

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA 1

Faculté des Sciences De la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé

THESE DE DOCTORAT 3^{ème} Cycle LMD

En Biologie

Spécialité : Biologie et santé

CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE, ETUDE HISTOLOGIQUE

ET PHARMACOLOGIQUE DU GENEVRIER OXYCEDRE

(Juniperus oxycedrus L.)

Par

Fatiha BACHIRI

Devant le jury composé de :

| | | |
|--------------------|-----------------------------|------------------------|
| W. HAMZI | Docteur, USD Blida1 | Présidente |
| D. CHAABANE | Professeur, USTHB Alger | Examinatrice |
| M. TOUAIBIA | Docteur, USD Blida1 | Examinatrice |
| F. HAMAIDI-CHERGUI | Professeur, USD Blida1 | Directrice de thèse |
| F. BENOAKLIL | Docteur, UDB khemis Miliana | Co-directrice de thèse |

Blida, le 23 Juin 2024

RESUME

Ce travail de recherche a porté sur l'analyse de la composition phytochimique des huiles essentielles de Genévrier oxycèdre (*Juniperus oxycedrus* L.) et l'évaluation des activités biologiques, notamment leurs propriétés thérapeutiques dans la formulation d'hydrogels topiques visant à prévenir les infections et à accélérer le processus de cicatrisation.

L'étude histologique des baies mûres et immatures du Genévrier oxycèdre a montré la présence de poches de nature schizogène responsables de la sécrétion des huiles essentielles.

Les analyses chromatographiques des huiles essentielles isolées des baies fraîches mûres et immatures par GC-MS ont révélé une dominance de la fraction monoterpénique hydrocarbonée à un pourcentage de 75,40% et 52,36%, respectivement, avec α -Pinène comme constituant majoritaire.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles a révélé un pouvoir inhibiteur intéressant contre toutes les souches de référence et les souches multi-résistantes isolées des plaies infectées chez les brûlés avec des CMI (concentrations minimales inhibitrices) variant de 0,62 à 5 μ l/ml. Les huiles essentielles étudiées ont montré une activité antioxydante considérable par le test du DPPH avec des valeurs de IC50 de $4,04 \pm 0,05$ μ g/ml et de $4,24 \pm 0,03$ μ g/ml pour les baies immatures et les baies mûres, respectivement).

Des hydrogels à base de Carbopol®ultrèz 10 ont été formulés pour chaque huile essentielle. Les hydrogels formulés à base des huiles essentielles ont présenté des propriétés rhéologiques satisfaisantes et conformité microbiologique.

Les résultats des études toxico-pharmacologiques *in vivo* ont démontré que les hydrogels formulés sont non irritants (IPC < 0,5) et peuvent être utilisés en toute sécurité, montrant des propriétés anti-inflammatoires et cicatrisantes.

À la lumière des résultats obtenus, les hydrogels à base des huiles essentielles de *Juniperus oxycedrus* L. présentent des propriétés rhéologiques et

pharmacologiques prometteuses, les qualifiant comme un traitement potentiel pour les infections bactériennes et la cicatrisation des plaies.

Mots clés: *Juniperus oxycedrus* L.; Huile essentielle; Activité antimicrobienne; Activité antioxydante; Anti-inflammatoire; Cicatrisante.

ABSTRACT

This research focused to analysis the phytochemical composition of the essential oils of Oxycedar Juniper (*Juniperus oxycedrus* L.) and the evaluation of the biological activities, specifically their therapeutic properties of topical hydrogels aimed to prevent infection and accelerate healing.

The histological study of ripe and unripe berries of Oxycedar Juniper revealed the presence of schizogenous secretory cavities responsible for essential oils secretion.

Chromatographic analysis by GC-MS showed that essential oils isolated from fresh ripe and unripe berries were dominated by monoterpene hydrocarbons fraction at percentage 75.40% and 52.36%, respectively, with α -Pinene as the major constituent.

The antimicrobial activity of essential oils demonstrated an interesting inhibitory power against all reference strains and multi-resistant strains isolated from infected wounds in burn victims with minimal inhibitory concentration (MIC) varies from 0.62 to 5 μ /ml. The essential oils studied exhibited considerable antioxidant activity by the DPPH test with IC₅₀ values of 4.04 ± 0.05 μ g/ml and 4.24 ± 0.03 μ g/ml for unripe berries and ripe berries, respectively).

Hydrogels based Carbopol®ultrèz 10 were formulated for each essential oil. All formulated hydrogels with essential oils presented satisfactory rheological behavior and microbiological conformity.

Results from toxico-pharmacological studies *in vivo*, demonstrated that the formulated hydrogels are non-irritating (PCI < 0.05) and can be safely used, showing inflammatory and healing properties.

In light of these results, the hydrogels based on the essential oils of *Juniperus oxycedrus* L. present promising rheological and pharmacological properties, qualifying them as a potential treatment for bacterial infections and wound healing.

Keywords: *Juniperus oxycedrus* L.; Essential oil; Antimicrobial activity; Antioxidant; Anti-inflammatory; Healing.

الملخص

ركز هذا البحث إلى تحليل التركيب الكيميائي للزيوت العطرية للعرعر الشربيني (*Juniperus oxycedrus L.*) و تثمين الأنشطة البيولوجية، خاصة خصائصها العلاجية بتصميم هلاميات مائية موضعية تهدف لمنع العدوى البكتيرية وتسريع علاج الجروح.

أظهرت الدراسة المهيجرة لأنسجة ثمار العرعر الشربيني الناضجة والغير ناضجة عن وجود جيوب إفرازية مسؤولة عن تخزين و إفراز الزيوت العطرية.

أظهرت التحاليل الكروماتوغرافية للزيوت العطرية المستخلصة من الثمار الطازجة الناضجة والغير ناضجة عبر (GC-MS)، أنها تهيمن عليها أحاديات الهيدروكربون بنسبة 75.40% و 52.36%، على التوالي و أن α -Pinène كنصر رئيسي لكليهما.

كشفت نتائج اختبارالنشاط المضاد للميكروبات للزيوت العطرية أن لها تأثير مثبت فعال على كل من السلالات المرجعية والسلالات المتعددة المقاومة المعزولة من جروح مرضى الحروق حيث تراوحت التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) من 0.62 إلى 5 ميكرو لتر/مل. كما أظهرت الزيوت العطرية للعرعر الشربيني أن لها نشاطاً معتبراً مضاداً للأكسدة من خلال اختبار DPPH حيث أن قيمة التراكيز المثبطة تقدر ب 4.04 ± 0.05 و 4.24 ± 0.03 ميكروغرام/مل للثمار الغير الطازجة و الطازجة، على التوالي).

تم تحضير نوعين من الهلاميات المائية الجلدية المعتمدة على الكربوبول التريز 10 لكل زيت عطري. كل الهلاميات المائية التي تحتوي على الزيوت العطرية أظهرت خصائص ريولوجية مرضية ومطابقة للمعايير الميكروبيولوجية.

نتائج الدراسة السمية الدوائية في الجسم الحي، برهنت أن الهلاميات المائية لا تهيج البشرة ($PCI < 0.05$) ويمكن استخدامها بكل أمان، مظهرة خصائص مضادة للالتهاب و تسريع التئام الجروح.

في ضوء هذه النتائج المتحصل عليها، فإن الهلاميات المائية التي تحتوي على الزيوت العطرية لثمار العرعر الشربيني (*Juniperus oxycedrus L.*) لها خصائص ريولوجية ودوائية واعدة تؤهلها كعلاج محتمل للعدوى البكتيرية والتئام الجروح.

الكلمات المفتاحية : *Juniperus oxycedrus L.*؛ الزيوت العطرية؛ نشاط مضاد للميكروبات؛ مضاد للأكسدة؛ مضاد للالتهابات؛ التئام الجروح.

DEDICACES

Je dédie ce travail à :

Mes chers parents, pour leur amour, leur gentillesse, le soutien qu'ils m'ont toujours apporté, la confiance dont ils m'ont toujours témoignée. Merci d'avoir toujours été à mes côtés. Je vous aime

A Mes sœurs :

Zohra, Turkia, Khadidja et Amina

A Mes frères :

Laamouri et Mohamed

A Mes beaux frères :

Karboue Chaabane, Ghorab Ali et Rebai Nadir

A mes chères amies :

Amina, Fairouz, Nacera, Dalal, Razika et Basma

REMERCIEMENTS

Avant tout, mes remerciements infinis sont adressés à ALLAH le tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné la force et le courage de mener ce travail à terme.

Je profite de l'occasion qui m'est offerte pour adresser mes vifs remerciements à Madame le Professeur Hamaidi-Chergui Fella de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'encadrer mes travaux de thèse, pour sa disponibilité et son aide tout au long de la réalisation de ce travail, pour ses précieux conseils et son soutien qui m'ont toujours donné du courage.

Je tiens à exprimer également toute ma gratitude à ma Co-directrice de thèse Madame le Docteur Benouaklil Fatouma, pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent manuscrit, pour ses conseils et ses orientations précieuses.

A Madame le Professeur Saidi Fairouz, Directrice du laboratoire de biotechnologie, environnement et santé, pour ses précieux conseils, ses encouragements et sa disponibilité. Un grand merci.

Mes sincères remerciements vont également aux membres de jury de thèse pour avoir bien voulu accepter de juger ce travail :

A Madame le Docteur Hamzi Wahiba (Université Saad Dahlab, Blida1), A Madame le Docteur Touaibia Meriem (Université Saad Dahlab, Blida1) et A Madame le Professeur Chaabane Djamila (Université des Sciences et de la Technologie Houari-Boumediene, Alger), j'exprime mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail et de participer à ce jury de thèse.

J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur le Docteur Ras El Djebel Youcef, responsable du laboratoire d'analyses médicales (Douéra) pour sa contribution et son aide.

Je tiens à remercier vivement, le Professeur A. Hadjsadok (Université de Blida), pour son aide et sa gentillesse, le Professeur AGGAD Hebib, Directeur du laboratoire d'hygiène et de pathologie animale à l'institut des sciences vétérinaires-Tiaret, et le Docteur Hemida Houari, Responsable du laboratoire à l'institut des sciences vétérinaires-Tiaret, pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire et de m'avoir permis de travailler dans d'aussi bonnes conditions.

Un grand merci est adressé à Madame Hali Latifa, responsable du laboratoire des substances naturelles, Groupe SAIDAL (Gué de Constantine).

Je remercie également Monsieur Farhi Adel Directeur de l'Etablissement Public de Santé et de Proximité de Ksar Chellala, ainsi que tous les biologistes, laborantins, Médecins et administrateurs de l'EPSP et l'EPH de Ksar Chellala-Tiaret.

TABLES DES MATIERES

RESUME

ABSTRACT

الملخص

DEDICACE

REMERCIEMENTS

TABLE DE MATIERE

LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION..... | 15 |
| CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 18 |
| 1.1. Huiles essentielles..... | 18 |
| 1.1.2. Structures des éléments élaborant les huiles essentielles..... | 19 |
| 1.1.3. Composition chimique des huiles essentielles..... | 21 |
| 1.1.5. Procédés d'extraction des huiles essentielles..... | 25 |
| 1.1.6. Activités biologiques des huiles essentielles..... | 26 |
| 1.1.7. Toxicité des huiles essentielles..... | 31 |
| 1.2. Genévrier oxycèdre (<i>Juniperus oxycedrus</i> L.)..... | 32 |
| 1.2.1. Nomenclature..... | 32 |
| 1.2.2. Taxonomique..... | 32 |
| 1.2.3. Description botanique..... | 33 |
| 1.2.4. Habitat et écologie..... | 34 |
| 1.2.5. Distribution géographique..... | 35 |
| 1.2.6. Etude chimique des huiles essentielles du Genévrier oxycèdre..... | 36 |
| 1.2.7. Usage et propriétés..... | 37 |
| 1.3. Peau et cicatrisation..... | 38 |
| 1.3.1. Anatomie de la peau..... | 38 |
| 1.3.2. Cicatrisation..... | 41 |

| | |
|---|-----|
| CHAPITRE 2 : Matériels et Méthodes..... | 46 |
| 2.1. Durée et lieu d'étude..... | 46 |
| 2.2.1. Matériel végétal..... | 46 |
| 2.2.3. Matériel microbiologique..... | 48 |
| 2.2.4. Matériel animal..... | 49 |
| 2.3. Méthodes..... | 49 |
| 2.3.1. Etude histologiques du Genévrier oxycèdre..... | 49 |
| 2.3.3. Extraction des huiles essentielles..... | 50 |
| 2.3.4. Etude analytique des huiles essentielles..... | 51 |
| 2.3.5. Préparation des Hydrogels dermique..... | 55 |
| 2.3.6. Activités biologiques (<i>in vitro</i>)..... | 60 |
| 2.3.7. Activités biologiques (<i>in vivo</i>)..... | 71 |
| CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSION..... | 84 |
| 3.1. Etude Histologique | 84 |
| 3.2. Etude analytique des huiles essentielles | 86 |
| 3.3. Analyse des huiles essentielles par GC/MS..... | 90 |
| 3.4. Etude des hydrogels formulés..... | 96 |
| 3.5. Résultats des activités biologiques <i>in vitro</i> | 104 |
| 3.5.1. Activité antimicrobienne..... | 105 |
| 3.5.2. Activité anti-oxydante..... | 118 |
| 3.6. Résultats des activités biologiques <i>in vivo</i> | 120 |
| 3.6.1. Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée..... | 120 |
| 3.6.2. Activité anti-inflammatoire..... | 121 |
| 3.6.3. Evaluation de l'activité cicatrisante..... | 125 |
| CONCLUSION..... | 152 |
| APPENDICES | |
| REFERENCES | |

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

| | | |
|------------|--|-----|
| Figure 1.1 | Structures des éléments sécréteurs des huiles essentielles | 21 |
| Figure 1.2 | Principe schématisé de l'hydrodistillation | 25 |
| Figure 1.3 | Schéma d'un extracteur soxhlet | 27 |
| Figure 1.4 | Arbre phylogénétique du genre <i>Juniperus</i> | 33 |
| Figure 1.5 | Photographies du <i>Juniperus oxycedrus</i> | 34 |
| Figure 1.6 | Distribution géographique de <i>Juniperus oxycedrus</i> .subsp. <i>oxycedrus</i> autour du bassin méditerranéen | 35 |
| Figure 1.7 | Structure anatomique de la peau humaine | 38 |
| Figure 1.8 | Schéma de l'épiderme humain | 39 |
| Figure 2.1 | Situation géographique de la station d'étude | 47 |
| Figure 2.2 | <i>Juniperus oxycedrus</i> | 48 |
| Figure 2.3 | Organigramme d'identifications bactériennes des souches isolées | 61 |
| Figure 2.4 | Test de cicatrisation sur incisions linéaires | 76 |
| Figure 2.5 | Test de cicatrisation sur excisions circulaires | 79 |
| Figure 3.1 | Coupes transversales au niveau d'une baie de <i>J. oxycedrus</i> | 84 |
| Figure 3.2 | Coupe transversale au niveau d'une baie immature de <i>Juniperus communis</i> | 86 |
| Figure 3.3 | Profil chromatographique de l'huile essentielle des baies mûres et immatures de <i>Juniperus oxycedrus</i> L. | 93 |
| Figure 3.4 | Photos des hydrogels récupérés à base des huiles essentielles des baies de <i>Juniperus oxycedrus</i> L. | 97 |
| Figure 3.5 | Observation microscopiques des Hydrogels à base des huiles essentielles des baies de <i>J. oxycedrus</i> | 99 |
| Figure 3.6 | Courbes d'écoulements des hydrogels préparés : variation de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement (s^{-1}) | 101 |
| Figure 3.7 | Variation des modules de conservation (G') et de perte (G'') des hydrogels préparés en fonction de la fréquence | 102 |
| Figure 3.8 | Variation des modules de conservation (G') et de perte (G'') des hydrogels préparés en fonction de la déformation | 103 |

| | | |
|-------------|---|-----|
| Figure 3.9 | Effet antibactérien de l'huile essentielle des baies mûres sur <i>S. aureus</i> 25923 | 107 |
| Figure 3.10 | Répartition des résultats des prélèvements cutanés réalisés | 108 |
| Figure 3.11 | Répartition des bactéries isolées des plaies infectées | 110 |
| Figure 3.12 | Répartition des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> selon la résistance et la sensibilité à la méthicilline | 114 |
| Figure 3.13 | Effet antibactérien de l'huile essentielle des immatures sur la souche <i>Acinetobacter baumannii</i> | 116 |
| Figure 3.14 | Variation du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration des huiles essentielles de <i>J. oxycedrus</i> et de l'acide ascorbique | 118 |
| Figure 3.15 | IC50 des huiles essentielles des baies mûres et immatures de <i>J. oxycedrus</i> et de l'acide ascorbique | 119 |
| Figure 3.16 | Pourcentage de réduction de l'inflammation par les hydrogels à base des huiles essentielles du Genévrier oxycèdre et le gel de Diclofenac | 123 |
| Figure 3.17 | Evaluation des incisions linéaires par les scores de Bates-Jensen (BWAT). | 127 |
| Figure 3.18 | Evolution du processus de cicatrisation des incisions linéaires | 129 |
| Figure 3.19 | Surfaces des plaies d'excisions circulaires | 131 |
| Figure 3.20 | Evolution de processus de cicatrisation des excisions circulaires | 132 |
| Figure 3.21 | Contraction des plaies d'excisions circulaires | 133 |
| Figure 3.22 | Evolution de la surface de cicatrisation des plaies de brûlures thermiques | 135 |
| Figure 3.23 | Evolution de la contraction des surfaces plaies | 136 |
| Figure 3.24 | Evolution du processus de cicatrisation des plaies brûlées | 137 |
| Figure 3.25 | Coupe histologique d'une plaie d'incision linéaire traitée par l'hydrogel à base d'huile essentielle des baies mûres de <i>J. oxycedrus</i> comparé avec une section de la peau saine | 140 |
| Figure 3.26 | Coupes histologiques des plaies d'excision traitées par les hydrogels à base d'huile essentielle des baies mûres de <i>J.</i> | |

| | | |
|-------------|--|-----|
| | <i>oxycedrus</i> observées au microscope | 142 |
| Figure 3.27 | Coupes histologiques des plaies d'excisions circulaires traitées par les hydrogels à base de l'huile essentielle des baies immatures | 143 |
| Figure 3.28 | Coupes histologiques des plaies d'excision traitées par le Madécassol® observées au microscope photonique | 144 |
| Figure 3.29 | Coupes histologiques des plaies du groupe témoin traité par l'hydrogel seul (HGC) | 144 |
| Figure 3.30 | Coupes histologiques des plaies brûlées traitées par les hydrogels à base d'huile essentielle des baies immatures de <i>J. oxycedrus</i> observés au microscope photonique | 147 |
| Figure 3.31 | Coupes histologiques des plaies brûlées traitées par les hydrogels à base d'huile essentielle des baies mûres de <i>J. oxycedrus</i> observés au microscope photonique | 148 |
| Figure 3.32 | Coupes histologiques des plaies brûlées traités par le Madécassol® | 149 |
| Figure 3.33 | Coupes histologiques des plaies brûlées du groupe témoin traitées par l'hydrogel seul (HGC) | 149 |
| Tableau 2.1 | Localisation des placettes d'échantillonnage | 47 |
| Tableau 2.2 | Composition des hydrogels formulés | 56 |
| Tableau 2.3 | Liste des antibiotiques testés contre les souches isolats des plaies infectées chez les brûlés. | 67 |
| Tableau 2.4 | Echelle de cotation de l'Irritation Primaire Cutanée | 73 |
| Tableau 2.5 | Evaluation de plaies d'incision par l'outil de BWAT (Bates-Jenson) | 77 |
| Tableau 2.6 | Systèmes de notation histologique | 82 |
| Tableau 3.1 | Résultats de la teneur en eau dans les baies de <i>J. oxycedrus</i> L. | 86 |
| Tableau 3.2 | Rendements en huiles essentielles des baies mûres et immatures de <i>Juniperus oxycedrus</i> L. | 87 |
| Tableau 3.3 | Propriétés organoleptiques des huiles essentielles du Genévrier oxycède | 88 |
| Tableau 3.4 | Propriétés physicochimiques des huiles essentielles de | |

| | | |
|--------------|--|-----|
| | Genévrier oxycèdre | 89 |
| Tableau 3.5 | Composition chimiques des huiles essentielles de <i>J. oxycedrus</i> | 91 |
| Tableau 3.6 | Les propriétés organoleptiques et physiques des hydrogels préparés | 96 |
| Tableau 3.7 | Résultats de l'analyse microbienne des hydrogels à base des huiles essentielles du <i>J. oxycedrus</i> L. | 104 |
| Tableau 3.8 | Détermination de la concentration minimale inhibitrice et les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de <i>J. oxycedrus</i> L. contre les souches de référence | 106 |
| Tableau 3.9 | Profil de résistance des bactéries isolées des plaies infectées chez les brûlés aux différents antibiotiques | 111 |
| Tableau 3.10 | Activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis les bactéries isolats des plaies infectés chez les brûlés | 115 |
| Tableau 3.11 | IC50 des huiles essentielles des baies mûres et immatures de <i>J. oxycedrus</i> et de l'acide ascorbique | 119 |
| Tableau 3.12 | Résultats de l'indice d'irritation cutanée | 121 |
| Tableau 3.13 | Effet des hydrogels à base des huiles essentielles du <i>J. oxycedrus</i> sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton | 122 |
| Tableau 3.14 | Résultats de l'évaluation des incisions selon l'outil de Bates-Jensen | 126 |
| Tableau 3.15 | Surfaces moyennes et les pourcentages des contractions des plaies des excisions circulaires | 130 |
| Tableau 3.16 | Surfaces moyennes et les pourcentages des contractions des plaies des brûlures thermiques | 134 |
| Tableau 3.17 | Résultats des scores histologiques des plaies des incisions linéaires (12 ^{ème} jours) | 138 |
| Tableau 3.18 | Résultats des scores histologiques des plaies des excisions circulaires | 141 |
| Tableau 3.19 | Résultats des scores histologiques des brûlures thermiques | 145 |

INTRODUCTION

Les plantes médicinales ont été traditionnellement exploitées par les communautés à travers le monde comme des moyens de traitement [1], [2]. Dans les pays les plus développés, la place de la phytothérapie et de la médecine traditionnelle a progressivement diminué au profit des traitements médicaux modernes conventionnels. Néanmoins, dans les pays en développement, elles demeurent la principale source de substances thérapeutiques [1].

Actuellement et malgré les progrès récents en pharmacologie, il est crucial de poursuivre la recherche en vue de développer des traitements efficaces à partir de produits naturels, notamment pour le traitement de certaines maladies telles que le diabète, le cancer et les infections des plaies chez les brûlés [2], [3].

Les brûlures demeurent un problème de santé publique significatif, même à l'heure actuelle [4]. Les patients brûlés, en particulier ceux présentant des plaies au premier ou au second degré, sont fréquemment exposés aux infections microbiennes. Parmi ces infections, les bactériémies nosocomiales (BN) se distinguent comme l'une des complications les plus graves chez les patients brûlés en réanimation. Leur pronostic est souvent aggravé par l'émergence et la dissémination de bactéries multi-résistantes (BMR), constituant ainsi l'une des causes fréquentes de retards dans le processus de cicatrisation [5].

La cicatrisation cutanée est un processus finement régulé pouvant être perturbé par de nombreux paramètres. Les plaies chroniques représentent une pathologie complexe, influencée par de multiples facteurs, ce qui rend leur prise en charge difficile. Parmi les approches thérapeutiques alternatives particulièrement prometteuses et ayant démontré leur efficacité, les huiles essentielles se distinguent. Elles sont utilisées pour traiter les infections en raison de leur capacité à éliminer certains germes particulièrement résistants, tout en favorisant également l'accélération du processus de cicatrisation des plaies [5], [6].

Dans cette perspective, l'industrie pharmaceutique s'efforce de mettre au point un système d'administration topique associé à des composés

pharmacologiques actifs, proposant ainsi une thérapie alternative moderne pour le traitement des plaies et des infections [7]. L'hydrogel, un matériau en trois dimensions (3D) capable de retenir l'eau sans se désintégrer, émerge comme le choix idéal pour un système de délivrance de médicaments par voie cutanée. Ce matériau répond de manière optimale aux besoins thérapeutiques des peaux endommagées et des plaies en assurant une hydratation constante, une absorption des exsudats et en favorisant la réparation tissulaire [8].

