

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Blida 1



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

Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du Diplôme de
Master en Biotechnologies
Option : **BIOTECHNOLOGIES ET PATHOLOGIES MOLECULAIRES**

THEME

**Mise au point et contrôle de la qualité
microbiologique et physico-chimique d'une
émulsion dermique régénérante**

Présenté par

BEN TRIDI Meriem & YAHYAOUI Khadija

Date de Soutenance
09h00 Amphi F

Devant le jury composé de :

Mme RAHIM I.	MCA	Univ. Blida 1	Présidente
Mme CHELGHOUH H.	MCB	Univ. Blida 1	Examinatrice
M. BOKHATEME M.	Pr	Univ. Blida 1	Promoteur

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 :

- Mme RAHIM I. (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.
- Mme CHELGHOUM H. (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.

Nos remerciements vont également à toutes celles et tous ceux qui nous ont aidés, de près ou de loin, dans la réalisation de ce mémoire de master.

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.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

A mes très chers parents Rachid et Saliha

Qui n'ont jamais cessé de m'encourager et me soutenir

*A mes très chère frère Ibrahim, Mohamed Youcef, surtout mon petite
ange Abdelhak.*

A ma princesse sœur Sara.

Que dieu vous protège et vous bénisse

*A mon binôme Khadîdja pour tous les beaux souvenirs qu'ils ont créés
ensemble.*

Meriem.

Dédicaces

Un rêve qui se réalise grâce à Dieu le tout puissant, ce mémoire est enfin achevé, je le dédie aux personnes qui me sont très chères :

*Mon très cher père **Noureddine** qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.*

*Ma très chère mère **Nabila** vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour. Vous êtes et vous resterez pour moi ma référence, la lumière qui illumine mon chemin.*

*À mes adorables sœurs : **Karima** et **Sara**, mes frères **Abdraouf** et **Abdrahman** ce travail est également leur travail pour leurs encouragements, assistances et disponibilités pour moi à n'importe quel moment.*

*Sans oublier sœur d'abord puis binôme **Meriem** pour tous les moments durs et agréables passés ensemble, ainsi qu'à toute sa famille.*

*À mes amies **AMIRA** et **ILHAM**, pour leurs amours et leurs encouragements.*

*Mes dédicaces sont également adressées à toute la famille **Yahiaoui**, et **Salmi**.*

Khadidja.

TABLE DES MATIERES

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des Abréviations

Introduction -----

Chapitre 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE -----

1.1. Condensé historique -----

1.2. Définition générale de l'huile essentielle -----

1.3. Localisation et structures de sécrétion -----

1.4. Biosynthèse et composition chimique -----

1.5. Domaines d'utilisation des huiles essentielles -----

Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES -----

2. Matériel -----

2.1. Huiles essentielles testées -----

2.2. Souches microbiennes -----

2.3. Animaux de laboratoire -----

2.4. Milieux de culture et produits chimiques -----

2.2. Méthodes -----

2.2.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro* -----

2.2.1.1. Méthode de l'aromatogramme (Technique en milieu solide) -----

2.2.1.2. Méthode en phase vapeur (Microatmosphère) -----

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

2.2.4. Préparation d'une émulsion topique et contrôle de la qualité microbienne -----

2.2.5. Etude du pouvoir anti-inflammatoire *in silico* -----

2.2.5.1. Structures des ligands -----

2.2.5.2. Structure et préparation -----

2.2.5.3. Simulation de l'affinité Ligands par amarrage moléculaire -----

2.2.6. Prédiction des propriétés ADMET -----

2.2.7. Génération d'un modèle pharmacophore -----

2.2.8. Etude statistique -----

Chapitre 3 : RESULTATS ET DISCUSSION -----

3.1. Evaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles *in vitro* -----

3.1.1. Détermination des zones d'inhibition par aromatoigramme et microatmosphère -----

3.1.2. Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides par macro-dilution -----

3.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire topique -----

3.4. Evaluation du pouvoir anti-inflammatoire *in silico* -----

3.5. Prédiction des propriétés -----

3.6. Développement d'un modèle pharmacophorique -----

3.7. Contrôle de la qualité microbienne de la crème préparée -----

Conclusion -----

Références Bibliographiques -----

Annexe 1 -----

RESUME

L'objectif assigné à notre travail consiste à valoriser les huiles essentielles (HE) distillées en phyto-aromathérapie. Le screening antimicrobien des HE a été réalisé, *in vitro*, sur différentes souches de référence.

En aromatogramme, l'HE a présenté un effet inhibiteur sur toutes les souches avec des diamètres d'inhibition variant entre 18 ± 1 mm et 60 ± 0 mm à forte dose. La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI), faite par macro-dilution, a montré que c'est toujours *C. albicans* qui a présenté la plus grande sensibilité aux HE

Le pouvoir a été exploré *in vivo* par technique d'induction. Le groupe d'animaux traité avec l'HE a présenté le taux de réduction le plus élevé. Ce résultat a été aussi confirmé, démontré une diminution de l'œdème et un faible recrutement. Les propriétés physicochimiques et pharmacocinétique des composés majoritaires de l'HE ont été prédites *in silico*.

Le pouvoir des composés majoritaires de l'HE a été aussi mené par docking moléculaire sur une enzyme pro-inflammatoire. Les médicaments anti-inflammatoires ont présenté la plus grande affinité pour le site actif.

Ces résultats, très prometteurs, laissent entrevoir de possibles applications des huiles en dermopharmacie comme ingrédients actifs.

Mots-clés : Huiles essentielles ; Pharmacologie ; Anti-inflammatoire topique ; In silico ; Propriétés ADTEM.

ABSTRACT

The objective of our study was to enhance the essential oils (EO) extracted from the aerial part of three aromatic and medicinal plants as an active ingredient in aromatherapy.

The *in vitro* antimicrobial screening of EO was carried out against different reference strains. Using disc diffusion assay, exhibited a potent inhibitory effect on all tested strains with inhibition diameters varying between 18 ± 1 mm and 60 ± 0 mm at high doses. The determination of the minimum inhibitory concentrations (MIC) was done by macro-dilution assay and showed that *C. albicans* presented the greatest sensitivity to EO.

Besides, the *in vivo* potential was carried out. Animals treated with showed the highest rate of reduction in. This result was also confirmed at the tissue level through sections which demonstrated a reduction.

The *in silico* physicochemical and pharmacokinetic properties of the main compounds were predicted.

The *in silico* activity of the major compounds of EO was also done using molecular docking on a pro-enzyme. Our findings revealed that the anti-inflammatory drugs showed the highest affinity for the active site.

Finally, these very promising data suggest possible applications of EO in aromatherapy as active ingredients.

Keywords : Essential oils; Pharmacology ; In silico ; Anti-inflammatory; ADTEM properties.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1. Souches microbiennes testées dans le screening antimicrobien des huiles. -----

Tableau 2.2. Ligands testés dans le docking *in silico*. -----

Tableau 3.1. Diamètre des zones d'inhibition des huiles aromatiques *in vitro* déterminés par technique de diffusion en milieu gélosé. -----

Tableau 3.2. Résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des huiles essentielles par techniques de macro-dilution en milieu gélosé. -----

Tableau 3.4. Résultats du pouvoir anti-inflammatoire des composés terpéniques majeurs de l'huile essentielle. -----

Tableau 3.5. Différents types de liaisons entre ligands et le site actif -----

Tableau 3.6. Prédiction des propriétés pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et toxicité des différents ligands testés. -----

LISTE DES ABREVIATIONS

ADMET	Absorption, distribution, métabolisme, excrétion et toxicité
AFNOR	Association française de normalisation
AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
ANOVA	Analyse de variance
ATCC	American type culture collection
CL	Clairance
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentrations minimales inhibitrice
CN	Céfalexine
DL50	Dose létale médiane
DZI	Diamètre de la zone d'inhibition
EC	Irritation cutanée
EI	Irritation oculaire
ES COP	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
FC	Formule chimique
H&E	Coloration hématoxyline-éosine
HE	Huile essentielle
hERG	Human Ether-à-go-go-Related Gene
H-HT	Hépatotoxicité humaine
ID	Identifiant
IL	Interleukine
MHA	Gélose Muller-Hinton
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NF- κ B	Facteur nucléaire kappa B
NMRI	National medical research institute
NO	Oxyde nitrique
ONAB	Office nationale de l'alimentation du bétail
PAM	Plantes aromatiques et médicinales
PM	Poids moléculaire
UFC	Unité format colonie

INTRODUCTION

A l'instar de ces AINS, d'autres médicaments tels que les antibiotiques ont été aussi retirés du marché en raison d'effets indésirables graves (**Kassah-Laouar, 2020 ; Schlemmer et al., 2002**). Cette décision s'est accompagnée de mises en garde et de restrictions d'usage pour d'autres antibiotiques de la famille des fluoroquinolones. En résumé, les fluoroquinolones deviennent réservées aux cas où on ne peut pas faire autrement (**Buxeraud et Faure, 2023**).

Cet engouement pour des thérapeutiques naturelles a poussé la communauté scientifique à explorer et confirmer les propriétés pharmaco-toxicologiques des plantes (**Iserin et al., 2001 ; Da Silva et al., 2014**). Et c'est en y puisant leur principe actif que les premiers médicaments ont vu le jour, avant l'arrivée des molécules de synthèse mimant leurs particularités chimiques (**Guinoiseau, 2010**). La phytothérapie n'a pas disparu.

Ces huiles sont considérées comme des produits odorants, généralement de composition complexe, et obtenues à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique (**Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012 ; Aziz et al., 2018**).

La bibliographie regorge d'études sur le pouvoir antimicrobien des HE et, personne ne peut nier l'action des huiles sur les souches bactériennes, voire multirésistantes, aux antibiotiques. Une approche consiste à combiner l'utilisation des HE et des antibiotiques (**De Billerbeck, 2007 ; Bouyahya et al., 2018 ; Zhao et al., 2022**).

La prudence est donc de mise quant aux choix des HE, de leur voie d'administration, de leur posologie et de la durée de traitement afin d'éviter tout effet indésirable et/ou toute interaction médicamenteuse.

Par manque de moyens et d'animaux, nous n'avons pas pu tester le pouvoir des HE initialement prévu dans notre démarche méthodologique, encore moins les propriétés physico-chimiques des préparations dermiques.

Raison pour laquelle nous avons réajusté nos objectifs en se focalisant sur le pouvoir antimicrobien et anti-inflammatoire des HE. A cet effet, l'objectif à notre étude consiste à évaluer le pouvoir antimicrobien des HE distillées peu exploitées dans notre pays. Le pouvoir antimicrobien a été évalué à travers l'utilisation de deux méthodes microbiologiques complémentaires.

Chapitre 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Condensé historique

Chez les Egyptiens, l'essence de térébenthine était déjà utilisée et tout porte à penser que certains parfums étaient obtenus sous forme d'huiles distillées. L'art de la distillation, initié par les Egyptiens et les Perses, s'améliora grandement au cours du IX^e siècle sous l'impulsion des Arabes avec, notamment, le développement de l'alambic attribué à Avicenne (980-1037).

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. Le développement des procédés de production et des connaissances de ces extraits fut alors par des pharmaciens (**Gilly, 1997 ; Bodiou, 2008 ; Géa et Banel, 2022**).

Il aurait fallu attendre 1928 pour que « l'aromathérapie moderne » soit ressuscitée grâce à un chimiste Français (Gatefosse) qui constata les énormes pouvoirs de guérison des HE. Les progrès de la science et des techniques de véritables investigations de ces molécules, contribuant au redéploiement international de l'aromathérapie à l'échelle du monde entier (**Teuscher et al., 2005 ; Roux, 2008 ; Aljaafari et al., 2021**).

1.2. Définitions de l'huile essentielle

Il s'agit d'un mélange de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans des tissus végétaux spécialisés, responsables de l'odeur caractéristique de la plante. Le terme « essentielle » fait référence à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante (**Zhiri et Baudoux, 2005 ; Grosjean, 2011**).

Pour certains auteurs (**Garetta, 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.

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

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

1.3. Localisation et structures de sécrétion

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), rhizomes (gingembre) ou graines (nigelle). Pour certaines HE comme celles de lavande ou de sauge, c'est la plante entière qui est utilisée (Parthasarathy et al., 2008 ; Lee et Ding, 2016).

Elles sont alors stockées dans des cellules à HE (Lauraceae), dans des poils sécréteurs (Geraniaceae et Lamiaceae) (figure 1.1), dans des poches ou dans des canaux (Asteraceae) (Teuscher et al., 2005 ; Festy, 2009).

