



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



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 : Biotechnologies et Pathologies Moléculaires

Thème

**Etude des propriétés pharmaco-toxicologiques des extraits aromatiques
distillés des plantes médicinales de la famille des Lamiacées**

Présenté par

DJEDIR Nada Hadil

Date de Soutenance

07/2023 à 11H00

Devant le Jury composé de =

Mme ALILECHE KH.	Maître de Recherche	CRAPC Bousmail	Présidente
Mme LOUNACI S.	Maître de Conférences	Univ. Blida 1	Examinatrice
M. BOKHATEM M.	Professeur	Univ. Blida 1	Promoteur

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je remercie notre Dieu, le tout puissant pour la volonté, le courage, la santé et la patience qu'Il m'a donné durant ces mois consacrés à la réalisation de ce modeste travail.

Je tien à adresser mes sincères remerciements à mon promoteur d'avoir proposé ce sujet de recherche et de m'encadrer et soutenue par ses conseils, sa compréhension, sa gentilles et ses encouragements.

J'aimerais également remercier =

- Madame la présidente du jury (Maître de recherche au niveau du CRAPC). Je suis particulièrement très honorée que vous ayez accepté la présidence du jury de mémoire de master en Biotechnologies et pathologies. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et mon profond respect.
- Madame l'examinatrice du jury (Maître de Conférences à l'Université Blida 1) de m'avoir honoré d'examiner mon mémoire de master. Je suis très reconnaissante et je saisis cette occasion pour vous adresser mes sincères remerciements et soyez assurée de ma profonde gratitude.
- Notre promoteur pour tous les conseils et orientations durant notre stage pratique

Je remercie particulièrement Melle SIHEM et Melle Zineb pour leur immense aide et coopération au cours de la réalisation de mon stage de fin d'études.

Enfin, j'exprime mon respect et remerciements à tout le corps enseignant du département, ainsi que ceux de la Faculté, et particulièrement toutes celles et tous ceux qui m'ont enseigné durant mon cursus universitaire.

DEDICACES

A l'aide de Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

Au bonheur de ma vie ma mère KADIRI ZAIA et à la lumière de mes yeux mon père DJEDIR ABDELKADER, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'Amour que vous m'avez donné depuis mon enfance, surtout mon père ce travail est le fruit de tes sacrifices. Là où je suis arrivée aujourd'hui c'est grâce à vous MES CHERS PARENTS Que dieu vous accorde la santé et la longue vie.

Je dédie aussi ce travail :

A ma chère tante KADIRI FATIMA ZOHRA et Monsieur GHAROUSS YACINE pour leurs grands efforts.

A mes chères sœurs YASSMINE et SOFIE, que je souhaite beaucoup de succès dans leurs études.

Une spéciale dédicace a KHERCHACHE HICHEM qui est une personne qui compte énormément pour moi.

A mes amies de la promotion et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

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.

Table des Matières

Résumé

Abstract

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des Abréviations

Introduction

Chapitre 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Réaction inflammatoire

1.2. Causes et acteurs de la réaction

1.3. Différentes phases

1.3.1. Phase vasculaire

1.3.2. Phase cellulaire

1.3.3. Phase de résolution

Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel

2.1. Huiles essentielles étudiées

2.2. Réactifs et produits chimiques

2.3. Animaux de Laboratoire

2.2. Méthodes

2.2.1. Evaluation de l'activité topique *in vivo*

2.2.1.3. Etude anatomopathologique

2.2.2. Évaluation de l'activité *in vivo*

2.2.2.1. Préparation d'une émulsion

2.2.2.2. Évaluation de l'activité *in vivo* de la crème

2.2.2.3. Coupes histologiques

2.2.3. Etude du pouvoir *in silico*

2.2.3.1. Structures des ligands

2.2.3.2. Structure et préparation

2.2.3.3. Simulation de l'affinité

2.2.3.4. Génération d'un modèle

2.2.4. Etude Statistique

Chapitre 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Composition chimique

3.2. Pouvoir topique *in vivo*

3.3. Examen de l'histologie tissulaire

3.4. Etude des propriétés *in vivo*

3.3. Evaluation du pouvoir *in silico*

3.4. Génération d'un modèle basé sur les ligands

Conclusion

Références Bibliographiques

RESUME

L'objectif de notre travail consiste à évaluer, *in vivo*, le pouvoir d'une préparation galénique contenant des extraits phytochimiques comme ingrédient actif, à différentes doses, et ce en comparaison avec un contrôle positif tels que les médicaments de synthèse. Les différents traitements ont été appliqués quotidiennement, complétés par un examen histologique.

Aussi, le pouvoir des extraits phytochimiques a été étudié *in vivo* via la technique d'induction chez les animaux de laboratoire en l'occurrence des souris. Cette activité a été aussi confirmée, à échelle tissulaire, par une étude histologique qui a révélé que les lots d'animaux traités avec des doses faibles en extrait phytochimique naturel ont présenté le meilleur effet, en comparaison avec le médicament de référence pris comme contrôle négatif.

Ces résultats prometteurs de l'inhibition *in vivo* topique nous ont encouragés à effectuer des études d'amarrage ou simulation moléculaire, pour établir et comprendre les différentes interactions ligand-protéine.

La simulation de l'affinité entre les composés terpéniques présents dans les extraits phytochimiques et les médicaments de synthèse a été réalisé séparément contre une enzyme comme récepteur. Le médicament a présenté la plus grande affinité pour le site actif avec une énergie de liaison la plus faible, suivi par un ester monoterpénique avec une énergie faible.

En définitive, les résultats obtenus laissent entrevoir de nouvelles perspectives d'application pharmaceutique des extraits phytochimiques naturels comme un ingrédient actif ou encore comme biomolécules actives.

Mots-clés : Activités biologiques ; Extraits aromatiques ; Inflammation locale ; Distillation ; Pharmacocinétique et pharmacodynamique.

ABSTRACT

The objective of our work is to evaluate the efficacy of a galenic preparation or formulation containing phytochemical extracts as the active ingredient at different doses, compared to a positive control such as synthetic drugs. The different treatments were applied daily and complemented by histological examination.

Furthermore, the efficacy of phytochemical extracts was studied *in vivo* using the induction technique in laboratory animals, specifically mice. This activity was also confirmed at the tissue level by histological study, which revealed that the groups of animals treated with low doses of natural phytochemical extract showed the best effect compared to the reference drug used as a negative control. These promising results of topical *in vivo* inhibition encouraged us to conduct docking or molecular simulation studies to establish and understand the different ligand-protein interactions and the binding energies.

The simulation of affinity between the terpene compounds present in the phytochemical extracts and synthetic drugs was separately performed against an enzyme as the receptor. The drug showed the highest affinity for the active site with the lowest binding energy, followed by a monoterpene ester with low energy.

In conclusion, the obtained results suggest new prospects for the pharmaceutical application of natural phytochemical extracts and their characteristic compounds as an active ingredient or as active biomolecules.

Keywords: Biological activities; Aromatic extracts; Local inflammation; Distillation; Pharmacokinetics and pharmacodynamics.

ملخص

الهدف من عملنا هو تقييم قوة التحضير الصيدلاني الذي يحتوي على مستخلصات فيتوكيميائية كمكون فعال في حالة حية (in vivo) بجرعات مختلفة، وذلك بالمقارنة مع مجموعة سيطرة إيجابية مثل الأدوية المصنعة اصطناعياً. تم تطبيق المعالجات المختلفة يومياً، مع إجراء فحص نسيجي.

تمت دراسة قوة المستخلصات فيتوكيميائية في حالة حية (in vivo) باستخدام تقنية التنشيط على حيوانات المختبر، على وجه التحديد فئة الفئران. تم تأكيد هذه النشاطات على مستوى الأنسجة من خلال دراسة نسيجية كشفت أن الفئران التي تم علاجها بجرعات منخفضة من المستخلص الفيتوكيميائي الطبيعي أظهرت أفضل تأثير، مقارنة بالدواء المرجعي المستخدم كسيطرة سلبية.

هذه النتائج الواعدة للتنشيط الموضعي في حالة حية (in vivo) حفزتنا لإجراء دراسات الربط أو المحاكاة الجزيئية، لتحديد وفهم التفاعلات المختلفة بين الروابط والبروتينات.

تم إجراء محاكاة التوافق بين المركبات الثيرينية الموجودة في المستخلصات الفيتوكيميائية والأدوية المصنعة اصطناعياً بشكل منفصل ضد إنزيم كمستقبل. أظهرت الدواء أعلى توافق مع الموقع النشط بأقل طاقة للربط، تليها الإستر الأحادي الثيريني بطاقة منخفضة.

في النهاية، تتيح النتائج المحصلة رؤية آفاق جديدة لتطبيق المستخلصات الفيتوكيميائية الطبيعية في مجال الصيدلة، سواء كمكون فعال أو كجزيئات حيوية فعالة.

الكلمات الرئيسية: أنشطة بيولوجية، مستخلصات عطرية، التهاب موضعي، التقطير، الصيدلية الدوائية والديناميكية.

Liste des Tableaux

Tableau 1.1. Différentes cellules intervenant dans la réaction.

Tableau 2.1. Composition de l'émulsion.

Tableau 2.2. Ligands testés *in silico*.

Tableau 3.1. Variabilité de la composition.

Tableau 3.2. Taux de réduction dans différents lots traités.

Tableau 3.3. Résultats de l'activité *in silico*.

Tableau 3.4. Différents types d'interaction dormés.

Liste des Figures

Figure 1.1. Schéma bilan de la réaction.

Figure 1.2. Formation du liquide plasmatique.

Figure 1.3. Exsudat : Matrice lâche et très claire.

Figure 1.4. Alvéolite.

Figure 1.5. Principales étapes de l'extravasation.

Figure 1.6. Diapédèse.

Figure 1.7. Tissu de granulation inflammatoire après quelques jours d'évolution.