La plante sélectionnée pour notre étude est le Genévrier oxycède, également connu sous le nom scientifique *Juniperus oxycedrus*. Originaire du pourtour méditerranéen et du Nord de l'Afrique, notamment en Algérie, au Maroc et en Tunisie [9], il est couramment appelé Genévrier de Cade. Traditionnellement reconnu comme un agent antiseptique efficace [10], il a démontré son pouvoir antibactérien, notamment contre *Staphylococcus aureus* et ses biofilms [11]. En outre, il présente une excellente activité antifongique, ciblant des organismes tels que *Candida*, *Aspergillus* et les dermatophytes [12]. Dans le domaine de la dermatologie humaine et vétérinaire, il est utilisé pour traiter des conditions telles que l'eczéma chronique, les infections cutanées et la cicatrisation des plaies [9], [13], [14]. Par ailleurs, son huile de cade est utilisée en cosmétique pour son parfum, utilisée dans la fabrication de savons, détergents, crèmes et lotions [9], [15], [16].

En Algérie, les travaux de recherche portant sur le profil phytochimique des huiles essentielles de Genévrier oxycède, ont bien confirmé qu'elles renferment une grande fraction en monoterpènes hydrocarbonés, notamment l'alpha pinène comme composé majeur. Ce dernier est le composé le plus actif de cette huile qui intervient dans leurs propriétés pharmacologiques [9], [14], [17]–[20]. Différentes activités biologiques des huiles essentielles de Genévrier oxycède ont été étudiées essentiellement, l'activité antimicrobienne, antioxydante et anti-inflammatoire [11], [12] [14]–[16]. Cependant, peu de recherches ont été consacrées à explorer leur capacité cicatrisante [24].

L'objectif principal de cette étude s'inscrit dans le domaine de recherche du laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé et vise à la caractérisation phytochimique et pharmacologique des huiles essentielles à partir des baies

mûres et immatures de *Juniperus oxycedrus* L., afin d'apporter une explication scientifique quant à son utilisation traditionnelle dans le processus de cicatrisation des plaies.

Ce manuscrit sera structuré en quatre parties principales :

- ❖ **Revue bibliographique** : Cette première section abordera divers sujets tels que les plantes en santé humaine, les huiles essentielles, la description détaillée de l'espèce végétale utilisée dans cette étude. Elle inclura également une exploration des étapes du processus de cicatrisation et mettra en évidence la problématique associée au retard de la cicatrisation.
- ❖ **Matériel et méthodes** : La deuxième partie du manuscrit détaillera le matériel et les méthodes employés au cours de l'étude. Cela englobera la localisation des sites sécréteurs des huiles essentielles, le processus d'extraction des huiles essentielles, ainsi que l'analyse de leur composition chimique. De plus, cette section couvrira la préparation des Hydrogels dermiques à base des huiles essentielles, ainsi que l'étude de diverses activités biologiques telles que l'activité antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire et l'évaluation de l'activité cicatrisante.
- ❖ **Résultats, discussion, conclusion et perspectives** : La troisième partie sera consacrée à la présentation des résultats obtenus. Elle sera suivie d'une discussion approfondie des conclusions tirées des résultats. La quatrième partie abordera la conclusion générale de l'étude ainsi que les perspectives futures de recherche.
- ❖ La dernière partie du manuscrit comprendra les références bibliographiques utilisées pour soutenir et étayer les différentes sections du document.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Les huiles essentielles

La phytothérapie (En grec, Phytos = végétal et Therapein = soigner) est l'art de soigner par les plantes. La phytothérapie est l'utilisation des plantes médicinales ou leurs métabolites actifs pour soulager les symptômes voire même guérir les maladies [25]. Depuis la plus haute antiquité l'homme a eu recours aux plantes pour se soigner contre de nombreuses maladies. Selon l'Organisation Mondiale de Santé (OMS), plus de 80% de la population mondiale spécialement dans les pays en voie de développement utilise les plantes dans les soins médicaux [26].

Au cours des dernières décennies, beaucoup d'attention a été accordée aux propriétés thérapeutiques des plantes en tant qu'agents thérapeutiques naturels alternatifs aux traitements synthétiques et chimiques [27], [28]. Les plantes constituent un réservoir important de substances actives, essentiellement les huiles essentielles. Les huiles essentielles sont des composés assez complexes, volatiles, de nature hydrophobe, synthétisées par les plantes aromatiques et médicinales comme métabolites secondaires [29]. Elles sont peu solubles dans l'eau mais solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Cependant, elles sont très altérables et s'oxydent au contact de l'air et de la lumière [30].

Les huiles essentielles sont utilisées comme saveurs et condiments en cuisine, en cosmétologie et en industries pharmaceutiques [31]. Elles interviennent dans les interactions entre la plante et son environnement. Elles jouent un rôle de défense et de protection de plantes contre certains ravageurs et pathogènes (végétal-animal) tels que : les insectes et les herbivores ou encore contre certains microorganismes.

Certaines essences favorisent la pollinisation en attirant les insectes pollinisateurs. Elles peuvent constituer des inhibiteurs de germination de certaines plantes adventices (végétal-végétal) [30].

1.1.2. Structures des éléments élaborant les huiles essentielles

La synthèse des essences se fait au sein de différents tissus sécréteurs présents dans toutes les parties des plantes : les fleurs, les feuilles, les fruits, les racines, les branches et les écorces [32]. Elles sont synthétisées et accumulées dans des structures histologiques spécialisées souvent situées à la surface des tissus des plantes [33]. Les principales structures élaborant les huiles essentielles sont (Figure 1.1) : les cellules sécrétrices ou les canaux excréteurs (les canaux résinifères), les glandes ou les trichomes (poils glandulaires) et les poches sécrétrices [34].

1.1.2.1. Cellules sécrétrices isolées

Elles sont généralement localisées au niveau de l'épiderme des feuilles et des parties florales, mais peuvent se retrouver dans différents tissus de la plante. L'essence produite s'accumule généralement dans des vacuoles (Figure 1.1. a). Ces cellules sécrétrices sont retrouvées chez les familles des *Lauraceae* et des *Zingiberaceae* [35].

1.1.2.2. Poils sécréteurs

Ce sont des émergences des cellules épidermiques uni ou pluricellulaires, dont les cellules glandulaires terminales secrètent l'essence produite (huile essentielle ou résine). L'essence sécrétée est accumulée entre la paroi des cellules et la cuticule (Figure 1.1. b). La déchirure de cette cuticule libère l'essence qui se volatilise. Leur forme est variable et caractéristique d'une famille.

On retrouve ces structures dans de nombreuses familles comme les *Lamiaceae* ou les *Solanaceae* [36].

1.1.2.3. Poches sécrétrices

On distingue trois types de poches sécrétrices qui sont: les poches lysigènes, schizogènes et schizolysigènes [37].

1.1.2.4. Poches lysigènes

Des cellules à mucilage isolées ou groupées pour former des poches sont tardivement lysées (Figure 1.1. c). Elles sont fréquentes chez famille de Malvacea [37],[38].

1.1.2.5. Poches schizogènes

Ce sont des cavités du parenchyme de certains organes, délimitées par des cellules glandulaires sécrétrices (Figure 1.1. d). Ces cellules constituent un méat central où l'essence s'accumule. Ces poches sont présentes chez les Myrtacées, chez les Hypéricacées et dans les feuilles de quelques conifères [39].

1.1.2.6. Poches schizolysigènes

La formation de ces poches est identique au mode de formation des poches schizogènes, mais le méat collecteur est délimité par plusieurs assises de cellules superposées, dont les cellules les plus internes (en contact direct avec la lumière) se lysent (Figure 1.1. e). On les retrouve dans le péricarpe de certains agrumes (*Rutaceae*) [37].

1.1.2.7. Canaux excréteurs

Ce sont des poches schizogènes très allongés, formées par une file de cellules (Figure 1.1. f). En s'écartant, les cellules forment un canal qui recueille les sécrétions. Ces canaux sont présents dans la feuille du Pin et le fruit de l'anis (*Pimpinella anisum* L.) [40].

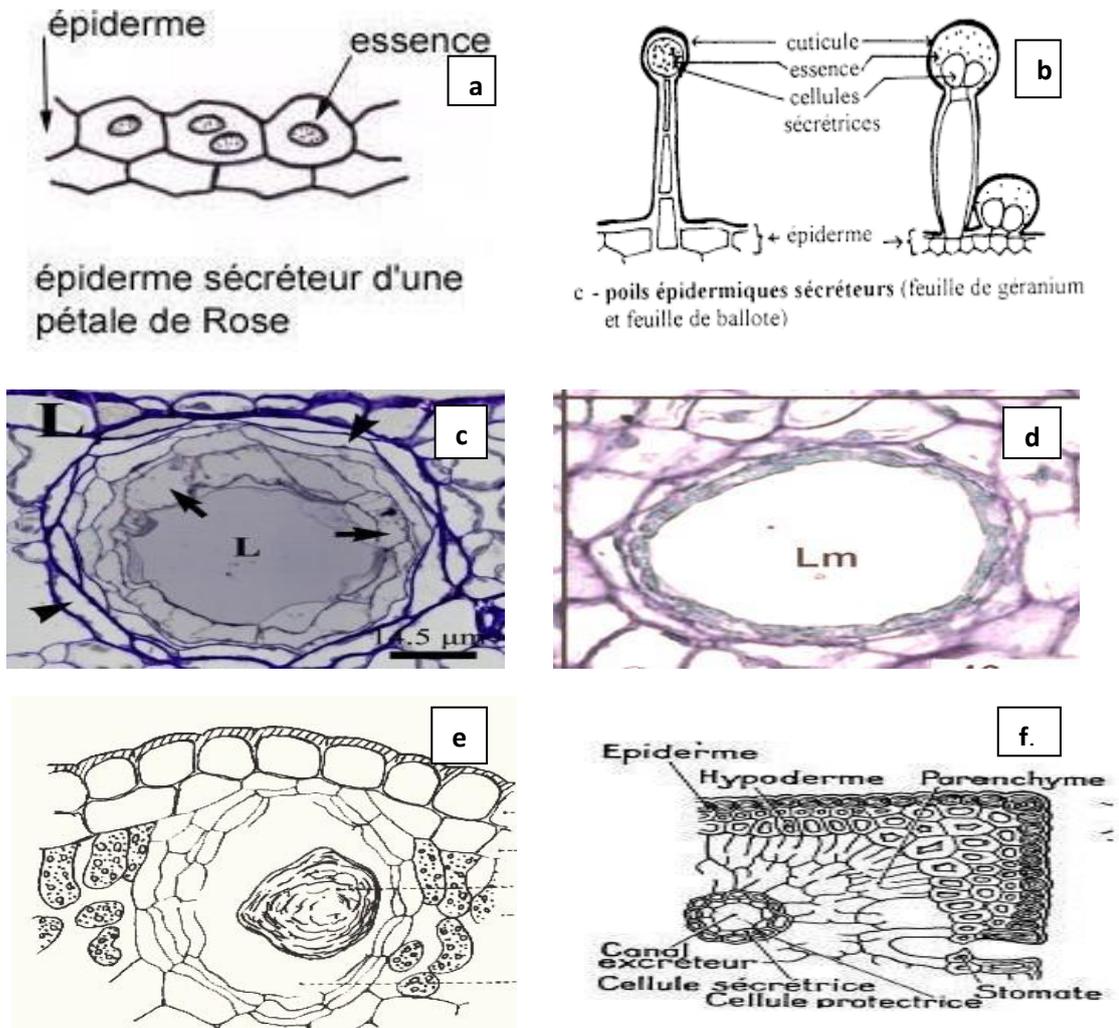


Figure 1.1 : Structures des éléments sécréteurs des huiles essentielles : a. Cellules sécrétrices du pétale de rose (*Rosa* sp); b. Poils sécréteurs de la tige de la Ballote (*Ballota foetida*) ; c. Poche lysigène de la feuille de *Dictamnus dasycarpus* [41]; d. Poche schizogène de la feuille de *Citrus limon* [42] ; e. Poche schizolysigène feuille de *Ruta graveolens* ; f. Canal excréteur en coupe transversale dans une feuille de *Pinus* [34],[37].

1.1.3. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles est complexe. Elle est caractérisée par deux à trois composants majeurs à des concentrations assez élevées (20-70%) [43].

Les huiles essentielles se constituent de nombreux composants appartenant principalement à deux principaux groupes chimiques; les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane [44].

1.1.3.1. Composées terpéniques

Les terpènes constituent le plus important groupe de produits naturels avec de structures très diverses [43]. Ils dérivent de la voie de l'acide mévalonique.

Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unités isopréniques [45]. La classification des terpènes est basée sur le nombre d'unité isoprène qui les compose, dont la formule brute est $(C_5 H_8)_n$:

Ils sont subdivisés en : hémiterpènes ($C_5 H_8$), monoterpènes ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$) diterpènes ($C_{20}H_{32}$), triterpènes ($C_{30}H_{48}$), tetraterpènes ($C_{40}H_{64}$) qui conduisent aux caroténoïdes et les polyterpènes. Les monoterpènes et les sesquiterpènes constituent les principaux composés des huiles essentielles [30], [43].

a. Monoterpènes

Ce sont les plus simples constituants des terpènes, représentent la majorité des constituants des huiles essentielles parfois (plus de 90%) [30], [45]. Cette catégorie se divise en deux principaux groupes:

- Monoterpènes hydrocarbonés

Le précurseur de cette catégorie de monoterpènes est le géranyl pyrophosphate [45]. Les carbures souvent présents dans l'huile essentielle et peuvent être acyclique (myrcène, o-cymène), monocyclique (terpinène, p-cimène) ou bicyclique (pinène, sabinène).

- Monoterpènes oxygénés

Lorsqu'une unité hydroxyle se rattache à un monoterpène. Il peut être acyclique (géraniol, linalol), monocyclique (menthol, thymol), ou bicyclique (bornéol, faenchol).

Les monoterpènes peuvent se rattacher à d'autres substances à fonction chimique : les aldéhydes (géraniol, citronellal), les cétones (carvone, menthone), les esters (acétate de géranyle, acétate de linalyl) [30].

b. Sesquiterpènes

Ils comportent trois unités d'isoprène, leur formule est C₁₅H₂₄. Ils sont le groupe le plus diversifié parmi les terpénoïdes volatiles [45]. Il existe une grande variété de structure :

- Sesquiterpènes hydrocarbonés (SH)

Cette catégorie comporte : les sesquiterpènes acycliques principalement dérivés du trans-farnésyl pyrophosphate [30], [45], monocycliques (bisabolène, zingiberène), bicycliques (cadinène, selinène), polycycliques dont le caryophyllène est le plus important l'humulène (isomère de caryophyllène) [45] .

- Sesquiterpènes oxygénés (SO)

Un sesquiterpène oxygéné est formé d'un hydroxyle fixé à un SH, nommé également sesquiterpénol (Eudesmol, carotol, β-santalol, patchoulol, α-bisabolol caryophellène oxide).

Il existe d'autres structures de sesquiterpènes selon leur fonction : les cétones (nootkatone, β-vétivone), les aldéhydes (sinensals) et les esters (acétate de cédryle) [46].

1.1.3.2. Composés aromatiques dérivés du phénylpropane

Les huiles essentielles contiennent aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane qui sont bien moins fréquents que les terpènes, à l'exception de certains cas tels que l'eugénol qui est un composé majoritaire (70 à 90%) de l'huile essentielle de giroflier (*Syzygium aromaticum* L.) [43]. Les phénylpropanoïdes proviennent de la voie shikimate. Ces composés odorants bien connus par leurs propriétés organoleptiques : comme la vanilline, l'anéthole (Anis), l'eugénol et l'estragole. Egalement, ils possèdent des propriétés thérapeutiques : l'acide salicylique (Salix), l'acide cinnamique (Cannelle) et l'acide benzoïque (Cannelle, thym) [45].

1.1.3.3. Autres composés

Les huiles essentielles peuvent renfermer d'autres composés de nature différente, généralement en faible quantité. Il s'agit de composés issus de la dégradation de terpènes (les norisoprénoïdes (C13), proviennent de l'auto-oxydation des carotènes), des acides gras (la peroxydation des acides linoléiques et l' α -linoléique (C18) aboutit à la coupure de leur liaisons et la formation d'acides en C9 ou C12) ou des acides aminés [30]. Aussi, les lactones qui sont des molécules comportant à la fois une fonction oxyde et cétone. Elles sont dérivées des acides cinnamiques comme les coumarines qui peuvent être entraînés par la vapeur d'eau lors de l'extraction des huiles essentielles [30], [45].

1.1.4. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique et le rendement d'une huile essentielle dépend largement de l'influence de certains facteurs extrinsèques, intrinsèques et les procédés d'extraction [47].

1.1.4.1. Facteurs extrinsèques

Ce sont les facteurs environnementaux, essentiellement les facteurs climatiques (le vent, l'exposition au soleil, la température, l'humidité et la pluviométrie), facteurs écologiques (communauté végétale), les facteurs pédologiques (texture, la nature du sol et le pH) et les facteurs géographiques (altitude, localisation géographique) [47], [48].

1.1.4.2. Facteurs intrinsèques

Dépendent de la plante elle-même. Notamment, selon l'origine botanique de la plante (Famille), l'organe végétal et le chémotype de la plante.

Le chémotype (chémiotype) qui désigne une entité chimique distincte au sein d'une même espèce et une même partie de plante utilisée [49].

D'autres facteurs peuvent aussi influencés la teneur et la composition chimique de l'huile essentielle tels que : le séchage, le stockage post-récolte et le cycle végétatif de la plante [46], [50].

1.1.5. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Diverses méthodes d'extraction des huiles essentielles ont été développées depuis longtemps visant à optimiser la qualité de l'huile essentielle et obtenir un rendement intéressant [45]. Le choix de la technique dépend de la localisation histologique de l'essence dans le végétal et de son utilisation. Parmi les procédés d'extraction : la distillation, l'enfleurage et l'expression [51].

1.1.5.1. Distillation

C'est la méthode la plus anciennement utilisée notamment à l'échelle commerciale. Le principe de la distillation repose sur la propriété qu'ont les huiles essentielles d'être volatiles sous l'effet de la chaleur. Après condensation, l'huile essentielle se sépare du distillat par décantation en deux phases : une phase aqueuse (HA) et l'autre phase organique (HE). Il existe deux méthodes de base de distillation qui reposent sur le même principe [45].

a. Hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un alambic rempli d'eau, le tout est ensuite porté à ébullition (Figure 1.2). [52]. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant puis décantées et séparées [53].

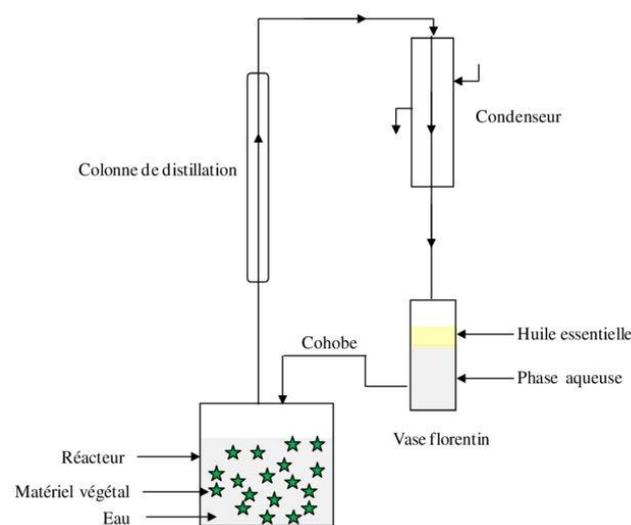


Figure 1.2: Principe schématisé de l'hydrodistillation [54].

b. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

C'est l'un des procédés les plus utilisés pour l'extraction des essences, et le mieux adapté. Il consiste à faire passer la vapeur d'eau à travers la matière végétale placée dans la partie supérieure de l'alambic (sans contact direct de la matière végétale et l'eau). Cette distillation apporte une amélioration de la qualité d'huile essentielle en minimisant le risque de toute altération ou hydrolyse de l'essence [52], mais elle peut engendrer des réactions d'isomérisation, de saponification ou de polymérisation [52], [54].

1.1.5.2. Extraction par enfleurage

C'est l'un des procédés d'extraction des essences des fleurs par contact avec une matière grasse. Le principe repose sur la capacité des corps gras à s'imprégner d'odeurs et à les conserver [46].

a. Enfleurage à graisse froide

Ce processus d'extraction est anciennement utilisé dans le domaine de parfumerie. L'enfleurage est conçu principalement pour les fleurs fragiles comme le jasmin et les roses. Il consiste à utiliser des châssis en bois : soit le châssis d'enfleurage à la graisse (la graisse animale froide est étalée comme la graisse de Bœuf ou la graisse de Porc) ou le châssis d'enfleurage à huile (l'huile végétale comme l'huile de palme).

L'enfleurage est une méthode pour laquelle le travail manuel nécessite une main-d'œuvre expérimentée et qualifiée, la rendant particulièrement longue et onéreuse [55].

b. Enfleurage à chaud (Macération)

Cette méthode consiste à mélanger la matière végétale avec la graisse animale clarifiée ou l'huile végétale, ensuite le tout est chauffé à température à 60°C pendant une à deux heures, puis laissé au moins 24 heures pour que les végétaux libèrent leur odeur. Ensuite, l'huile ou la pâte parfumée appelée pommade est récupérée par un lavage alcoolique.

L'intérêt de la méthode réside dans la réduction du temps de contact fleur/graisse et le moindre besoin en main-d'œuvre [46], [55].

1.1.5.3. Expression à froid

Ce procédé d'extraction est destiné aux agrumes. Il est basé sur l'ouverture des sacs oléifères contenus dans l'épiderme du fruit par un traitement mécanique. L'huile essentielle obtenue est entraînée par un courant d'eau qui va ensuite former une émulsion. Enfin, l'essence est isolée par une décantation de l'émulsion [54], [56].

Cependant, ce procédé peut altérer la qualité des huiles essentielles. Afin d'éviter cette altération et pour améliorer les rendements, de nouveaux procédés mécaniques usuels sont apparus [52], [54].

1.1.5.4. Extraction par les solvants organiques

Cette méthode d'extraction est la plus utilisée pour les plantes délicates contenant une très faible quantité d'huiles essentielles (Figure 1.3). Cette méthode d'extraction présente des inconvénients tels que : problèmes de sécurité et de la toxicité des solvants.

Cela réduit les champs d'application des produits obtenus « concrets » dans les domaines agroalimentaires et pharmaceutiques [52],[53], [56].

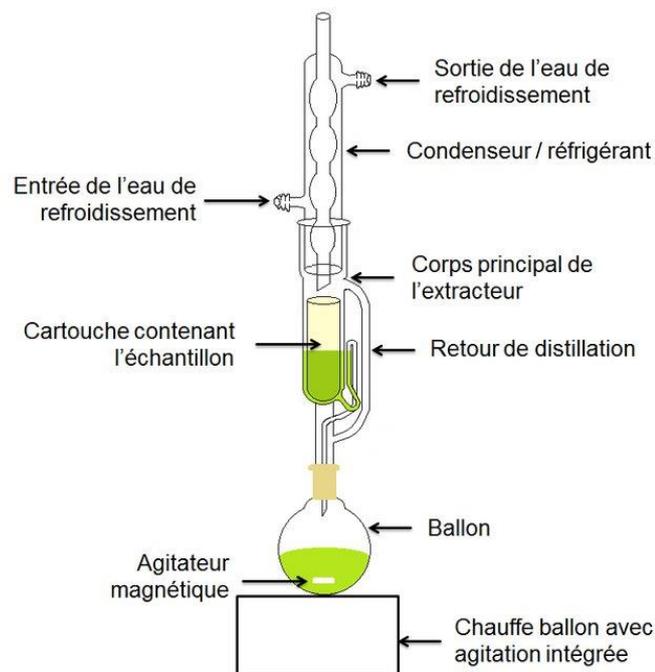


Figure 1.3 : Schéma d'un extracteur Soxhlet [57].

1.1.6. Activités biologiques des huiles essentielles

De nombreuses études ont été réalisées en vue de l'estimation des propriétés biologiques des huiles essentielles [24], [58], [50].

1.1.6.1. Activité antimicrobienne

La recherche sur la découverte de composés phytochimiques ayant des propriétés antimicrobiennes et étudier leurs mécanismes d'action ainsi que la possibilité de leur inclusion dans d'éventuelles thérapies progresse rapidement ces dernières décennies [49], [59]. Parmi les composés phytochimiques, les huiles essentielles font l'objet de nombreuses études afin de tester leur effet antimicrobien notamment avec l'apparition de bactéries multi-résistantes (BMR) [43], [60]. Des huiles pures ou en synergies avec des antibiotiques courants sont étudiées afin de comprendre leur potentiel antimicrobien vis-à-vis des souches BMR [14], [61], [62].