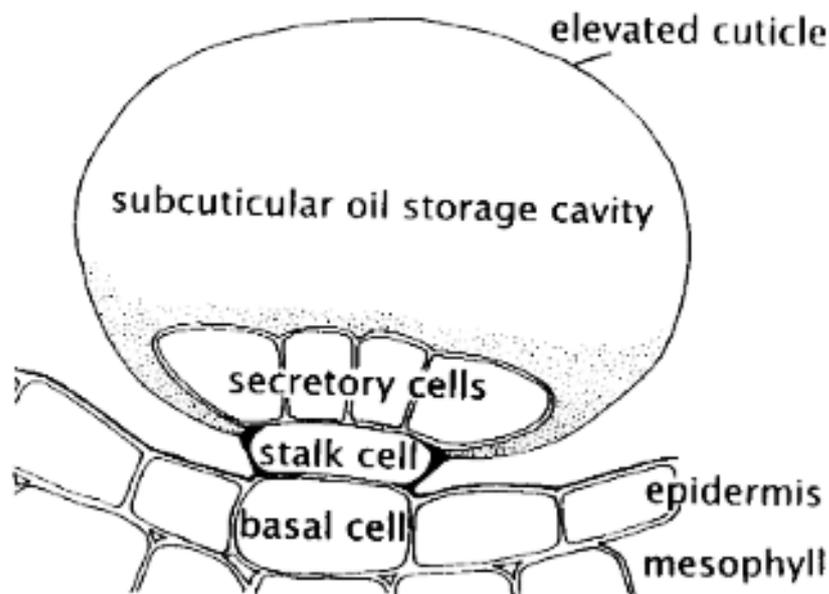
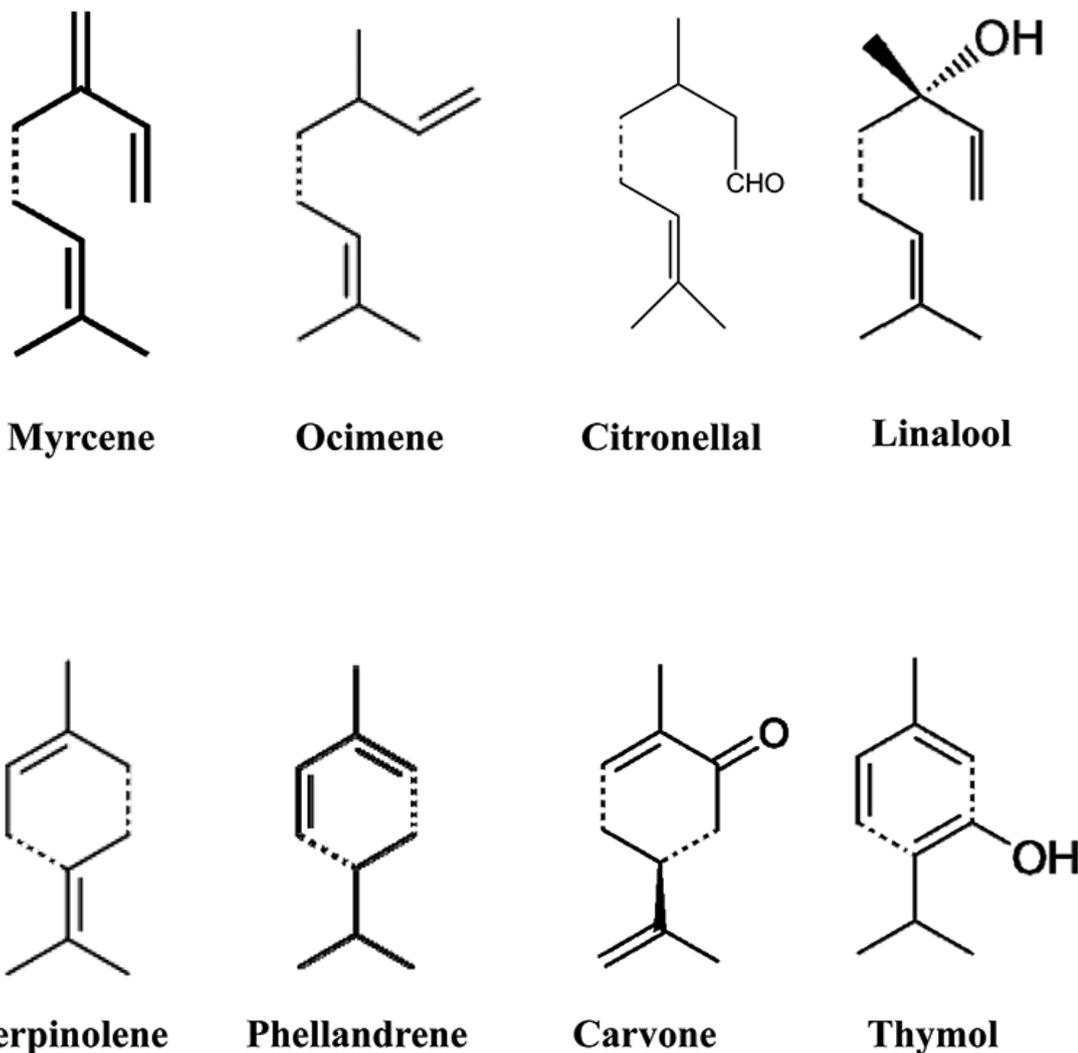


Figure 1.1. Illustration d'un trichome glandulaire dans un poil glandulaire.

1.4. Composition chimique des huiles essentielles

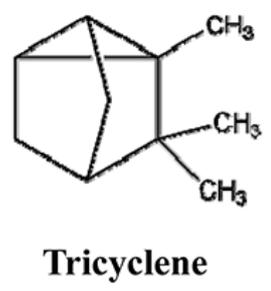
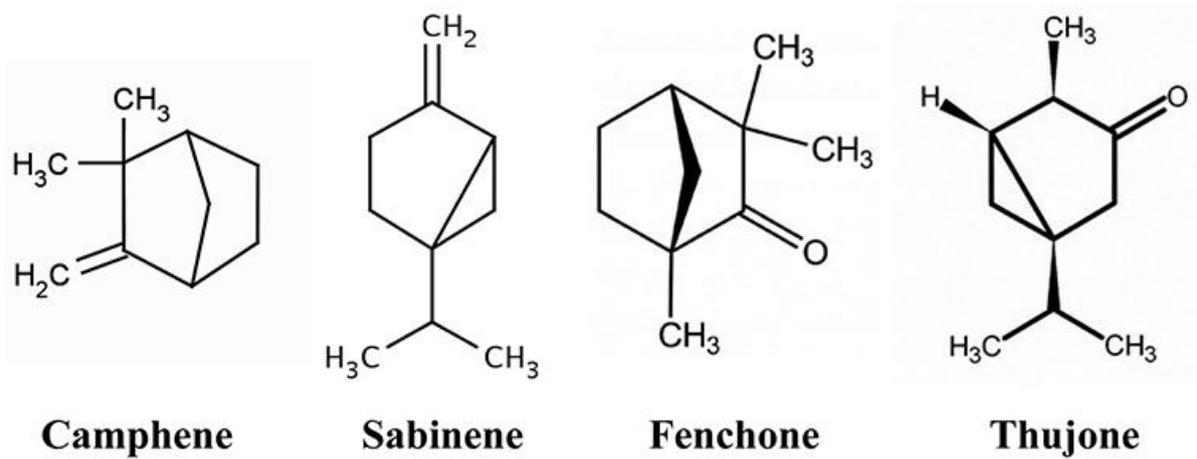
Leur masse moléculaire, relativement faible, leur confère un caractère volatil à la base des propriétés olfactives. La plupart des HE sont poly-moléculaires (dans l'HE de rose). Il existe quelques HE dites mono-moléculaires, telle la menthe pouliot. Le citron et le clou de girofle sont bi- et tri-moléculaires (Kempf et al., 2011).



Monoterpènes monocycliques

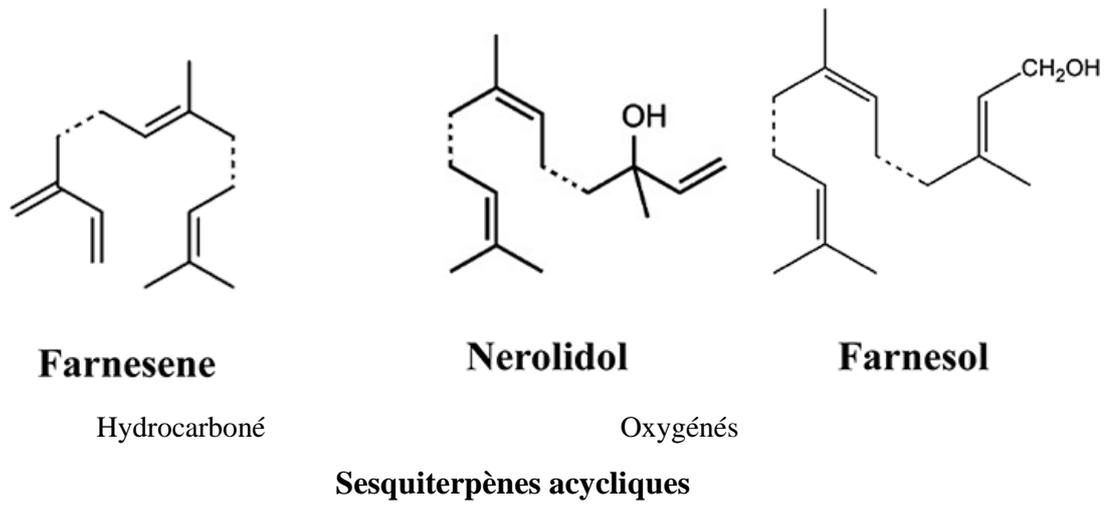
Figure 1.2. Structure chimique de quelques monoterpènes acyclique et monocyclique.

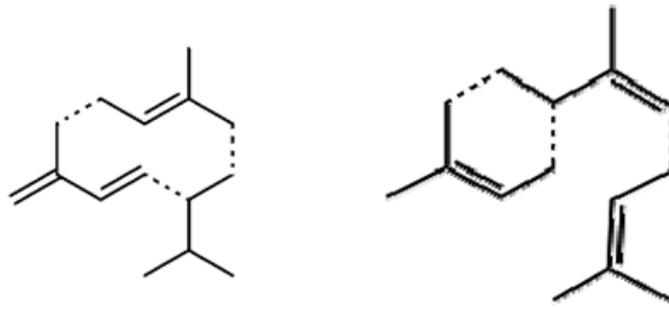
La plupart des HE sont constituées dans leur grande majorité d'un mélange assez complexe de monoterpènes acyclique et mono (figure 1.2), bi- et tri-cycliques (figure 1.3), de sesquiterpènes (figure 1.4), d'alcools, d'esters, d'aldéhydes, d'oxydes (Baser et Buchbauer, 2010 ; Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012).



Monoterpène tricyclique hydrocarboné

Figure 1.3. Structure chimique de quelques monoterpènes bicyclique et tricyclique (Morsy, 2017).





Germacrene D

Bisabolene

Hydrocarboné Oxygéné

Sesquiterpènes monocycliques

Figure 1.4. Structure chimique de quelques sesquiterpènes bicyclique et tricyclique.

1.5. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

1.5.1. Aromathérapie

Actuellement, un retour très net aux HE pour la désinfection et le traitement des maladies infectieuses a été signalé (Inouye et Abe, 2007 ; Guinoiseau, 2010). Ce retour est stimulé par l'usage de certains antibiotiques. Les HE ont une aucune résistance contrairement aux antibiotiques (Franchomme et al., 1990 ; Maurya et al., 2021).

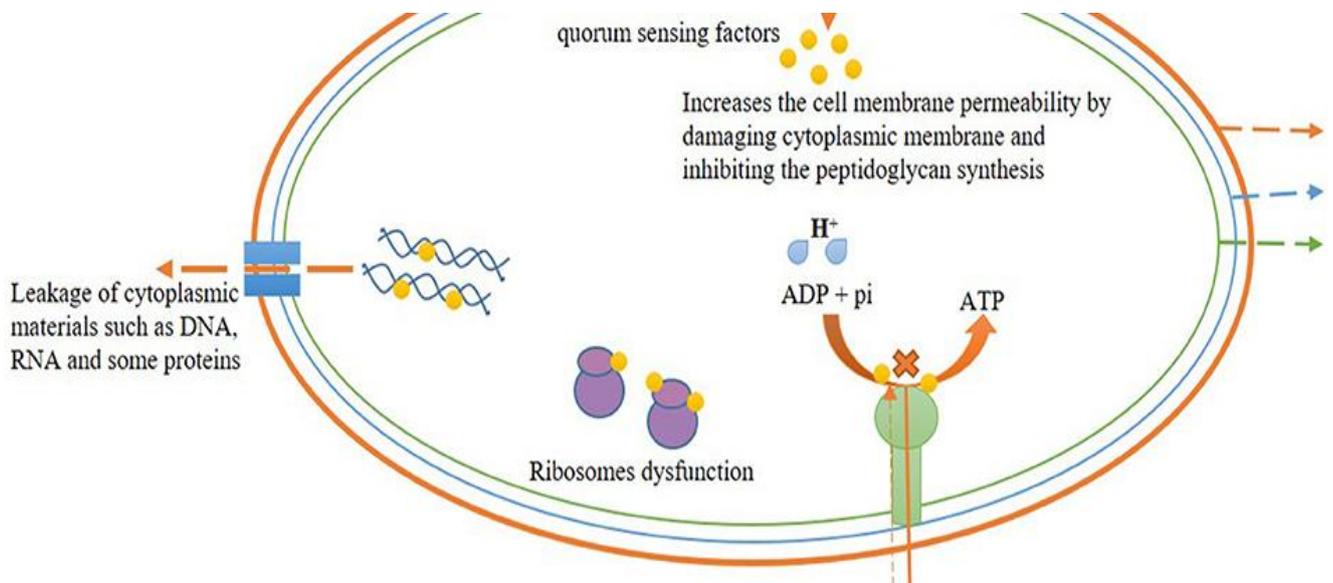


Figure 1.5. Modes d'action antibactériens probables des huiles (Maurya et al., 2021).