Figure 1.8. Bourgeon charnu constitué de capillaires et d'une matrice extracellulaire lâche.

Figure 2.1. Etapes du test *in vivo*

Figure 2.2. Structure chimique des différents composés testés.

Figure 2.3. Structure de la protéine téléchargée.

Figure 2.4. Interaction du ligand avec le site actif.

Figure 2.5. Structure préparée.

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

Figure 3.1. Résultats du pouvoir topique.

Figure 3.2. Examen pathologique des tissus.

Figure 3.4. Evolution de l'aspect.

Liste des Abréviations

® = Marque enregistrée

ANOVA = Analyse de la variance

BALB/c = Bagg Albino

CHU = Centre hospitalo-universitaire

HE = Huile essentielle

Ig = Immunoglobuline

Il = Interleukines

NMRI = Naval Medical Research Institute

ONAB = Office Nationale de l'Alimentation du Bétail

PAM = Plantes aromatiques et médicinales

PMN = polynucléaires

TEA = Triéthanolamine

TGF- β = Facteur de croissance transformant

TNF- α = Facteur de nécrose tumorale

INTRODUCTION

Certains médicaments, en particulier à fortes doses ou lors d'une utilisation prolongée, peuvent augmenter le risque d'accidents cardiovasculaires tels que les crises cardiaques et les accidents vasculaires cérébraux. Les médicaments peuvent affecter la fonction rénale et entraîner une rétention d'eau, une augmentation de la pression artérielle et des problèmes rénaux tels que l'insuffisance (**Ulinski et Bensman, 2004**).

Partant de ce constat amer, les scientifiques recherchent et explorent, depuis de nombreuses années dans l'industrie pharmaceutique, de nouvelles substances ou molécules bioactives permettant de traiter les pathologies inflammatoires. En outre et face au problème soulevé, depuis plusieurs décennies, par les effets indésirables des médicaments conventionnelles et les interactions médicamenteuses, une alternative à l'usage de ces médicaments synthétiques des molécules (**Goetz et Ghedira, 2012 ; Zhang et al., 2020**).

Le secteur de production des extraits connaît, ces derniers temps, un essor rapide. Cette évolution est due essentiellement à la forte demande mondiale pour les produits naturels, au nombre croissant des utilisateurs et, enfin, à la diversité des domaines de valorisation (**Bessah and Benyoussef, 2015**).

En outre, l'étude de ces extraits naturels est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels de domaines tels que la pharmacognosie et la pharmacie galénique. Depuis, l'utilisation des extraits naturels s'est développée jusqu'à devenir, depuis plus d'une vingtaine d'années, une sérieuse alternative à la médication de synthèse.

Parmi les produits naturels qui sont largement utilisées pour leurs vertus thérapeutiques, nous pouvons citer les espèces appartenant à la famille des lamiacées. Cette famille regroupe la plupart des plantes aromatiques et condimentaires de la région méditerranéenne. Elle est une importante source d'extraits naturels, d'infusion et antiseptiques naturels pour l'aromathérapie, la parfumerie, l'industrie des cosmétiques qui les exploitent pour leurs propriétés (**Nieto, 2017 ; Festy, 2018 ; Ramos da Silva et al., 2021**).

L'objectif assigné à notre travail consiste à évaluer, *in vivo*, le pouvoir pharmacologique et régénérant d'une préparation galénique topique de type émulsion contenant les extraits végétaux comme ingrédient actif, à deux doses différentes, sur des animaux de laboratoire, et ce en comparaison avec un contrôle positif.

Chapitre 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Réaction inflammatoire

La fonction principale de l'inflammation est de résoudre l'infection ou de réparer les dommages et de revenir à un état d'homéostasie intrinsèque. Ainsi, la réponse inflammatoire idéale est rapide (**Barton, 2008 ; Zeghal, Sahnoun, 2013**).

Ce processus comprend :

- Des phénomènes généraux, exprimés biologiquement par le syndrome inflammatoire et cliniquement de façon variable, le plus souvent par de la fièvre et éventuellement une altération de l'état général.
- Les tissus épithéliaux n'ont pas de rôle actif dans le déroulement de la réaction inflammatoire mais ils peuvent être altérés par l'agression qui déclenche l'inflammation, puis être réparés au cours de la phase terminale de l'inflammation (**Calvino, 2021**).

La réaction inflammatoire est une défense non spécifique et complexe de l'organisme (tissus vivants et vascularisés) contre des agressions endogènes (cellules tumorales) ou exogènes (envahisseurs microbiens, lésions tissulaires et traumatismes chirurgicaux) (**Serhan et Savill, 2005**) s'accompagne par une succession d'événements clés permettant l'acheminement des différents leucocytes (Figure 1.1) (**Ben-Baruch, 2006**).

On distingue l'inflammation aiguë et chronique. Le premier cas est un phénomène physiologique qui se déroule sur une courte période.

Cette dernière est caractérisée par une perméabilité vasculaire accrue et persistante, une sécrétion inappropriée de cytokines inflammatoires par les cellules stromales et les leucocytes résidents, une activation persistante des leucocytes avec une sécrétion de protéines lytiques (**Ru Raymondjean, 2007**).

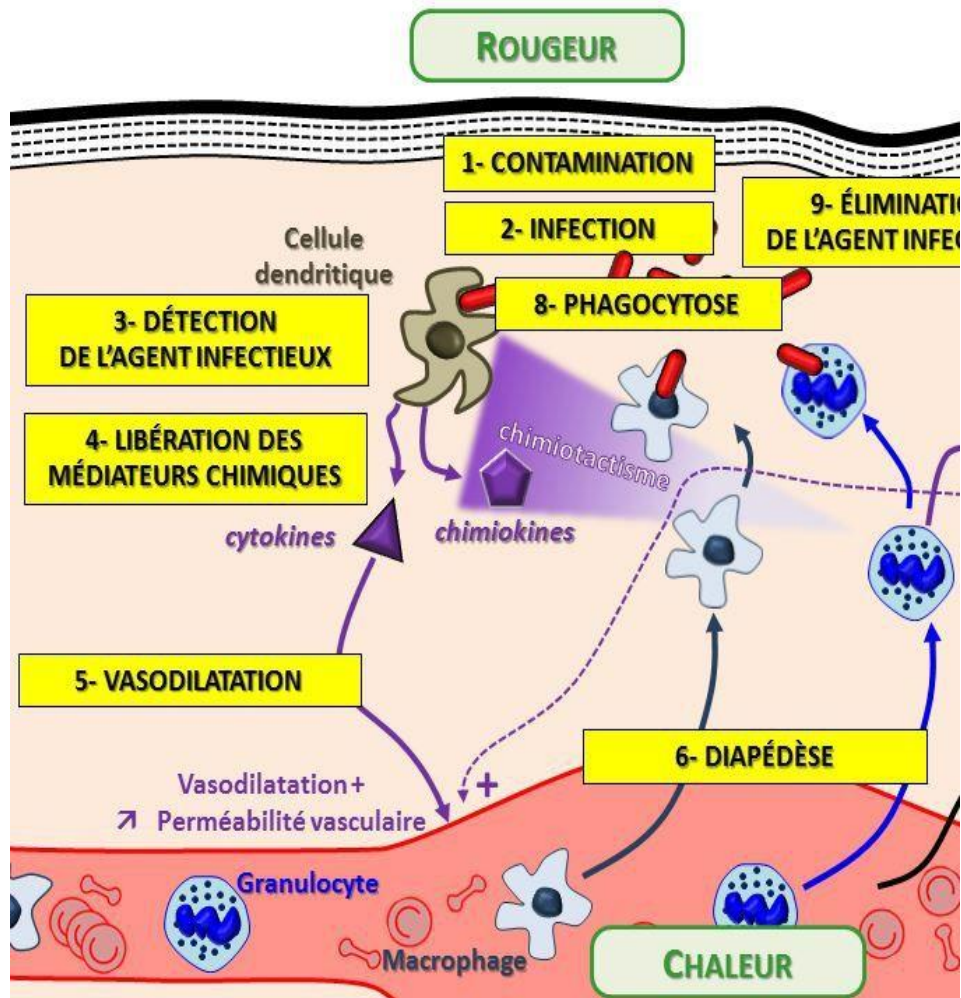


Figure 1.1. Schéma bilan de la réaction. (google.images.fr)

1.2. Causes et acteurs de la réaction inflammatoire

Les causes de l'inflammation sont multiples (Dujardin et al., 2010). Nous pouvons citer les :

- Facteurs physiques :
- Facteurs chimiques :
- Facteurs trophiques :
- Facteurs biologiques :
- Facteurs dysimmunitaires :

A noter que les microorganismes infectieux ne constituent qu'une partie des causes de l'inflammation et qu'une réaction.

Et parmi les acteurs impliqués dans la réaction inflammatoire, nous pouvons citer :

- Les cellules représentées en premier par les polynucléaires neutrophiles avec parfois les éosinophiles et ou les mastocytes, puis les monocytes, les macrophages et les lymphocytes, (Tableau 1.1).

Tableau 1.1. Différentes cellules intervenant dans la réaction inflammatoire.

Type de cellule	Différentiel (%)	Fonction basique
Neutrophiles	40-75	Migrer dans le tissu extravasculaire.
Eosinophiles	1-6	Migrer à travers le sang dans les tissus extravasculaires et y survivre.
Basophiles	-1	Ils sont morphologiquement similaires aux mastocytes. Ils peuvent se déplacer.
Monocytes	2-10	Se différencient en macrophages une fois dans la circulation sanguine.
Lymphocytes	20-45	Les deux principaux lymphocytes.

- Les histamines sont produites lors de la dégranulation des mastocytes et se lient à des récepteurs retrouvés au niveau des capillaires et des veines. Ses effets sont nombreux, entraînant une dilatation des artérioles et augmentation de la perméabilité des veinules, une constriction des artères (**Zeghal, Sahnoun, 2013**).