Les huiles ont un spectre d'action très étendu contre un large éventail de micro-organismes [14], [59], [63]. L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est étroitement liée à sa composition chimique et en particulier à certains composants majeurs tels que le linalol, le géraniol, le phénol et l'alpha pinène qui sont connus par leur activité antiseptique [44], [64]. Aussi, elle peut être due à l'effet synergique des composés majeurs et mineurs (phénols, composés terpéniques et cétoniques) [65]. Cet effet antimicrobien des huiles essentielles dépend également de la souche bactérienne testée (Gram + ou Gram-). Cependant les bactéries Gram positif sont les plus sensibles [5], [64], [21], [66].

1.1.6.2. Activité antioxydante

a. Radicaux libres

Le radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) possédant un ou plusieurs électrons non appariés (célibataire) sur ses orbitales externes, par conséquent il est très réactives avec une durée de vie très courte [67]. Ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron.

L'origine de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) est l'oxygène (O_2) qui est une molécule bi-radicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitaux externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement un puis deux électrons pour être partiellement réduit en radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) puis en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [68].

b. Stress oxydatif

C'est un déséquilibre de la balance entre la production en excès des espèces radicalaires ou réactives oxygénés (pro-oxydant) et la capacité cellulaire à les neutraliser (antioxydant) [69]. Elles sont responsables des dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles, conduisant à de nombreuses pathologies chroniques telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, le cancer, les maladies inflammatoires et les maladies cardiovasculaires [70].

c. Les antioxydants

Ce sont des molécules qui diminuent ou empêchent l'oxydation et ses effets néfastes et peuvent être naturels ou synthétiques. Les antioxydants synthétiques les plus utilisés sont le BHT (Butyl Hydroxy Toluène) et le BHA (Butyl Hydroxy Anisole) qui peuvent être toxiques. Actuellement, Les plantes peuvent être la source d'antioxydants naturels, notamment les polyphénols, les caroténoïdes, les vitamines et les huiles essentielles [68]. Certains constituants des huiles essentielles présentent un potentiel antioxydant très marqué comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol qui sont utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique [71].

1.1.6.3. Activité anti-inflammatoire

a. Inflammation

L'inflammation est définie comme un moyen de défense naturel de l'organisme contre toute agression extérieure comme les agressions mécaniques et les infections microbiennes. La réaction inflammatoire peut être aiguë ou chronique [63].

L'inflammation aiguë est une réponse typique du système immunitaire inné qui se manifeste immédiatement. Lors d'une agression, les cellules immunitaires libèrent des médiateurs de l'inflammation, tels que des cytokines, des chimiokines, des histamines et des facteurs de nécrose tumorale et d'autres médiateurs. Ces molécules contribuent à l'initiation, au contrôle et l'entretien de l'inflammation. La fonction primordial de la réponse inflammatoire est d'éliminer les agents pathogènes et de favoriser la réparation et la guérison des tissus lésées [72].

La réaction inflammatoire chronique peut durer des semaines, voire des années. Ce type inflammation est impliqué dans l'apparition de nombreuses pathologies telles que l'arthrite, les allergies, le diabète et le cancer [72], [73].

b. Anti-inflammatoires

Actuellement, de nombreux médicaments sont utilisés pour prévenir ou traiter l'inflammation. Deux types de médicaments anti-inflammatoires sont disponibles : les anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et les non stéroïdiens (AINS) comme l'ibuprofène, le Diclofenac et de nouveaux inhibiteurs sélectifs de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2). Ces molécules, bien qu'étant efficaces, possèdent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent être très graves aux longs termes [74].

Les plantes, en particulier les huiles essentielles et leurs constituants ont un effet anti-inflammatoire similaire à celui des médicaments synthétiques, mais avec des effets secondaire moindre [72]. Des études scientifiques ont montré que l'activité anti-inflammatoire des plantes est fortement liée à la capacité d'inhibition de la synthèse des cytokines, des chimiokines et des molécules d'adhésion, ainsi que de l'acide arachidonique et les voies de l'oxyde nitrique [72], [74], [75].

1.1.6.4. Activité cicatrisante

a. Produits cicatrisants

Plusieurs produits sont présents sur le marché pour le traitement des plaies. Mais, ils sont souvent limités à cause de leur efficacité variable, leur indisponibilité et leur prix jugé élevé notamment dans les pays en développement. Ainsi, la

plupart des produits disponibles ont une activité antimicrobienne plutôt que cicatrisante [76].

Cependant, les médicaments synthétiques ont des effets indésirables ce qui a provoqué le retour aux produits naturels pour le traitement des plaies [77]. Parmi ces produits figurent les tanins, les flavonoïdes et les huiles essentielles. Ces biomolécules présentent nombreuses propriétés antimicrobiennes, anti-oxydantes et anti-inflammatoires qui favorisent la réparation tissulaire et accélèrent le processus de cicatrisation [78].

Nombreuses études ont confirmé l'effet cicatrisant des huiles essentielles ou leurs constituants comme les terpénoïdes [79]–[81]. L'alpha pinène et le caryophyllène sont considérés comme des facteurs clés de l'homéostasie, de la ré-épithélialisation et de la régénération en favorisant la prolifération des fibroblastes et/ou la production de collagène [4], [82].

Ces dernières décennies, des préparations topiques modernes à base des huiles essentielles ont été développées (microcapsules, nanocapsules, gels et hydrogels), afin de surmonter les inconvénients de préparations galéniques conventionnelles [49].

1.1.7. Toxicité des huiles essentielles

L'utilisation des huiles essentielles comme un principe actif est devenue très répandue dans le domaine de soins de la peau et les préparations dermatologiques [78]. Cependant, les huiles essentielles pures peuvent présenter des réactions cutanées de type dermites allergiques ou dermites par irritation qui apparaissent après leurs utilisations. Afin d'éviter leurs effets nocifs, ils sont soumis à des tests de toxicités avec une quantification minutieuse de leurs concentrations maximales avant de les incorporer dans une formulation pharmacologique ou cosmétologique [83], [84].

1.2. Genévrier oxycède (*Juniperus oxycedrus* L.)

Le Genévrier oxycède a été décrit par le botaniste Linné en 1753 sous le nom de *Juniperus oxycedrus* [85]. C'est une espèce typique de la région méditerranéenne, constitue un espèce pionnière peu exigeante sur le plan écologique [86].

1.2.1. Nomenclature

Le nom *oxycedrus* provient de deux mots grecs «oxys» qui signifient aigu ou pointu et «*Cedrus* » ou cèdre, c'est-à-dire «cèdre à feuilles épineuses». Les noms vernaculaires sont les suivant en différentes langues:

Arabe dialectal: Teka, Tagga [87];

Berbère:Tamerbout [87];

Arabe: Araâr Cherbini [88];

Français: Genévrier cade, Genévrier oxycède [87], [89] ;

Anglais: Prickly juniper; Prickly cedar [90] ;

1.2.2. Taxonomique

La classification taxonomique de *Juniperus oxycedrus* L. selon Quézel, P., et Santa, S., (1962) [89], est comme suit:

Règne: Plantae

Embranchement : Spermatophytes

Sous-embranchement: Gymnospermes

Classe : Conifères

Ordre : Coniférales (Pinales)

Sous ordre : Taxales

Famille : Cupressaceae

dessus de deux sillons blanchâtres séparées par la nervure médiane verte [88], [94], [95] (Figure 1.5).

La sous espèce *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* est caractérisée par des feuilles étroites de 1 à 1,5 mm de largeur et de petits fruits [91].

Le genévrier cade est une espèce dioïque avec un cycle reproductif de deux ans. Les cônes mâles sont jaunes de petite taille allant de 1 à 2 mm et les cônes femelles sont vertes. La pollinisation se déroule en six mois de la fin d'Octobre jusqu'à Février. La floraison qui a lieu au printemps. Sur les pieds femelles, les cônes globuleux se transforment en petits fruits immatures après soudures des écailles [91], [92]. Au bout de dix-sept mois, les fruits arrivent à maturité et deviennent de couleur rougeâtre où rouge brun avec un diamètre de 8 à 10 millimètres et plus de 1cm pour la variété macrocarpa [88], [90].



Figure 1.5: Photographies du *J. oxycedrus* [94] :

a. Feuilles; **b.** Baies.

1.2.4. Habitat et écologie

Le Genévrier oxycède constitue l'ossature de certains écosystèmes forestiers et pré-forestiers grâce à sa faculté de résister aux conditions climatiques très sévères et par son indifférence à la nature du sol [89], [90], [93], mais il préfère les sols drainés, calcaires, sableux, même argileux où un sol marneux. Le Genévrier oxycède est une espèce xérophile et héliophile [90].

Le *J. subsp. oxycerus* et le *J. subsp. badia* poussent dans l'étage bioclimatique

semi-aride supérieur à aride, mais parfois il peut atteindre le subhumide inférieur. Ils sont souvent en mélange avec le chêne vert, le chêne liège et les Pins [90].

Le *J. macrocarpa* pousse sur une variété de sites rocheux des dunes littorales allant de 0 m à 1600 m d'altitude [93].

1.2.5. Distribution géographique

Le *Juniperus oxycedrus* L. est une espèce originaire du bassin méditerranéen. Elle est répartie de l'Est du Portugal jusqu'au nord d'Iran. Elle est très répandue en Espagne, en France (Sud de France et en Corse), en Italie, en Sardaigne, en Grèce, en Albanie, en Bulgarie et en Yougoslavie, en Turquie, en Liban et en Nord d'Afrique (Maroc, Algérie et Tunisie) [90], [43].

Le *Juniperus oxycedrus*.subsp. *oxycedrus* est le plus abondant dans le bassin méditerranéen, suivi par le *Juniperus oxycedrus*. subsp.*macrocarpa* Sibth. & Sm qui est distribué tout au long des côtes méditerranéennes et atlantiques du Sud de la Péninsule Ibérique. Tandis que, le *Juniperus oxycedrus*. subsp. *badia* (H.Gay) Debeaux est limité en Espagne, Péninsule Ibérique, Portugal et l'Afrique du Nord [43].

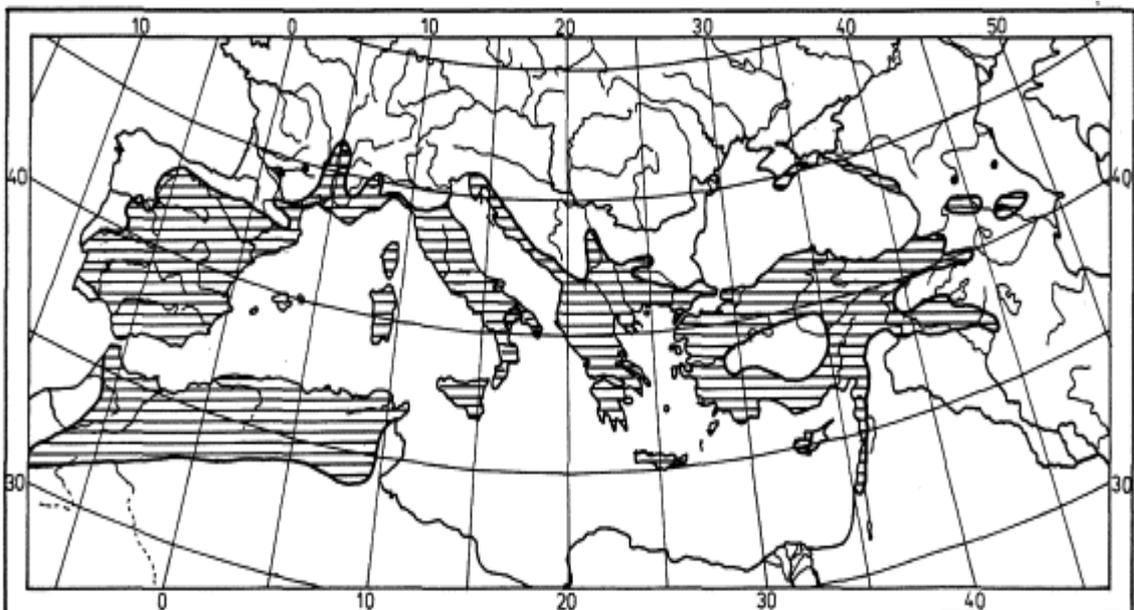


Figure 1.6: Distribution géographique de *Juniperus oxycedrus*.subsp. *oxycedrus* autour du bassin méditerranéen [91].

En Algérie, le Genévrier oxycèdre couvre une superficie de 112 000 ha [87], [89]. *Juniperus oxycedrus*.subsp. *oxycedrus* se localise dans le Tell sous forme d'un peuplement mixte avec le chêne vert et le chêne liège. Il est également présent sur les massifs montagneux (Monts des Ksours, Djebel Amour, Monts des Ouled Nail, Monts des Zab) où il est souvent abondant dans les chênaies et rarement en peuplements presque purs, notamment dans les vallées internes du Haut de l'Atlas. Le *Juniperus oxycedrus*.subsp.*macrocarpa* est réparti sur les dunes littorales [89], [96] .

1.2.6. Etude chimique des huiles essentielles du Genévrier oxycèdre

Les huiles essentielles de genévrier de cade sont largement utilisés dans différents domaines: en parfumerie, en cosmétiques, en pharmacie et en biomédicaux [97], [98]. La composition chimique et la variabilité des huiles essentielles ont fait l'objet de plusieurs études [14], [16], [66], [86], [90], [92], [99]–[102]. Les constituants fondamentaux des huiles essentielles de *J. oxycedrus* L. sont les terpènes, principalement les monoterpènes et les sesquiterpènes hydrocarbonés [103].

Les huiles essentielles des feuilles sont extrêmement riches en monoterpènes avec une forte teneur en α -pinène. D'autres composés majoritaires sont également identifiés : β -pinène, limonène, β -caryophyllène, manoyl oxide, sabinène et β -myrcène [14], [59], [97], [100].

De même, les fruits sont riches en monoterpènes hydrocarbonés, dont l' α -pinène est le composé majoritaire et peu atteint plus de 70% dans les baies mûres [100],[15],[104]. Le germacrène D, le myrcène et le limonène sont également cités comme composés majeurs dans de nombreux échantillons d'origine géographique différente : le germacrène D était le deuxième composé majoritaire suivi par le myrcène dans les échantillons des huiles récoltées en Maroc [16] et en Turquie [13], le germacrène D (16,62% à 32,96%)/(30,8 %) et le myrcène (2,12 à 4,19%)/(10,9 %), respectivement. En revanche, le myrcène était le deuxième composé majoritaire suivi par le germacrène dans l'étude effectuée en Corse (France) [105] et en Sardaigne (Italie) [106]: le myrcène (14,10%-21,90%)/(10,24 à 17,07%) et le germacrène D (11,70%-19,90%)/(12,86 à 13,71%),

respectivement. Une étude menée par Salido *et al*, (2002) [100] en Espagne, a montré que le myrcène était le deuxième composé suivi par le limonène (4,2%)/(1,5 à 2,1%), respectivement.

Le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle peut sensiblement varier selon la saison, la variété, les conditions environnementales et climatiques, le type de sol et l'emplacement géographique [65],[63].

1.2.7. Usage et propriétés thérapeutiques

Le Genévrier oxycèdre est utilisé à de nombreuses fins : en chauffage, en tournerie, pour la production de manches d'outils et de couteaux [107].

En médecine traditionnelle, toutes les parties de cette plante sont utilisées (le bois, les fruits, les écorces et les feuilles) [17]. En effet, l'huile de cade obtenue par distillation de son bois est considérée comme un antiseptique dermatologique largement utilisé dans différents pays du monde pour soigner certaines maladies de la peau chez l'homme et l'animal : Psoriasis, eczémas, plaies et gales [22]. En outre, elle est employée pour lutter contre les parasites chez les animaux, en particulier pour éliminer les tiques sur les chiens et autres porteurs [108]. L'huile de cade est également utilisée en cosmétique comme fragrance dans les savons, détergents, crèmes et lotions [22].

Les feuilles de *Juniperus oxycedrus* sont également utilisées en médecine traditionnelle en Turquie et en Nord d'Afrique sous forme de décoctions pour traiter l'hyperglycémie [22], [104], les diarrhées [17], la tuberculose, la bronchite et la pneumonie [21]. De plus, elles possèdent des propriétés diurétiques mises à profit pour combattre toute sorte de maladies urinaires (goutte, infections et inflammations) [13], [17]. Alors que, les fruits sont utilisés comme épice, en particulier dans la cuisine européenne [109].

Des formulations galéniques sont préparés à base des fruits broyés sous forme d'une poudre fine pour traiter les infections de la peau et les brûlures [24], [110]. En Turquie, les cônes des *Cupressus* et les baies de *Juniperus* (*J. oxycedrus* et *J. phoenicea*) sont utilisés en médecine traditionnelle dans la cicatrisation des plaies [56].

1.3. Peau et cicatrisation

1.3.1. Anatomie de la peau

La peau est le tégument externe recouvrant l'ensemble du corps [111]. Elle constitue une barrière protectrice vis-à-vis l'environnement extérieur, notamment contre les agents pathogènes, les agressions physiques et chimiques [112]. Elle joue un rôle crucial dans nombreuses fonctions comme la fonction sensorielle par sa richesse en fibres sensibles et en récepteurs sensoriels (le toucher, la douleur et la température). Sa fonction métabolique (synthèse de la vitamine D, réserve d'énergie par le tissu adipeux de l'hypoderme et la thermorégulation corporelle) [111],[113]. La peau est constituée de trois couches superposées de l'extérieur vers l'intérieur : l'épiderme, le derme et une couche sous cutanée appelée l'hypoderme [114] (Figure 1.7).

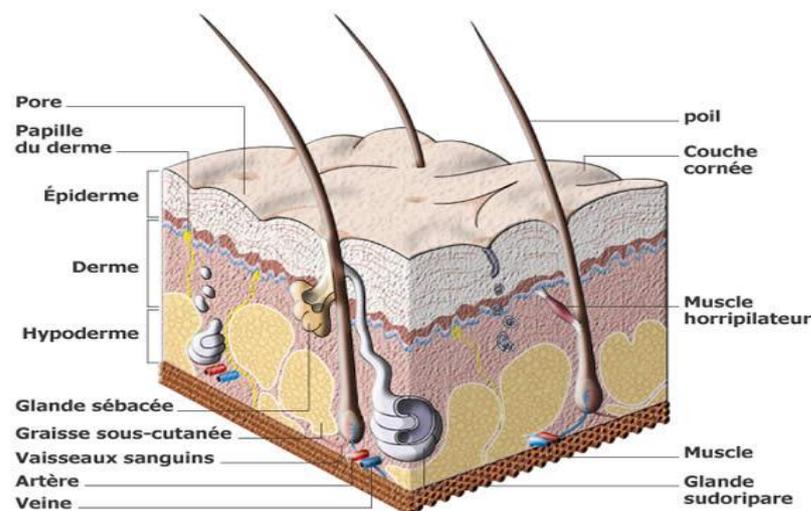


Figure 1.7 : Structure anatomique de la peau humaine [114].

1.3.1.1. Epiderme

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau. C'est un épithélium squameux, stratifié et kératinisé [115]. Il ne contient ni vaisseau sanguin ni vaisseau lymphatique, mais renferme de nombreuses terminaisons nerveuses libres. L'épiderme comporte cinq strates superposées de l'intérieur à l'extérieur (Figure 1.8): stratum germinativum, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum et stratum corneum [116].

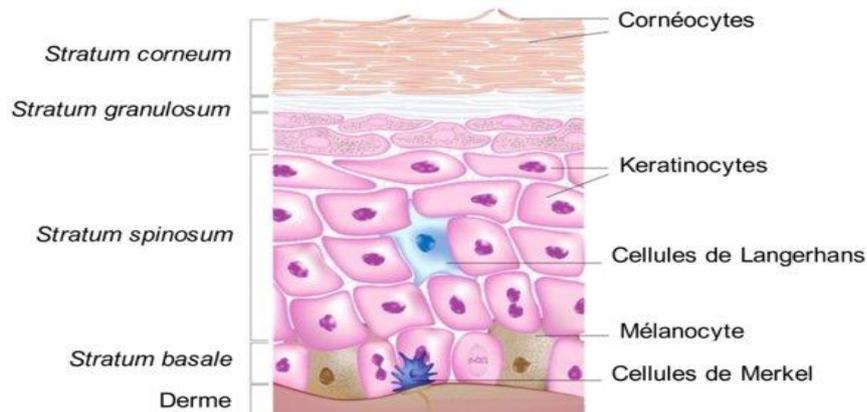


Figure 1.8 : Schéma de l'épiderme humain [117].

a. Stratum germinativum (Couche basale)

C'est la couche la plus profonde de l'épiderme appelée couche basale ou germinative. Elle repose sur la membrane basale. Cette couche unicellulaire majoritairement composée de kératinocytes [118], des mélanocytes, des cellules de Merkel et des langerhans (reconnaissant l'antigène et les présentant au système immunitaire) [119].

b. Stratum spinosum (Couche Malpighi)

Les cellules de cette couche ont liées l'une à l'autre par des desmosomes qui donnent un aspect d'épines. Les kératinocytes de la couche épineuse dérivent de la couche basale, commencent leur maturation en s'aplatissant et en accumulant de la kératine [119].

c. Stratum granulosum (Couche granuleuse)

Cette strate comporte un à trois couches des cellules. Les kératinocytes sont aplatis avec des noyaux rétrécis qui contiennent des granules des kératohyalines et des corps lamellaires. Ces granules sont riches en lipides qui jouent un rôle important dans la protection de l'épiderme et dans la kératinisation de la peau [112].

d. Stratum lucidum (Couche claire)

C'est une fine couche difficilement visible sur les coupes histologique. Les cellules ont un aspect brillant, très clair, aplati et dépourvu de noyaux [112].

e. Stratum corneum (Couche cornée)

C'est la couche la plus superficielle de l'épiderme. Elle est composée de nombreuses couches de cellules qui sont principalement divisées en deux zones: une couche profonde (le stratum compactum) au sein duquel les liaisons intercellulaires sont encore conservées grâce à l'existence de desmosomes [119]. Une autre couche superficielle (le stratum disjonctum) composée principalement de cellules kératinisées, anucléées et dépourvues de desmosomes. Ces cellules mortes seront ensuite remplacées par de nouvelles cellules provenant de la couche basale durant une période de deux à trois semaines [113].

La couche cornée constitue une barrière protectrice de perméabilité contre la déshydratation cutanée grâce aux lipides lamellaires intercellulaires entre les cornéocytes [112]. De plus, elle constitue une barrière antimicrobienne contre micro-organismes pathogènes. En effet, la couche cornée a un pH est acide de 4,5 à 5 ce qui permet le maintien de la symbiose du microbiote cutanée inhibant la croissance des bactéries pathogènes [113], [120]. De même, les protéines et les peptides antimicrobiens ont un rôle important dans l'immunité innée. La mélanine et l'acide transurocanique offrent également une protection contre les rayons ultraviolets (UV) et empêchent ainsi le développement de cancers cutanées [116].

1.3.1.2. Derme

Le derme ou le tissu conjonctif lâche qui possède une structure complexe plus épaisse que l'épiderme, assure la souplesse de la peau et le maintien de la température du corps [117]. Il est constitué principalement de la matrice extracellulaire (substance fondamentale) au sein de laquelle se trouvent des fibres de collagène entrecoupées de fibres élastiques entourées d'une matrice de protéoglycanes et de glycoprotéines. Des cellules qui sont principalement les fibroblastes sont responsables de la synthèse et de dégradation des protéines. D'autres cellules immunitaires comme les macrophages et les mastocytes qui sont entourées par une matrice extracellulaire [121]. Le derme contient aussi des

annexes cutanées, telles que les follicules pileux, les glandes sébacées et les glandes sudoripares, qui contribuent à la protection et à la thermorégulation du corps [115].

Le derme cutané est composé de deux couches différentes : une couche papillaire supérieure et une autre couche réticulaire inférieure [116].

a. Couche papillaire (Stratum papillare)

C'est une fine couche située entre les ondulations de la jonction dermo-épidermique « papilles dermiques » qui contiennent des terminaisons nerveuses responsables de la transmission sensorielle du toucher, des vibrations ou de la chaleur et des vaisseaux microvasculaires qui nourrissent l'épiderme [122].

b. Couche réticulaire (Stratum reticulare)

C'est une couche plus profonde du derme. Elle est constituée d'un tissu conjonctif dense composé des faisceaux de collagène et des brins d'élastine qui forment un réseau bien ordonné conférant au derme ses propriétés de rigidité, d'extensibilité et d'élasticité [122],[123].

1.3.1.3. Hypoderme

C'est une couche profonde qui relie la peau au fascia sous-jacent. Il est composé de lobules d'adipocytes dispersés au sein de septa conjonctifs vascularisés (systèmes vasculaires et des nerfs). Cette couche sert non seulement à la mobilité et à l'élasticité de la peau, mais joue également un rôle de thermorégulation et de protection mécanique. L'hypoderme favorise la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes et la cicatrisation des plaies [124]. C'est une couche mal différenciée où se trouvent les glandes sudorales qui fabriquent et expulsent la sueur via de petits canaux [117].