1.5.2. Aéro-ionisation et désinfection des ambiances

Bien conduite, la diffusion atmosphérique devient un procédé idéal prévention contre les infections et les pathologies hivernales. Elle contribue largement à la désinfection des locaux, qu'ils soient industriels ou destinés aux soins médicaux (**Pibiri, 2006**).

1.7.3. Industries agro-alimentaires

Depuis peu, les industriels ont souhaité l'utilisation d'HE au détriment des molécules de synthèse classiques couramment utilisées, telles que les parabènes. Plusieurs travaux ont montré que les HE de thym, de cannelle, d'origan et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxino-génèse de plusieurs bactéries et champignons responsables d'infections alimentaires (**Hyldgaard et al., 2012**).

1.5.4. Parfumerie et cosmétologie

C'est le cas du « 1,8-cinéole » connu commercialement sous le nom d'eucalyptol, principal constituant de la majorité des HE d'*Eucalyptus*. Il entre dans la fabrication des savons de toilette, dentifrices et lotions désodorisantes (**Martini, 2011**).

Chapitre 2

MATERIEL ET METHODES

2. Matériel

2.1. Huiles essentielles testées

Les HE ont été fournies par la société de production des HE. L'extraction des HE a été faite à échelle industrielle (alambic sous pression) de la partie aérienne des herbacées et des rameaux feuillés des ligneux récoltés.

Nous avons conservé ces HE dans des flacons stériles et teintés à température ambiante.

2.2. Souches microbiennes

Plusieurs souches microbiennes de référence ont été utilisées pour le screening antimicrobien des HE *in vitro*. Toutes les souches ont été fournies par le laboratoire de microbiologie. Les souches testées sont rapportées dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1. Souches testées dans le screening antimicrobien des HE.

Souches microbiennes	Groupe
Bactéries	
<i>Bacillus</i>	Gram +
<i>Staphylococcus</i>	Gram +
Champignons	
<i>Candida</i>	Levure
<i>Aspergillus</i>	Moisissure

ATCC : souche de référence (American Type Culture Collection).

2.3. Animaux de laboratoire

En ce qui concerne l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*, nous avons utilisé souris. 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*.

2.4. Milieux de culture et produits chimiques

Des disques (Antibiotica-Testblattchen, Allemagne) sont utilisés pour les imprégner en HE. Plusieurs solvants et colorants ont été utilisés à l'exemple du tween 80, l'acétone, le formol, l'eau physiologiques, et la paraffine.

2.2. Méthodes

2.2.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro*

2.2.1.1. Méthode de l'aromatogramme

Cette technique est adoptée afin d'estimer, dans un premier temps, les propriétés essences aromatiques. Elle est similaire à l'antibiogramme.

Par la suite, le disque est mis ou déposé au centre d'une boîte Pétri contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche microbienne.

De même, la suspension microbienne a été bien homogénéisée (vortex) avant son ensemencement sur le milieu gélosé adéquat. Les boîtes Pétri seront ensuite fermées et incubées dans l'étuve à température adéquate (37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C moisissure, respectivement). Les micro-organismes croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration en HE.

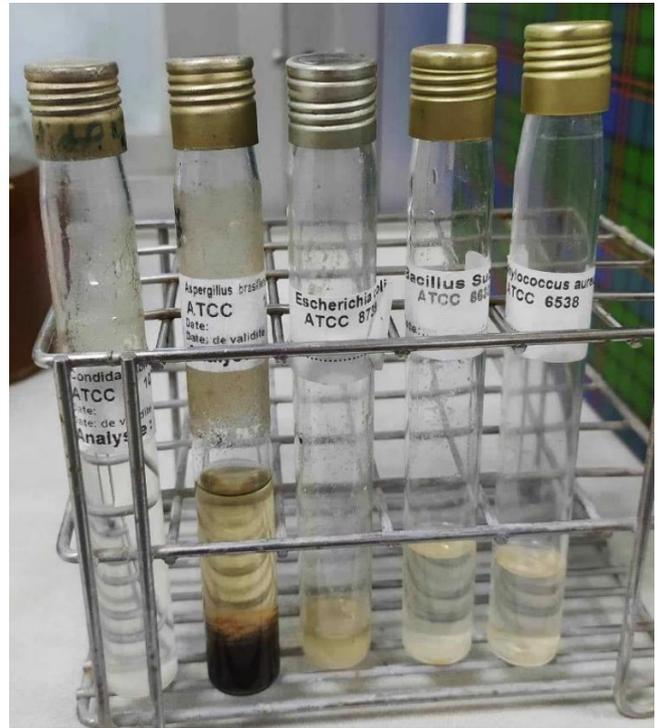
Par ailleurs, nous avons utilisé, pour chaque souche microbienne, des contrôles positifs en appliquant, dans les mêmes conditions opératoires afin de comparer leur pouvoir antimicrobien avec nos échantillons d'HE.

2.2.1.2. Méthode de microatmosphère

La seule différence entre la microatmosphère et disque imprégné en HE qui sera déposé au centre du couvercle de la boîte Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. La préparation de l'inoculum, l'ensemencement, des résultats ont été réalisés de la même manière que l'aromatogramme. Après incubation, il se produit une évaporation des HE qui, souches microbiennes déjà ensemencées, vont inhiber leur croissance.



Dépôt.



Préparation.



Dépôt du disque.



Incubation.

Figure 2.1. Etapes de la réalisation *in vitro* (Original, 2023).

2.2.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles *in vivo*

A la fin de l'expérimentation et après quatre heures, tous les animaux, diètre, ont été coupés et retirés à l'aide d'un punch.

2.2.3. Examen histologique

Les coupes sont réalisées permettant d'obtenir des sections de 5 µm d'épaisseur.

L'observation a été accomplie par microscopie photonique aux grossissements avec huile à immersion).

Des photos ont été prises pour quantifier l'intensité cellulaire.

2.2.4. Préparation d'une émulsion topique et contrôle de la qualité microbienne

Nous portons les 2 béchers au bain-marie à 70°C jusqu'à fusion complète des composés. La phase aqueuse sera versée dans la phase en mélangeant jusqu'au refroidissement. A température ambiante, nous ajoutons homogénéisation continue.

Les analyses à effectuer se résument le dénombrement des germes totaux (en masse) et la recherche des germes spécifiés.

2.2.5. Etude du pouvoir anti-inflammatoire *in silico*

2.2.5.1. Structures des ligands

Nous avons utilisé huit molécules terpéniques (figure 2.2) détectées majoritairement dans l'HE, des AINS, deux sélectifs et un seul non sélectif.

Tableau 2.2. Ligands testés dans le docking moléculaire *in silico*.

Ligand	Synonyme	ID	FC	PM	SMILES
α -Terpinéol	Terpineol	1710044	C10H18O	154	CC1=CCC(CC1)C(C)(C)O
Acétate de GERANYLE	bergamiol	829444	C12H20O2	196	CC(=CCCC(C)(C=C)OC(=O)C) C
β -caryophyllene	Ocimene	52815453	C10H16	136	CC(=CCCC/C=C\C/C=C)C
		23662	C ₁₇ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₂ S	381	CC1=CCCC=C(C=C1)C2=CC(=NN2C3=CC=C(C=C3)S(=O)(=O)N)C(F)(F)F
		12333619	C ₁₈ H ₁₅ ClN ₂ O ₂ S	358	CC1=NCCC=C(C=C1)C2=C(C=C(C=C2)C1)C3=CC=C(C=C3)S(=O)(=O)C
		303333	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NNaO ₂	318	C1=CC=C(CCC(=C1)CC(=O)[O-])NC2=C(C=CCCC=C2Cl)Cl.[Na+]

SMILES = Simplified molecular input line entry specification ; FC : Formule chimique ; PM = Poids moléculaire (g/mole) ; ID = Identifiant.

Toutes les molécules ont été téléchargées sous format SDF de la base de données chimiques PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.2.5.2. Structure et préparation

Des médicaments appelés inhibiteurs ont été développés pour réduire la douleur et l'inflammation associées à ces maladies, qui est importante pour la production de prostaglandines qui protègent l'estomac (Chiolero et al., 2000).

La préparation de la structure protéique a été réalisée en supprimant les molécules avec une minimisation de l'énergie, protonation et suppression de la chaîne B.

Enfin, les coordonnées du site actif inhibiteur ont été déterminées dans le but de restreindre l'amarrage à son niveau. Toute cette préparation a été faite.

2.2.5.3. Simulation de l'affinité par amarrage moléculaire

La simulation de l'affinité et les différents ligands a été réalisée par amarrage moléculaire en utilisant les logiciels qui permettent le criblage virtuel pour la découverte computationnelle de médicaments et pouvant être des bibliothèques de composés par rapport à des cibles médicamenteuses potentielles.

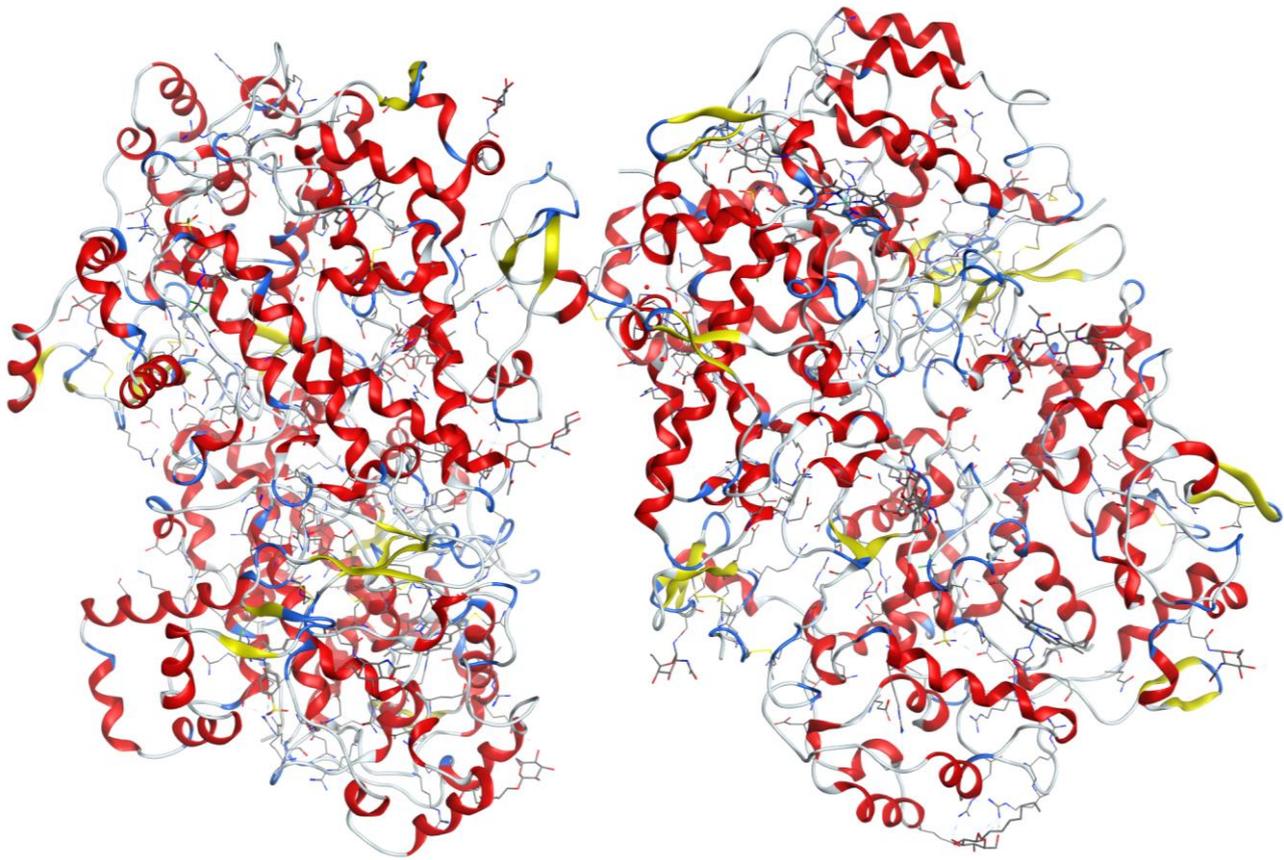


Figure 2.3. Structure de la protéine téléchargée du site PDB (Protein data bank).