- Parmi les médiateurs chimiques, il y a les prostaglandines et les leucotriènes qui sont des médiateurs lipidiques interviennent dans les processus inflammatoires aigus (**Bertin et Vergne-Salle, 2019 ; Karleskind, 2016**).

1.3. Différentes phases de l'inflammation aigue

L'inflammation aigue est la réponse immédiate de l'organisme à un agent pathogène (**Terheyden et al., 2014**).

1.3.1. Phase vasculaire (réaction vasculo-exsudative)

Quelques secondes apparaissent la rougeur associée à la douleur qui est attribuée à la congestion. Il s'agit d'une modification du calibre vasculaire qui apparaît très rapidement, après une brève vasoconstriction, et consiste à une vasodilatation artériolaire (Figure 1.2) (**Weill et Batteux, 2003 ; Zeghal et Sahnoun, 2013**).

Ce liquide (exsudat) est riche en médiateurs inflammatoires, anticorps, composants du complément et en différentes protéines plasmatiques. Le passage de l'exsudat riche en médiateurs (Figure 1.3 et 1.4) (Calvino, 2021).

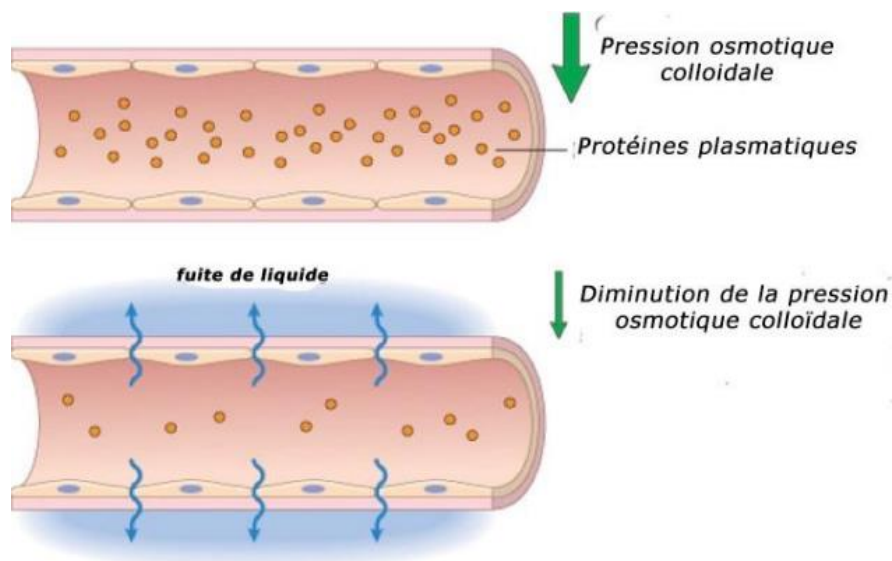


Figure 1.2. Formation du liquide (Kumar et al., 2007).

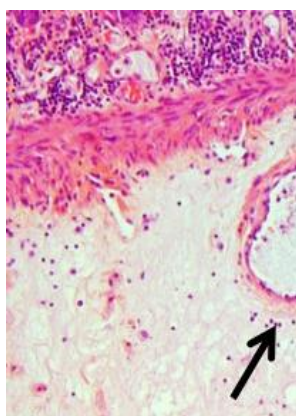


Figure 1.3. Exsudat : Matrice lâche et très claire (#) dissociant les fibres de collagène (*) et quelques leucocytes.

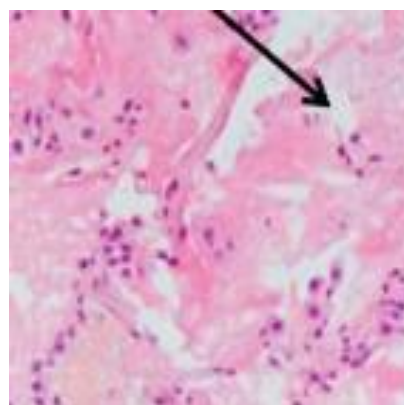


Figure 1.4. Alvéolite œdémateuse. La lumière des alvéoles pulmonaires est comblée (flèches).

(Société Française d'Anatomie Normale et Pathologique, 2022)

1.3.2. Phase cellulaire

L'afflux des cellules, fait que celles-ci vont d'abord se marginaliser sur le site de l'agression (Figure 1.5, 1.6 et 1.7). Ces cellules vont traverser la paroi, grâce à de nombreux facteurs (Weill et Batteux, 2003 ; Raymondjean, 2007).

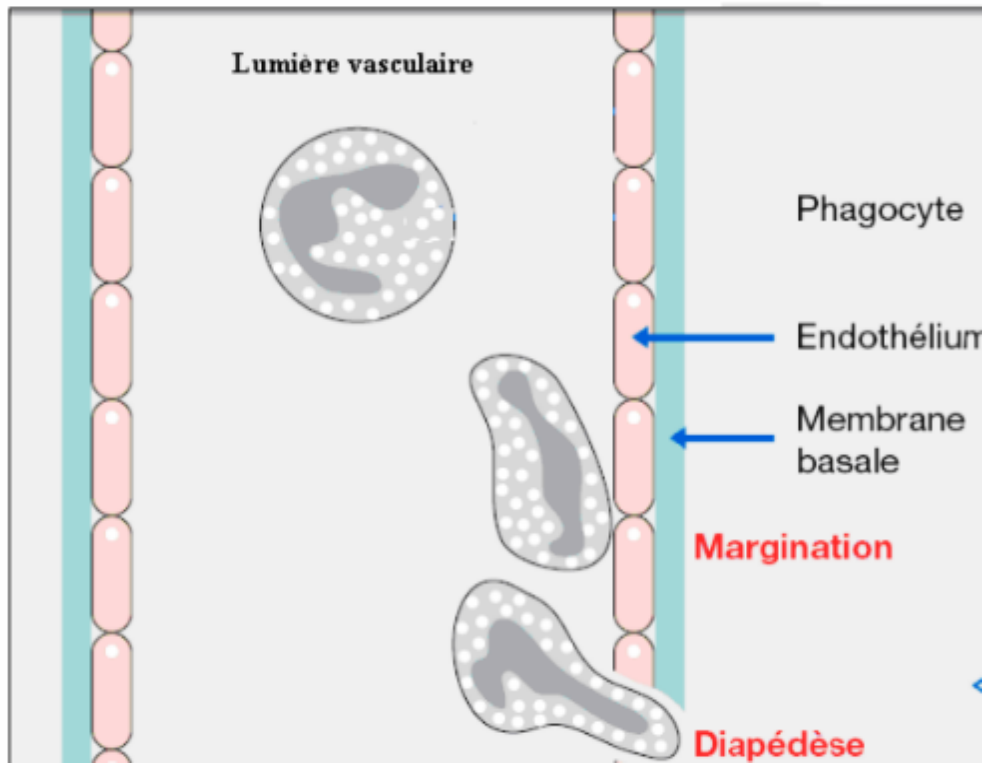


Figure 1.5. Principales étapes de l'extravasation

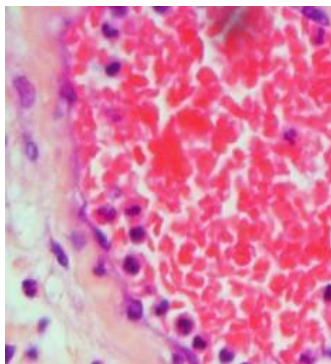


Figure 1.6. Diapédèse.

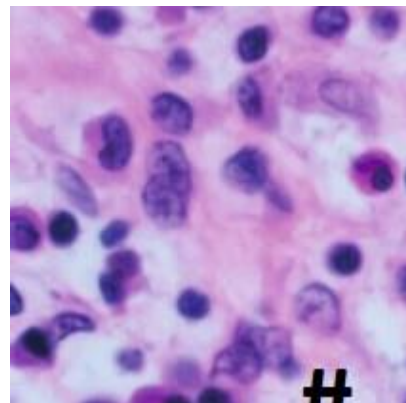


Figure 1.7. Tissu.

(Société Française d'Anatomie Normale et Pathologique, 2022)

1.3.3. Phase de résolution

Les macrophages vont alors sécréter des cytokines et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire pour le retour à un état physiologique. Les macrophages vont participer à l'angiogenèse, mais ce sont surtout les fibrocytes (Figure 1.8) **Calvino, 2021**).

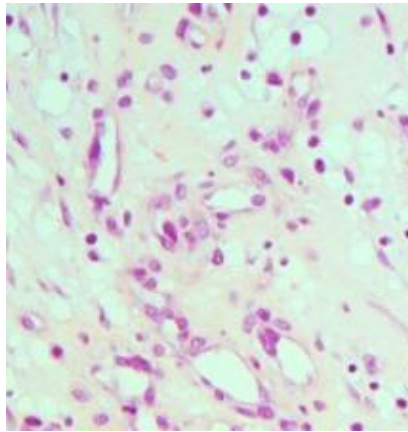


Figure 1.8. Bourgeon.

(Société Française d'Anatomie Normale et Pathologique, 2022)

1.2. Cicatrisation

La cicatrisation est le processus naturel par lequel l'organisme répare les tissus endommagés. Elle se décompose en plusieurs phases (**Laverdet et al., 2018**) :

- La coagulation : immédiatement après la blessure, des petits caillots de fibrine se forment afin.
- L'inflammation : elle débute quelques minutes après la lésion et dure environ 3 à 4 jours.
- La maturation : la cicatrice atteint sa maturité vers la fin du processus.

Chapitre 2

MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel

2.1. Matériel végétal étudié

Les extraits phytochimiques ont été fournis par la société de production des produits naturels. Les extraits naturels ont été extraits à partir de la partie aérienne dans des alambics par technique d'eau sous pression.

Les plantes ont été récoltées de la région de Ain defla. Nous avons conservé ces extraits naturels dans des flacons.

2.2. Réactifs et produits chimiques

Plusieurs réactifs et produits chimiques ont été utilisés pour mener à bien notre expérimentation animale et les tests.