1.3.2. Cicatrisation

Les plaies cutanées peuvent être provoquer par un traumatisme mécanique (plaies chirurgicales) thermique , chimique ou radiologique (plaies de brûlures) [125].

Suite à une lésion ou une plaie cutanée, un processus cicatriciel se met en place [24]. La cicatrisation est un processus biologique complexe dynamique et multifactoriel visant à rétablir l'intégrité et la fonctionnalité des tissus lésés. Ce processus cicatriciel dépend de certains facteurs, principalement le type et la localisation de la plaie ainsi que la survenue ou non de l'infection [4].

1.3.2.2. Modes de cicatrisation

On peut distinguer deux principaux modes de cicatrisation des plaies suivant les conditions de traumatisme [117] :

a. Cicatrisation par première intention

Dans les plaies sans pertes de substance cutanée dont les bords des plaies sont bien rapprochés et en absence d'agents infectieux ou corps étrangers (plaies superficielles ou plaies d'incisions) la cicatrisation se fait rapidement par un processus adhésif [117], [126].

b. Cicatrisation par deuxième intention

Les plaies avec perte de substance cutanée cicatrisent moins rapidement par un processus prolifératif intense, formation d'un caillot sanguin et une contraction des plaies plus prononcée qui est la conséquence d'un mouvement centripète du revêtement cutané autour de la plaie [126].

1.3.2.1. Phases de cicatrisation

La cicatrisation comporte trois phases : l'hémostase et l'inflammation, la prolifération et le remodelage (maturation) [127]. Toutes ces phases sont interdépendantes et se chevauchent sans séparation stricte dans le temps. La durée et l'intensité de chaque phase varient en fonction de la plaie et du mode de cicatrisation [4] .

a. Phase vasculaire et inflammatoire

Après une lésion tissulaire, le processus cicatriciel commence immédiatement. Dans cette phase, une vasoconstriction locale associée avec à

une agrégation plaquettaire délimitent le saignement qui assure l'hémostase primaire. Puis, une seconde étape permet au phénomène de coagulation de se mettre en place par la formation d'un réseau de fibrine. Cette dernière s'agglutine avec les plaquettes sanguines pour former le caillot sanguin. La phase vasculaire dure environ trois jours [98], [128].

Une phase inflammatoire implique la libération de chimiokines, des cytokines et des facteurs de croissance, les neutrophiles et les macrophages permettent l'élimination des bactéries et des tissus morts [129]. Cette phase est caractérisée par certains signes cliniques : un gonflement provoqué par la formation d'exsudat, une rougeur et une chaleur due à la vasodilatation [130].

Cette phase de détersion joue un rôle important au cours du processus de cicatrisation (recrutement et activation cellulaires, synthèse matricielle et angiogenèse) [129].

b. Phase de prolifération (granulation)

C'est une phase essentiellement cellulaire a pour but de restaurer la fonction de barrière épidermique et la formation d'un tissu cicatriciel [131]. Elle peut durer deux jours jusqu'à trois semaines. Le processus de granulation se met en place parallèlement à la phase de détersion. Il est caractérisé par la synthèse du collagène et de fibrinogène par les cellules fibroblastiques sous l'effet des médiateurs de croissance et des macrophages afin de combler la perte de substance. Ainsi, l'angiogenèse (la néovascularisation) est un processus important de la cicatrisation qui est déclenchée principalement par les macrophages. La néo-vascularisation assure aux fibroblastes l'apport d'oxygène et de nutriments nécessaires [49]. La migration et la prolifération des cellules endothéliales nécessitent également une stimulation exercée principalement par le facteur VEGF (Vascular endothelial growth factor) et d'autres facteurs chimiotactiques et facteurs de croissance qui sont sécrétés par les macrophages, les fibroblastes et les kératinocytes. Cette prolifération des cellules endothéliales permet la formation des structures tubulaires (des artérioles ou en veinules) [129], [130].

Les fibroblastes synthétisent des protéoglycanes, des polysaccharides, et diverses glycoprotéines notamment la fibronectine pour former la nouvelle

substance fondamentale de la MEC. Les myofibroblastes jouent un rôle primordial dans la contraction des plaies et la maturation du tissu de granulation [76]. La contraction de la plaie permet la diminution de la surface grâce à un mouvement centripète des berges de la plaie. Les kératinocytes s'agrègent sur les bords de la plaie commencent le processus d'épithélialisation par l'installation d'une fine couche de cellules épithéliales « membrane basale ». Cette ré-épithélialisation permet la protection de la peau contre le dessèchement et les autres agressions du milieu extérieur [132].

c. Phase de maturation et de remodelage

C'est la phase la plus longue du processus de cicatrisation et qui peut durer plusieurs années. Durant cette phase, une réparation touche toutes les couches cutanées avec une diminution progressive de la réponse immunitaire, une réorganisation de la matrice extracellulaire et le remodelage du tissu conjonctif cicatriciel [118].

En effet, le tissu de granulation jeune devient mature, fibreux et plus résistant. Ce dernier est caractérisé par une diminution de la vascularisation et une augmentation de la proportion de collagène granulaire. Cette modification visant à obtenir un tissu cicatriciel ressemblant le plus possible au tissu physiologique. En outre, un épaississement de l'épiderme suivi par une kératinisation progressive permet la restauration de la fonction de la peau [118], [133], [134].

Cependant, la cicatrice est généralement dépigmentée et la reconstitution des follicules pileux et des glandes sébacées est limitée [51].

1.3.2.3. Facteurs influençant la cicatrisation

Les facteurs pouvant influencer la survenue et la persistance de la cicatrisation des plaies sont essentiellement des facteurs locaux et généraux [135].

a. Facteurs généraux

Parmi ces facteurs, l'âge avancé qui est responsable du vieillissement cutané, d'affaiblissement des défenses immunitaires et de certaines maladies cardiovasculaires et de diabète [113]. Ces facteurs augmentent le risque de développer une plaie chronique difficile à traiter. Aussi, le tabagisme entraîne un ralentissement de la cicatrisation par une diminution de l'oxygénation de la plaie. D'autres atteintes métaboliques et nutritionnelles sont capables de perturber l'ensemble des phases de la cicatrisation tels que l'anémie, les carences en vitamines (Vitamine A et Vitamine C) et l'insuffisance rénale [135].

b. Facteurs locaux

Parmi les facteurs locaux qui peuvent perturber la cicatrisation, la présence des corps étrangers et des tissus nécrotiques, de mauvaises conditions vasculaires, des niveaux excessifs de cytokines pro-inflammatoires, de protéases, des espèces réactives d'oxygènes (ROS) et d'autres molécules. Ainsi que, les infections causées par divers agents pathogènes notamment les bactéries résistantes aux antibiotiques comme *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* et *Acinobacter baumannii* [136], [137] qui entraînent une inflammation intense et provoquent le recrutement des cellules immunitaires tout en réduisant la production des facteurs de croissance et de synthèse de collagène [135].

En conséquent, la cicatrisation reste stagner dans la phase inflammatoire et les plaies deviennent chroniques [138],[135].

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1. Durée et lieu d'étude

L'étude s'est étalée sur une période allant du mois de Janvier 2019 jusqu'au mois d'Octobre 2022. Elle a été réalisée au niveau des structures suivantes :

- Laboratoire de Biotechnologies, Environnement et Santé université Blida1.
- Laboratoire des substances naturelles du Centre de Recherche et de Développement, Groupe SAIDAL-Gué de Constantine.
- Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC), Bou Ismail.
- Laboratoire d'Analyses Médicales Ras Djbel à Douera.
- Laboratoire d'Hygiène et de Pathologie Animale, Institut des Sciences Vétérinaires, Université Ibn Khaldoun –Tiaret.
- Laboratoire d'Histopathologie. Institut des sciences vétérinaires, Université Ibn Khaldoun-Tiaret.

2.2. Matériel

2.2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de baies mûres (mâtures) et immatures (la désignation de stade de maturation des fruits de *Juniperus oxycedrus* a été réalisé par observation visuelle).

A cet effet, 2 parcelles du *J. oxycedrus* sont choisies aléatoirement d'une forme carrée et une superficie de 100 m² (10 m × 10 m). Au total, 20 à 25 arbres ont été échantillonnés suite à des inspections visuelles des gros arbres (plus âgés).

Les baies ont été récoltées par un échantillonnage de façon aléatoire au printemps 2019 à une altitude de 950 m dans la région de Guertoufa (Tableau 1.1), Wilaya de Tiaret au Nord-Ouest de l'Algérie (Figure 2.1).

Tableau 2.1 : Localisation des placettes d'échantillonnage

| Station | Latitude | Longitude | Altitude (m) | Etage bioclimatique |
|-----------|---------------|---------------|--------------|---------------------|
| Guertoufa | 35°36' 9.70"N | 1° 22'36.40"E | 950 | Semi-aride |

L'identification de la plante a été faite selon les clés de détermination de Quezel et Santa (1962) [96]. Cette identification a été confirmée par le Professeur BENHOUBOU Salima du Département de Botanique de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA)- Alger.

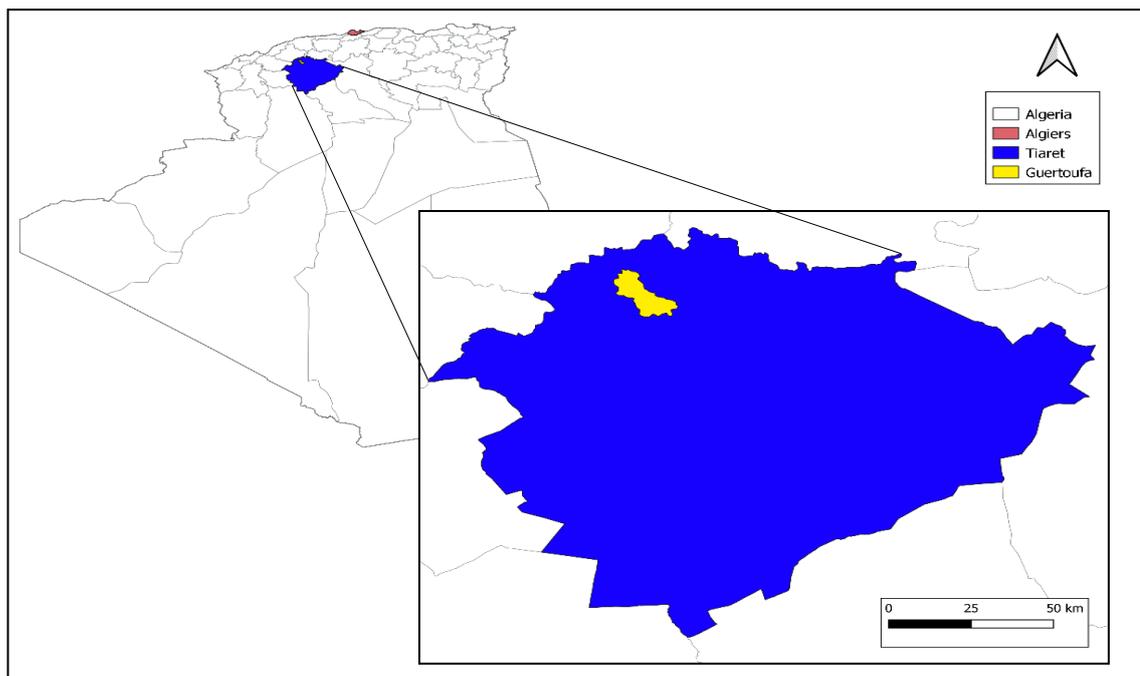


Figure 2.1 : Situation géographique de la station d'étude.

Les échantillons (1kg pour chacun) ont été manipulés à l'état frais. Une partie de ces échantillons a été utilisée pour calculer la teneur en eau et l'autre partie a été écrasé par un moulin électrique et laisser pour extraire les huiles essentielles.

Des échantillons séchés ont été déposés au niveau de l'herbier du laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé du Département de Biologie, Université de Blida-1 sous la référence numéro : No. 03/2019.



Figure 2.2 : *Juniperus oxycedrus* (Originale, 2021) :

a : Baies mures ; b : Baies immatures

2.2.3. Matériel microbiologique

Durant une période de six mois allant du mois d'Octobre 2019 jusqu'au mois de Mars 2020, l'effet antimicrobien des huiles essentielles du Genévrier oxycède a été testé sur 34 souches prélevées à partir des plaies infectées chez les brûlés par écouvillonnage cutané au niveau du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Douera- Alger.

Nous avons aussi testé les huiles essentielles sur six souches microbiennes de référence, fournis par le laboratoire bactériologique de l'Institut Pasteur d'Alger. Il s'agit de: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Escherichia coli* (ATCC 25922) et une levure *Candida albicans* (ATCC 10231).

2.2.4. Matériel animal

Un ensemble de 54 rats mâles Wistar pesant 180 ± 20 g, 12 lapins New Zélandais albinos pesant entre 1,9 à 2,1 kg et 24 souris adultes mâles et femelles d'un poids de 20 à 30 g ont été fournis par l'Institut Pasteur (Kouba-Alger). Ces animaux ont été hébergés dans des cages de polypropylène avec accès libre à l'eau et à la nourriture au niveau de l'animalerie du laboratoire d'hygiène et de pathologie animale de la faculté des sciences vétérinaires de l'Université de Tiaret. Ils étaient maintenus à une température ambiante de 25 ± 2 °C et un cycle jour-nuit de 12 h-12 h. Les animaux ont été laissés sept (07) jours afin de s'adapter aux conditions de l'animalerie. Toutes les expériences *in vivo* ont été menées conformément aux principes décrits dans le «guide pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire» [139].

2.2.5. Matériel non biologique

Le matériel non biologique est détaillé en Appendice A et B. Il est représenté principalement par des milieux de cultures, des appareillages, des verreries et des réactifs.

2.3. Méthodes

2.3.1. Etude histologiques du Genévrier oxycèdre

Pour étudier la spécificité anatomique des fruits du Genévrier oxycèdre et afin de localiser les sites sécréteurs des huiles essentielles, une étude histologique a été réalisée.

L'examen microscopique a été réalisé en effectuant des coupes transversales très fines à main levée, à l'aide d'une lame de rasoir au niveau des fruits du Genévrier oxycèdre. Ces coupes ont été colorées par la technique de double coloration (Vert de méthyle - Rouge congo).

La coloration est réalisée selon le protocole modifié adopté par Bensalem bendjalloul, (1998) [140] selon les étapes suivantes :

- Les coupes sont plongées dans de l'eau de Javel à 12° pendant 10 à 15 min pour vider les cellules de leur contenu.
- Après rinçage à l'eau courante 5 à 10 min, les coupes sont traitées par l'acide acétique (10%) pendant 1 à 2 minutes.
- Elles sont ensuite lavées à l'eau courante 5 à 10 min et placées dans le vert de méthyle pendant 15 à 20 min.
- Les coupes sont rincées à l'eau courante pendant 5 à 10 min puis plongées dans le rouge Congo 15 à 20 min.
- Les coupes sont ensuite lavées à l'eau, montées entre lame et lamelle et observées au microscope photonique.

2.3.2. Teneur en eau

La teneur en eau a été déterminé selon le protocole décrit par Raffauf (1996) [141]. Des échantillons frais (baies mûres et immatures) de poids déterminé ont été placés dans une étuve à une température de $75 \pm 0,5$ °C. Puis, les échantillons ont été pesés chaque 24 heures jusqu'à l'obtention d'une masse pratiquement constante.

La teneur en eau a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en eau (\%)} = \frac{(\text{Poids frais} - \text{Poids sec})}{\text{Poids frais}} \times 100$$

2.3.4. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été faite par la technique d'hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger, selon le protocole décrit dans la Pharmacopée Européenne [142]. Une quantité de 100 g des

échantillons frais et broyés a été soumise à une hydrodistillation pendant 3 heures (après la première goutte) avec 700 ml d'eau distillée dans un ballon de 1litre.

Les huiles essentielles obtenues par le sulfate de magnésium anhydre ($MgSO_4$) et stockées dans des flacons en verre opaque à +4 °C dans le réfrigérateur jusqu'à leur utilisation ultérieure. Les essais sont réalisés en triplicata.

Le rendement en huile (%) basé sur le poids sec des échantillons a été calculé comme suit :

$$\text{Rendement (\%)} = (P_{HE}/P_m) \times 100$$

P_{HE} : Poids de l'huile essentielle obtenu après séchage.

P_m : Poids de la matière végétale.

2.3.5. Etude analytique des huiles essentielles

2.3.5.1. Détermination des caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques (apparence, couleur et odeur) des huiles essentielles des baies de *J. oxycedrus* ont été notées.

2.3.5.2. Détermination des caractéristiques physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles ont été déterminées selon les normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR, 2000) [143] et l'Organisation Internationale de Standardisation (ISO, 2006) [144].

a. Potentiel d'Hydrogène (pH)

Cette mesure a été effectuée à l'aide d'un pH-mètre, en mesurant la différence potentiel entre deux électrodes en verres plongées dans l'huile essentielle à analyser [145].

b. Densité relative à 20° C

La densité d'une huile essentielle à 20 °C est le rapport de la masse volumique de cette huile à la masse volumique de l'eau à la même température. Elle a été déterminée selon la norme NF T 75-111, 1982/ISO 279-1993 [143], [144], [146].

Un volume de 1 ml d'huile essentielle à tester a été prélevé à l'aide d'une micropipette et puis pesé avec une balance analytique de précision en prenant en considération le coefficient de correction de température :

$$d_{20} = [(m_{HE}/m_{H_2O}) + (0,00073 \times (T^\circ \text{ échant}-20))]$$

m_{HE} : masse de l'huile essentielle en gramme.

m_{H_2O} : masse de l'eau en gramme.

T° : Température en °C.

c. Indice de réfraction

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante de 20 °C. Les indices ont été déterminés grâce à un réfractomètre monoculaire selon la norme NF T 75-112, 1977/ISO 280-1976 [143], [144].

Après étalonnage et nettoyage de l'appareil, l'indice de réfraction de l'eau distillée a été mesuré à une température de 20 °C et doit être de 1,333. Deux gouttes d'huile essentielle à analyser ont été déposées au milieu du prisme. Puis une lecture de la mesure a été effectuée à une température stable selon l'équation suivante :

$$IR = nt' + 0,0004 (20 - T')$$

nt' : valeur de lecture obtenue à la température t' .

T' : Température en °C de l'échantillon.

d. Indice d'acide

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1 gramme d'huile essentielle. La neutralisation des acides libres se fait par une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium selon NF T 75-103, 1982/ISO1242-1982 [143], [144].

Une quantité de deux grammes d'huile essentielle à analyser a été pesée et introduite dans un ballon, puis ont été ajoutés, 5 ml d'éthanol (95°) avec 5 gouttes d'indicateur (rouge de phénol). La titration de ce liquide a été effectuée avec une solution de KOH de 0,02 mol/l jusqu'à l'obtention d'un virage de coloration persistant. Le volume de la solution KOH utilisé est noté. L'indice d'acide est donné par l'équation suivante :

$$IA = (V \times C \times 56,11 / m)$$

V : volume (ml) de KOH utilisé pour le titrage.

C : concentration (moles/l) de KOH.

m : masse de la prise d'essai en gramme.

e. Indice d'ester

Selon la norme NF T75-128, 1984/ISO 7660-1983 [143], [144], c'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par hydrolyse des esters contenus dans 1 gramme d'huile essentielle.

Un gramme d'HE a été introduit dans un ballon muni un réfrigérant à reflux. Puis, 25 ml de KOH (0,5 mol/l) ont été ajoutés à l'aide d'une burette. Après une heure de chauffage, le ballon est laissé pour refroidir et une quantité de 20 ml d'eau et 5 gouttes de solution de rouge de phénolphthaléine ont été ajoutées. La titration de l'excès de KOH est effectuée avec une solution d'acide Chlorhydrique (0,5 mol/l).

Dans les mêmes conditions expérimentales, un essai à blanc par l'eau distillée (au lieu de l'HE) a été effectué. L'indice d'ester est calculé selon l'équation suivante :

$$IE = 28,05 (V_0 - V_1)$$

V_0 : volume (ml) de solution d'HCl (essai à blanc).

V_1 : volume (ml) de solution d'HCl (détermination de l'IE).

2.3.5.3. Caractérisation phytochimique

a. Analyse des huiles essentielles par CG/SM

La détermination de la composition moléculaire des huiles essentielles a été effectuée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS) en utilisant un HP (Hewlett Packard Agilent 6890 plus, USA) équipé d'une colonne capillaire HP-5MS de (30 m x 0,25 mm et une épaisseur du film de 0,25 µm) couplé à un spectromètre de masse HP (Hewlett Packard Agilent de type 5973, Agilent Technologies), avec un détecteur scan à impact électronique (EID).

Les conditions opératoires sont : Température du four : 60°C pendant 8min, 2°C/min jusqu'à 250°C, avec un isotherme pendant 10 min, le gaz vecteur est l'Hélium dont le débit est de 0,5 ml/min. Un volume de 0,2 µl de chaque échantillon étudié a été injecté en mode Split, 1;20 dont la température d'injecteur est de 250 °C. Pour le spectromètre de masse : la température de l'interface est de 280 °C, l'énergie d'ionisation est de 70 eV et une température de la source est de 230 °C. Type de l'analyseur de masse est quadripôles en utilisant l'acquisition en mode Scan de 45-550 m/z.

L'identification des constituants des huiles essentielles a été réalisée en comparant leurs indices de rétention relative à n-alkanes C8-C20 avec ceux rapportées dans la littérature [103], ainsi qu'en comparant leurs spectres de masse à ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées (NIST 14 et Adams 07).

Les principaux constituants des huiles essentielles ont été identifiés par Co-injection avec des standards authentiques disponibles dans le laboratoire sous les mêmes conditions opératoires.

2.3.6. Préparation des Hydrogels dermique

Le but de cette partie est de mettre au point une formulation semi-solide (hydrogel) à usage topique adaptée aux huiles essentielles de *J. oxycedrus* et d'étudier leurs propriétés physico-chimiques, rhéologiques et de tester leurs effets thérapeutiques notamment dans le processus de la cicatrisation des plaies et des brûlures.

2.3.6.1. Choix du type d'hydrogel

Nous avons choisi de travailler sur un hydrogel à base d'un carbomer « Carbopol ultrèz 10 ». Le choix de l'hydrogel est basé sur sa large utilisation dans les traitements de plaies, car il est capable de fournir un environnement humide permettant de réhydrater les tissus et d'absorber les exsudats [131].

Les gels à base des émulsions (H/E) ont été conçus pour surmonter les limites des gels conventionnels, des crèmes et des onguents dans l'administration des principes actifs hydrophobes à la peau [76].

Le Carbopol® ultrèz 10 est choisi comme agent gélifiant, qui est largement utilisé dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques pour ses propriétés physico-chimiques stables et sa basse toxicité [147].

Les surfactants et les co-surfactants sont fréquemment ajoutés pour solubiliser les principes actifs lipophiles [148]. Les surfactants non ioniques tels que le cremophor RH40 et le Cremophor L sont les plus utilisés dans l'application cutanée en raison de leur faible toxicité [149]. D'autres types d'excipients comme les co-surfactants (Propylène glycol, Ethanol et Glycérol) sont également utilisés du fait de leur pouvoir solubilisant [150].

2.3.6.2. Préparation des hydrogels

Le Carbopol®ultrez 10, le Glycérol, le Tocophérol, le Propylène glycol, le Cremophor® Rh 40, l'Ethanol et le Triéthanolamine ont été gracieusement fournis par le groupement pharmaceutique BIOPHARM.

Lors de cette étude, deux formulations pour chaque huile essentielle et une formulation de base (sans principe actif) ont été élaborées (Tableau 2.2).

Nous avons réalisé en premier temps, des essais préliminaires de gélification. Puis, afin de comparer la solubilité des huiles dans l'eau (H/E) et évaluer leur stabilité, deux formulations ont été préparées, une par la combinaison du surfactant et de co-surfactant comme des agents émulsifiants et une autre formulation qui ne contient que les co-surfactants.