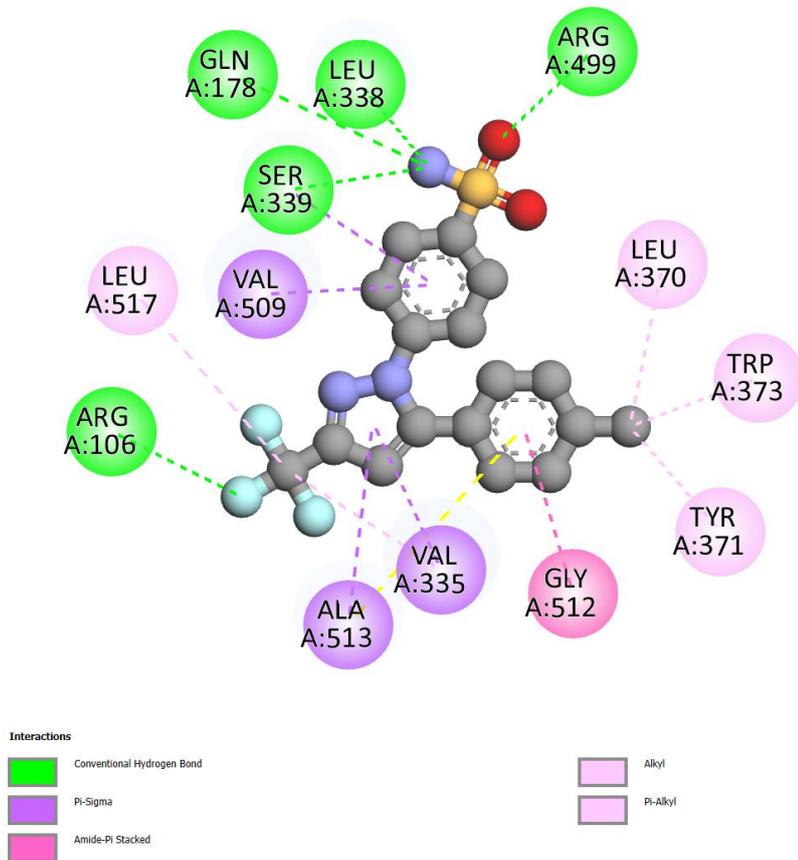


Figure 2.4. Interaction du ligand avec le site catalytique.

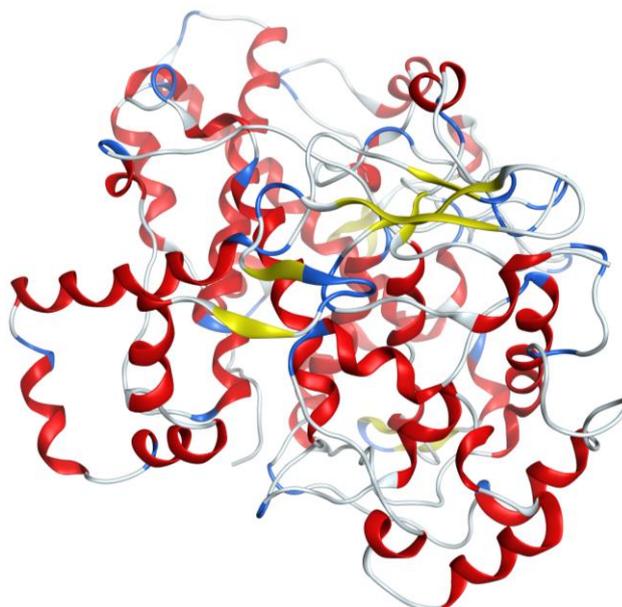


Figure 2.5. Structure protéique

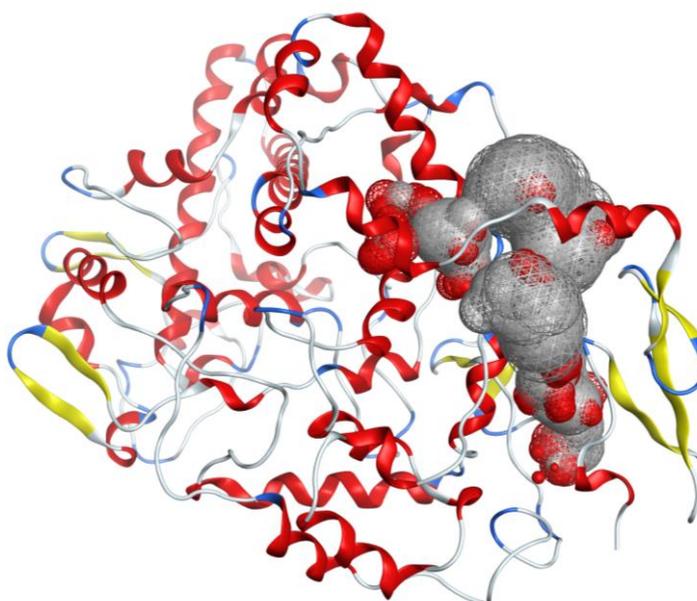


Figure 2.6. Localisation du site actif dans la chaîne A.

2.2.6. Prédiction des propriétés

Par ailleurs et au cours de cette prédiction, la règle des cinq a été aussi vérifiée pour tous les composés. Cette règle est un ensemble de critères utilisés en chimie médicinale pour évaluer qu'un composé donné c'est-à-dire qu'il puisse être absorbé et distribué dans l'organisme.

2.2.7. Génération d'un modèle

Les étapes typiques de la génération consistent à collecter et recueillir des données sur les composés ou ligands ayant présenté la meilleure affinité pour le site catalytique de la cible biologique d'intérêt. Cela doit inclure des données, des données de structure moléculaire et des informations sur les interactions entre les composés et le récepteur enzymatique.

Par la suite, un alignement des sur la cible pour identifier les similitudes et les différences entre les structures et ce afin d'identifier des caractéristiques moléculaires communes à tous les composés actifs. Cela peut inclure des noyaux aromatiques, des groupes fonctionnels, des interactions ou des liaisons hydrogène

2.2.8. Etude statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. Pour l'évaluation du pouvoir anti-inflammatoire topique, la signification statistique a été déterminée au moyen du test d'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivi par le test *post-hoc* pour comparaison par paire. Une $p < 0,05$ a été considérée comme différence significative.

Chapitre 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Evaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles *in vitro*

3.1.1. Détermination des zones d'inhibition par aromatoigramme et microatmosphère

L'évaluation du pouvoir antimicrobien des HE testées a été réalisée *in vitro* en utilisant deux méthodes complémentaires.

A la lecture des résultats obtenus en aromatoigramme, il apparaît clairement que toutes les HE testées ont présenté un certain pouvoir sur les germes mais à des degrés variables.

De plus, une action dose-dépendante a été notée pour la quasi-totalité des germes.

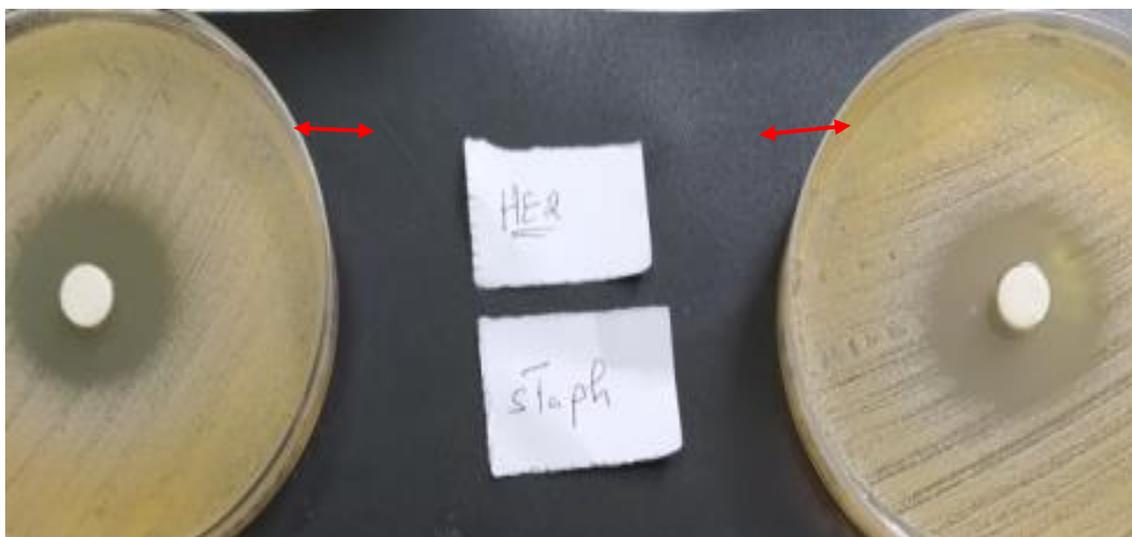
Tableau 3.1. Diamètre des zones d'inhibition des huiles aromatiques *in vitro* déterminés par technique de diffusion en milieu gélosé (aromatoigramme).

Technique d'aromatoigramme (DZI)									
Volume en huile essentielle ($\mu\text{L}/\text{disque}$)									
Souches	20	30	40	20	30	40	20	30	40
<i>Escherichia</i>	-	-	-	18 \pm 0	25,3 \pm 2,3	28 \pm 1	-	-	-
<i>Staphylocoques</i>	-	-	-	20 \pm 1,7	20 \pm 1,7	20 \pm 1,7	-	-	-
<i>Bacillus</i>	-	-	-	18 \pm 1	30,6 \pm 4	39,3 \pm 2,5	-	-	-
<i>Candida</i>	-	-	-	18 \pm 0	18 \pm 0	18 \pm 0	-	-	-

Technique de microatmosphère (DZI)									
Volume en huile essentielle ($\mu\text{L}/\text{disque}$)									
Souches	20	30	40	20	30	40	20	30	40
<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptocoques</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

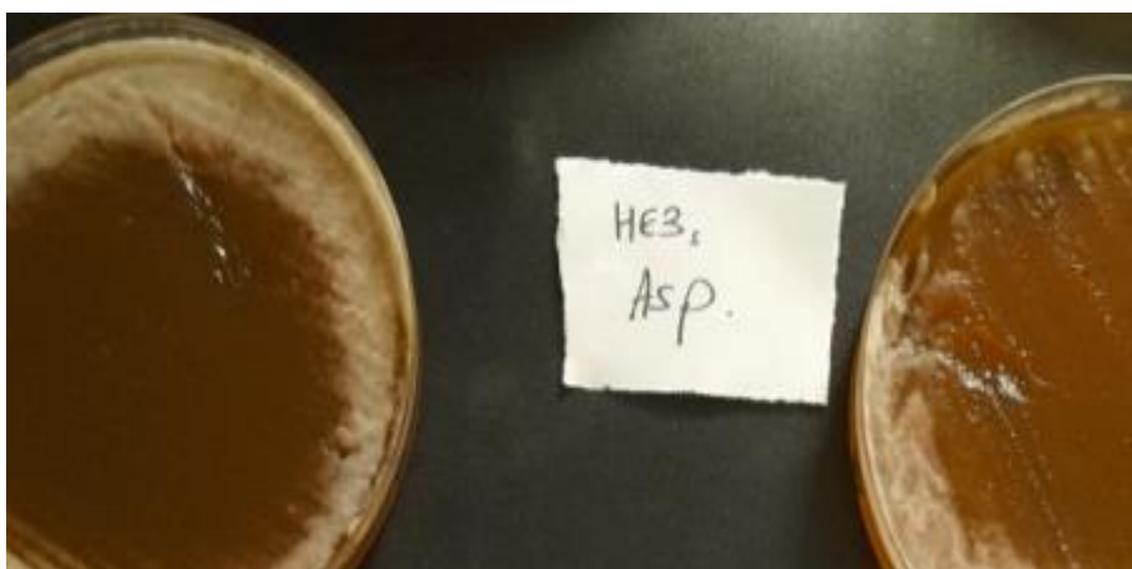
(-) Aucune zone d'inhibition ; HE : Huile essentielle ; DZI : Diamètre de la zone d'inhibition (moyenne de trois répétitions \pm écart-type).

Par contre et avec l'HE, de meilleurs résultats ont été enregistrés, en comparaison avec la technique précédente (aromatoigramme), avec une inhibition totale des souches fongiques.



Aromatogramme de l'HE sur *Escherichia*.

Figure 3.1. Exemple de photographies montrant les zones d'inhibition générées par les huiles essentielles en aromatoigramme.



HE sur souche fongique.

Figure 3.2. Exemple de photographies montrant les zones d'inhibition générées par les huiles essentielles en microatmosphère.