2.3. Animaux de Laboratoire

En ce qui concerne l'évaluation des propriétés topiques *in vivo*, nous avons utilisé des souris (*Mus musculus*) de la race NMRI, avec un poids variant entre 28-38 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*.

2.2. Méthodes

2.2.1. Evaluation de l'activité topique *in vivo*

2.2.1.1. Principe

Le pouvoir locale des extraits phytochimiques naturels a été évalué *in vivo* sur des souris de souche NMRI.

2.2.1.2. Déroulement de l'essai

Nous avons constitué plusieurs lots contenant chacun 3 souris. Les différents traitements ont été administrés aux souris de la façon suivante :

- Lot du Contrôle +;
- Lot du Contrôle + recevra une quantité d'un gel dermique ;
- Lots Essai recevra une application des extraits différentes concentrations ;
- Lot du Contrôle négatif recevra une quantité de 20 µL d'huile.
- Lot qui recevra l'agent phlogogène.

Après l'écoulement d'une période estimé à 4 heures, tous les animaux ont été sacrifiés. Ces pièces ont été pesées et conservées immédiatement dans du formol à 10% pour l'étude histologique au niveau du laboratoire anatomie pathologique.

2.2.1.3. Etude anatomopathologique

Afin de confirmer l'activité topique des HE à l'échelle cellulaire, des coupes ont été réalisées sur des pièces circulaires des oreilles droites et gauches coupées précédemment. La coloration effectuée était celle de la procédure de **Martoja et Martoja-Pierson (1967)**. L'observation a été accomplie par microscopie photonique aux grossissements x4, x10 et x40.

2.2.2. Évaluation de l'activité *in vivo*

2.2.2.1. Préparation galénique

Les ingrédients utilisés lors des formulations des émulsions hydrophiles sont consignés dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1. Composition de la crème dermique.

Ingrédients	Concentration (%)
Phase Huileuse (25-35%)	
- Huile végétale	1-20
- Cire	1-12
- Extrait phytochimique	0,5-4
Phase Aqueuse (60-70%)	
- Eau distillée	20-90
- Glycérine	2-7

2.2.2.2. Évaluation de l'activité *in vivo*

- Objectif :

Il consiste en l'application du produit à tester, et d'un produit de référence.

Ce test a été réalisé *in vivo* chez des souris. Les applications se feront quotidiennement jusqu'à l'épithélialisation complète.

- un groupe recevant un médicament de référence.
- un groupe traité uniquement par l'excipient.

- Méthodologie :

Chaque animal est placé dans une cage et recevra de la nourriture granulée et de l'eau durant tout le traitement jusqu'à la fin de l'expérimentation animale.



Figure 2.1. Etapes du test.

Enfin, le produit à tester sera appliquée en réalisant un massage local.

2.2.2.3. Coupes histologiques

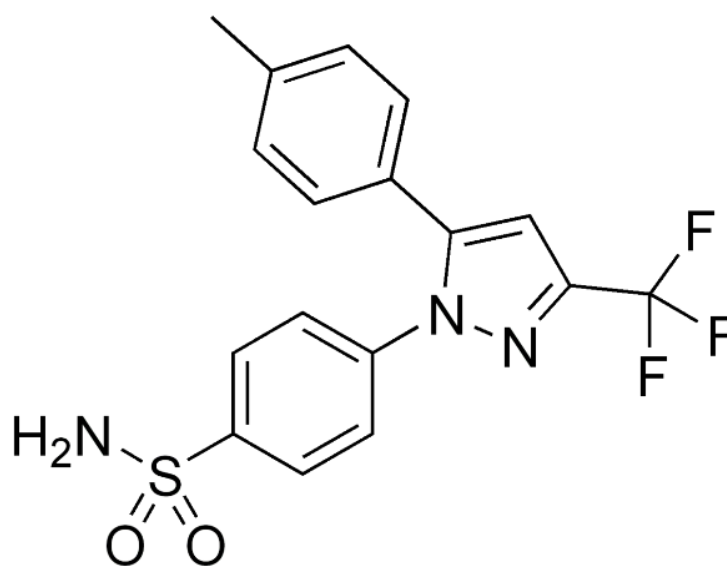
Afin de confirmer l'effet et distinguer les différentes étapes d'épithélialisation, des coupes histologiques (Martoja et Martoja-Pierson, 1967) (Annexe 1).

2.2.3. Etude du pouvoir *in silico*

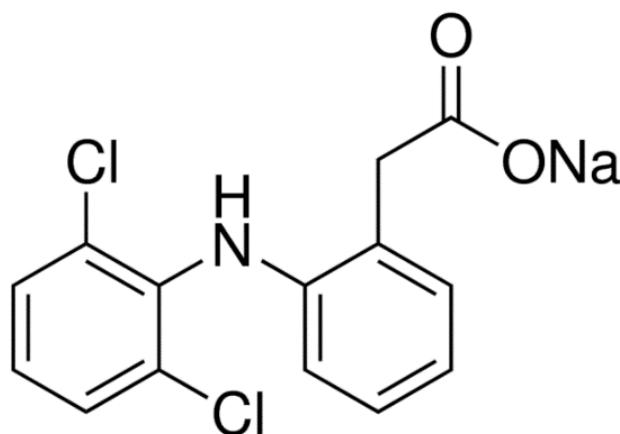
Ce travail a été mené afin de mettre en exergue l'efficacité des composés présents dans les extraits phytochimiques naturels dans l'inhibition du site actif ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes d'action. De plus, certains paramètres de toxicité ont été prédits et ce pour tous les ligands testés.

2.2.3.1. Structures des ligands

Nous avons utilisé six molécules détectées majoritairement dans l'extrait phytochimique de la et deux médicaments sélectifs.



Célécoxib



Diclofénac de sodium

Figure 2.2. Structure chimique des différents composés testés.

Tableau 2.2. Ligands testés *in silico*.

ID	Formule chimique	PM	SMILES
26632	C ₁₇ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₂ S	381	<chem>CC1=CC=CCCC(CCC=C1)C2=CC(=NN2C3=CC=C(C=C3C)S(=O)(=O)N)C(F)(F)F</chem>
303343	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NNaO ₂	318	<chem>C1=CC=C(C(=CCC1)CCCC(=O)[O-])NC2=C(C=CC=C2Cl)CC1.[Na+]</chem>

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

Toutes les molécules ont été téléchargées sous format SDF du site PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.2.3.2. Structure et préparation

La structure 3D de l'enzyme a été téléchargée de la base de données protéique PDB (<https://www.rcsb.org/structure/>) sous le format PDB. La structure de cette enzyme (Figure 2.3) a été préparée à l'aide du logiciel (Figure 2.4), ainsi que la chaîne B (Figure 2.5) et, à la fin, la détermination du site (Figure 2.6).

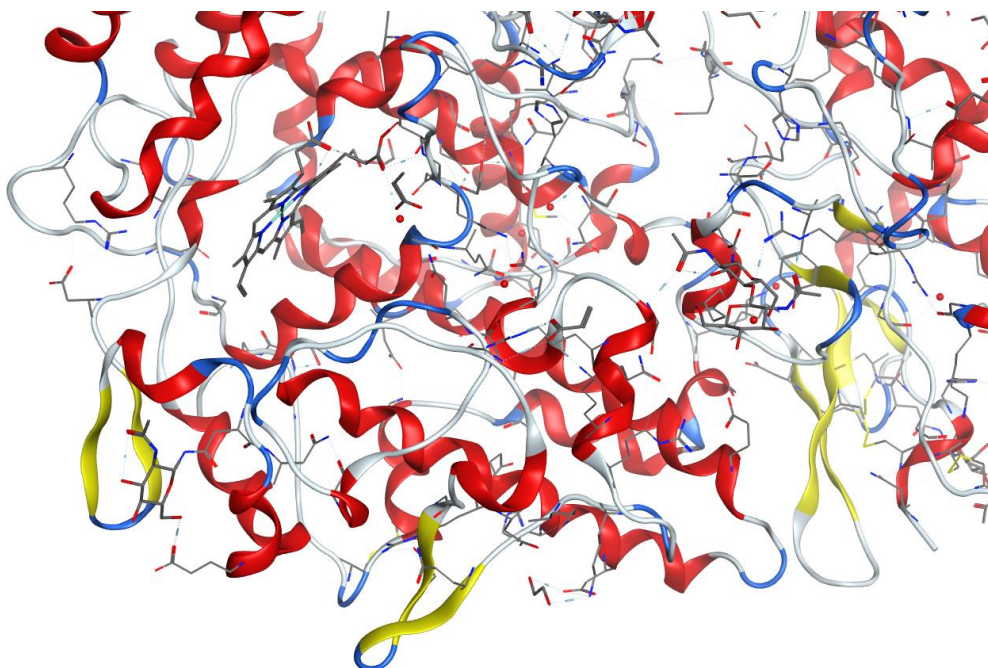


Figure 2.3. Structure de la protéine téléchargée.

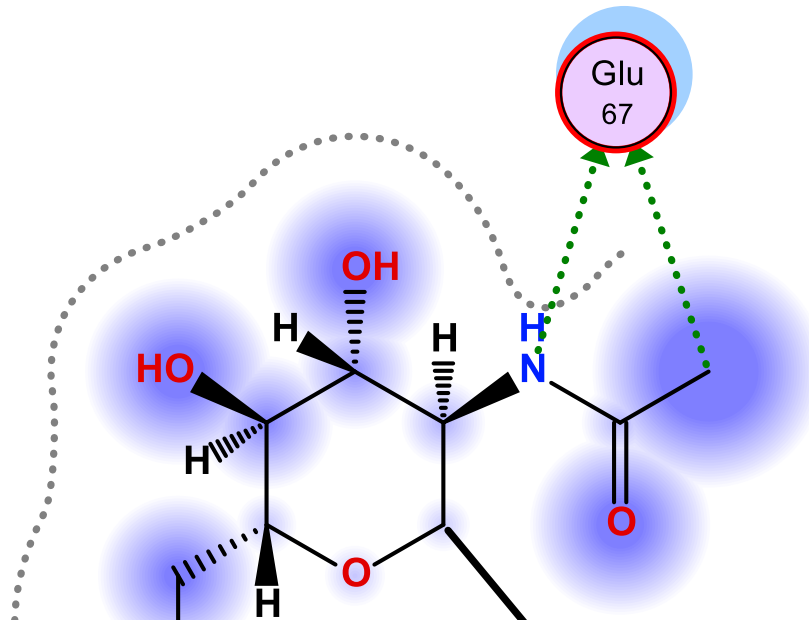


Figure 2.4. Interaction du ligand avec le site catalytique.