Tableau 2. 2 : Les hydrogels préparés

| Formulation | Composition |
|----------------------|---|
| F1 (HGPG/HEM) | Hydrogel à base de l'huile essentielle des baies mûres, contenant le Propylène glycol. |
| F2 (HGCR/HEM) | Hydrogel à base de l'huile essentielle des baies mûres, contenant le Cremophor® Rh40 |
| F3 (HGPG/HEI) | Hydrogel à base de l'huile essentielle des baies immatures, contenant le Propylène glycol |
| F4 (HGCR/HEI) | Hydrogel à base de l'huile essentielle des baies immatures, contenant le Cremophor® Rh40 |
| F5 (HG) | Hydrogel de base (sans principe actif) |

La méthode utilisée consiste à préparer séparément, la phase aqueuse et la phase huileuse :

- Etape 01: La phase aqueuse a été réalisée en ajoutant le Carbopol progressivement à l'eau distillée (sous agitation à 100 tr/min pendant une demi-heure. Le mélange (Carbopol : Eau) a été utilisé dans une proportion égale de (1:50) (m/m). L'agitation est maintenue pendant deux

heures jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Puis, le glycérol a été ajouté au mélange sous agitation pendant 5 mn.

- Etape 02: La phase huileuse a été préparée en dissolvant l'huile essentielle dans l'éthanol absolu en obscurité (le bécher a été entièrement recouvert d'une feuille d'aluminium), la concentration de l'huile essentielle a été fixée à 0,3%. Puis, le tocophérol a été ajouté au mélange sous agitation magnétique. Pour les formulations F2 et F4, le Cremophor® Rh40 a été ajoutée sous agitation magnétique pendant 15 mn à 20 mn.
- Etape 03 : Nous avons introduit par la suite la phase huileuse dans la phase aqueuse progressivement en ajoutant le Propylène glycol pour les formulations F1 et F3. Ensuite, des dilutions de chaque formulation ont été effectuées par l'eau distillée (Qsp 100 g) sous agitation (100 à 500 tr/mn).

Après leurs préparations, les différents mélanges d'hydrogels sont neutralisés à l'aide de quelques gouttes de Triéthanolamine jusqu'à pH voisin de (6,5).

2.3.6.3. Caractérisation des hydrogels

a. Caractérisation organoleptique

Nous avons effectué des examens macroscopiques des hydrogels : la couleur, la consistance, la texture et l'opacité ainsi qu'un contrôle d'odeur spécifique des hydrogels étudiés.

b. Caractérisation microscopique

Une quantité d'échantillon est placée entre lame et lamelle pour une observation microscopique. Ce test permet d'apprécier l'homogénéité des hydrogels.

c. Caractérisation rhéologique

La caractérisation rhéologique a été déterminée en utilisant un rhéomètre à contraintes et déformations imposées de la marque MCR 302 Anton Paar Physica (Anton Paar, GmbH, Allemagne). Pour les hydrogels préparés, une géométrie plan-plan avec $r = 25$ mm a été utilisée à 25 °C. Les résultats expérimentaux ont été analysés par le logiciel Rheoplus US200.

La détermination des propriétés viscoélastiques des hydrogels formés (G' module d'élasticité et G'' au module de dissipation) a été évaluée en appliquant une déformation variant de 0,01 à 1000%, avec une fréquence de 1 Hz. Une rampe logarithmique de taux de cisaillement variait de 10^{-3} à 10^3 s^{-1} . La fréquence a été effectuée en variant la fréquence de 0,01 à 100 Hz dans la plage linéaire à 25 °C. Les valeurs de G' et de G'' ont ensuite été enregistrés.

2.3.6.4. Contrôle microbiologique des hydrogels

Afin de vérifier la conformité des hydrogels formulés aux conditions microbiologiques, un test de pureté microbiologique a été effectué suivant la méthode décrite dans la Pharmacopée Européenne [151]. Ce test a pour but de détecter la présence et le dénombrement des germes aérobies viables totaux et la recherche des germes pathogènes spécifiés comme la détection d'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* susceptibles d'être présents dans les hydrogels préparés. Ces tests ont été réalisés à $t = 0$ et à $t = 30$ jours.

Pour chaque formule, nous avons suivi le mode opératoire suivant :

La préparation de la solution mère (dilution 10^{-1}), par dissolution de 10 g de l'échantillon à analyser dans 90 ml de la solution tampon peptonée au Chlorure de Sodium (pH = 7.0) sous agitation mécanique par vortex jusqu'à l'homogénéisation complète de la suspension préparée. Une deuxième dilution (10^{-2}) a été préparée à partir de la solution mère à l'aide d'une micropipette, 1 ml introduit dans un tube stérile contenant 9 ml de la solution tampon peptonée avec une agitation mécanique par vortex jusqu'à homogénéisation.

a. Recherche et dénombrement des germes aérobies totaux (GAT)

A l'aide d'une micropipette, 1 ml de chaque dilution concernée est introduit dans une boîte de pétri de 90 mm de diamètre. Puis, 20 ml de gélose Tryptocaséine soja liquéfiée (TSA) ont été ajoutées. Par la suite, les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 3 à 5 jours. Trois boîtes ont été utilisées pour chaque formule.

b. Dénombrement des levures et des moisissures (DLM)

Nous avons suivi la même méthode que précédemment, sauf que le milieu gélosé liquéfié à base de peptones de Caséine de Soja a été remplacé par un milieu gélosé liquéfié Sabouraud-glucosé. Puis les boîtes ont été incubées entre 20 à 25 °C durant 5 à 7 jours.

c. Recherche et dénombrement des germes spécifiés

Les germes spécifiques sont recherchés par l'utilisation des milieux de cultures sélectifs.

- Recherche de *Escherichia Coli*

A partir de la solution mère préparée, un volume 10 ml a été transféré dans 100 ml du milieu liquide aux peptones de caséine et du soja (TSB) puis incubés à 35 °C pendant 24 h. Après ce temps d'enrichissement, des subcultures ont été faites sur milieu gélosé MacConkey et l'incubation a été maintenue pendant 24 à 72 h à 35 °C. Après incubation, l'observation des colonies de couleur rouge foncé avec un halo de précipité rouge foncé indique la présence de *Escherichia Coli*. Une confirmation des résultats a été faite par des tests biochimiques comme le test Indole et le test au réactif de Kovacs.

- Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*

Un volume de 10 ml de la solution mère a été transféré dans 100 ml du milieu liquide aux peptones de caséine et du soja (TSB) puis incubés à 35 °C pendant 24 h. Après ce temps d'enrichissement, des subcultures sur milieu Cétrimide ont été incubés à 35 °C durant 72 heures. Après incubation, les colonies apparaissent bleues à vertes fluorescentes sous UV. Une confirmation a été effectuée par des tests biochimiques comme le test oxydase et la coloration de Gram.

- Recherche de *Staphylococcus aureus*

La première étape se fait de la même manière que la précédente. Après la période d'incubation, des subcultures sur milieu Chapman ont été réalisées puis incubés à 35°C pendant 24h.

Après l'apparition de colonies jaunes, lisses et rondes, une confirmation supplémentaire a été effectuée en utilisant des tests biochimiques comme le test catalase, le test Coagulase et la coloration de Gram.

- Recherche de *Candida albicans*

Un volume de 10 ml a été transféré à 100 ml du bouillon d'enrichissement TSB et incubés à 30-35 °C pendant 20 à 72 heures. Après incubation, des subcultures sur gélose de Sabouraud au Chloramphénicol ont été effectuées. Puis les boîtes ont été incubées à 30-35 °C pendant 18 à 24 heures.

d. Interprétation des résultats

Chaque produit testé doit être conforme aux normes de la Pharmacopée Européenne [151] :

- Dénombrement des germes aérobies totaux ≤ 200 UFC/g.
- Dénombrement des moisissures et levures ≤ 20 UFC/g.
- Absence totale des germes spécifiés.

2.3.7. Activités biologiques (*in vitro*)

2.3.7.1. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles des baies de *J. oxycedrus* a été testée vis-à-vis des souches microbiennes de références et vis-à-vis des souches cliniques isolées de patients brûlés.

Des prélèvements cutanés ont été réalisés pour isoler et identifier les bactéries responsables des infections des plaies chez les brûlés et tester leurs sensibilités vis-à-vis des antibiotiques utilisés. Les étapes d'isolement et de l'identification bactérienne ainsi que le test de l'antibiogramme sont résumés dans la Figure 2.3 :

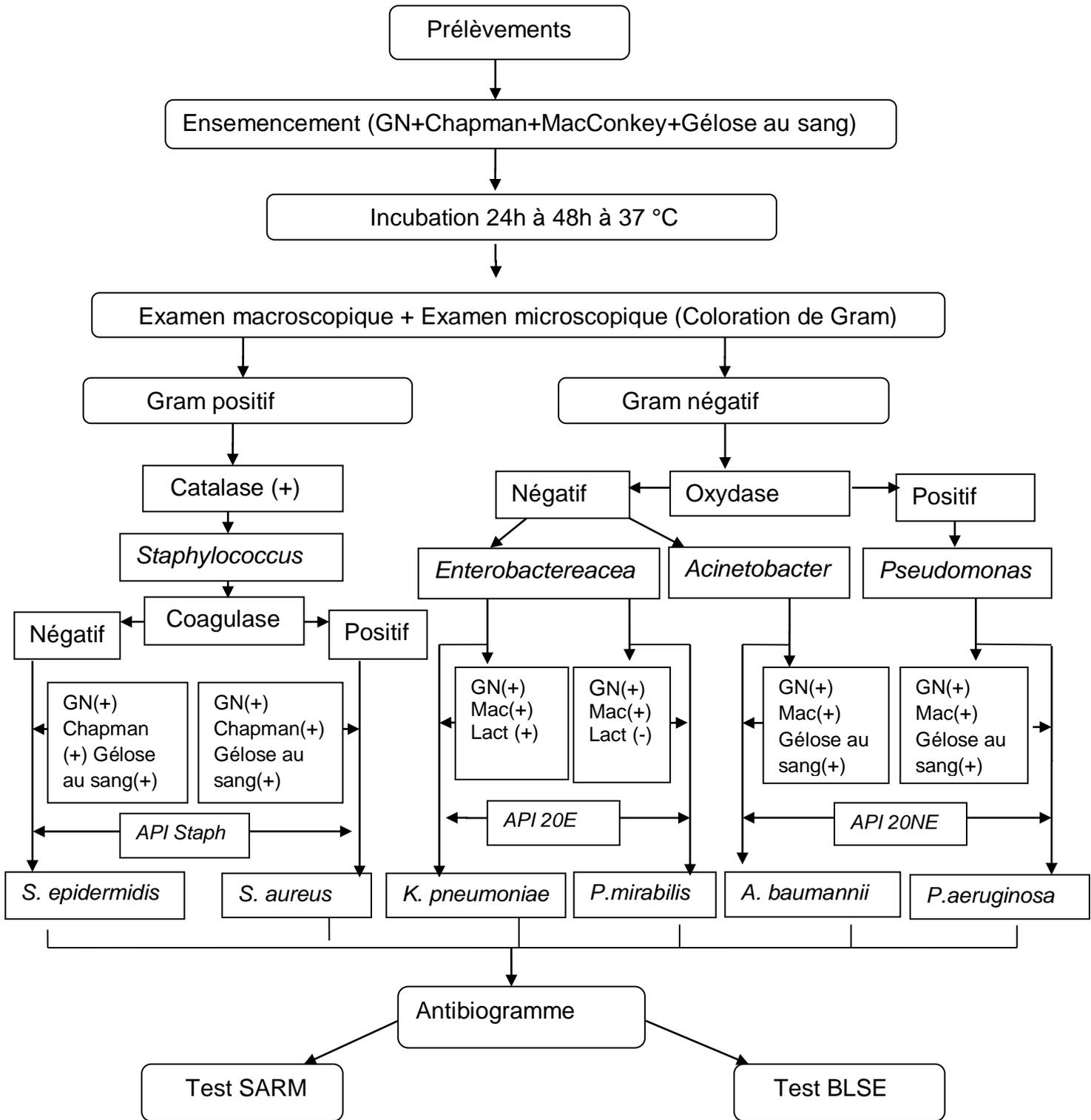


Figure 2.3 : Organigramme de l'identification bactérienne des souches isolées.

a. Isolement des souches bactériennes

Les souches bactériennes étudiées proviennent du service des grands brûlés du CHU de Douera à Alger. Les prélèvements ont été réalisés par écouvillonnage sur les plaies infectées puis acheminés rapidement au laboratoire pour être enrichis dans un bouillon nutritif et incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures. Les prélèvements reçus sont accompagnés d'une fiche de renseignement clinique des patients.

b. Technique d'ensemencement

Après incubation, chaque prélèvement était ensemencé sur différents milieux : Gélose nutritive (GN), gélose MacConkey, Chapman ou (MSA) et la gélose au sang (cuit et frais). Nous avons procédé comme suit : chaque boîte de Pétri a été ensemencée directement à l'aide de l'extrémité cotonnée de l'écouvillon, puis avec une pipette Pasteur stérile en utilisant la technique de quatre quadrants en faisant des stries serrées puis éloignées. Les boîtes ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

c. Identification des souches

L'identification a été faite par des tests usuels de bactériologie : des examens macroscopique et microscopique (Coloration de Gram) ainsi que certains tests biochimiques d'orientation (catalase, oxydase et coagulase). Puis, les souches bactériennes ont été identifiées par les galeries biochimiques API 20 (Biomerieux, France) [152].

- Examen macroscopique

L'examen macroscopique est basé sur l'observation de l'aspect des colonies obtenues sur les différents milieux de cultures (taille, forme, couleur, consistance, opacité et odeur caractéristiques pour chaque espèce) [153].

- Examen microscopique (Coloration de Gram)

Elle permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne ainsi que de classer les bactéries en deux groupes : Gram ⁽⁺⁾ et Gram ⁽⁻⁾ [154], [155]. La méthodologie utilisée était celle adoptée par Beveridge (2001) [154] :

❖ Technique

Une goutte de suspension bactérienne est étalée sur une lame propre, puis elle est laissée sécher à l'air libre. Elle est ensuite passée rapidement dans la flamme du bec Bunsen pour fixer le frottis à la chaleur. Après la fixation, la lame est recouverte par le violet de Gentiane ou par le Crystal violet pendant 1 min. Puis, on ajoute le Lugol pendant 30 secondes afin de fixer le premier colorant. La lame est ensuite rincée à l'eau distillée et on effectue une décoloration par l'alcool pendant 15 secondes suivie par un rinçage à l'eau. Une dernière étape de contre coloration à la Fushine pendant 1 minute suivie par un rinçage à l'eau et un séchage de la lame par un papier buvard.

○ Lecture

La lecture est effectuée par une microscopie optique au grossissement (G: 100x) en utilisant une goutte d'huile d'immersion. Les bactéries Gram positif sont colorées par le violet. Tandis que les bactéries Gram négatif sont colorées par le rose Fushine [154],[155].

- Identification biochimique
- Tests d'orientation

❖ Catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs [156]. La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formé comme sous-produit de processus métaboliques.

Sur une lame propre et sèche, on dépose une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2) à 10 volumes ensuite à l'aide d'une pipette Pasteur boutonné, on prélève une colonie bactérienne isolée du germe à étudier et on la dépose sur la goutte d'eau oxygénée [157].

○ Lecture

Catalase (+) : Observation immédiate du dégagement de bulles d' O_2 .

Catalase (-) : Absence de bulles d' O_2 [155].

❖ Test d'oxydase

Le test d'oxydase permet de mettre en évidence l'enzyme Phénylène diamine oxydase. Sur une lame, on imbibe un disque d'oxydase imprégné par le réactif N tétraméthylparaphénylène diamine, puis avec une pipette Pasteur, on prélève une colonie bactérienne et on la gratte sur le disque [157].

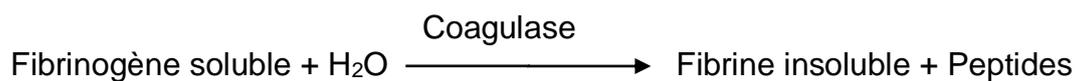
○ Lecture

Oxydase (+) : Coloration de disque en violet.

Oxydase(–) : Disque incolore.

❖ Test de Coagulase

La coagulase libre est une enzyme libérée dans le milieu au cours de la culture par *Staphylococcus aureus*. Sa mise en évidence permet, d'affirmer la présence de *S. aureus*. Cette enzyme est capable de coaguler le plasma [157].



- Dans un tube à hémolyse stérile, on introduit 0,5 ml de plasma et un 0,5 ml d'une culture de 18 h en bouillon nutritif de la souche à étudier.
- Dans un deuxième tube et avec la même procédure, une bactérie de référence *S. aureus* ATCC 25923 est utilisée pour un contrôle positif.
- Un troisième tube contenant que le plasma est utilisé comme un témoin.

Une incubation à 37 °C. Des lectures sont effectuées toutes les heures au moins les cinq premières heures [155].

○ Lecture

- Test positif : formation d'un coagulum lié à la transformation du fibrinogène en fibrine, spécifique à *S. aureus*.
- Test négatif : pas de coagulation, bactérie définie en tant que Staphylocoque à Coagulase Négative (SCN) [155],[157].

▪ Identification par les galeries biochimiques (API 20)

Les galeries API 20 (BioMérieux, France) sont des tests biochimiques miniaturisés. Elles comportent vingt microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Ces tests sont fondés sur une croissance bactérienne associée à une étude de métabolisme nécessitent une incubation à 37 °C pendant 24 à 48

heures, soit sur une recherche de l'activité enzymatique [157]. Les bactéries ont été identifiées par le système API 20E pour les Entérobactéries, API 20NE pour les bactéries Gram négatif non fermentaires comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* et API Staph pour le genre *Staphylococcus* (Gram positif) [155].

- Technique

- ❖ Préparation de la galerie

Réunir fond et couvercle de la boîte d'incubation et remplir les alvéoles avec de l'eau distillée (environ 5 ml) pour créer une atmosphère humide. Puis, déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

- ❖ Préparation de l'inoculum

Préparation d'une suspension bactérienne à partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement approprié. Quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une anse de platine. Ensuite, déchargée dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% NaCl. La suspension bactérienne est bien homogénéisée à l'aide d'un vortex. La densité optique de la suspension bactérienne est réalisée par spectrophotométrie réglé sur une longueur d'onde de 625 nm et doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ce qui correspond à 10^7 à 10^8 cellules/ml [157].

- ❖ Inoculation de la galerie

- Galerie API Staph

- Remplir les tubes des tests avec la suspension bactérienne en utilisant la même micropipette.
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leurs cupules d'huile de paraffine.

- Galerie API 20E

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même micropipette, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Remplir les tubes et les cupules des tests suivants : CIT, VP et GEL.

- Créer une anaérobiose dans les tests suivants : ADH, LDC, ODC, H₂S et URE en remplissant leurs cupules d'huile de paraffine.

➤ Galerie API 20NE

- Remplir tube et cupule des tests : GLU et PAC.
- Les cupules des trois tests : (GLU, ADH, URE) sont remplies d'huile de paraffine pour créer une anaérobiose.

○ Lecture

La lecture a été faite après une incubation à 37 °C pendant 24 heures. Les réactions produites durant l'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. L'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique, après traduction des réactions produites en un profil numérique.

d. Antibiogramme

La sensibilité des germes aux antibiotiques a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton (méthode de Kirby-Beaur) selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 2016 (EUCAST-SFM) [158].

▪ Technique

Une suspension bactérienne d'opacité 0,5 Mc Farland est préparée à partir d'une culture pure de 18 à 24 heures et le milieu de culture Gélose Mueller Hinton (MH) est coulé aseptiquement dans les boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Puis, un ensemencement est réalisé par un écouvillon stérile imbibé par l'inoculum préparé, en étalant la surface du milieu gélosé en stries serrées. Cette opération est répétée trois fois, en tournant la boîte à environ 60° sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Les disques d'antibiotiques sont déposés délicatement sur la surface gélosée ensemencée à l'aide d'une pince stérile. Les disques d'antibiotiques utilisés sont choisis selon la bactérie isolée [158].

Les principaux antibiotiques utilisés sont présentés sur le tableau 2.3.

Tableau 2.3: Liste des antibiotiques testés contre les souches isolats des plaies infectées chez les brûlés.

| Famille | Antibiotique | Abréviation | Charge du disque |
|---|------------------------------------|--------------------|-------------------------|
| Pénicillines (β-lactamines) | Pénicilline | P | 10UI |
| | Ampicilline | AMP | 10 µg |
| Carbapénèmes (β-lactamines) | Imipenème | IMP | 10µg |
| Céphalosporine 3G (β-lactamines) | Cefxime | CFX | 30 µg |
| | Céfoxitine | FOX | 30 UI |
| Aminoglycosides | Amikacine | AMK | 30 µg |
| | Gentamicine | GEN | 10µg |
| Fluoroquinolones | Ciprofloxacine | CIP | 5 µg |
| | Levofloxacine | LVX | 5 µg |
| Glycopeptides | Vancomycine | VAN | 30 µg |
| | Teicoplanine | TEC | 30 µg |
| Polymexines | Colistine | CL | 10 µg |
| Oxazolidinones | Linezolide | LZD | 10 µg |
| Cyclines | Tétracycline | TIC | 30 UI |
| Fusidanines | Acide Fusidique | FAD | 10 µg |
| Macrolides | Erythromycine | E | 15 UI |
| Streptogramines | Pristinamycine | PT | 15 UI |
| Phénicolés | Chloramphénicol | C | 10 µg |
| Lincosamides | Clindamycine | CMN | 2 µg |
| Autres | Ticarcilline+ ac. Clavulanique | TCC | 75/10µg |
| | Amoxicilline+ Ac.clavulanique | AMC | 10/20 µg |
| | Trimethoprime+ Sulfamethoxazole | TSX | 1,25/23,75 µg |

µg : microgramme; UI : unité international.

- Lecture

Après une période d'incubation de 24 heures à 37 °C, les diamètres des zones d'inhibition seront mesurés en mm avec précision à l'aide d'un pied à coulisse. Les diamètres des zones d'inhibition mesurés seront comparés aux diamètres critiques donnés par les instances en vigueur afin de classer la bactérie dans l'une des catégories : Résistante (R), Intermédiaire (I) et Sensible (S).

e. Détection phénotypique des bactéries multi-résistances (BMR)

- Recherche phénotypique de la résistance des *S. aureus*

Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (SARM) est détectée par un disque de cloxacilline ou de l'oxacilline par la présence d'un gène chromosomique (*mecA*) qui code pour la PLP2a. Actuellement, le disque de céfoxitine par la méthode de diffusion est plus utilisé pour confirmer la méticillino-résistance [136].

Dans les conditions standards de l'antibiogramme, un disque de Céfoxitine (30µg) est déposé sur une gélose Mueller Hinton préalablementensemencée avec un inoculum à 0,5 Mc Farland. Ensuite, la boîte est incubée à 37 °C pendant 24h.

- Lecture

Les souches présentant un diamètre inférieur à 22 mm sont résistantes à l'oxacilline [136].

- Détection de phénotype de résistance des souches productrices de BLSE

Les souches résistantes aux β -lactamines produisent des enzymes spécifiques capables d'inactiver ces antibiotiques. La détermination phénotypique de la présence d'une β -lactamase à spectre élargi (BLSE) consiste à mettre en évidence une image de synergie «bouchon de champagne» entre un disque de céphalosporine de troisième génération (CG3) ou monobactame et un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamases [152].

Dans les conditions standards de l'antibiogramme et sur une gélose Mueller Hinton préalablementensemencée par l'isolat à tester, un disque de ceftazidime, de céfotaxime, de céfépime et d'aztréonam (30µg) sont déposés à une distance

de 20 à 30 mm (centre à centre), d'amoxicilline +acide clavulanique (AMC) (20/10 µg) pour les entérobactéries et d'un disque de Ticarcilline+ acide clavulanique (TCC) (75 µg+10µg) pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* [159].

○ Lecture

Il y a présence d'une BLSE ou un test de synergie positif quand il y a une augmentation de la zone d'inhibition autour du disque de la céphalosporine de 3^{ème} génération en direction du disque d'acide clavulanique « image caractéristique en bouchon de Champagne », par rapport à la zone d'inhibition d'une céphalosporine seule [158].

f. Détermination de l'activité antimicrobienne

La sensibilité des microorganismes aux huiles essentielles des baies de genévrier oxycèdre a été évaluée par la méthode de diffusion sur disques [160].

L'activité antimicrobienne a été testée vis-à-vis cinq bactéries de référence : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) et une levure *Candida albicans* (ATCC10231). Puis, nous avons testé l'effet antibactérien des huiles essentielles vis-à-vis de trente-quatre souches prélevées des plaies infectées chez les brûlées.

▪ Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Différentes concentrations des huiles essentielles ont été préparées (Pure, 1/2, 1/4, et 1/8 v:v) en dissolvant l'huile essentielle dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).

Des suspensions microbiennes ont été préparées à partir de colonies jeunes de 18 à 24h dans des tubes stériles qui contiennent de l'eau physiologique (0,9% NaCl) en ajustant la turbidité à une densité optique de 0,08 à 0,10 à 625 nm (équivalente à 0,5 Mc Farland). À l'aide d'un écouvillon stérile, les bactéries en suspension ont été ensemencées sur une surface gélosée sèche coulée et refroidie dans des boîtes de Pétri (gélose Mueller-Hinton pour les bactéries et gélose Sabouraud pour les champignons).