Les résultats d'essais *in vitro* tendent à confirmer ces usages traditionnels. L'HE aurait, en effet, une action antibactérienne marquée sur plusieurs souches de micro-organismes infectieux, dont *E. coli* et *S. aureus* (Mimica-Dukic et al., 2003 ; Betoni et al., 2006).

Concernant le screening antimicrobien par la méthode de microatmosphère, il a été constaté, qu'avec certains germes. Par contre et en microatmosphère, l'HE est très volatile et, de ce fait, il y aura une bonne diffusion sur une gélose ensemencée préalablement (Laird et Phillips, 2012).

Par ailleurs, l'activité des HE est souvent réduite à l'activité de ses composés, ou ceux susceptibles d'être actifs. Evalués séparément sous la forme, ils confirment ou infirment l'activité de l'HE de composition semblable.

De cette manière, la valeur d'une huile tient à l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires (Dorman et Deans, 2000 ; Lahlou, 2004).

3.1.2. Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides par macro-dilution

La détermination des CMI et CMB des HE a été accomplie sur souches bactériennes et fongique.

La gamme de dilutions en HE utilisée, lors de cette étude, varient. Les résultats de cette analyse sont rapportés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2. Résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI, %) des huiles en milieu gélosé.

Souches testées	Huile essentielle	
	CMI	CMB
<i>Candida</i>	>5.25	>6.25
<i>Escherichia</i>	>5.25	>6.25



Figure 3.3. Résultats des CMI sur souches microbiennes.

Une étude sur la composition chimique (Hussain et al., 2010) de l'HE a également étudié son efficacité antimicrobienne et rendu les résultats avec la méthode de diffusion et la CMI.

La plupart des méthodes microbiologiques utilisées ont été critiquées. Ces critiques ont été basées observée dans les résultats obtenus concernant l'étude de la zone d'inhibition et l'étude de l'inhibition de la croissance à différentes concentrations d'HE. La comparaison à travers les différentes publications, reste problématique voire difficile à établir.

Cette difficulté réside dans le fait que les paramètres expérimentaux (méthodes employées, conditions physiologiques des germes, dose utilisée, chimique des HE) diffèrent entre les études.

3.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire topique

Les résultats de l'évolution de l'inflammation, à travers la mesure de la masse des pièces auriculaires coupées de chaque animal, sont illustrés dans la figure 3.4 et le tableau 3.3.

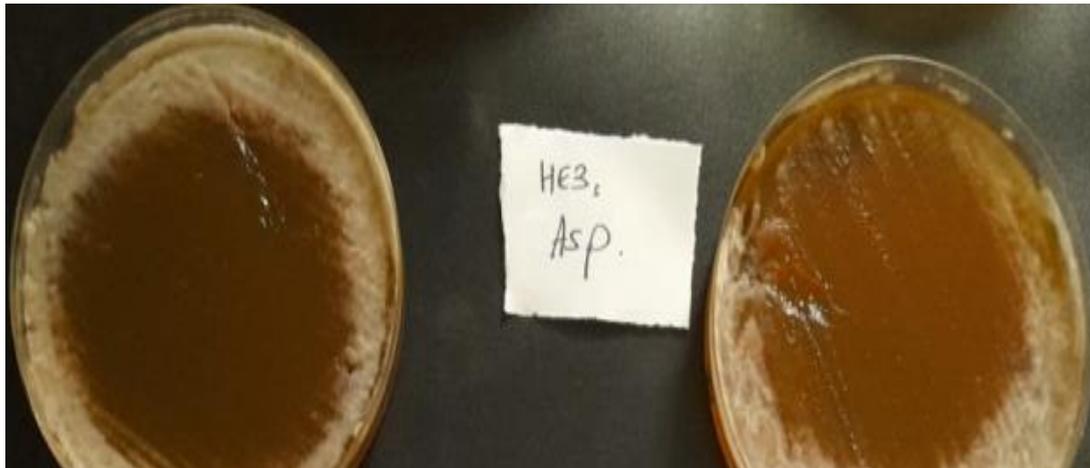


Figure 3.4. Résultats du pouvoir des huiles essentielles testées en comparaison avec les contrôles positif et négatif.

Cependant et vu le nombre d'animaux utilisé dans chaque lot, peut être dégagée de nos résultats préliminaires.

Raison pour laquelle il nous a semblé nécessaire de compléter cette étude par un examen des pièces prélevées de chaque animal afin de confirmer ou d'infirmes cet effet.

Tableau 3.3. Taux de réduction de l'inflammation d'animaux traités en comparaison.

Traitements	Moyenne \pm écart-type
HE (26 mg/kg)	0,00352 \pm 0,0047
HE (2,6 mg/kg)	0,00342 \pm 0,0047
HE (0,26 mg/kg)	0,00725 \pm 0,0057
Contrôle positif	0,00252 \pm 0,0069
Agent phlogogène	0,00350 \pm 0,0074

3.3. Etude de la morphologie des souris

Les observations, accomplies par microscopie photonique à différents grossissements (x4, x10 et x40), sont rapportées dans la figure 3.5.

L'inflammation provoquée est un phénomène qui implique, entre autres, une série de réactions locales et la libération des médiateurs tels que les prostaglandines, et l'histamine.

Aussi, elle se manifeste par une modification du flux, une augmentation de la perméabilité entraînant une fuite de protéines plasmatiques vers le fluide extracellulaire, ainsi qu'une extravasation de cellules sanguines, notamment des leucocytes neutrophiles et des macrophages vers le site (**Hersini et al., 2014**).

En revanche et chez le lot contrôle, nous avons noté une congestion vasculaire avec quelques éléments et une faible présence d'œdème.

Ces résultats démontrent les propriétés des HE dans le tissu cible, fournissant une confirmation supplémentaire que cette HE réduit l'inflammation mais uniquement à certaine dose.

Les HE contiennent des composés actifs dont certains sont anti-inflammatoires. Elles peuvent donc être utilisées dans de nombreux cas comme les douleurs, l'arthrite, l'arthrose ou encore les rhumatismes (**Miguel, 2010**).

Le composé terpénique présent en fortes concentrations dans les distillats aromatiques excite les récepteurs du froid et simule un refroidissement par une action au niveau des canaux d'où un effet antalgique en usage topique pour réduire les douleurs, qu'elles soient aiguës ou inflammatoires (**Liu et al., 2013**).

En usage local, en application mais également en inhalation, l'HE ou les médicaments à base de cette plante sont utilisés en cas de prurit, mais aussi en cas de nez bouché. Ils sont également utilisés pour améliorer l'hygiène buccale. En outre, antalgique, elle beaucoup à alléger les affections ou pharyngées, comme les migraines et la sinusite. On l'utilise également pour réduire les démangeaisons cutanées (**Shah et Mello, 2004**).

3.4. Evaluation du pouvoir anti-inflammatoire

Le choix de l'HE est justifié par rapport au pouvoir anti-inflammatoire avéré et démontré précédemment *in vivo*. Le docking est réalisé à l'aide du logiciel. Notre choix est motivé par le fait que c'est une protéine exprimée dans les tissus et est induite, qui est dans de nombreux tissus et impliquées dans la régulation de la fonction.

Dans notre étude, un seul non sélectif ont été choisis pour comparer leurs énergies d'affinité avec celles des constituants terpéniques de l'HE. Les résultats du docking sont rapportés dans le tableau 3.4.

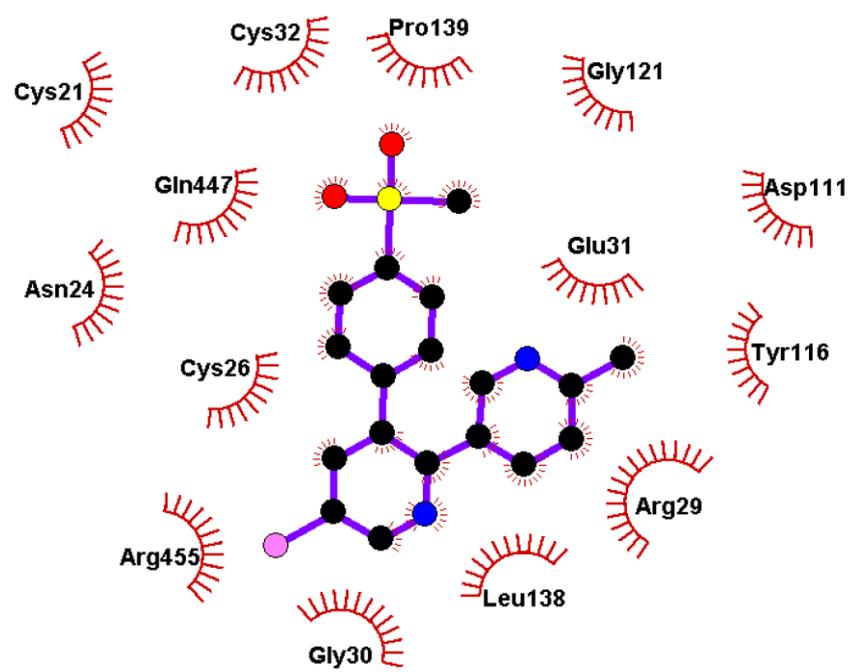
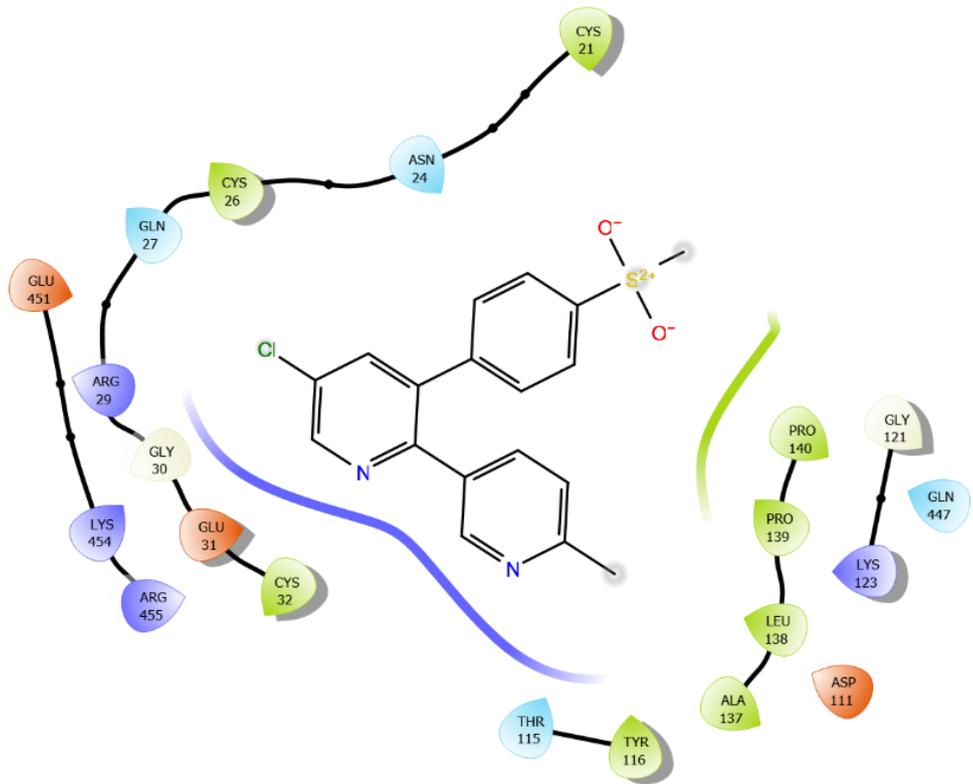
Tableau 3.4. Résultats du pouvoir des composés terpéniques majeurs de l'huile essentielle, en comparaison avec des AINS.

Famille	Score² de liaison (Kcal/mole)
AINS sélectifs	-5.67
	-5.63
AINS non sélectif	-7.63
Ester monoterpénique	-7.28
	-7.21
Alcool monoterpénique	-4.75
	-4.68
	-4.47
	-3.47
Monoterpène	
hydrocarboné	-4.23
Ether monoterpénique	-4.09

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien ; ID : Identifiant.

La liaison des différents ligands testés (AINS) et composés terpéniques de l'HE avec le site catalytique du récepteur protéique est souvent hautement spécifique. Ces interactions ligand-protéine ont été visualisées.

Ces applications permettent de visualiser la structure pour une meilleure compréhension et illustration des interactions moléculaires qui contribuent à la liaison. Les résultats des différentes interactions établies sont illustrés dans les figures 3.6 et 3.7 et le tableau 3.5.