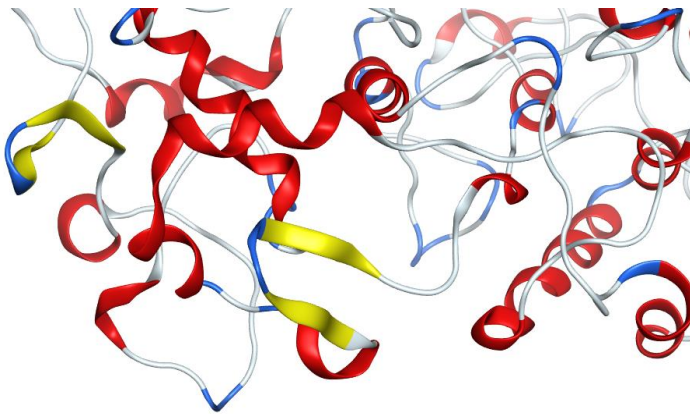


Figure 2.5. Structure préparée par le logiciel.

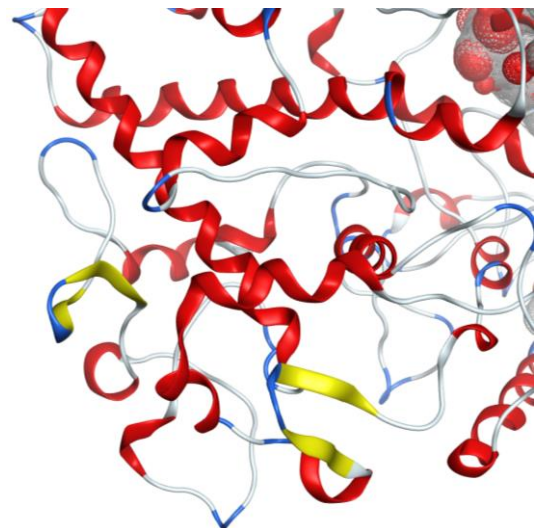


Figure 2.6. Localisation du site actif.

2.2.3.3. Simulation de l'affinité

C'est une technique de modélisation informatique utilisée pour prédire la manière dont une petite molécule, telle qu'un médicament ou un composé terpénique, peut se lier à une protéine cible. Le but du est de prédire la structure 3D du complexe protéine-ligand de prédire la force et la nature (**Dallakyan et Olson, 2015**).

2.2.3.4. Génération d'un modèle

La génération d'un modèle est un processus qui vise à identifier les caractéristiques moléculaires clés qui sont nécessaires pour qu'un composé interagisse avec une cible biologique spécifique (**Wolber et al., 2008**). Cela peut inclure des groupes, des noyaux, des interactions hydrophobes ou des liaisons hydrogène.

2.2.4. Etude Statistique

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. Composition chimique

A la lecture des résultats comparatifs rapportés dans la littérature concernant l'extrait végétal, il s'est avéré que la composition chimique de cette dernière a été étudiée dans différentes régions avec des résultats variables selon plusieurs facteurs (Tableau 3.1) (De Oliveira Hashimoto et al., 2016 ; Abdel-et al., 2018).

Tableau 3.1. Variabilité de la composition.

Equipes	Sun	Samber	Samber	Samber	Benabdalla	
Composés					h	
β -Pinène	0,5	0,1	12,8	12,8	12,8	1,6
Limonène	1,8	3,3	0,5	1	0,8	3
neomenthol	9,3	5,4	0,5	0,2	0,2	
α -Terpinéol	0,2	0,2	0,5	0,2	0,4	
\$Pipéritone	2,3	3,3	0,6	0,2	0,4	
β -Caryophyllène	0,2	0,2	0,2	5,4	0,4	

3.2. Pouvoir topique des *in vivo*

Nous nous sommes assignés comme objectif l'étude de l'activité topique des deux extraits via la réduction. Les résultats de ce test sont rapportés par la mesure du poids sont consignés dans la figure 3.1 et le tableau 3.2.

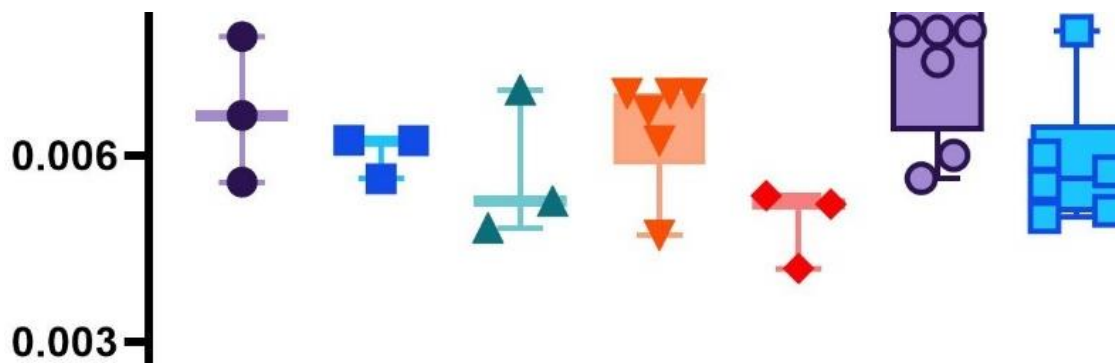


Figure 3.1. Résultats du pouvoir topique en comparaison avec les contrôles positif et négatif.

Les résultats de l'activité montrent les variations des poids des différents essais (contrôles positifs et HE), en comparaison avec le contrôle négatif. En revanche, nous avons noté une grande masse ($0,0090 \pm 0,0035$ g) et qui demeure très hautement significative ($p < 0.001$). En plus, le contrôle positif a présenté une très faible réduction avec une différence ($p > 0.05$) aux autres lots traités par les extraits phytochimiques.

Tableau 3.2. Taux de réduction dans différents lots traités.

Moyenne \pm écart type	% inhibition
$0,0057 \pm 0,0311$ ^{BC}	34.5
$0,005 \pm 0,0033$ ^{AB}	24.3
$0,006 \pm 0,0031$ ^{AB}	34.2
$0,006 \pm 0,0030$ ^{AB}	53.1
$0,00555 \pm 0,0306$ ^{AB}	38.3

L'incorporation et l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement de plusieurs réactions, telles que le rhumatisme, sont des pratiques communes dans la médecine traditionnelle. Aujourd'hui, c'est un fait remarquable que les substances d'origine végétale présentent un intérêt (**Miguel, 2010**).

L'extrait végétal peut être utilisé en usage externe pour traiter les douleurs, les névralgies, les maux de tête, et le rhume (**Mahendran et Rahman, 2020**). Elles sont aussi connues pour favoriser la digestion, (**Rozza et al., 2014**).

D'autres études scientifiques ont révélé qu'il est capable de diminuer la production de substances pro- (**Kamatou et al., 2013**). En outre, les propriétés thérapeutiques des extraits s'expliquent par la présence de composés actifs à l'origine présents dans les plantes (**Kamatou et al., 2013 ; de Cássia da Silveira et al., 2013**).

L'estragol possède des propriétés anti TNF- α (facteur de nécrose tumorale) intéressantes en rhumatologie (**Júnior et al., 2020**). De plus en plus de preuves suggèrent que l'extrait phytochimique a des propriétés thérapeutiques. Des études *in vitro* ont montré que cet extrait peut inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine (IL)-1 β et le TNF- α (**Arranz et al., 2015 ; Li et al., 2017**).

Bien que la recherche sur les effets pharmacologiques des biomolécules actives soit prometteuse, des études supplémentaires sont nécessaires pour bien comprendre leur mode d'action, et de déterminer leur efficacité.

3.3. Examen de l'histologie

Afin de confirmer l'effet des extraits testés à échelle tissulaire, des coupes des pièces auriculaires ont été effectuées, suivies par une coloration et des observations microscopiques. Les résultats sont illustrés dans la figure 3.2.

La réaction provoquée est un phénomène qui implique, entre autres, une série de réactions cellulaires locales et la libération de cytokines, les leucotriènes, la bradykinine, ou encore la sérotonine (**Hersini et al., 2014**).

Ces résultats démontrent les propriétés des extraits végétaux dans le tissu cible, fournissant une confirmation supplémentaire que ces produits naturels possèdent des vertus.

En résumé, notre étude histopathologique a confirmé le pouvoir topique de la fraction phytochimique au cellulaire.

3.4. Etude des propriétés *in vivo*

Il y a eu un certain nombre d'études qui ont évalué les propriétés de l'huile, et les résultats ont été prometteurs. Une revue systématique des études sur les propriétés thérapeutiques des biomolécules naturelles a révélé que l'huile était l'une des HE les plus efficaces. L'examen a révélé qu'elle était efficace. En outre, l'extrait naturel augmente l'expression du gène en tant que facteur important (**Amirzade-Iraq et al., 2022**).

Cependant, il est important de noter que ces études ont été menées sur des animaux et que des tests cliniques supplémentaires sont nécessaires pour évaluer les effets des extraits phytochimiques naturels ou encore les biomolécules actives chez l'être humain avec des expériences. Le mode d'action du pouvoir des extraits végétaux au niveau moléculaire n'a pas encore été totalement élucidé dans sa totalité (**Roza et al., 2021**).