Des disques stériles de 6 mm de diamètre ont été imprégnés de 10 µl d'huile essentielle testée. Des disques imprégnés par le DMSO utilisés comme control négatif. Les boîtes ont été maintenues à une température de +4 °C pendant quelques heures, pour assurer une bonne diffusion de l'huile essentielle dans la gélose [161]. Des disques de Céftazidime 1g ont été utilisés comme contrôle positif pour les bactéries et des disques de Lamidaz 250 mg ont été utilisés comme témoin positif pour les champignons.

○ Lecture

Après incubation à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries et à 28 °C pendant 48 heures pour les champignons, la lecture s'est faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque souche. Selon Ponce *et al.*, (2003) [161], la souche est considérée comme :

- Résistante lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 8 mm,
- Sensible lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est entre 8 et 14 mm,
- Très sensible lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est entre 15 et 19 mm,
- Extrême sensible lorsque le diamètre est supérieur à 20 mm [161].

2.3.7. Evaluation du pouvoir antioxydant des huiles essentielles

Nous avons étudié le potentiel antioxydant des huiles essentielles de *J. oxycedrus* (*in vitro*) par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

2.3.7.1. Test de piégeage de radical libre DPPH

Le test DPPH a été effectuée selon le protocole décrit par Burits et Bucar, (2000) [162]. Ce test vise à mesurer la capacité des huiles essentielles à réduire le radical libre DPPH de couleur violette en DPPH-H (2,2 Diphenyl-1-picryl hydrazine) de couleur jaune.

Les absorbances mesurées à 517 nm, servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel à la concentration et au pouvoir

antioxydant de l'échantillon testé [163]. Nous avons procédé de la manière suivante :

Un volume de 50 µl d'huile essentielle de différentes concentrations (50 à 450 µg/ml) est ajouté à un volume de 5 ml d'une solution méthanolique de DPPH à 0,004%. Ce mélange réactionnel est agité vigoureusement et laissé à température ambiante, à l'obscurité, pendant 30 minutes. L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif.

La lecture se fait en utilisant un spectrophotomètre de marque Thermo-Scientific-Genesys 180 et une absorbance à 517 nm.

La détermination du pourcentage d'inhibition du radical libre de DPPH (I%) est calculée en utilisant la formule suivante :

$$I (\%) = [(A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) / (A \text{ blanc})] \times 100$$

A échantillon: absorbance de l'échantillon.

A blanc: absorbance du blanc (une solution de DPPH sans HE ou Vit c).

- Détermination de concentration inhibitrice IC50

L'effet anti-radicalaire a été exprimé sous forme d'IC50 (µg/ml). L'IC50 a été calculé graphiquement en traçant des pourcentages d'inhibition par rapport aux différentes concentrations des échantillons testées.

2.3.8. Activités biologiques (*in vivo*)

2.3.8.1. Test de l'irritation cutanée

Le but de cette partie d'étude est d'évaluer le potentiel irritant des hydrogels testés par voie topique. Le test a été conduit en conformité aux directives de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE 404, 2015) [164]. Nous avons procédé comme suit :

Avant 24 heures de tenue de l'expérience, les animaux ont été divisés en quatre lots (3 lapins albinos pour chaque lot) puis à l'aide d'une tondeuse électrique, les flancs droit et gauche de douze lapins ont été tondu tout en évitant

les blessures. Le flanc gauche a servi de site d'essai, tandis que le flanc droit non traité a servi de témoin.

Les différents hydrogels testés sont : deux hydrogels à base d'huile essentielle des baies mûres de Genévrier oxycèdre (HGPG/HEM et HGCR/HEM) et deux hydrogels à base d'huile essentielle de baies immatures de Genévrier oxycèdre (HGPG/HEI et HGCR/HEI). Ils ont été appliqués topiquement à raison de 0,5 g.

Les animaux traités ont été observés durant la première heure puis après 4h, 24 heures, 48 heures et 72 heures de l'application topique des traitements à tester en cherchant des signes d'érythèmes ou d'œdèmes. L'évaluation de la réaction cutanée primaire a été déterminé selon l'échelle de Draize (1944) [165], (Tableau 2.4). Au bout de 72 heures, s'il y a des lésions cutanées (une irritation ou une corrosion), les observations étaient poursuivies jusqu'au 14^{ème} jour pour déterminer les effets toxiques locaux comme les lésions cutanées ou des signes cliniques de toxicité.

Le résultat est donné par la valeur de l'Indice de l'Irritabilité Primaire (IPC) comme suit et classé selon l'échelle de cotation IPC :

| |
|--|
| IPC= Somme des valeurs des érythèmes et des œdèmes/3 (flancs droits pour 3 lapins) |
|--|

Tableau 2.4 : Echelle de cotation de l'Irritation Primaire Cutanée [165].

| Echelle | Erythème et formation d'escarres | Formation d'œdème |
|---------|--|---|
| 0 | Pas d'érythème | Pas d'œdème |
| 1 | Léger érythème (à peine visible) | Très léger œdème (à peine visible) |
| 2 | Erythème bien visible | Léger œdème (contour bien définis et gonflement apparent) |
| 3 | Erythème important | Œdème moyen (épaisseur environ 1mm) |
| 4 | Erythème grave (pourpre) avec ou sans escarres (lésions profondes) | Œdème grave (épaisseur supérieur 1 mm et surface supérieure à celle de la zone d'application) |

Evaluation de 0 à 4. Echelle 4 représente la plus grave.

Selon la gravité des effets observés, les produits testés sont classés en :

- Non irritant : $IPC \leq 0,5$.
- Légèrement irritant : $0,5 \leq IPC \leq 2$.
- Irritant : $2 \leq IPC \leq 5$.
- Très irritant : $5 \leq IPC \leq 8$.

2.3.8.2. Activité anti-inflammatoire

Selon le protocole décrit par Sosa et al,(2005) [166], nous avons évalué l'activité anti-inflammatoire des hydrogels à base des huiles essentielles de *J. oxycedrus*. Pour cela, nous avons choisi comme protocole expérimental un modèle d'inflammation par voie topique. L'activité anti-inflammatoire a été réalisée *in vivo*, en utilisant le modèle d'inflammation aigue d'œdème de l'oreille de souris induit par l'huile de croton.

L'examen a été réalisé sur 24 souris Swiss, maintenues à jeun pendant 18h avant le début de l'expérimentation. Les animaux ont été divisés en six groupes, de quatre souris chacun.

Le principe consiste en l'induction d'un œdème de l'oreille de souris par l'application topique de 20 µl de solution irritante d'huile de croton à 5 % (1 ml d'huile de croton dans 19 ml d'acétone) sur les surfaces interne et externe de l'oreille droite. L'oreille gauche non traitée a servi de témoin.

Une heure avant l'application de l'huile de croton, des traitements ont été appliqués localement à l'oreille droite de chaque souris selon les groupes:

- 20 µl (0,5mg) d'hydrogel à base d'huile essentielle de genévrier oxycèdre : (Groupe I: HGPG/HEM), (Groupe II: HGCR/HEM), (Groupe III: HGPG/HEI) et (Groupe IV: HGCR/HE).
- 20 µl (0,5mg) de Diclofénac de sodium 1% (Contrôle positif) pour le groupe V.
- 20 µl (0,5mg) d'hydrogel HGC (hydrogel sans principe actif) pour le groupe VI.

Après 6 h, les animaux ont été sacrifiés à l'aide de l'éther et les oreilles droites et gauches ont été sectionnées suivant l'arête cartilagineuse. Des disques de 6 mm de diamètre ont été sectionnés de chaque oreille, à l'aide d'un perforateur de papier. Puis, les disques obtenus ont été pesé en utilisant une balance de précision.

L'effet anti-inflammatoire topique a été évalué selon la formule suivante :

$$\text{Réduction de l'œdème(\%)} = [(\Delta T_{\text{témoin}} - \Delta E_{\text{traitée}}) / \Delta T_{\text{témoin}}] \times 100$$

ΔT : différence entre le poids moyen des oreilles (droites– gauches) pour le lot témoin (hydrogel de control sans principe actif).

ΔE : différence entre le poids moyen des oreilles (droites– gauches) pour les lots essai (des hydrogels à base des huiles essentielles de *J. oxycedrus* où le témoin positif).

2.3.8.3. Détermination de l'activité cicatrisante

Afin d'évaluer l'activité cicatrisante des hydrogels à base des huiles essentielles de *J.oxycedrus* (*in vivo*), trois modèles de plaies sont provoqués :

incision linéaire (plaies suturées), excision circulaire et brûlure thermique chez des rats Wistar.

Les animaux ont été répartis en six groupes trois rats chacun, selon le traitement appliqué:

- Groupe I: Les plaies ont été traitées par la formule F1 (l'hydrogel à base d'huile essentielle des baies mûres, contenant le propylène glycol) (HGPG/HEM),
- Groupe II: Les plaies ont été traitées par la formule F2 (l'hydrogel à base d'huile essentielle des baies mûres, contenant le Cremophor® Rh40) (HGCR/HEM),
- Groupe III: Les plaies ont été traitées par la formule F3 (l'hydrogel à base d'huile essentielle des baies immatures, contenant le propylène glycol) (HGPG/HEI),
- Groupe IV: Les plaies ont été traitées par la formule F4 (l'hydrogel à base d'huile essentielle des baies immatures, contenant le Cremophor® Rh40) (HGCR/HEI),
- Groupe V : Les plaies ont été traitées par le produit de référence (Madécassol® 1%) comme Contrôle positif,
- Groupe VI : Les plaies ont été traitées par la formule F5 (l'hydrogel de base sans principe actif) (HG) comme témoin.

a. Test de cicatrisation des incisions avec sutures (Plaies suturées)

Ce test a été réalisé selon le protocole décrit par Mekonnen *et al*, (2013) [167], avec des modifications mineurs.

Les rats sont anesthésiés par une injection intramusculaire de kétamine-xylazine (85 mg/kg et de 5mg/kg). Ensuite, les régions dorsales des animaux ont été tondues à l'aide d'une tondeuse électrique tout en évitant les blessures. Dans des conditions d'asepsie, des incisions linéaires de 3 cm de longueur et 0,5 cm de profondeur ont été créés parallèles à l'axe vertébrale, à l'aide d'un scalpel chirurgical et fermées par deux points de sutures. Puis, ces animaux ont été placés dans des cages individuelles (Figure 2.5).



Figure 2.4 : Test de cicatrisation sur incisions linéaires (Originale, 2021).

Une quantité de 0,5 g de chaque formulation a été appliquée quotidiennement sur les plaies provoquées chez les rats pendant 12 jours.

- Evaluation macroscopique de la gravité des plaies

L'évaluation a été effectuée selon le protocole de Bates-Jensen (BWAT, Bates Jensen Wound Assessment Tool) [127]. Une observation macroscopique a été effectuée pour suivre l'évolution de la cicatrisation les jours suivants : le 1^{er}, le 6^{ème} et le 12^{ème} jour post-incision.

Les huit paramètres de BWAT utilisés pour suivre et évaluer les caractéristiques de la plaie sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 2.5 : Evaluation de plaies d'incision par l'outil de BWAT(Bates-Jenson) [127] :

| Paramètres de description | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|---|---|--|--|---|
| Bordures de la plaie | Indistinct, diffus, les contours ne sont pas clairement visibles. | Distinct, contour clairement visible, attaché, même avec la base de la plaie. | Bien défini, non attaché à la base de la plaie. | Bien défini, non attaché à la base, enroulée dessous, épaisse. | Bien défini, cicatrice fibrotique marqué, ou hyperkeratosique. |
| Sillon de la plaie | Absence | Sillon < 2 cm dans toute la plaie | Sillon de 2-4 cm touchant < 50% du siège de la plaie | Sillon de 2-4 cm touchant > 50% du siège de la plaie | Sillon > 4 cm ou perçage d'un tunnel dans tout le siège de la plaie |
| Type d'exsudat | Absence | Sanglant | Séro-sanguin, aqueux rouge pâle/rose | Sérotique, aqueux, claire. | Purulent, aqueux ou épais, beige/ jaune avec ou sans odeur. |
| Quantité d'exsudat | Absence, blessure sèche | Faible, la plaie humide mais pas d'exsudat observé | Faible | Modérée | Grande |
| Couleur de la peau qui entoure la plaie | Rose ou normale | Rouge brillant et/ou blanche au touché | Blanche ou grise pale ou hypo pigmenté | Rouge foncé ou pourpre | Noire ou hyper pigmenté |
| Œdème périphérique de tissu | Absence de gonflement ou œdème | Pas d'œdème qui se prolonge à < 4 cm autour de la blessure | Pas d'œdème qui se prolonge à > 4 cm autour de la blessure | Œdème se prolonge à < 4 cm autour de la blessure | Œdème |

Chaque paramètre a été marqué sur une échelle de cinq points. Echelle 5 représente les résultats les plus graves et 1 représente les moins graves.

b. Test de cicatrisation des excisions circulaires

Ce test a été réalisé sur des rats Wistar selon le protocole décrit par Mekonnen *et al.*,(2013) [167], avec des modifications mineurs. Les rats sont anesthésiés par injection intramusculaire (kétamine 85 mg/kg et Xylazine 05 mg/kg).

Après la désinfection par l'alcool chirurgical à 70° et de la Povidone iodée du flanc rasé de chaque rat, on dessine un cercle de 2 cm de diamètre à l'aide d'un marqueur. Ensuite, une excision dermique profonde a été faite à l'aide d'un scalpel stérile et un ciseau pointu en suivant la marque du cercle (Figure 2.5). Après, la réalisation des plaies, celles-ci étaient traitées selon le groupe auquel chaque rat appartenait.

- Evaluation macroscopique de la cicatrisation des plaies d'excisions

L'évaluation macroscopique de la cicatrisation des plaies d'excisions est basée sur la contraction des plaies pendant 12 jours :

- Contraction des plaies

Les dimensions des plaies d'excision ont été mesurées chaque six jour (le 1^{er}, le 6^{ème} et le 12^{ème} jour), en indiquant la surface de chaque plaie sur des feuilles d'acétate transparent. La surface de la plaie est calculée en (mm²) par logiciel AutoCad, 2014.

Le pourcentage de contraction de la plaie est calculé selon l'équation suivante :

$$(\%) = (S_{J1} - S_{Jn}) \times 100 / S_{J1}$$

S_{J1}: Surface de la plaie au jour 1.

S_{Jn}: Surface de la plaie au 6^{ème} jour et 12^{ème} jour.



Figure 2.5 : Test de cicatrisation sur excisions circulaires (Originale, 2021).

c. Test de cicatrisation des brûlures thermiques

Ce test a été réalisé selon le protocole décrit par Pirbalouti et *al*, (2011) [168]. Les rats ont été anesthésiés par injection intramusculaire de kétamine (85 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg).

L'induction des plaies sur le dos des rats a été faite à l'aide d'une tige métallique à base circulaire de 1cm de diamètre chauffé au bain marie durant 10 minutes à une température de 100 °C, puis appliquée 20 secondes sur la peau des rats sans exercer de force. Les groupes ont reçu un traitement topique une fois par jour jusqu'à la cicatrisation complète de la plaie.

▪ Evaluation macroscopique des plaies de brûlures

L'évaluation de la cicatrisation des plaies de brûlures thermiques est basée sur deux paramètres : la contraction des plaies et la période d'épithélialisation.

• Contraction des plaies

Les dimensions des plaies de brûlures ont été mesurées chaque jour par des feuilles d'acétate transparentes afin de calculer la contraction de la surface de

chaque plaie jusqu'à sa cicatrisation complète. La surface de la plaie est calculée en (mm²) par logiciel AutoCad, 2014.

- Période de re-épithélialisation

La période d'épithélialisation de la plaie a été évaluée selon le nombre de jours requis pour que la croûte se détache et ne laisse aucune trace [167].

d. Etude histopathologique

L'étude histologique a été effectuée pour déterminer l'effet cicatrisant des produits testés à base des huiles essentielles de la plante étudiée. Après sacrifice des animaux, des échantillons des tissus (des zones des plaies et des zones de peau saine) ont été prélevés immédiatement et fixés dans du formol à 10% qui a pour but de préserver la morphologie cellulaire et tissulaire des échantillons. Les prélèvements sont ensuite acheminés vers le laboratoire d'histopathologie.

La réalisation des coupes histologiques a été effectuée au niveau du laboratoire d'histopathologie de l'Institut des Sciences Vétérinaires de Tiaret. Après la fixation dans le formol, les tissus prélevés sont découpés en des petits fragments de 0,5 cm d'épaisseur, puis sont mis dans des cassettes histologiques identifiées.

Dans le but d'éliminer l'eau présente dans les tissus, les cassettes ont été transférées dans un automate de tissus (Leica TP1020) qui déshydrate les tissus grâce à des immersions successives dans différents bains d'éthanol de concentrations croissantes (70%, 80%, 95% et 100%). Ensuite, elles sont éclaircies deux fois dans un bain de xylène miscible à la paraffine. Enfin, elles sont incluses dans deux à trois bains de paraffine fondue et c'est le dernier passage des cassettes dans l'automate.

À l'aide d'un appareil appelé station d'enrobage (LEICA Arcadia C 2615 et Arcadia H 2224), les tissus ont été inclus dans des moules métalliques remplis de paraffine chauffée à 56 °C, puis ils ont été placés sur une surface refroidissante permettant la solidification finale du bloc de paraffine froide.

Des coupes fines sous forme d'un ruban de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées avec un microtome (LEICA2125). Ces rubans ont été placés à la surface

de l'eau d'un bain marie à une température de 50 °C, puis récupérés sur des lames. Les lames réalisées sont séchées dans une étuve (Memmert U10) à une température de 37 °C durant 24h afin d'assurer une bonne adhésion des tissus sur la lame avant la coloration.

Le déparaffinage des lames a été effectué par deux bains de xylène de 15minutes chacun et une réhydratation par des bains d'alcool à des degrés décroissants et enfin un rinçage par l'eau distillée. Une coloration par l'hématoxyline-Eosine puis, un montage des lames qui consiste à fixer une lamelle sur une lame à l'aide de « Eukit ».

Les coupes obtenues ont été observées à l'aide d'un microscope optique (ZeissAxioskop20, Zeiss, GmbH, Allemagne) et photographiées au moyen d'un appareil photo numérique intégré (GR : 40x, 100x).

- Evaluation microscopique

L'évaluation microscopique du processus cicatriciel des différents types de plaies provoqués chez les rats (Incisions, excisions et brûlures thermique) est réalisée selon un système d'évaluation histopathologique (Tableau 2.6). Ce système de notation est développé par Mari van et al, (2021) [169] et basé sur les paramètres caractéristique de chaque phase de cicatrisation.

Tableau 2.6 : Systèmes de notation histologique proposé par Mari van *et al.*, (2021) [169] : Description des paramètres d'évaluations

| Paramètres | Description | Critères | Score | Contribution |
|--|----------------|--|-------|--------------|
| Re-epithelization % = [distance de la plaie recouverte par l'épithélium (a)+(b)]/ [distance entre les bords de la plaie d'origine (c)] *100 | Complète | 95-100% | 2 | 16,66% |
| | Partiel | >0 % à <95% | 1 | |
| | Absence | 0% | 0 | |
| Indice d'épaisseur de l'épiderme IEE= Epaisseur moyenne de l'épiderme (zone de la plaie)/ Epaisseur moyenne de l'épiderme dans la peau saine). | Normal | 95-100% | 2 | 16,66% |
| | Hypertrophique | >105% | 1 | |
| | Hypotrophique | <95% | 0 | |
| Recommandation: Si la ré-épithélialisation est complète | | | | |
| Kératinisation (Inspection visuelle) | Oui | Couches légèrement attachées ou une couche parakératosique cornée épaisse | 2 | 16,66% |
| | Non | Absence | 0 | |
| Recommandation: Si la ré-épithélialisation est complète | | | | |
| Tissu de Granulation (inspection visuelle + mesure absolue en mm) | Derme intact | Couche cutanée intacte, absence d'infiltration granulaire | 2 | 16,66% |
| | Épais | >100 µm | 1 | |
| | Mince | <100 µm | 0 | |
| Remodelage (Inspection visuelle) | Complète | La présence des paramètres suivants dans la zone de plaie 1. Tissu adipeux, 2.Appendices cutanées, 3. Muscle | 2 | 16,66% |
| | Partiel | Présence un de ces paramètres dans la zone de plaie : 1 -Collagène 2-Tissu adipeux | 1 | |
| | Absence | Aucun signe de remodelage | 0 | |
| Indice d'élévation de la cicatrice IEC= [Epaisseur moyenne du derme dans la zone de plaie (P2)/Epaisseur moyenne du derme dans la peau saine (P1)] *100. | Normal | 95–105% | 2 | 16,66% |
| | Hypertrophie | > 105% | 1 | |
| | Hypotrophie | <95% | 0 | |

P1 : Peau saine; P2 : Peau traumatisée.

2.13. Analyses statistiques

Les analyses ont été effectuées avec le logiciel (Graph pad prism, version 8). Les résultats obtenus lors des différents tests sont présentés sous forme de (moyenne \pm l'écart-type). L'analyse statistique a été effectuée par One-way ANOVA, suivi par le test Post hoc de Tukey pour les comparaisons multiples des différents groupes. Une valeur $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

CHAPITRE 3

RESSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Etude microscopique

Une étude microscopique de la structure histologique des baies du Genévrier oxycède a été effectuée afin de localiser les structures responsables de la sécrétion des huiles essentielles. Les résultats microscopiques des coupes transversales réalisées ont été représentés dans la figure 3.1.

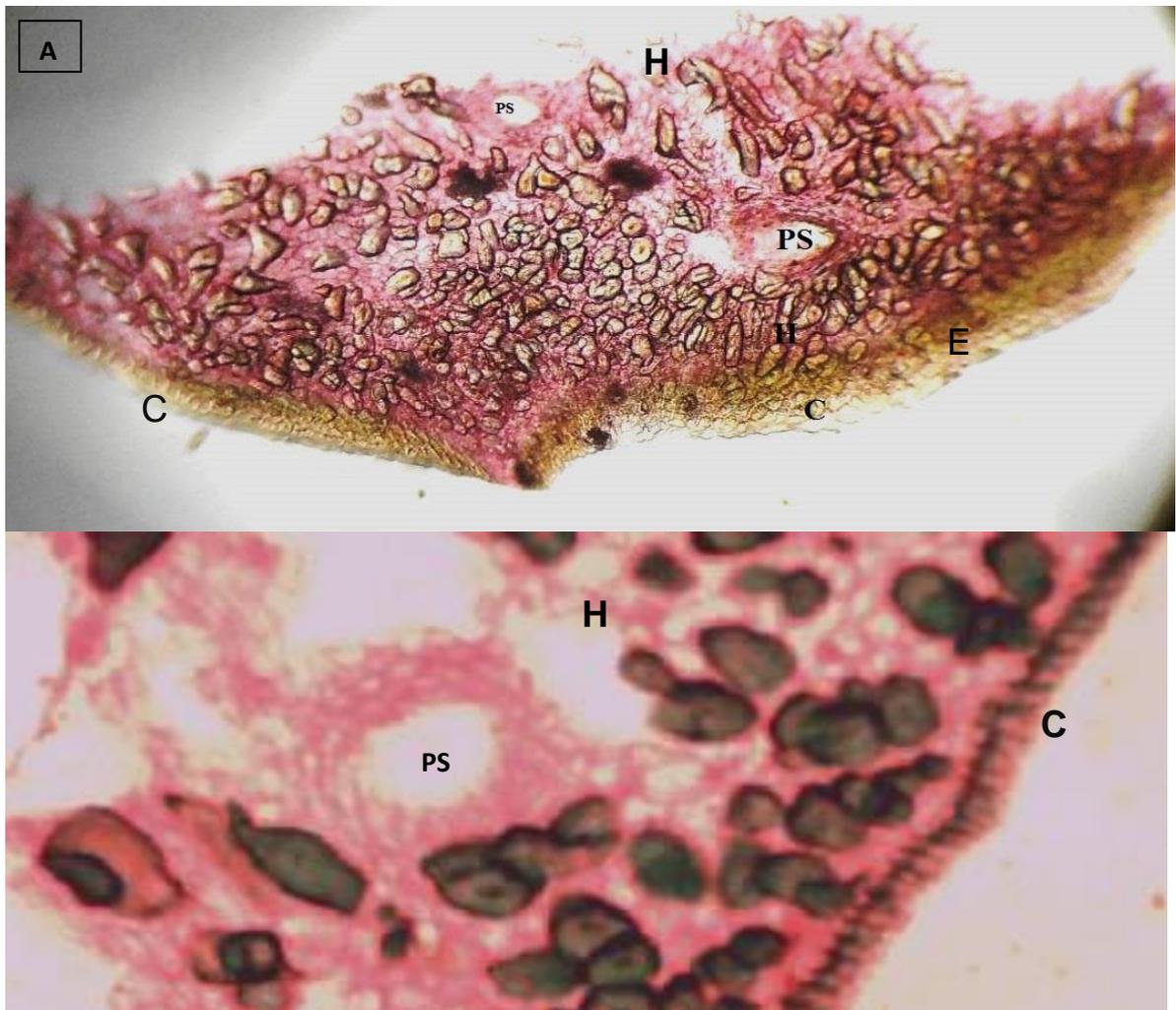


Figure 3.1: Coupes transversales au niveau d'une baie de *J. oxycedrus* L.
 A: Section générale (G: 40x); B: Poche sécrétrice (G: 100x); C : Cuticule ;
 Ps : Poche sécrétrice; E : épiderme ; H : hypoderme.