AINS

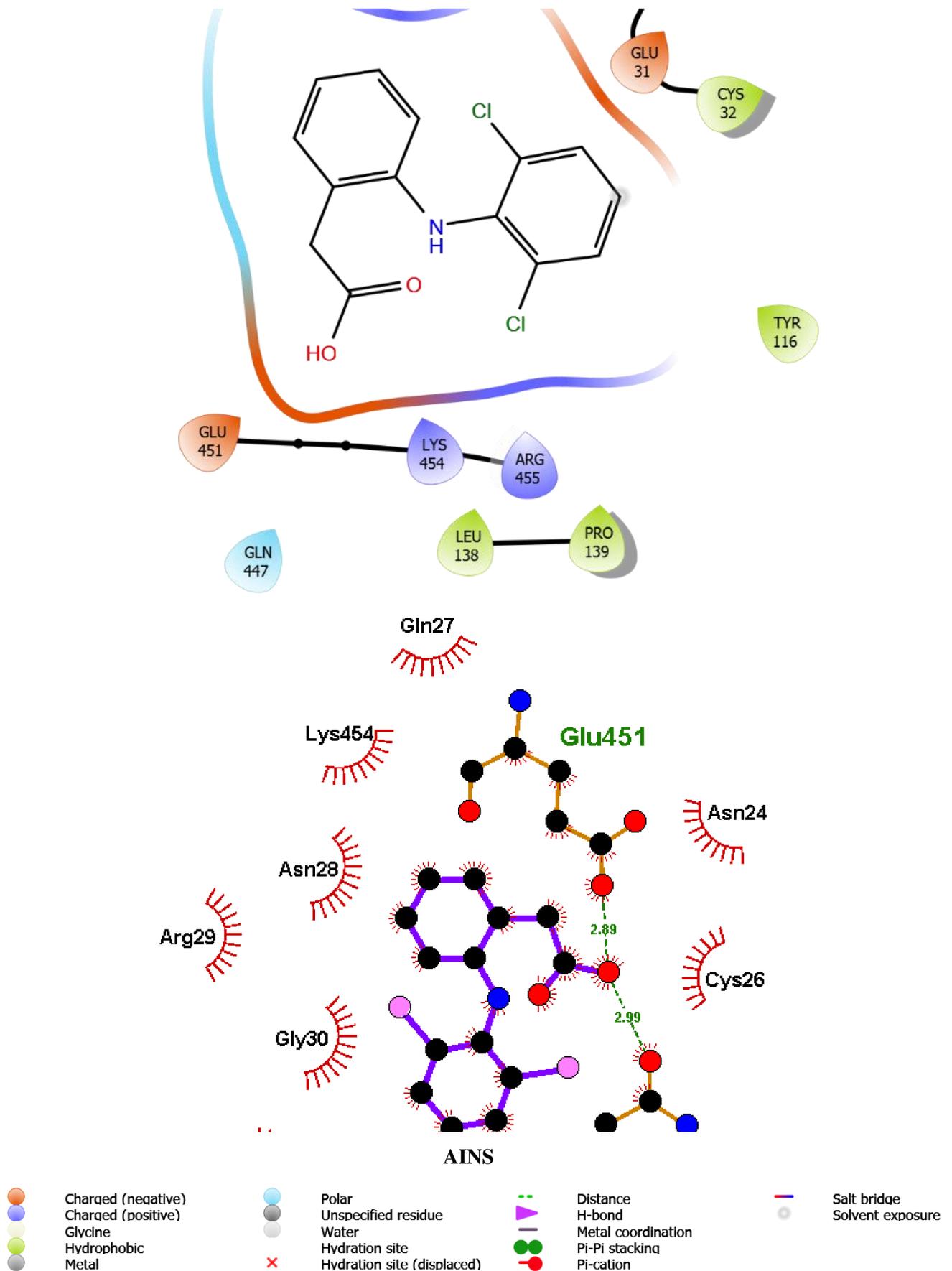
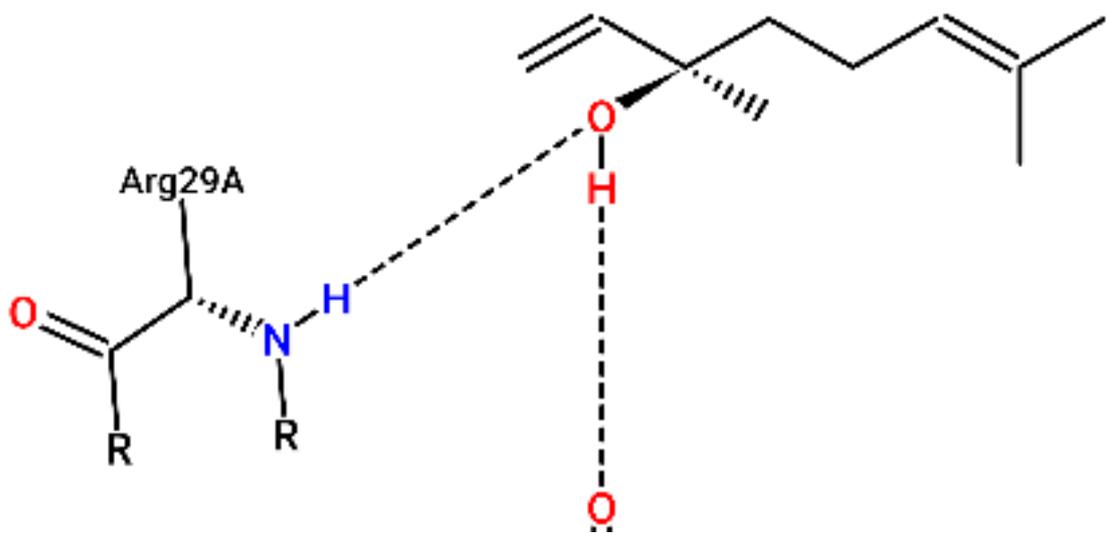
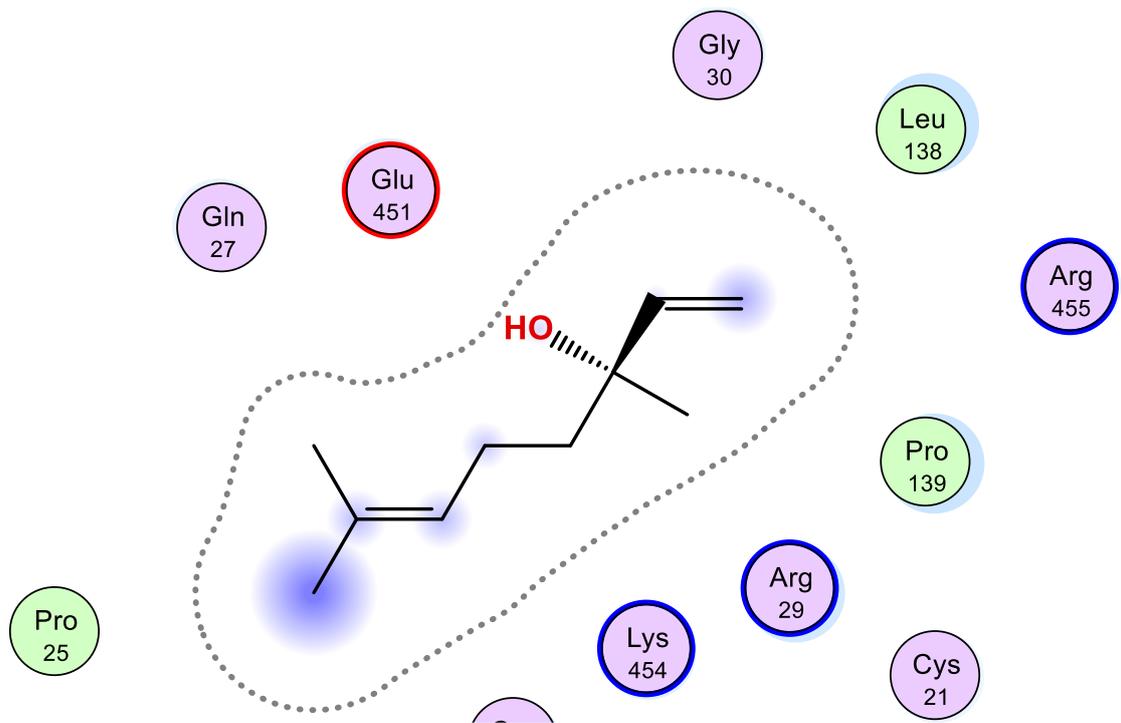
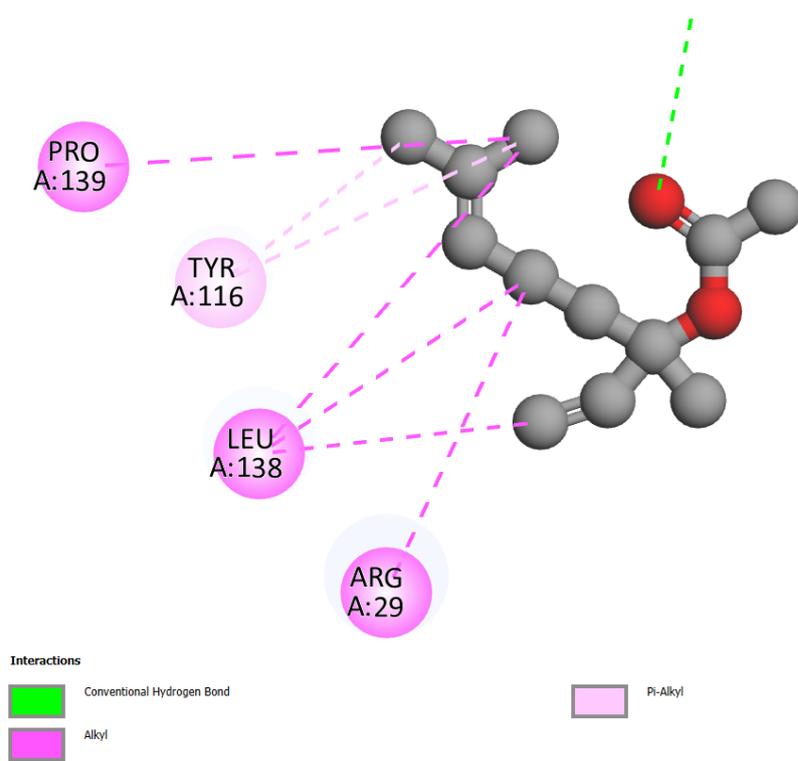
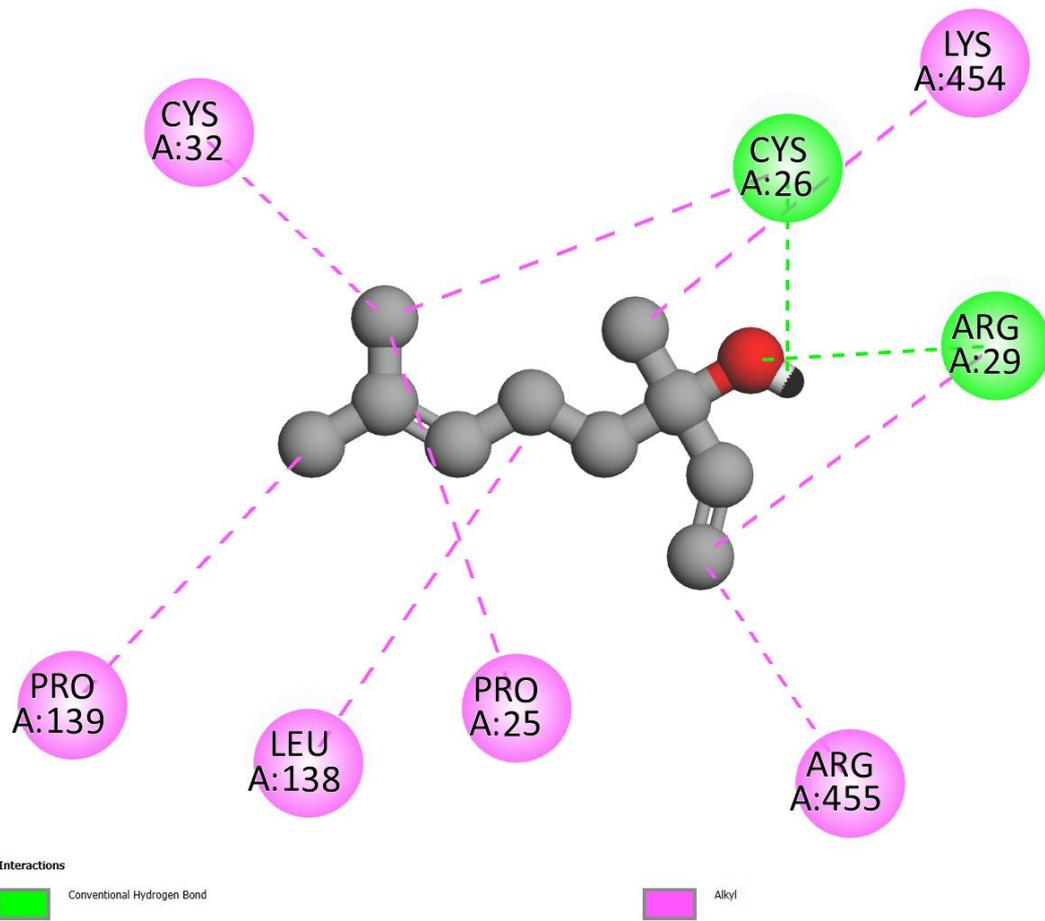


Figure 3.6. Types d'interactions testés et le site actif du récepteur protéique.





