé par les huiles essentielles. Alpen Editions sam.
65. Sforcin, J. M., Amaral, J. T., Fernandes Jr, A., Sousa, J. P. B., & Bastos, J. K. (2009). Lemongrass effects on IL-1 β and IL-6 production by macrophages. *Natural product research*, 23(12), 1151-1159.
66. Shakeri, A., Sahebkar, A., & Javadi, B. (2016). *Melissa officinalis* L.–A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology*, 188, 204-228.
67. Tabari, M. A., Youssefi, M. R., Nasiri, M., Hamidi, M., Kiani, K., Samakkhah, S. A., & Maggi, F. (2019). Towards green drugs against cestodes: Effectiveness of *Pelargonium roseum* and *Ferula gummosa* essential oils and their main component on *Echinococcus granulosus*. *Veterinary parasitology*, 266, 84-87.
68. Teuscher, E., Anton, R., & Lobstein, A. (2005). Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et leurs huiles essentielles. Tec et Doc.
69. Tran, T. H., Nguyen, H. H. H., Nguyen, D. C., Nguyen, T. Q., Tan, H., Nhan, L. T. H., & Nguyen, T. D. (2018). Optimization of microwave-assisted extraction of essential oil from vietnamese basil (*Ocimum basilicum* L.) using response surface methodology. *Processes*, 6(11), 206.
70. Varma, S., Blackford, S., Statham, B. N., & Blackwell, A. (2000). Combined contact allergy to tea tree oil and lavender oil complicating chronic vulvovaginitis. *Contact Dermatitis*, 42(5), 309-310.
71. Weill, B., & Batteux, F. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. De Boeck Supérieur.
72. Wu, S., Wang, H. Q., Guo, T. T., & Li, Y. H. (2020). Luteolin inhibits CVB3 replication through inhibiting inflammation. *Journal of Asian natural products research*, 22(8), 762-773.
73. Zaika, L. L. (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination1. *Journal of Food Safety*, 9(2), 97-118.
74. Zarei, A., Ashtiyani, S. C., Taheri, S., & Rasekh, F. (2014). Comparison between effects of different doses atorvastatin on the activity of liver enzymes in hypercholesterolemia rats. *Avicenna journal of phytomedicine*, 4(1), 15.
75. Zarei, A., Changizi-Ashtiyani, S., Taheri, S., & Hosseini, N. (2015). A brief overview of the effects extract on the function of various body organs. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 17(7).
76. Zhang, S., Liu, X., Sun, C., Yang, J., Wang, L., Liu, J., & Jing, Y. (2016). Apigenin attenuates experimental autoimmune myocarditis by modulating Th1/Th2 cytokine balance in mice. *Inflammation*, 39(2), 678-686.
77. Zhiri, A., & Baudoux, D. (2005). Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies: aromathérapie scientifique. Luxembourg: Édition Inspir Development.

ANNEXES

Annexe 1 :

Coloration histologique Hématoxyline-Eosine

Mode opératoire : Pour réaliser l'étude histologique, nous avons fait une technique de base qui comporte plusieurs étapes : fixation, inclusion en paraffine, confection de coupes et colorations.

- **Fixation :** Nous avons fixé les pièces d'oreilles des six lots dans un volume de formol (10%), Cette étape est indispensable pour conserver la morphologie cellulaire, elle doit être immédiate ou au moins très rapidement débutée après l'obtention du prélèvement.
- **Imprégnation et inclusion :** Nous avons déposé les prélèvements ayant achevés leur fixation dans des cassettes en plastiques. Ces étapes sont automatisées dans des appareils à inclusion. L'étape finale de l'inclusion est manuelle et consiste à réorienter convenablement le fragment tissulaire dans le sens de la coupe dans un moule de paraffine.

Mode opératoire de l'automate Leika

Station	Réactifs	Temps
01	Formol	01h
02	Alcool 70%	02h
03	Alcool 80%	02h
04	Alcool 95%	02h
05	Alcool 100%	02h
06	Alcool 100%	02h
07	Alcool 100%	02h
08	Xylene	02h
09	Xylene	02h
10	Xylene	02h
11	Paraffine	02h
12	Paraffine	02h



Inclusion manuelle du tissu dans un moule de paraffine

A gauche : orientation des prélèvements dans la paraffine. A droite : refroidissement de la paraffine.

- **Coupes et colorations:** Le bloc solide de paraffine contenant le tissu de l'oreille est coupé grâce à un microtome, les coupes de 3 à 5 microns d'épaisseur sont étalées sur des lames. Ces étapes sont automatisées dans des appareils à coloration.

Mode opératoire de l'automate de coloration

Station	Réactifs	Temps
01	Xylene	20 min
02	Alcool 100%	1 min
03	Alcool 95%	30 sec
04	Alcool 70%	30 sec
05	Eau rinçage	10 min
06	Hématoxyline	2 min
07	Eau rinçage	5 min
08	Ammoniac	15 sec
09	Eau rinçage	5 min
10	Eosin	5 min
11	Eau rinçage	10 min
12	Alcool	30 sec
13	Xylene	20 min

- **Montage :** Le montage a pour but de protéger nos échantillons contre la dégradation chimique des colorants qui s'oxyde facilement à l'air libre et de faciliter ainsi leurs examens microscopiques. Cette étape est suivie par le séchage des lames à une température ambiante.
- **L'observation et lecture :** un délai d'attente est observé après le montage des lames pour permettre le séchage de ces derniers, puis l'observation microscopique des coupes histologiques a été accomplie.



Automate de déshydratation

Annexe 2

Statistiques = Activité Anti-inflammatoire *in vivo*

Contrast	Difference	Standardized difference	Critical value
	0,0145		
	0,0073		
		1,4915	3,0417
LOT 3 vs LOT 1		0,5620	3,0417
LOT 3 vs LOT 5		0,1945	3,0417
	0,0008		
LOT 4 vs LOT 6	0,0107		
Tukey's d critical value:			4,3016

Category	LS means	Standard error	Lower bound (95%)
			0,0285
			0,0255
	0,0358		0,0247