Cette figure a permis de montrer les structures suivantes (en partant de l'extérieur vers l'intérieur) :

La face extérieure de l'épiderme des fruits de *J. oxycedrus* est couverte d'une épaisse couche de cuticule interrompue par des stomates. Les poches sécrétrices sont arrondies, délimités par des cellules sécrétrices.

Il n'existe que peu d'études sur la morphologie et l'anatomie des feuilles et les tiges du genre *Juniperus*. Parmi ces études ; Guvenc et al., (2011) [170], ont étudiés les caractéristiques anatomiques des feuilles de cinq espèces du genre *Juniperus* en Turquie: *Juniperus drupacea* Lab. ; *J. communis* L. var. *communis*; *J. communis* var. *saxatilis*; *J. oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus*; et *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa*. Aussi, Vasic et al., (2012) [171], sur la morphologie et l'anatomie des feuilles de *J. oxycedrus* et de *J. communis* en Serbie et l'effet de l'altitude sur la leurs morphologie (épaisseur, largeur et longueur des feuilles); Mine et al., (2017) [172], sur les caractéristiques histologiques des feuilles de *J. oxycedrus*, *Aloe vera* et *Smilax excelsa* utilisés dans les traitement de psoriasis en Turquie. Une autre étude récente menée par Ibrahim Z. et Saleem E. Shahbaz (2023) [33], sur les caractéristiques anatomique des feuilles de cinq espèces de Cupressacées poussant en Irak (*Cupressus sempervirens*, var. *horizontalis*, *C. sempervirens* var. *pyramidalis*, *Cupressus arizonica*, *Platycladus orientalis* et *J. oxycedrus*).

Les résultats des ces travaux ont démontré que les caractéristiques anatomiques de toutes les espèces sont similaires, et que la différence entre eux réside dans la disposition du parenchyme palissade, la taille et l'emplacement des canaux sécréteurs [33], [39], [170].

Cependant, des études sur la morphologie et l'anatomie des fruits de genre *Juniperus* sont rares. Une étude antérieur menée par Katerina P. Svoboda (2000) [173], sur les structures sécrétrices des plantes aromatiques et médicinales a montré des coupes anatomiques sur les feuilles et les baies de genévrier commun (*Juniperus communis*). Les résultats ont montrés que les feuilles possèdent une structure sécrétrice sous forme des canaux, alors que les baies ont une structure sécrétrice sous forme des poches. Ces résultats sont similaires aux nos propre

résultats, où les baies de Genévrier oxycède possèdent des structures sécrétrices sous forme des poches de nature schizogène.

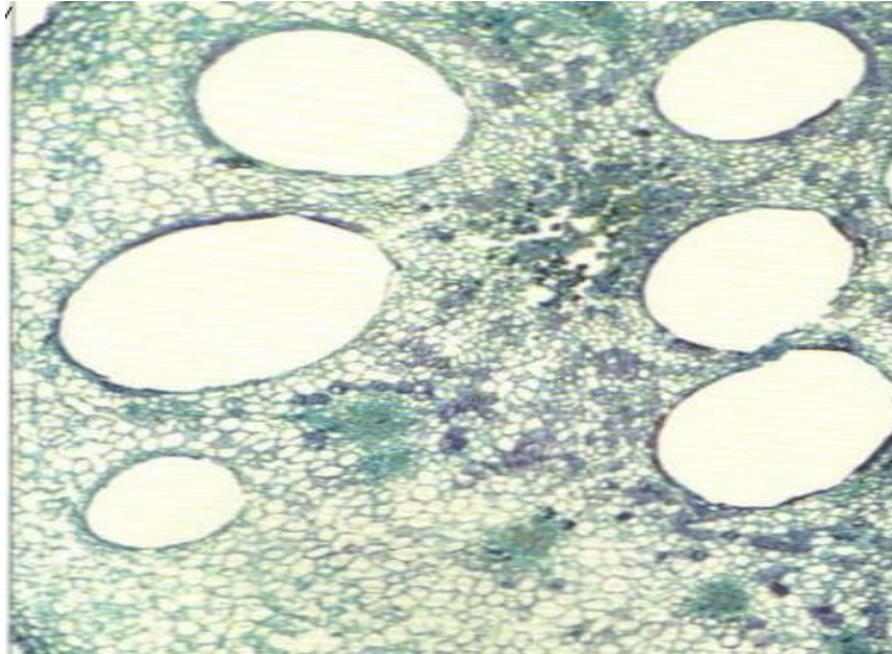


Figure 3.2 : Coupe transversale au niveau d'une baie immature de *Juniperus communis*, montrant la présence des poches sécrétrices (G : 44x)

3.2. Etude analytique

3.2.1. Teneur en eau

Les résultats de la teneur en eau des baies de la plante étudiée sont reportés dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Résultats de la teneur en eau dans les baies de *J. oxycedrus* L.

| Organe | Teneur en eau (%) |
|------------------------|--------------------------|
| Baies immatures | 50,34 ± 0,22 |
| Baies mûres | 10,86 ± 0,10 |

Chaque valeur représente la moyenne ± l'écart-type (n = 3).

Une teneur en eau importante a été enregistrée dans les baies immatures 50,34 ± 0,22%. Ce qui signifie que la moitié du poids des baies immatures est

constitué d'eau. Ce résultat est plus élevé que celui des baies mûres ($10,86 \pm 0,10$ %). La teneur en eau diminue au fur et à mesure que les fruits deviennent matures.

3.2.2. Rendements en huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles des baies mûres et immatures du Genévrier oxycède a été réalisée par hydrodistillation. Les résultats des rendements moyens sont représentés dans le Tableau 3.2 :

Tableau 3.2 : Rendements en huiles essentielles des baies mûres et immatures de *Juniperus oxycedrus* L.

| Huile essentielle | Baies mûres | Baies immatures |
|-------------------|------------------|--------------------|
| Rendement | $01,00 \pm 0,07$ | $01,20 \pm 0,01^*$ |

Chaque valeur représente la moyenne \pm l'écart-type ($n = 3$) ; * $p < 0,05$.

D'après ces résultats, les baies mûres présentent un rendement en huile essentielle d'environ $01,00 \pm 0,07\%$, alors que les baies immatures ont un rendement relativement supérieur de $01,20 \pm 0,01\%$ ($p < 0,05$).

Ces résultats sont semblables à ceux d'une étude réalisée par Guerroudj et al., (2021) [18], sur les feuilles, les branches et les baies de Genévrier oxycède provenant de trois stations forestières de la Wilaya de Tiaret : Guertouffa, Manège et Mekhatria. Le rendement en huiles essentielles était de 0,26% à 1,05%. Cette étude a montré que les baies récoltées à la région de Guertouffa (même région que celle de notre étude) ont fourni un rendement similaire de 1,05%. De même, les baies provenant de l'Espagne ont fourni un rendement en huile essentielle d'environ 1,14%. Ce résultat est proche de notre résultat obtenu suite à l'extraction de l'huile des baies immatures [100]. Nos résultats concordent également avec les résultats obtenus par Rajouani et al., (2015) [16], sur les baies de *J. oxycedrus* de Tighadwine et Ourika du Maroc avec un rendement de 1,02% et de 0,97%, respectivement. En outre, une autre étude effectuée par Angioni et al., (2003) [106] sur le Genévrier oxycède de Sardaigne en Italie, a confirmé que le rendement en huile essentielle obtenu par les baies immatures est plus élevé

que celui obtenu par les baies mûres ($1,07 \pm 0,06\%$ et $0,49 \pm 0,13\%$, respectivement). Néanmoins, ce rendement des baies mûres est plus faible que le notre. Nos résultats sont supérieurs à celui obtenu par Loizzo *et al.*, (2007) [104], sur les baies de *J. oxycedrus* du Liban (0,72%). Tandis que, les fruits de genévrier oxycèdre récoltés à la région de Markovodu Bulgarie, ont un rendement largement élevé que le rendement de notre échantillon (0,83 à 2,60%).

La variation des rendements en huiles essentielles peut être liée à certains facteurs comme l'origine géographique de la plante, la partie étudiée de la plante et la méthode d'extraction utilisée [97].

3.2.3. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles isolées ont subi une série de tests afin d'évaluer leurs propriétés organoleptiques. Les résultats de ces tests sont résumés dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3: Propriétés organoleptiques des huiles essentielles des baies mûres et immatures du Genévrier oxycèdre

| Critères | Huile essentielle | |
|----------|-------------------------|-----------------------------|
| | Baies mûres | Baies immatures |
| Aspect | Liquide, limpide | Liquide, légèrement épaisse |
| Couleur | Jaune foncé | Jaune pâle |
| Odeur | Odeur puissante, boisée | Odeur puissante, boisée |

D'après les résultats consignés dans le tableau, nous constatons que les deux huiles essentielles possèdent une forte odeur de genévrier (boisée, rappelant celle de la résine). Un aspect liquide limpide avec une couleur jaune foncé pour l'huile isolée des baies mûres. Alors que, la couleur est jaune pâle et l'aspect est liquide légèrement épais pour l'huile isolée des baies immatures. Les paramètres organoleptiques de nos huiles essentielles de Genévrier oxycèdre

sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature [20], [174], [175]. La composition chimique de l'huile essentielle (les composants majeurs où les composants mineurs) a un rôle important dans les propriétés organoleptiques de l'huile [176].

3.2.4. Propriétés physico-chimiques

La détermination des propriétés physicochimiques d'une huile essentielle constitue un moyen de contrôle de la qualité de l'huile.

Les résultats des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles sont notés dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Propriétés physicochimiques des huiles essentielles de Genévrier oxycèdre

| Critères | Huile essentielle | | Normes AFNOR |
|------------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| | Baies mûres | Baies immatures | |
| pH | 3,70 | 3,57 | Inferieur à 5,8 |
| Densité relative à 20 C° | 0,91 | 0,90 | 0,840 - 0,940 |
| Indice d'acide | 1,00 | 0,98 | Inferieur à 2 |
| Indice d'ester | 9,00 | 7,00 | - |
| Indice de réfraction à 20°C | 1,473 | 1,462 | 1,450 -1,513 |

D'après ces résultats obtenus, nous constatons que les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles des baies de Genévrier oxycèdre sont en accord avec les normes AFNOR [143].

Nos huiles essentielles ont montrés un potentiel d'Hydrogène (pH) des huiles essentielles des baies mûres et immatures est de 3,57 et de 3,70, respectivement. Les huiles essentielles de bonne qualité ont un pH qui ne dépasse pas le 5,8 [143].

L'indice d'acide de nos échantillons est de 1 et de 0,98 pour l'huile essentielle des baies mûres et immatures, respectivement. Un indice d'acide inférieur à 2 est une preuve de la bonne conservation de l'huile essentielle (faible quantité d'acides libres) [65]. Un indice d'ester de 9 et de 7 pour HE des baies mûres et HE immature, respectivement. L'indice de réfraction de nos huiles est de 1,46 à 1,47. Ces résultats concordent avec l'étude de Bouyahyaoui ahmed (2017) [94], qui a montré que l'indice de réfraction de l'huile essentielle de Genévrier oxycèdre récoltée dans la Wilaya de Naàma est de 1,46 à 1,47, alors que Boufares khaled (2020) [58] a trouvé un indice de réfraction de 1,510. Ce qui est légèrement supérieur à nos résultats. Selon la norme AFNOR, les huiles essentielles de bonne qualité ont un indice de réfraction compris entre 1,450 et 1,513. L'indice de réfraction varie principalement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés [65].

Les paramètres physico-chimiques des huiles essentielles peuvent être influencés par les conditions édaphiques et climatiques [65].

3.3. Analyse des huiles essentielles par GC/MS

La composition chimique des huiles essentielles extraites des baies mûres et immatures de *J. oxycedrus* a été déterminée par la technique de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Les résultats de la composition chimique des huiles essentielles sont présentés dans le Tableau 3.5.

Quarante-neuf (49) composés ont été identifiés, trente (30) composés pour l'huile essentielle des baies mûres (représentant 99,99% de la composition totale de l'huile), et quarante-cinq (45) composés pour l'huile essentielle des baies immatures (représentant 99,98% de la composition globale de l'huile).

Les chromatogrammes sont représentés dans la Figure 3.3 et la Figure 3.4.

Tableau 3.5:Composition chimiques des huiles essentielles de *J. oxycedrus*.

| No. | Composé | Classe | RI ^{exp} | RI ^{lit} | Baies mûres | | Baies immatures | |
|-----|-----------------------|--------|-------------------|-------------------|-------------|--------------|-----------------|--------------|
| | | | | | Rt (min) | (%) | Rt (min) | (%) |
| 1 | Tricyclène | Mh | 923 | 921 | 8,53 | 0,64 | 8,58 | 0,20 |
| 2 | α-Pinène | Mh | 939 | 939 | 9,54 | 56,39 | 9,58 | 38,25 |
| 3 | Camphène | Mh | 949 | 948 | 10,14 | 0,56 | 10,18 | 0,36 |
| 4 | Sabinène | Mh | 972 | 972 | 11,50 | 0,42 | 11,54 | 0,20 |
| 5 | β-Pinène | Mh | 976 | 977 | 11,82 | 2,00 | 11,89 | 2,09 |
| 6 | β-Myrcène | Mh | 993 | 993 | 12,80 | 10,39 | 12,86 | 8,44 |
| 7 | α-3-Carène | Mh | 1010 | 1011 | 13,78 | 0,34 | - | - |
| 8 | p-Cymène | Mh | 1027 | 1026 | - | - | 15,08 | 0,24 |
| 9 | Limonène | Mh | 1031 | 1031 | 15,30 | 1,87 | 15,36 | 1,92 |
| 10 | β-Phellandrène | Mh | 1032 | 1034 | 15,41 | 0,42 | 15,45 | 0,37 |
| 11 | γ-Terpinène | Mh | 1058 | 1061 | 17,33 | 0,17 | - | - |
| 12 | Terpinolène | Mh | 1086 | 1089 | 19,24 | 0,85 | 19,26 | 0,29 |
| 13 | Cis-limonèneoxide | Mo | 1131 | 1132 | - | - | 22,59 | 0,21 |
| 14 | Trans-verbénol | Mo | 1145 | 1145 | - | - | 23,52 | 0,33 |
| 15 | Camphre | Mo | 1151 | 1148 | - | - | 24,04 | 0,26 |
| 16 | α-Terpinéol | Mo | 1185 | 1187 | 26,34 | 0,30 | 26,39 | 0,36 |
| 17 | γ-Terpinéol | Mo | 1200 | 1197 | - | - | 27,58 | 0,85 |
| 18 | Thymol méthyléther | Mo | 1235 | 1235 | - | - | 28,48 | 0,21 |
| 19 | Bornylacétate | Mo | 1286 | 1286 | 33,57 | 0,15 | 33,56 | 0,31 |
| 20 | Carvacrol | Mo | 1297 | 1299 | 34,34 | 0,26 | - | - |
| 21 | δ-Elemène | Sh | 1331 | 1332 | 36,90 | 0,17 | 36,65 | 0,12 |
| 22 | α-Cubebène | Sh | 1346 | 1349 | 37,46 | 1,06 | 37,47 | 1,30 |
| 23 | Nerylacétate | Mo | 1365 | 1366 | - | - | 38,86 | 0,23 |
| 24 | α-Copaène | Sh | 1372 | 1375 | 39,30 | 0,33 | 39,31 | 0,61 |
| 25 | β-Bourbonène | Sh | 1384 | 1384 | 40,26 | 0,33 | 40,16 | 0,27 |
| 26 | β -Cubebène | Sh | 1389 | 1390 | - | - | 40,31 | 0,18 |
| 27 | β- Longifolène | Sh | 1405 | 1407 | 41,44 | 0,39 | - | - |

(Suite de Tableau)

| No. | Composé | Classe | RI ^{exp} | RI ^{lit} | Baies mûres | | Baies immatures | |
|-----------------------------------|----------------------------|--------|-------------------|-------------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|
| | | | | | Rt (min)(%) | Rt (min) | Rt (min) | (%) |
| 28 | β-Caryophyllène | Sh | 1417 | 1418 | 42,15 | 1,55 | 42,20 | 3,01 |
| 29 | β-Copaène | Sh | 1428 | 1430 | 42,79 | 0,18 | 42,81 | 0,40 |
| 30 | α-Caryophyllène | Sh | 1454 | 1456 | 44,44 | 1,41 | 44,49 | 3,18 |
| 31 | Germacrène D | Sh | 1483 | 1481 | 46,34 | 14,21 | 46,42 | 21,25 |
| 32 | α-Amorphène | Sh | 1488 | 1488 | 46,79 | 0,25 | 46,66 | 0,21 |
| 33 | Valencène | Sh | 1494 | 1995 | 47,18 | 0,39 | 46,84 | 0,76 |
| 34 | α-Muuroolène | Sh | 1498 | 1500 | 47,39 | 0,16 | 47,23 | 1,05 |
| 35 | γ-Cadinène | Sh | 1513 | 1513 | 48,07 | 1,03 | 48,14 | 2,70 |
| 36 | δ-Cadinène | Sh | 1519 | 1520 | 48,41 | 2,09 | 48,50 | 4,57 |
| 37 | Trans-calamenène | Sh | 1522 | 1522 | - | - | 48,68 | 0,49 |
| 38 | α-Cadinène | Sh | 1535 | 1537 | - | - | 49,47 | 0,30 |
| 39 | α-Calacorène | Sh | 1541 | 1544 | - | - | 49,81 | 0,21 |
| 40 | Trans-Nerolidol | So | 1566 | 1564 | - | - | 51,24 | 0,19 |
| 41 | Caryophyllène oxide | So | 1581 | 1583 | - | - | 52,18 | 0,27 |
| 42 | Gleenol | So | 1587 | 1587 | - | - | 52,54 | 0,64 |
| 43 | Longibornéol | So | 1592 | 1593 | - | - | 52,83 | 0,30 |
| 44 | Humulèneépoxydell | So | 1609 | 1608 | - | - | 53,81 | 0,24 |
| 45 | Cadalène | Sh | 1674 | 1676 | - | - | 57,35 | 0,53 |
| 46 | Occidol | So | 1837 | 1837 | - | - | 65,98 | 0,23 |
| 47 | Manoyl oxide | Do | 1987 | 1987 | 73,48 | 0,48 | 73,50 | 1,02 |
| 48 | Abietatriène | Dh | 2050 | 2054 | - | - | 76,37 | 0,27 |
| 49 | Abietadiène | Dh | 2078 | 2086 | 77,74 | 0,31 | 7,75 | 0,56 |
| Monoterpèneshydrocarbonés(Mh) | | | | | 75,40 | | 52,36 | |
| Sesquiterpènes hydrocarbonés (Sh) | | | | | 23,55 | | 41,14 | |
| Diterpènes hydrocarbonés (Dh) | | | | | 0,31 | | 0,56 | |
| Fraction oxygénés | | | | | 0,93 | | 5,48 | |
| Total (%) | | | | | 99,99 | | 99,98 | |

RI^{exp}: Indice de rétention expérimentale. RI^{lit}: Indice de rétention relative à la littérature.

Monoterpènes oxygénés (Mo) ; Diterpènes oxygénés (Do) ; Sesquiterpènes oxygénés (So)

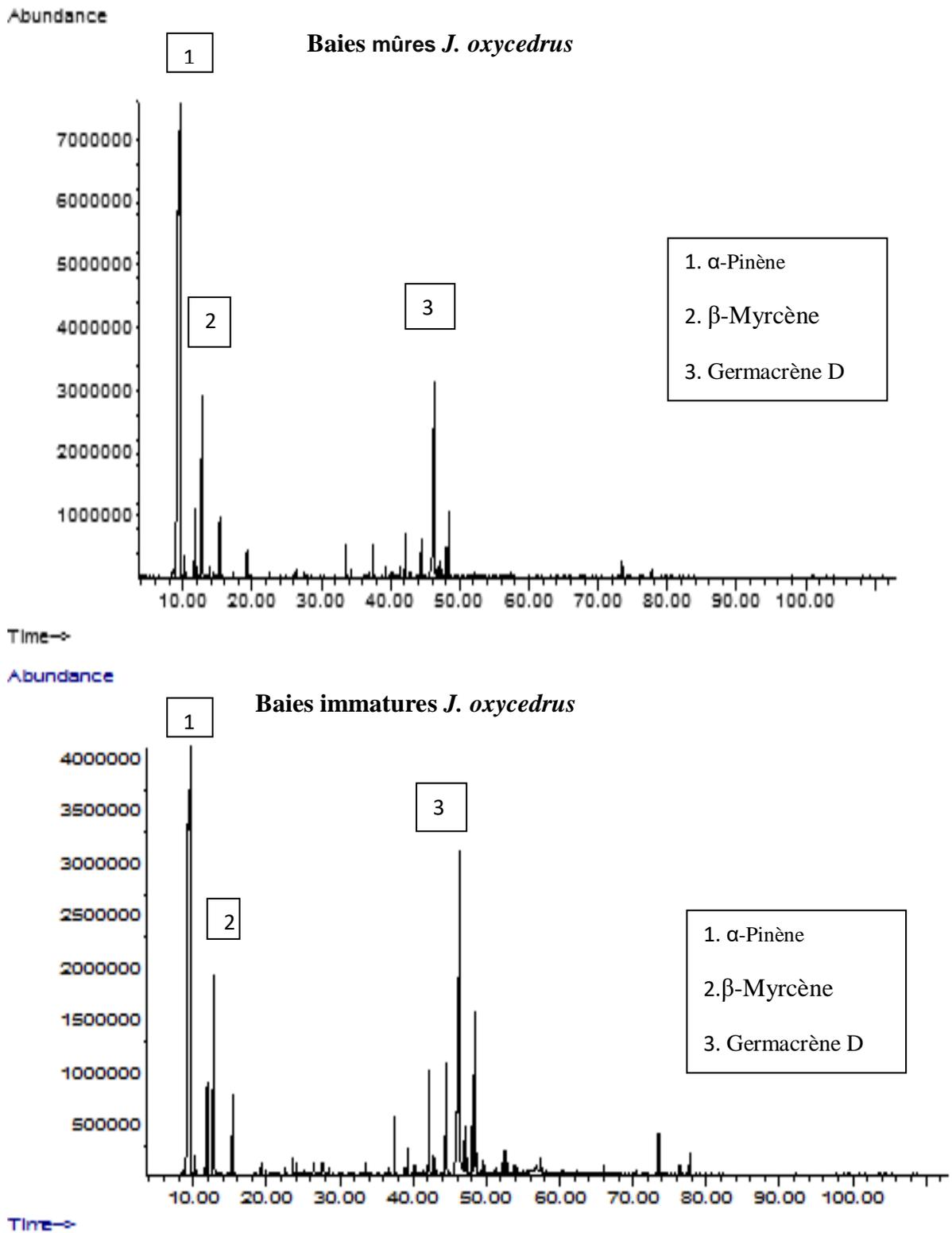


Figure 3.3 : Profils chromatographiques des huiles essentielles des baies mûres et immatures de *Juniperus oxycedrus* L.

L'huile essentielle des baies mûres est plus riche en monoterpènes hydrocarbonés avec un pourcentage de 75,40%, suivi par les sesquiterpènes hydrocarbonés (23,55%), dont l' α -Pinène (56,39%) est le composé majoritaire, suivi par le Germacrène D (14,21%), le β -Myrcène (10,39%) et le δ -Cadinène (2,09%).

L'huile essentielle des baies immatures présente une dominance des monoterpènes hydrocarbonés (52,36%), et un taux plus élevé en sesquiterpènes hydrocarbonés (41,14%) par rapport à celle obtenue des fruits mûrs. Les principaux composés identifiés sont : l' α -Pinène (52,36%), le Germacrène D (21,25%), le β -Myrcène (8,44%) et le δ -Cadinène (4,57%). On note également la présence d'autres composés avec des teneurs notables comme l' α -Caryophyllène (3,18%), le β -Caryophyllène (0,01%), le γ -Cadinène (2,70%) et le β -Pinène (2,09%).