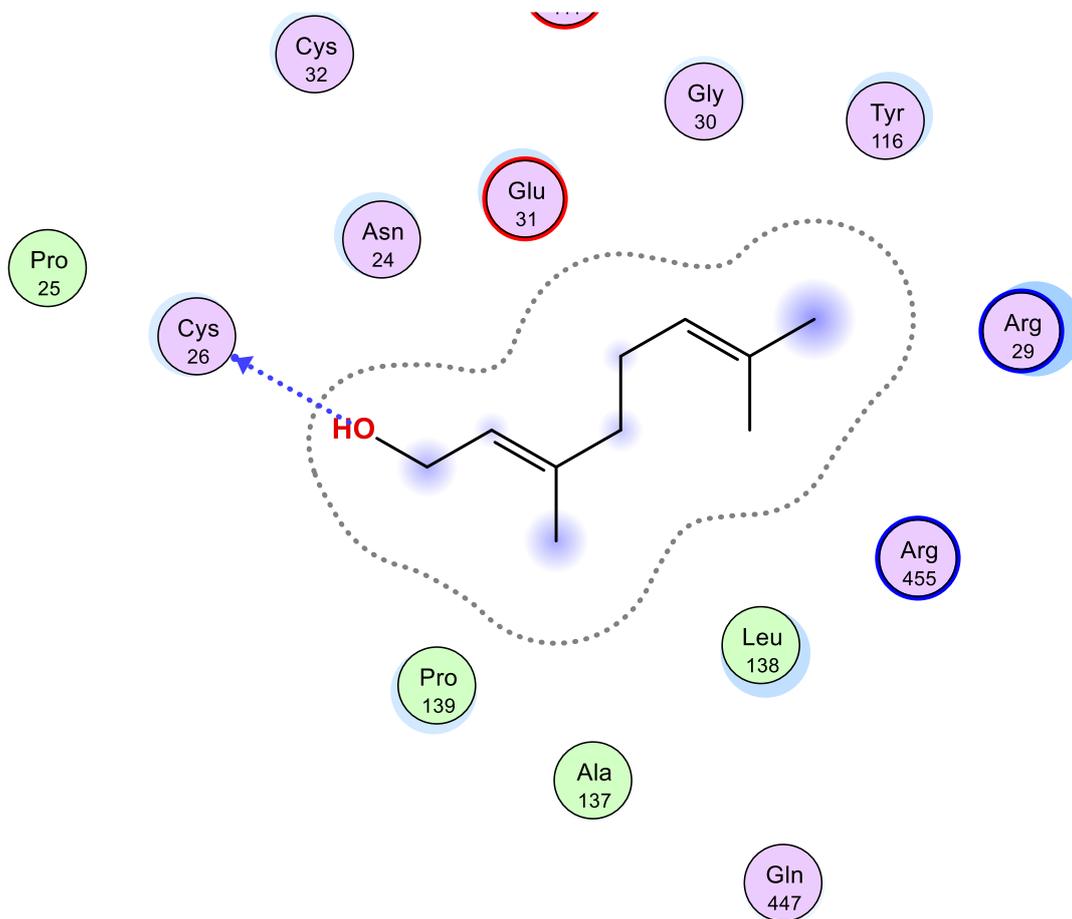


Figure 3.7. Types d'interaction entre les composés terpéniques et le site actif.

Tableau 3.5. Différents types de liaisons établies entre ligands et le site actif du récepteur.

Distance (Å)	Type de liaison
3,64	Hydrophobique
3,02	Liaison Hydrogène
	Electrostatique
3,18	Hydrophobique
3,09	Electrostatique
3,99	
3,14	
3,09	
5,56	
5,32	
3,98	Electrostatique
3,99	
3,46	
3,81	Liaison Hydrogène
4,72	
4,94	Electrostatique
4,15	Hydrophobique
3,34	
3,35	Hydrophobique
3,83	
4,45	Hydrophobique
3,42	
3,52	
4,14	
4,17	
3,09	
4,89	
3,03	
1,00	Electrostatique
3,08	Liaison Hydrogène
4,98	
5,35	
3,62	
2,07	
2,27	

2,23	
3,94	Liaison Hydrogène
3,45	Liaison Hydrogène
2,49	
3,14	
4,12	
4,30	
3,37	Electrostatique
3,01	
4,44	Liaison Hydrogène
4,63	Liaison Hydrogène
4,71	
3,63	Electrostatique
6,24	
6,40	Hydrophobique

Aussi, une autre publication scientifique (**Peana et al., 2002**) a démontré l'efficacité anti-inflammatoire ester terpénique contre l'œdème de la patte induit chez la souris.

Les résultats du docking doivent donc être validés par des expériences *in vitro* et *in vivo*, voire des études cliniques pour confirmer l'activité réelle des composés identifiés dans les HE.

3.5. Prédiction des propriétés

Aussi et pour une meilleure compréhension, nous avons complété cette étude par la prédiction de la toxicité aigüe avec l'aide d'un serveur en ligne. Enfin, tous les composés testés ont été confrontés à la règle qui donne une prédiction de la biodisponibilité.

Tableau 3.6. Prédiction des propriétés pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et toxicité (ADMET) des différents ligands testés.

	Propionate	Acétate	Formate
P CI PB	95.42%	42.268%	82.034%
BPPBB	0.5-1.0	0.7-0.9	0.8-1.0
CI	5.037	6.363	8.071
hERG	0-0.1	0-0.1	0-0.1
ECCH-HT	0.4-0.7	0.4-0.7	0.8-0.7
Skin Sensit.	0.5-1.0	0.4-0.9	0.8-0.9
Carcinogénicité	0-0.1	0.4-0.3	0.8-0.3
ECTT	0.6-0.7	0.4-0.9	0.8-0.7
ELLI	0.6-1.0	0.5-1.0	0.8-1.0

BPP = Liaisons aux protéines plasmatiques. BBB = barrière hémato-encéphalique ; CL = clairance [≥ 5 : excellent (vert) ; $<$; EI = Irritation oculaire ; Règle de Lipinski [$MW \leq 500$; $\log P \leq 5$; $Hacc \leq 10$; $Hdon \leq 5$] ; DL : Dose létale médiane ; Couleur = 0-0,3 : excellent (vert) ; 0,3-0,7 : moyen (jaune) ; 0,7-1,0 : faible (rouge)].

Parmi les différents paramètres prédits, nous pouvons citer le logP (log mol/L) qui donne le coefficient de distribution. Ce coefficient possède une position, à la fois sur la perméabilité membranaire et la liaison hydrophobe aux macromolécules, y compris cible ainsi que d'autres protéines comme les protéines plasmatiques.

Parmi les paramètres dont la satisfaisante, il y a la pénétration de la barrière hémato-encéphalique (BBB). La BBB est une barrière physique et biochimique central (SNC) de la circulation sanguine et empêche la plupart des molécules de passer de la circulation sanguine vers le cerveau.

Même constat pour le paramètre

. Enfin et concernant la règle 5 de Lipinski, il a été constaté que toutes les molécules testées sont en conformité avec cette règle et, par conséquent, présentent une biodisponibilité orale satisfaisante.

Pour les paramètres toxicologiques, il s'avère que tous faible pouvoir cancérogène qui se traduit par leur possibilité à induire des changements dans le matériel génétique. Nous avons également noté un risque faible d'inhibition du gène par tous les ligands testés. L'inhibition de ce gène problèmes cardiaques associés cardiaque.

La SkinSen) est un effet indésirable potentiel des produits appliqués par voie cutanée. L'évaluation pour savoir si un composé avec la peau peut induire une dermatite de contact allergique est une préoccupation de sécurité importante (Wang et al., 2017).

En résumé, les échecs dans la conséquence de mauvaises performances pharmacocinétiques. Ce problème a été, en grande partie, résolu grâce à l'utilisation d'un précédent l'utilisation des chimiothèques, réduisant les taux d'échec dans les phases de développement. L

3.6. Développement d'un modèle

Un modèle de pharmacophore a été généré (figure 3.7) en superposant quatre composés ayant la plus forte affinité pour le site actif, à savoir les deux AINS et les deux esters monoterpéniques et ce pour identifier des caractéristiques communes. La disposition spatiale de ces caractéristiques est également importante, et le modèle pharmacophore précisera les distances et les angles entre eux.

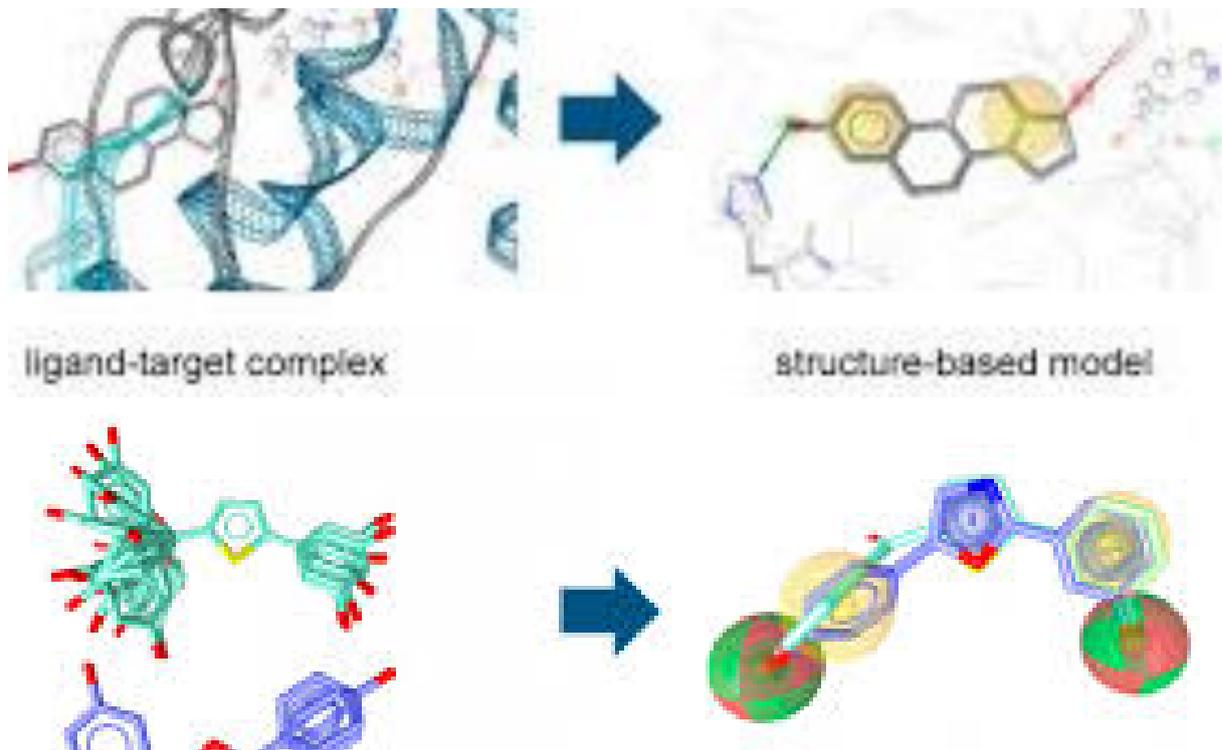


Figure 3.8. Modèle pharmacophore généré par superposition des ligands.

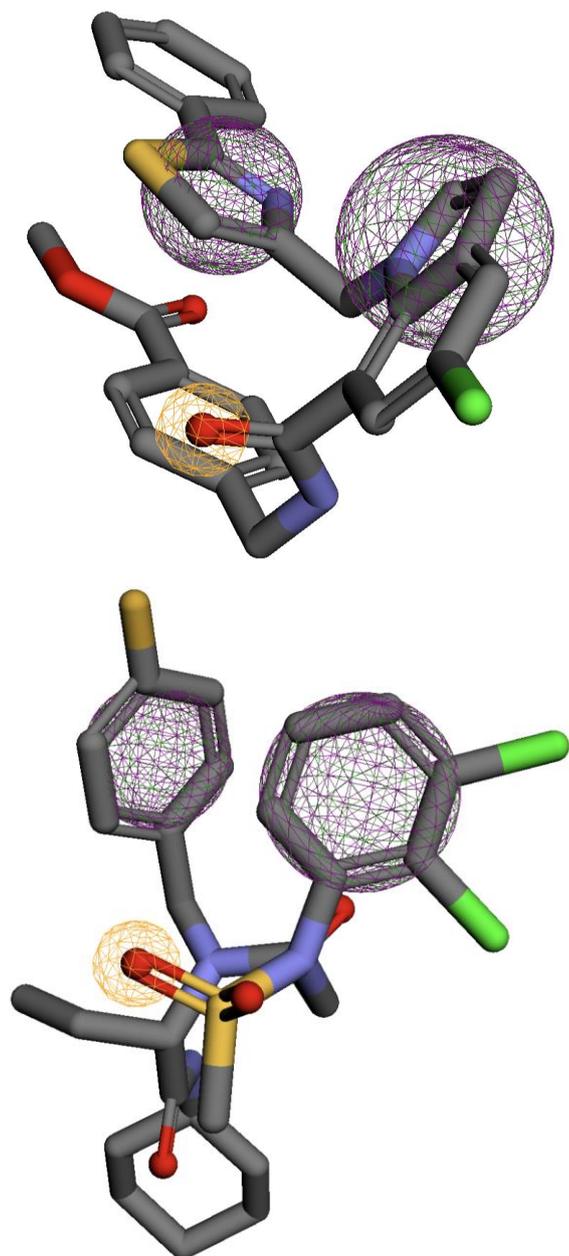


Figure 3.9. Structure obtenue par criblage du modèle.