3.3. Evaluation du pouvoir *in silico*

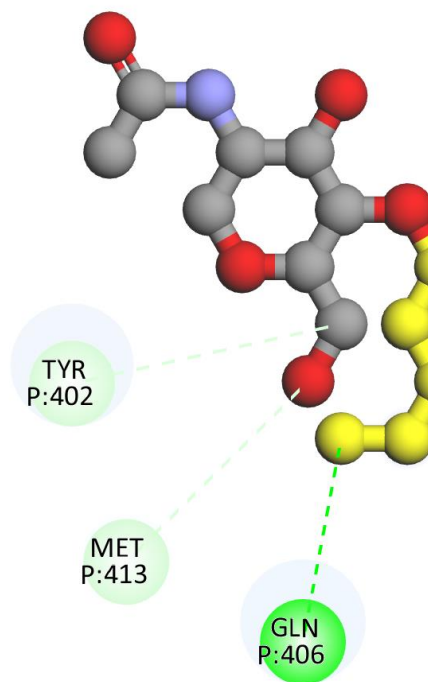
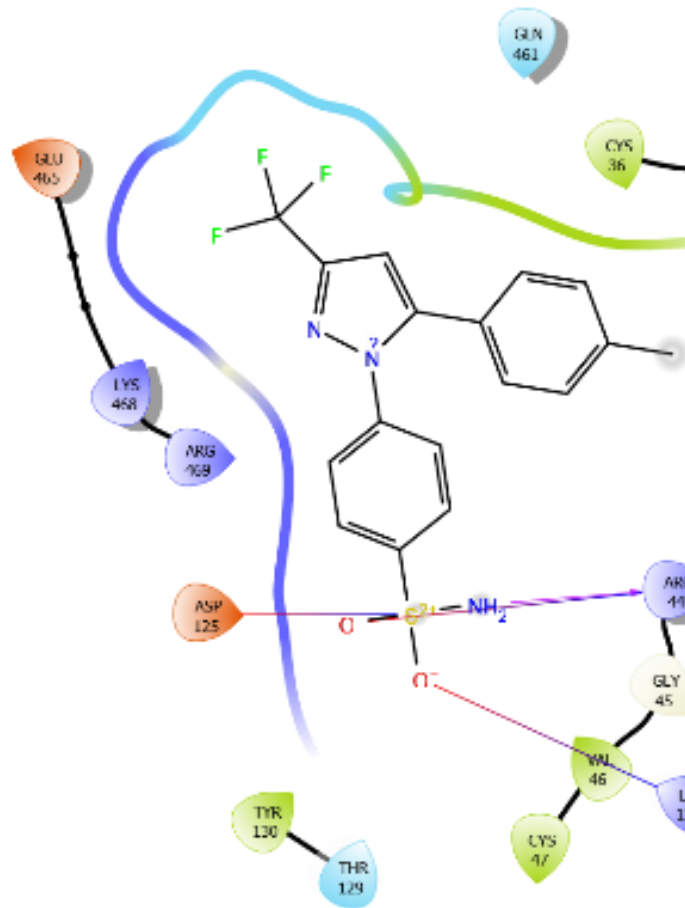
Le docking est une technique de modélisation informatique utilisée pour prédire l'interaction entre une protéine et un ligand. Le processus de docking moléculaire commence par la modélisation de la structure tridimensionnelle de la protéine cible et du ligand. La protéine cible est généralement une enzyme ou une protéine réceptrice impliquée dans une maladie spécifique, tandis que le ligand est une petite molécule qui se lie à la protéine cible et modifie son activité. La simulation moléculaire est réalisée à l'aide du logiciel open source ou libre d'accès. Les résultats de ces stimulations sont rapportés dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3. Résultats de l'activité des composés majoritaires *in silico*.

Famille	PubChem ID	Energie de liaison (Kcal/mole)
	262632	-8.1
	303232	-7.7
Composés terpéniques oxygénés	27862733	-6.9
	1254222	-6.9
	19243223	-6.9
	329923823	-6.0
	2644272	-4.75
	2752282	-4.24

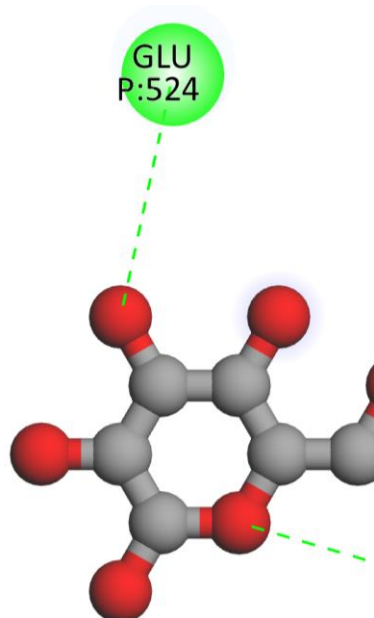
Les inhibiteurs ont été largement prescrits pour traiter diverses pathologies, en particulier dans le traitement de l'arthrose, de la polyarthrite rhumatoïde et d'autres maladies inflammatoires chroniques. Cependant, certains inhibiteurs ont été retirés du marché en raison de préoccupations concernant leur sécurité, par exemple association à un risque accru de maladies cardiovasculaires, comme les crises (Scheen, 2004).

Deux alcools monoterpéniques ont eux aussi présenté une affinité. La liaison des différentes molécules testées avec le site catalytique est souvent hautement spécifique et dépend des interactions chimiques et physiques entre le ligand et les résidus. Les résultats sont illustrés dans les figures 3.2 et 3.3 et le tableau 3.4.




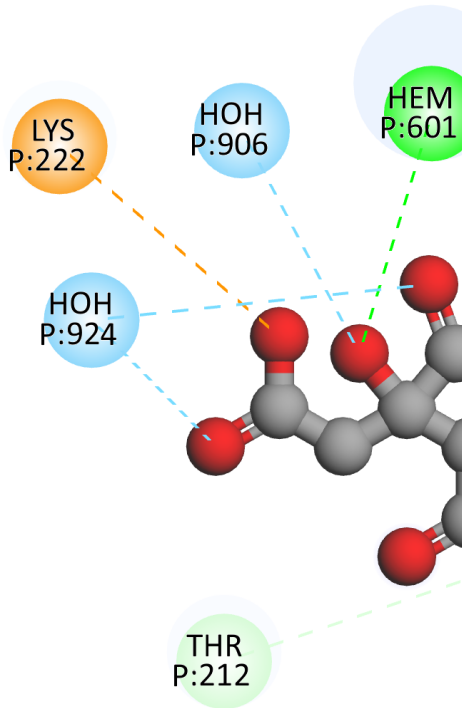
Interactions

■ Conventional Hydrogen Bond





Interactions

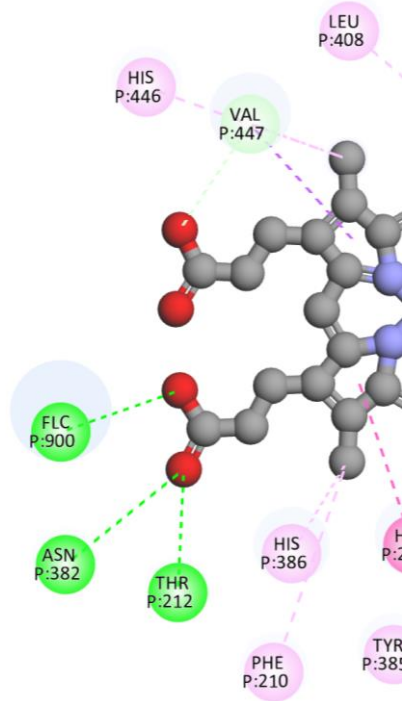
 Conventional Hydrogen Bond



Interactions

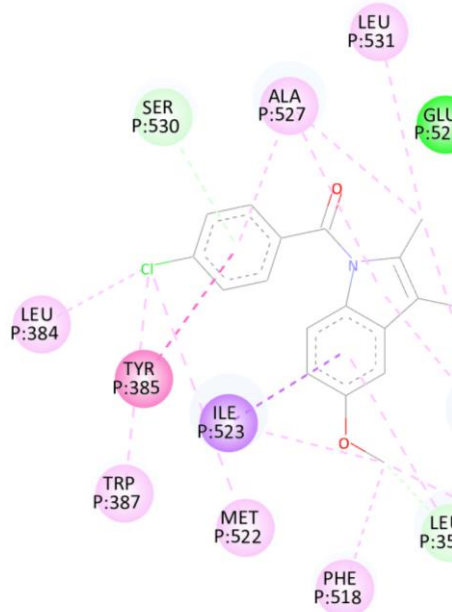
 Salt Bridge

 Water Hydrogen Bond



Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Sigma
- Pi-Sulfur



Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Donor Hydrogen Bond
- Pi-Sigma
- Pi-Pi T-
- Alkyl
- Pi-Alkyl

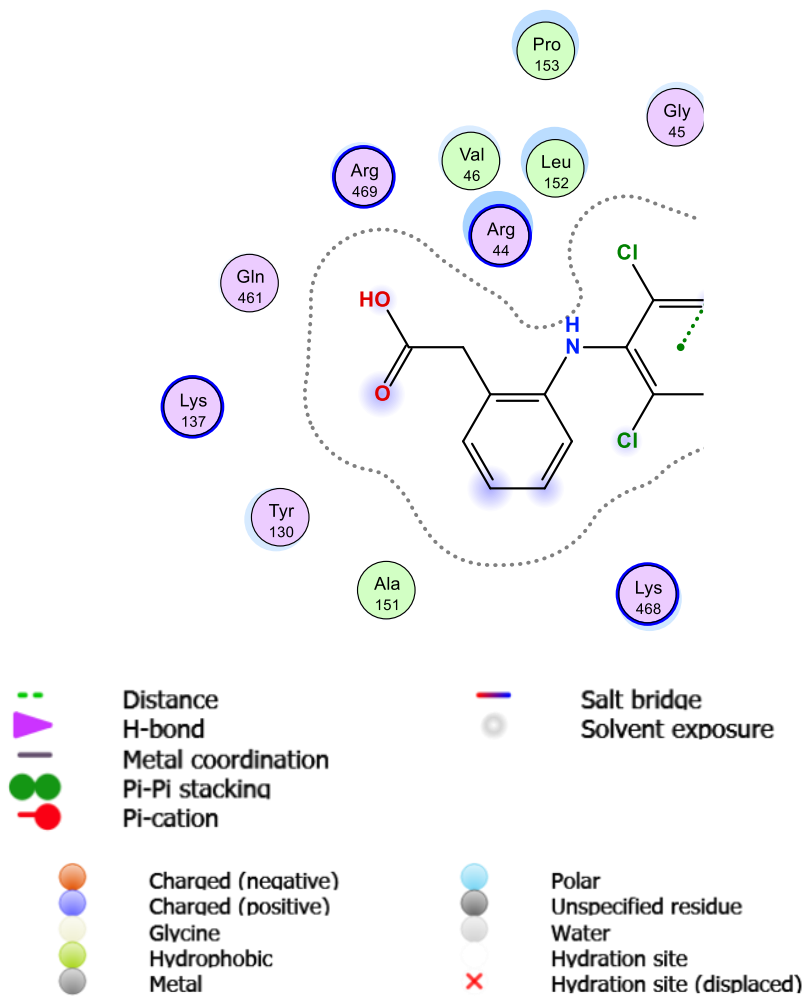


Figure 3.4. Types d'interactions entre ligands testés et le site actif du récepteur protéique.

Tableau 3.4. Différents types d'interaction formés.

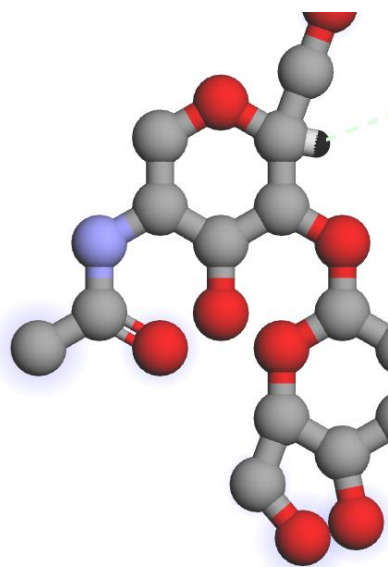
Type de liaison	Nature de liaison
Hydrogène ;	Liaison H-C
Halogène	Halogène (Fluorine)
Hydrogène	Liaison H-C
Hydrogène ;	Liaison H-C ; Halogène (Fluorine)
Halogène	
Hydrogène	Liaison H-C
Halogène	Halogène (Fluorine)

Autre	Liaison H conventionnelle
Hydrophobique	Pi-Alkyl


Hydrophobique Pi-Alkyl

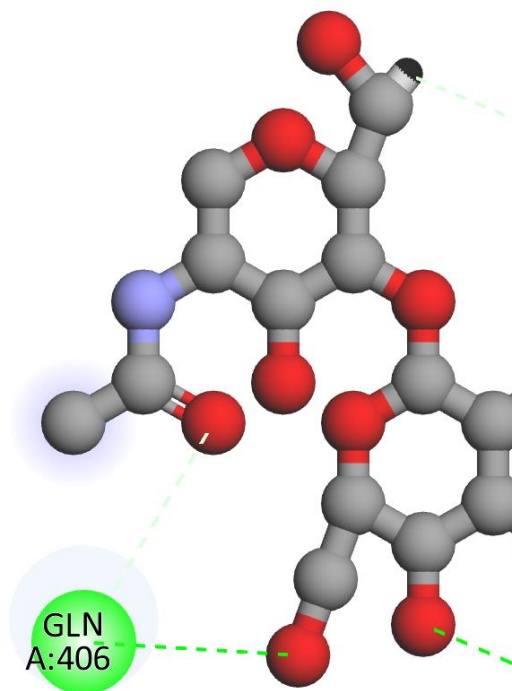
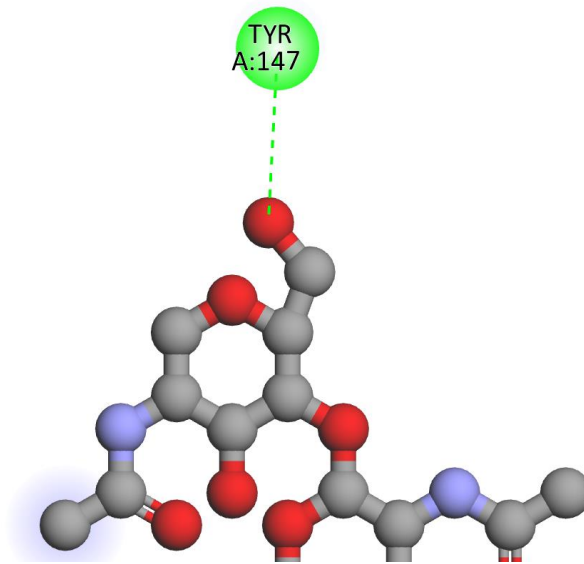
Hydrogène	Liaison H conventionnelle
Hydrophobique	Alkyl

Hydrogène	Liaison H-C
Hydrogène	Liaison H-C
Hydrophobique	Alkyl




Interactions

 Carbon Hydrogen Bond



Interactions

 Conventional Hydrogen Bond



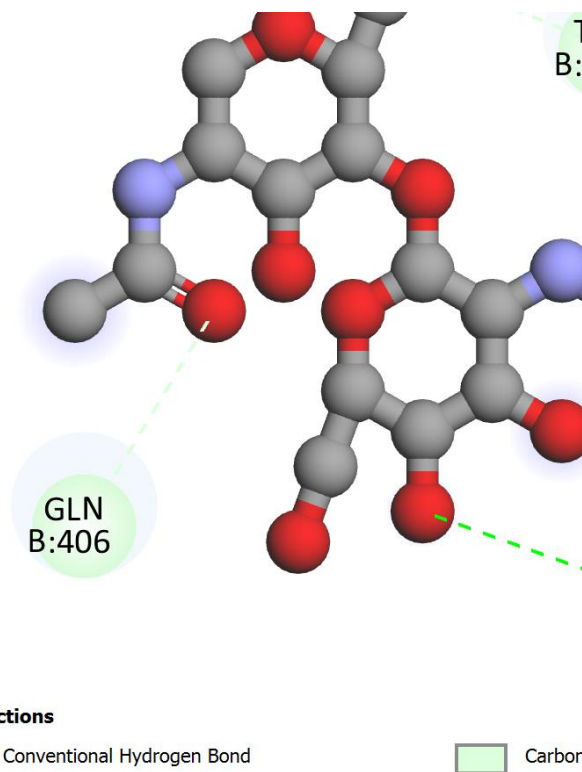


Figure 3.5. Types d'interaction entre les composés et le site actif.

En résumé, c'est une méthode puissante qui peut être utilisée pour étudier l'interaction entre les protéines impliquées. Cette technique peut aider à identifier les protéines cibles les plus prometteuses pour le développement de nouveaux médicaments à base de plantes aromatiques et médicinales.

Le processus de docking moléculaire implique la recherche de la conformation la plus stable et la plus favorable à l'interaction entre la cible et la molécule candidate (**Rayar, 2017**).

3.4. Génération d'un modèle

En ce qui concerne les médicaments, le modèle peut être utilisé pour identifier les caractéristiques moléculaires communes à un ensemble de molécules actives contre une cible particulière.

A noter que la génération de ce modèle permet de détecter les caractéristiques communes entre les composés cités précédemment. Les résultats sont illustrés dans la figure 3.6.

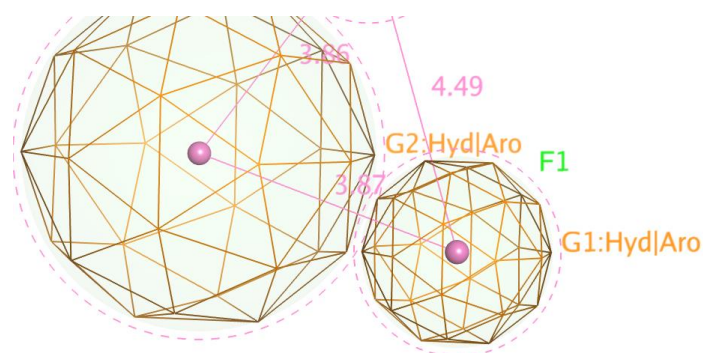


Figure 3.6. Modèle généré par superposition des ligands.

Le modèle peut être utilisé pour guider la conception de nouvelles molécules en identifiant les caractéristiques moléculaires qui sont nécessaires pour une activité efficace. Les chercheurs peuvent ensuite utiliser des méthodes de criblage virtuel pour identifier de nouvelles molécules candidates qui correspondent au modèle de pharmacophore. Les molécules candidates identifiées peuvent ensuite être testées expérimentalement pour leur activité biologique et leur toxicité.

CONCLUSION

L'objectif assigné à notre travail consiste à évaluer, *in vivo*, le pouvoir d'une préparation galénique topique contenant l'extrait phytochimique naturel comme ingrédient actif. Aussi, le pouvoir a été étudié *in vivo*.

Cette activité a été aussi confirmée, à échelle cellulaire, par une étude histologique. Ces résultats prometteurs de l'inhibition *in vivo* topique nous ont encouragés à effectuer des études d'amarrage moléculaire, *in silico*.

Le médicament a présenté la plus grande affinité pour le site actif avec une énergie de liaison, suivi par un ester.

En définitive, les résultats obtenus laissent entrevoir de nouvelles perspectives parapharmaceutiques comme un ingrédient actif.