Les études peuvent être utilisées pour identifier des motifs moléculaires communs dans des composés connus pour avoir une activité anti-inflammatoire. Ces motifs peuvent être utilisés pour concevoir de nouveaux composés ayant une structure similaire et une activité anti-inflammatoire prévue. Il existe plusieurs exemples de médicaments anti-inflammatoires conçus en utilisant la méthode du modèle pharmacophore.

3.7. Contrôle de la qualité microbienne

Le contrôle de la qualité microbienne préparée a été menée par technique d'ensemencement en masse, et a révélé que notre préparation est exempte de toute contamination bactérienne ou fongique.

Par conséquent, est déclarée conforme aux normes en vigueur (**Pharmacopée, Européenne, 2005**).

Cette protection microbiologique est liée à la présence d'un conservateur de synthèse puissant du nom de KathonCG® utilisé dans comme agent de conservation de l'émulsion.

CONCLUSION

Toutes les HE testées ont présenté un certain pouvoir inhibiteur sur les germes mais à des degrés variables.

Aussi, la détermination des concentrations minimales inhibitrice et bactéricide a été menée par macro-dilution et a révélé que c'est principalement les souches fongiques qui ont montré la plus grande sensibilité aux huiles testées, ce qui est en étroite corrélation avec les résultats obtenus précédemment.

Le pouvoir des huiles a été évalué par technique, et ce en comparaison avec le contrôle positif. Le groupe d'animaux traité avec l'essence à faible dose, a présenté un taux de réduction le plus élevé.

Cette expérimentation animale a été complétée par un examen histologique prélevées afin de confirmer cet effet à échelle tissulaire.

La méthodologie utilisée dans la détermination du pouvoir anti-inflammatoire plusieurs tests *in vitro* (culture, inhibition enzymatique) et *in vivo* (œdème des pattes induit, l'inflammation articulaire par adjuvant de Freund).

Les études *in silico* peuvent fournir une base solide pour la conception rationnelle de nouveaux composés, mais des essais biologiques *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires pour confirmer leur activité pharmacologique et évaluer leur toxicité potentielle.

Références Bibliographiques

1. Aljaafari, M. N., AlAli, A. O., Baqais, L., Alqubaisy, M., AlAli, M., Molouki, A., & Lim, S. H. E. (2021). An overview of the potential therapeutic applications of essential oils. *Molecules*, 26(3), 628.
2. Al-Reza, S. M., Yoon, J. I., Kim, H. J., Kim, J. S., & Kang, S. C. (2010). Anti-inflammatory activity of seed essential oil from *Zizyphus jujuba*. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 639-643.
3. Aziz, Z. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., & Ashraf, G. M. (2018). Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential-a review. *Current Drug Metabolism*, 19(13), 1100-1110.
4. Bardeau, F. (2009). *Les huiles essentielles: Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale*. Fernand Lanore.
5. Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (Eds.). (2010). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press.
6. Baudoux, D. (2000). *L'aromathérapie, se soigner par les huiles essentielles*. Douce Alternative, Biarritz France.
7. Blain, H., Jouzeau, J. Y., Netter, P., & Jeandel, C. (2000). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *La Revue de Médecine Interne*, 21(11), 978-988.
8. Chiolero, A., Würzner, G., & Burnier, M. (2000). Les inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase de type 2: moins d'effets rénaux que les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques. *Néphrologie*, 21(8), 425-430.
9. Da Silva, P. P., Bendjeddou, L. Z., & Meijer, L. (2014). Recherche de substances naturelles à activité thérapeutique. *Médecine/sciences*, 30(3), 319-328.
10. De Sousa, A. A. S., Soares, P. M. G., de Almeida, A. N. S., Maia, A. R., de Souza, E. P., & Assreuy, A. M. S. (2010). Antispasmodic effect of *Mentha* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2), 433-436.
11. Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
12. Falleh, H., Jemaa, M. B., Saada, M., & Ksouri, R. (2020). Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. *Food Chemistry*, 330, 127268.
13. Franchomme, P., Jollois, R., & Pénéol, D. (1990). *L'Aromathérapie exactement: encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles: fondements,*

démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. Roger Jollois Editeur.

14. Garreta, R. (2007). Des simples à l'essentiel: de l'herboristerie à l'aromathérapie, pratiques et représentations des plantes médicinales. Presses Univ. du Mirail.
15. Géa, A., & Banel, P. (2022). Physiologie et huiles essentielles (Vol. 1). Malakoff, France: Dunod.
16. Grosjean, N. (2011). Les huiles essentielles: Se soigner par l'aromathérapie. Editions Eyrolles.
17. Guillon, J. M. (2010). Place et rôle de la pharmacologie de sécurité dans le développement des médicaments. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 68, No. 5, pp. 291-300). Elsevier Masson.
18. Hersini, K. J., Melgaard, L., Gazerani, P., & Petersen, L. J. (2014). Microdialysis of inflammatory mediators in the skin: a review. *Acta Dermato-Venereologica*, 94(5), 501-511.
19. Hoffmann, K. H. (2020). Essential oils. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 75(7-8), 177-177.
20. Huo, M., Cui, X., Xue, J., Chi, G., Gao, R., Deng, X., & Wang, D. (2013). Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. *Journal of Surgical Research*, 180(1), e47-e54.
21. Iserin, P., Masson, M., Restellini, J. P., Ybert, E., De Laage de Meux, A., Moulard, F., & Botrel, A. (2001). *Larousse des plantes médicinales identification, préparation, soins*. Editions Larousse, Paris, 15.
22. Kamatou, G. P., Vermaak, I., Viljoen, A. M., & Lawrence, B. M. (2013). Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry*, 96, 15-25.
23. Kim, M. G., Kim, S. M., Min, J. H., Kwon, O. K., Park, M. H., Park, J. W., & Ahn, K. S. (2019). Anti-inflammatory effects of linalool on ovalbumin-induced pulmonary inflammation. *International Immunopharmacology*, 74, 105706.
24. Kloucek, P., Smid, J., Frankova, A., Kokoska, L., Valterova, I., & Pavela, R. (2012). Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. *Food Research International*, 47(2), 161-165.
25. Laird, K., & Phillips, C. (2012). Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?. *Letters in Applied Microbiology*, 54(3), 169-174.
26. Lee, Y. L., & Ding, P. (2016). Production of essential oil in plants: ontogeny, secretory structures and seasonal variations. *Pertanika Journal of Scholarly Research Reviews*, 2(1).
27. Lizarraga-Valderrama, L. R. (2021). Effects of essential oils on central nervous system: Focus on mental health. *Phytotherapy Research*, 35(2), 657-679.

28. Mallea, M., Soler, M., Anfosso, F., & Charpin, J. (1979). Activité antifongique d'essences aromatiques. *Pathology Biology*, 27, 597-602.
29. Marsico, F., Paolillo, S., & Filardi, P. P. (2017). NSAIDs and cardiovascular risk. *Journal of Cardiovascular Medicine*, 18, e40-e43.
30. Martini, M. C. (2011). *Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie*. Edition Lavoisier, France.
31. Martoja, R., Martoja-Pierson, M., & Grassé, P. P. (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Edition Masson, Paris, France.
32. Maurya, A., Prasad, J., Das, S., & Dwivedy, A. K. (2021). Essential oils and their application in food safety. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 653420.
33. Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.
34. Oussou, K., Yolou, S., Boti, B., Guessend, N., Kanko, C., Ahibo, C., & Casanova, J. (2008). Chemical and Activity Study Antidiarrhal activity of essential oils of two aromatic plants pharmacopoeia of Ivory Coast. *European Journal of Scientific Research*, 24(1), 94-103.
35. Parthasarathy, V. A., Chempakam, B., & Zachariah, T. J. (Eds.). (2008). *Chemistry of spices*. CABI.
36. Peana, A. T., D'Aquila, P. S., Panin, F., Serra, G., Pippia, P., & Moretti, M. D. L. (2002). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*, 9(8), 721-726.
37. Pharmacopée Européenne. (2005). *Pharmacopée Européenne*. Direction Européenne de la Qualité du Médicament. V^{ème} édition, Strasbourg, France.
38. Schlemmer, B., Fieux, F., Moreau, D., Thiery, G., & Azoulay, E. (2002). Place des nouvelles molécules dans le traitement des infections à pneumocoques. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 32, 71-78.
39. Sethi, A., Joshi, K., Sasikala, K., & Alvala, M. (2019). Molecular docking in modern drug discovery: Principles and recent applications. *Drug Discovery and Development-New Advances*, 2, 1-21.
40. Turner, G. W., Gershenzon, J., & Croteau, R. B. (2000). Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. *Plant Physiology*, 124(2), 655-664.
41. Vishwakarma, R. K., Negi, A., & Negi, D. S. (2022). Development of potential COX inhibitor as anti-inflammatory agents from leaves of *Lantana camara* by *in-vitro* analysis, molecular docking and ADMET prediction. *Journal of the Indian Chemical Society*, 99(10), 100694.
42. Voravuthikunchai, S. P., Minbutra, S., Goodla, L., Jefferies, J., & Voravuthikunchai, S. (2012). Mixtures of essential oils in an air conditioning prototype to reduce the prevalence of airborne pathogenic bacteria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(5), 739-749.

43. Wilson, M. (2016). The New England Journal of Medicine: commercial conflict of interest and revisiting the Vioxx scandal. *Indian Journal of Medical Ethics*, 1(3), 167-171.
44. Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., & Szumny, A. (2019). Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative?. *Molecules*, 24(11), 2130.

Technique de coloration « Hématoxyline-Eosine »

1. Fixation :

- Elle a pour but la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit se faire après le prélèvement, par immersion dans un grand volume de liquide fixateur (formol).

2. Déshydratation et Eclaircissement :

- La déshydratation a pour but de faire sortir l'eau contenue dans les tissus pour les préparer à l'inclusion. On utilise généralement un automate muni (Leica TP 1020, V2.3 Français-03 /2008) de plusieurs bacs contenant par ordre :

Réactifs	Temps (h)	Température (°C)
Formol	2	< 40
Ethanol 50%	2	45
Ethanol 90%	1	45
Ethanol 98%	1	45
Xylène 50%	1	45
Xylène 60%	1	45
Paraffine 50%	2	60
Paraffine 60%	2	60

- L'inclusion dans la paraffine nécessite au préalable la déshydratation des pièces histologiques (bains successifs d'éthanol de degrés croissants, jusqu'à l'absolu).

Mode opératoire :

- On met les pièces des oreilles dans des cassettes en plastique qui se placent en vrac dans le panier. Chaque cassette porte toutes les indications utiles de chaque pièce. On met le panier dans l'automate d'infiltration qui va effectuer automatiquement toutes les opérations de traitement des prélèvements tissulaires : fixation, déshydratation, et éclaircissement des spécimens dans les solvants pour finir par l'inclusion dans la paraffine liquide.

3. L'inclusion :

- Régler la température du bain de paraffine en fonction de ce point de fusion (45-70°C).
- L'inclusion se fera dans des moules pour la confection de blocs qui se montent sur le microtome.

Mode opératoire :

On utilise pour cette étape une station d'enrobage contenant un console thermique, console d'enrobage et console réfrigérante.

- La cassette d'enrobage est alors enlevée de la plate-forme de travail chauffée, puis placée au-dessus du moule : la température de la cassette et la paraffine liquide permettent une soudure immédiate. La cassette et le moule sont alors de nouveau placés sous le système de distribution, la paraffine est ajoutée jusqu'à ce que la cassette soit à moitié remplie.

4. Réalisation des coupes au microtome :

- Les coupes du bloc de paraffine sont réalisées avec un microtome (Leica RM 212SRTS) permettant d'obtenir des sections de 5 µm d'épaisseur.

5. Coloration :

- Elle est précédée par séchage des lames à 90°C pendant 10 min à l'étuve dans le but d'éliminer la paraffine du prélèvement et d'augmenter l'adhérence des coupes.

	Durée (minutes)
Xylène	3
Alcool (éthanol 98%)	2
Alcool pur (éthanol 98%)	3
Eau lithiné	2
Eau courante	2
Eosine	12
Eau courante	3
Alcool (éthanol 98%)	2
Xylène	3