Pour améliorer la compréhension des mécanismes d'action pharmacologiques, un travail plus approfondi, devra être entrepris.

Après ces nombreux tests toxicologiques, les molécules à activité thérapeutiques pourront servir de base au développement de nouveaux médicaments.

En plus de cet apport thérapeutique, le gain économique ne serait pas négligeable puis qu'il s'agit de valoriser le patrimoine végétal de notre pays et promouvoir la culture et l'exploitation industrielle des plantes aromatiques.

Références Bibliographiques

1. Amirzade-Iranaq, M. H., Tajik, M., Takzaree, A., Amirmohammadi, M., Yazdi, F. R., & Takzaree, N. (2022). Topical *Mentha piperita* effects on cutaneous wound healing: A study on TGF- β expression and clinical outcomes. *World Journal of Plastic Surgery*, 11(1), 86.
2. Arranz, E., Jaime, L., de las Hazas, M. L., Reglero, G., & Santoyo, S. (2015). Supercritical fluid extraction as an alternative process to obtain essential oils with anti-inflammatory properties from marjoram and sweet basil. *Industrial Crops and Products*, 67, 121-129.
3. Athari, S. M., Nasab, E. M., & Athari, S. S. (2018). Study effect of *Ocimum basilicum* seeds on mucus production and cytokine gene expression in allergic asthma mice model. *Revue Française d'Allergologie*, 58(7), 489-493.
4. Barton, G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 413-420.
5. Ben-Baruch, A. (2006, February). Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 16, No. 1, pp. 38-52). Academic Press.
6. Bensegueni, A., Belkhiri, A., Boulebda, N., & Keck, G. (2007). Evaluation de l'activité cicatrisante d'un onguent traditionnel de la région de Constantine sur les plaies d'excision chez le rat. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 83-87.
7. Calvino, B. (2021). La phase de résolution de l'inflammation, une phase active orchestrée par le rôle des médiateurs «pro-resolving»: résolvines, protectines, et marésines. *Douleurs: Évaluation-Diagnostic-Traitement*, 22(5-6), 219-231.
8. Chebira, M., & Boudjaadar, W. (2014). Contribution à la mise en évidence de nouveaux antis inflammatoires par dockingmoléculaire. *Biochimie Moléculaire et Santé*, 62(24), 1136-1148.
9. Dallakyan, S., & Olson, A. J. (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Chemical Biology: Methods and Protocols*, 243-250.
10. De Billerbeck, V. G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5(5), 249-253.
11. de Cássia da Silveira e Sá, R., Andrade, L. N., & de Sousa, D. P. (2013). A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, 18(1), 1227-1254.
12. 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*, 2018.

13. de Oliveira Hashimoto, G. S., Neto, F. M., Ruiz, M. L., Acchile, M., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., & Martins, M. L. (2016). Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture*, 450, 182-186.
14. Hendawy, S. F., El Gendy, A. G., Omer, E. A., Pistelli, L., & Pistelli, L. (2018). Growth, yield and chemical composition of essential oil of *Mentha piperita* var. *multimentha* grown under different agro-ecological locations in Egypt. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(1), 23-39.
15. Henrotin, Y., Deby-Dupont, G., & Reginster, J. Y. (2001). Les médiateurs biochimiques de l'inflammation. *Revue Médicale de Liège*, 56(6).
16. 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.
17. Júnior, E. B. A., de Oliveira Formiga, R., de Lima Serafim, C. A., Araruna, M. E. C., de Souza Pessoa, M. L., Vasconcelos, R. C., & Batista, L. M. (2020). Estragole prevents gastric ulcers via cytoprotective, antioxidant and immunoregulatory mechanisms in animal models. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110578.
18. Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2012). La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie; Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Edition Springer.
19. Karleskind, B. (2016). Prévenir et soulager les allergies saisonnières. *Actualités Pharmaceutiques*, 55(555), 46-47.
20. Kehili, S., Boukhatem, M. N., Belkadi, A., Ferhat, M. A., & Setzer, W. N. (2020). Peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil as a potent anti-inflammatory, wound healing and anti-nociceptive drug. *European Journal of Biological Research*, 10(2), 132-149.
21. Krishna, P. S., Vani, K., Prasad, M. R., Samatha, B., Charya, M. A. S., & Reddy Shetty, P. (2013). *In-silico* molecular docking analysis of prodigiosin and cycloprodigiosin as COX-2 inhibitors. *Springerplus*, 2, 1-6.
22. Li, H., Ge, Y., Luo, Z., Zhou, Y., Zhang, X., Zhang, J., & Fu, Q. (2017). Evaluation of the chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of distillate and residue fractions of sweet basil essential oil. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 1882-1890.
23. Lioté, F. (2011). Physiopathologie et traitement de l'inflammation goutteuse. *Revue du rhumatisme*, 78, S122-S128.

24. Lucca, L. G., Romão, P. R., Vignoli-Silva, M., da Veiga-Junior, V. F., & Koester, L. S. (2022). In vivo acute anti-inflammatory activity of essential oils: A review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 22(11), 1495-1515.
25. Maggio, A., Roscigno, G., Bruno, M., De Falco, E., & Senatore, F. (2016). Essential-oil variability in a collection of *Ocimum basilicum* L.(Basil) cultivars. *Chemistry & Biodiversity*, 13(10), 1357-1368.
26. Mahendran, G., & Rahman, L. U. (2020). Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on Peppermint (*Mentha piperita* L.) - A review. *Phytotherapy Research*, 34(9), 2088-2139.
27. Marrelli, M., Amodeo, V., Perri, M. R., Conforti, F., & Statti, G. (2020). Essential oils and bioactive components against arthritis: A novel perspective on their therapeutic potential. *Plants*, 9(10), 1252.
28. Martoja, R., & Martoja-Pierson, M. (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Edition Masson.
29. Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.
30. Morita, I. (2002). Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68, 165-175.
31. Nieto, G. (2017). Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae family. *Medicines*, 4(3), 63.
32. Palomer, A., Cabré, F., Pascual, J., Campos, J., Trujillo, M. A., Entrena, A., & Espinosa, A. (2002). Identification of novel cyclooxygenase-2 selective inhibitors using pharmacophore models. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(7), 1402-1411.
33. Prost-Squarcioni, C., Fraitag, S., Heller, M., & Boehm, N. (2008). Histologie fonctionnelle du derme. In *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* (Vol. 135, No. 1, pp. 5-20). Elsevier Masson.
34. Raymondjean, M. (2007). Les mécanismes de l'inflammation périphérique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2007(389), 21-28.
35. Rozza, A. L., Meira de Faria, F., Souza Brito, A. R., & Pellizzon, C. H. (2014). The gastroprotective effect of menthol: involvement of anti-apoptotic, antioxidant and anti-inflammatory activities. *PloS one*, 9(1), e86686.
36. Samber, N., Khan, A., Varma, A., & Manzoor, N. (2015). Synergistic anti-candidal activity and mode of action of *Mentha piperita* essential oil and its major components. *Pharmaceutical Biology*, 53(10), 1496-1504.
37. Sardar, M., Zia, K., Ashraf, S., Malik, H. N., Jabeen, A., Khan, K. M., & Ul-Haq, Z. (2022). Interface inhibitory action on Interleukin-1 β using selected anti-inflammatory compounds

to mitigate the depression: A computational investigation. *Computational Biology and Chemistry*, 101, 107774.

38. Saviuc, C., Ciubucă, B., Dincă, G., Bleotu, C., Drumea, V., Chifiriuc, M. C., & Lazăr, V. (2017). Development and sequential analysis of a new multi-agent, anti-acne formulation based on plant-derived antimicrobial and anti-inflammatory compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 175.
39. Scheen, A. (2004). Retrait du rofecoxib (Vioxx): a propos de la sécurité cardiovasculaire des anti-inflammatoires non stéroïdiens COX-2 sélectifs. *Revue Médicale de Liège*, 59(10).
40. Sun, Z., Wang, H., Wang, J. & Yang, P. (2014). Chemical composition and anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of essential oil from leaves of *Mentha piperita* grown in China. *PloS one*, 9(12), e114767.
41. Terheyden, H., Stadlinger, B., Sanz, M., Garbe, A. I., & Meyle, J. (2014). Inflammatory reaction—communication of cells. *Clinical Oral Implants Research*, 25(4), 399-407.
42. Ugbogu, O. C., Emmanuel, O., Agi, G. O., Ibe, C., Ekweogu, C. N., Ude, V. C., & Ugbogu, E. A. (2021). A review on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.). *Heliyon*, 7(11), e08404.
43. Ulinski, T., & Bensman, A. (2004). Renal complications of non-steroidal anti-inflammatories. *Archives de Pédiatrie: Organe Officiel de la Société Française de Pédiatrie*, 11(7), 885-888.
44. Weill, B., & Batteux, F. (2003). *Immunopathologie et réactions inflammatoires*. De Boeck Supérieur.
45. Wolber, G., Seidel, T., Bendix, F., & Langer, T. (2008). Molecule-pharmacophore superpositioning and pattern matching in computational drug design. *Drug Discovery Today*, 13(1-2), 23-29.

Annexe 1

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.

Réactifs	Temps (h)	Température (°C)
Formol	2	< 40
Ethanol 50%	2	45
Ethanol 98%	1	45
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 (Leica Micro Systems) qui se placent en vrac dans le panier. Chaque cassette porte toutes les indications utiles de chaque pièce. Enlever le panier et prendre les cassettes pour l'enrobage.

3. L'inclusion :

- L'inclusion a pour but de permettre la réalisation de coupes histologiques fines et régulières.

Mode opératoire :

On utilise pour cette étape une station d'enrobage contenant une 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 :

5. Coloration :

Les différentes étapes de la coloration Hématoxyline-Eosine sont:

- Coloration.
- Eclaircissement (Xylène).

	Durée (minutes)
Eau distillé	2
HCl 1%	2 secondes
Eau lithiné	2
Alcool (éthanol 98%)	2
Xylène	3