A titre de comparaison, les deux huiles sont riches en hydrocarbures monoterpéniques et sesquiterpéniques avec un pourcentage plus de 90% de leur composition totale. Nous constatons que les mêmes composés majoritaires sont identifiés mais avec une légère variation quantitative (aucune importance pour le stade de maturité des baies). Néanmoins, il est intéressant de noter qu'il y a une différence dans leurs constituants mineurs (les nombres des composés identifiés et leur composition chimiques). En effet, une fraction de sesquiterpène oxygénée a été détectée à faible teneur (1,87%) dans l'huile essentielle des baies immatures et qu'elle était quasiment absente dans l'huile des baies mûres. Parmi les composés de cette fraction : le Gleenol (0,64%), le Cadalène (0,53%), le Longibornéol (0,30%) et du Caryophyllène oxide (0,27%).

Nos résultats sont globalement similaires à ceux obtenus par Rajouani *et al.*, (2015) [16], sur les huiles essentielles des baies de *J. oxycedrus* recueillies dans deux différentes régions marocaines (Tighadwine et Ourika), dont la fraction des monoterpènes hydrocarbonés est la plus dominante et que les deux constituants majoritaires sont l' α -pinène (69,43 % et 48,12 %) et le germacrène D (16,62 % et 32 %). Aussi, Najar *et al.*, (2020) [15], ont confirmé que l'huile essentielle des fruits immatures provenant de Turquie est constitué par

deux fractions qui sont les monoterpènes et les sesquiterpènes hydrocarbonés (56% et 38,50%, respectivement) et que l' α -pinène (40%), le germacrène-D (30,80%) et le myrcène (10,90%) sont les principaux constituants.

D'autres études antérieures ont confirmé la présence des mêmes composés identifiés, mais avec des constituants majoritaires plus ou moins variables : Molina *et al.*, (2019) [177], ont indiqué que les huiles essentielles des baies de *J. oxycedrus* provenant d'Espagne sont dominées par les monoterpènes hydrocarbonés (42,8-89,8%) suivi par les sesquiterpènes hydrocarbonés (4,0-26,4%) dont les principaux composés sont l' α -pinène (30,1-66,4 %), le myrcène (6,1-34,8 %) et le germacrène-D (0,2-16,9 %) comme troisième composé. Ivanka *et al.*, (2000) [97] ont également trouvé que les huiles essentielles des baies de la Bulgarie sont constitués principalement de l' α -pinène (18,0%–29,1%), de β -myrcène (12,1 %–31,5 %) et du limonène (4,49%-10,8%). Mais, ils ont signalé l'absence de germacrène D. Ce composé paraît aussi absent dans l'huile essentielle des baies de *J. oxycedrus* collectées à la région de Tebessa, où le composé majoritaire est toujours l' α -pinène (57,5%), suivie par l' α -amorphène (9,0%) et le β -myrcène (8,0%) [14].

D'après les travaux publiés par Robert Adams et Tashev en 2012 [93], ainsi que par Robert Adams en 2014 [178], trois principaux examens sont utilisés pour identifier le Génévrier oxycède : l'examen macroscopique qui est basé sur des critères morphologiques (feuilles et fruits), la composition chimique des huiles essentielles (composés majoritaires) et l'étude moléculaire (empreinte génétique de l'espèce par le séquençage d'ADN et RAPDs) [179]. En effet, ils ont trouvés que les huiles essentielles de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* sont fortement riche en α -pinène comme constituant principal (plus de 41%), ce qui constitue un indicateur important pour confirmer son identification [15].

La variation en composition chimique des huiles essentielles des fruits de genévrier dépend de leur stade de maturité [175], ou probablement de nombreux facteurs incluant les facteurs génétiques de la plante étudiée, les facteurs géographiques et bioclimatiques de la région d'étude [64], des méthodes d'extraction et de la partie de la plante étudiée [3].

3.4. Etude des hydrogels formulés

Les hydrogels formulés à base des huiles essentielles des baies de *J. oxycedrus* ont été évalués par l'étude des volets suivants : les propriétés organoleptiques, les propriétés physiques, l'analyse microscopique et les caractères rhéologiques.

3.4.1. Propriétés organoleptiques et physiques

L'évaluation organoleptique et physique des hydrogels formulés à base des huiles essentielles des baies de *J. oxycedrus* sont représentés dans le tableau 3.6

Les hydrogels préparés ont été évalué selon le pH, la couleur, l'aspect et l'odeur.

Tableau 3.6 : les Propriétés organoleptiques et physiques des hydrogels préparés

| Propriétés | Hydrogels formulés | | | |
|----------------|--|--|--|--|
| | F1 | F2 | F3 | F4 |
| Aspect | Homogène | Homogène | Homogène | Homogène |
| Couleur | Blanchâtre (crémeux) | Blanchâtre (translucide) | Blanchâtre (crémeux) | Blanchâtre (translucide) |
| Odeur | Agréable et légère odeur de l'huile de genévrier |
| pH | 6,6 | 6,5 | 6,7 | 6,6 |

F1(HGPG/HEM): Hydrogel à base d'huile essentielle des baies mûres contenant le Propylène glycol ; F2 (HGCR/HEM): Hydrogel à base d'huile essentielle des baies mûres contenant le Cremophor®Rh40 ; F3 (HGPG/HEI): Hydrogel à base d'huile essentielle des baies immatures contenant le Propylène glycol, HGCR/HEI (F4): Hydrogel à base d'huile essentielle des baies immatures contenant le Cremophor®Rh40.

Les hydrogels récupérés présentent deux aspects distincts :

Les deux hydrogels contenant le Cremophor®RH40 (HGCR/HEM et HGCR/HEI) présentent une couleur blanche, homogène et lisse au touchée (figure 3.4.a). Alors que les hydrogels contenant le Propylène glycol (HGPG/HEM et HGPG/HEI) présentent une couleur blanchâtre, crémeux (texture nuageuse), homogène et lisse au toucher (3.4.b). Les hydrogels obtenus ont une légère odeur spécifique aux huiles essentielles étudiés.

D'après ces résultats, nous notons que toutes les formulations étaient homogènes, sans aucune séparation de phase pendant la période d'étude. Ces propriétés sont conformes aux exigences idéales d'un gel topique [180].

Le pH des hydrogels varie entre 6,5 à 6,7, ce qui est considéré comme un pH idéal pour la peau et ne provoque aucune irritation cutanée. Pour les produits pharmaceutiques et cosmétiques à application topique le pH doit être compris entre 4,5 et 7 [181].

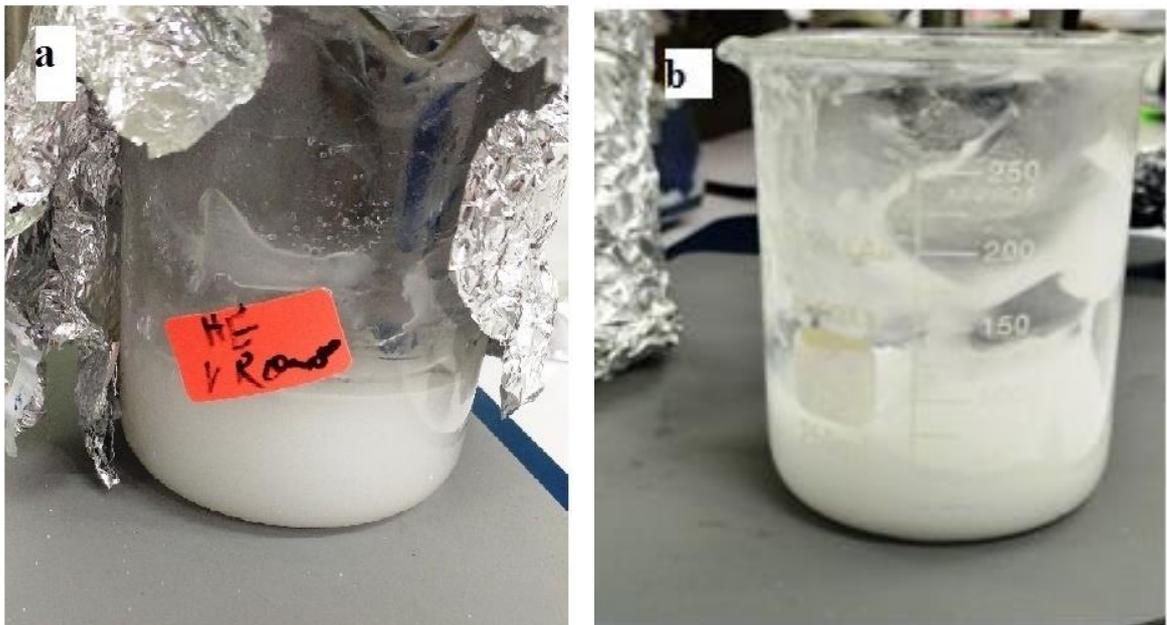


Figure 3.4 : Photos des hydrogels récupérés à base des huiles essentielles des baies de *Juniperus oxycedrus* L.: a. Hydrogel contenant le Cremophor®RH40 (HGCR/HEM et HGCR/HEI); b. Hydrogel contenant le propylène glycol (HGPG/HEM et HGPG/HEI).

3.4.2. Analyse microscopique

L'examen microscopique est un outil important pour étudier la morphologie des gouttelettes des émulsions dans le gel.

Afin d'examiner l'homogénéité et la stabilité des hydrogels préparés contenant le Cremophor®RH40 (HGCR/HEM et HGCR/HEI) et des hydrogels contenant le Propylène glycol (HGPG/HEM et HGPG/HEI), des analyses microscopiques optiques ont été effectuées.

La Figure 3.5 représente l'observation microscopique des hydrogels : l'étude morphologique des hydrogels contenant le surfactant Cremophor®RH40 (HGCR/HEM et HGCR/HEI) a montré des gouttelettes sphériques et homogènes de tailles moyennes de $1,83 \pm 0,07 \mu\text{m}$ et de $1,84 \pm 0,06 \mu\text{m}$, respectivement (Figure 3.5.a et 3.5.b).

L'observation microscopique des hydrogels contenant le propylène glycol (HGPG/HEM et HGPG/HEI) a montré des gouttelettes dispersés de diamètres moyens de $2,54 \pm 0,18 \mu\text{m}$ et de $2,56 \pm 0,06 \mu\text{m}$, respectivement (Figure 3.5.c et 3.5.d).

Les résultats ont montré que les formulations des hydrogels conservées pendant un mois à l'obscurité dans un réfrigérateur à 4 C° étaient aussi stables que les hydrogels nouvellement préparés (aucun changement n'a été observé).

D'après ces résultats, les formulations F1 et F3 contenant seulement les co-surfactant (propylène glycol, glycérol et éthanol) ont un effet positif dans la diminution des tailles des particules, mais ne sont pas assez suffisant pour la dispersion complète des gouttelettes de la phase huileuse dans la phase aqueuse.

Alors que, les formulations F2 et F4 contenant un agent tensioactif (surfactant) qui est le Cremophor® RH40 associé avec des co-surfactants (Ethanol et glycérol), amène des résultats satisfaisant par une dispersion plus important que les formulations précédentes

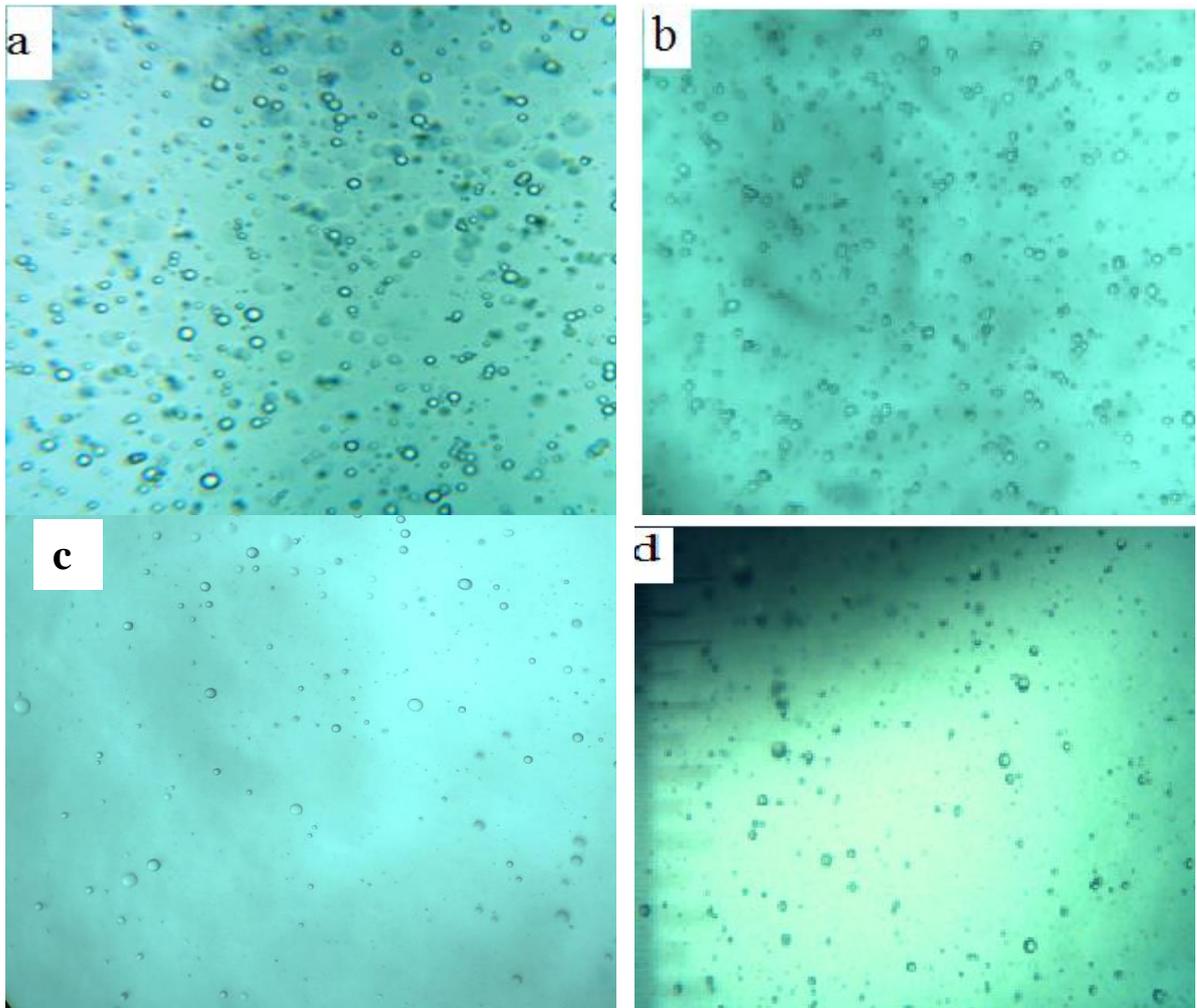


Figure 3.5 : Observation microscopiques des Hydrogels à base des huiles essentielles des baies de *J. oxycedrus* (G: 40x) :

a. (F2) hydrogel contenant le Cremophore® RH 40 (HGCR/HEM); **b.** Hydrogel contenant le Cremophor®Rh40 (HGCR/HEI); **c.** Hydrogels contenant le Propylène glycol (HGPG/HEM); **d.** Hydrogel contenant le Propylène glycol (HGPG/HEI).

Nos résultats concordent avec Tang *et al.*, (2019) [150], qui ont confirmés que l'utilisation des co-surfactants comme l'éthanol et le propylène glycol était bénéfiques aux préparations des émulsions et des microémulsions s'ils étaient mélangés avec un agent tensioactif (surfactant) non ionique tels que : le Cremophor® RH40. En plus, d'autres études ont indiqué que l'éthanol devrait être utilisé avec un agent tensioactif comme le Cremophor® [76], [182].

3.4.3. Caractérisation rhéologique des hydrogels préparés

3.4.3.1. Test d'écoulement

La figure 3.6 représente les courbes d'écoulement en termes de variation de viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement des hydrogels étudiés, $\eta_{app} = f(\dot{\gamma})$.

D'après ces courbes d'écoulement, il apparaît clairement la présence de deux régions : La première région au comportement newtonien où les valeurs de viscosité restent stables et constantes au faible cisaillement inférieur à $0,01 \text{ s}^{-1}$ (nul). Une deuxième région réofluidifiante a été observée avec l'augmentation de vitesse de cisaillement supérieur à $0,01 \text{ s}^{-1}$ et s'étalant jusqu'à une valeur de cisaillement de 1000 s^{-1} .

Le comportement des hydrogels étudiés a été identifié comme non-newtonien de type pseudo-plastique, caractérisé par une diminution brutale de la viscosité apparente au moyen de cisaillement. L'augmentation de vitesse de cisaillement perturbe les interactions intermoléculaires entre les chaînes polymères qui subissent une réduction de la viscosité apparente. Ce comportement d'amincissement est fortement bénéfique pour une application topique [183], car permettant de viser les couches les plus profondes de la peau sans l'excès de frottement, augmentation de temps de contact avec la peau et une dispersion de l'huile essentielle (principes actifs).

Nous constatons également que les hydrogels contenant le Cremophor® RH 40 (F2 et F4) ont des viscosités moins élevées que celles des hydrogels de contenant le propylène glycol (F1 et F3). Ce résultat peut se justifier par l'utilisation d'un tensioactif dans les formulations F2 et F4, qui conduit à une diminution de la tension interfaciale des gouttelettes (meilleure solubilisation) et qui va aboutir à une diminution de la viscosité de la formulation [34] .

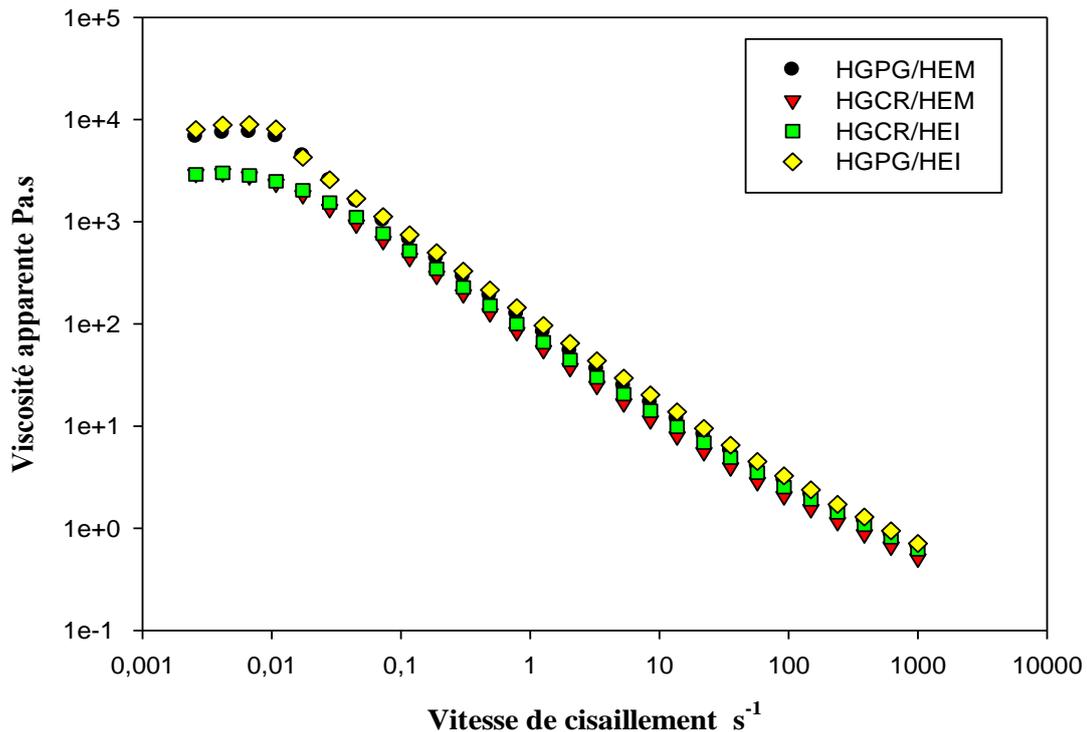


Figure 3.6 : Courbes d'écoulement des hydrogels préparés : variation de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement (s^{-1}).

3.4.3.2. Test de fréquence

La figure 3.7 présente la variation du module de stockage (G') et du module de perte (G'') en fonction de la fréquence.

Il a d'abord été remarqué, que pour les échantillons des hydrogels étudiés, la présence d'un domaine de linéarité des modules à une faible fréquence de 0,01 à 1 Hz. Une prédominance du comportement élastique où le $G' > G''$ avec une très faible dépendance même aux hautes fréquences, ce qui indique une forte et rigide structure des hydrogels formés [184]. De plus, on a constaté que les hydrogels contenant le Propylène glycol (HGPG/HEI et HGPG/HEM) sont beaucoup plus stables par rapport aux hydrogels contenant le Cremophor® RH 40 (HGCR/HEM et HGCR/HEI). Ceci est attribué à la structure de Propylène glycol qui est riche en réseau des liaisons d'hydrogènes, ainsi que la taille de leurs gouttelettes [185].

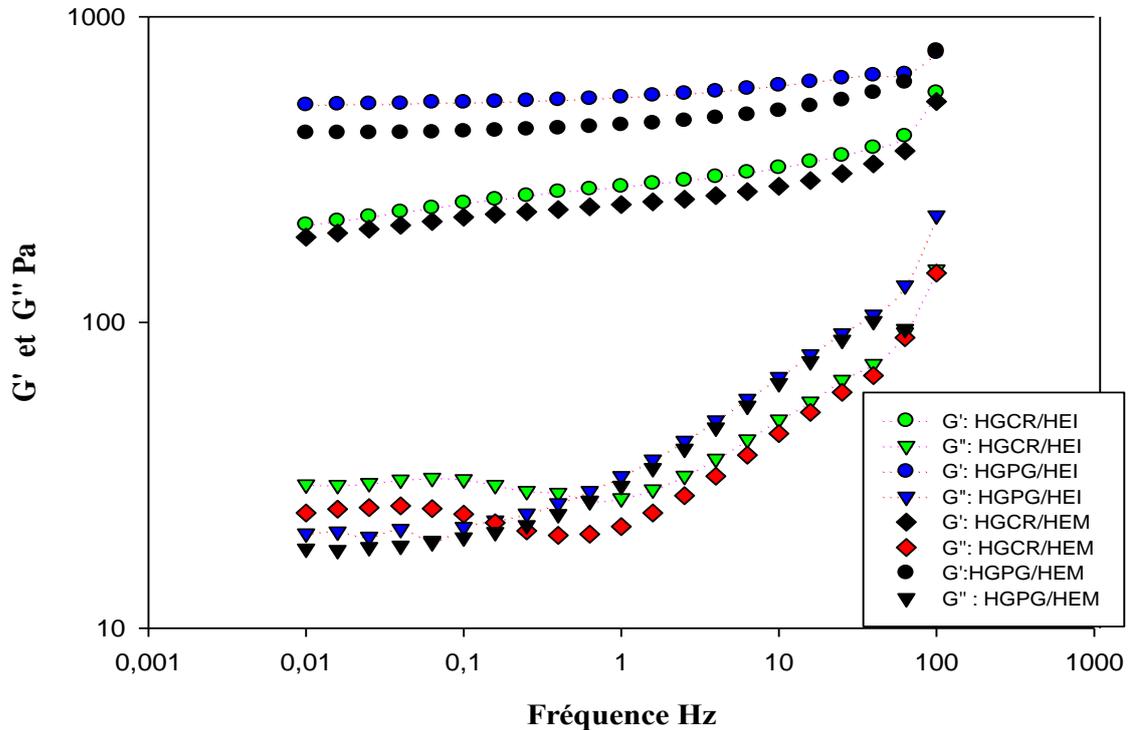


Figure 3.7 : Variation des modules de conservation (G') et de perte (G'') des hydrogels préparés en fonction de la fréquence.

3.4.3.3. Test de viscoélasticité

Les échantillons d'hydrogels préparés ont été soumis à un balayage de déformation à une fréquence constante de 1 Hz (Figure 3.8)

Afin de déterminer la force d'étalement nécessaire aux hydrogels, leur rétention et leur temps de contact avec la peau, des propriétés viscoélastiques des hydrogels ont été évalués par les deux modules (G' et G''). Une gamme viscoélastique linéaire (LVE) a été observée pour une déformation inférieure à 10 %, où les modules d'élasticité G' et les modules de perte (visqueux) G'' sont indépendants de la déformation appliquée. A cette gamme viscoélastique les hydrogels testés présentaient un comportement solide viscoélastique stable ($G' > G''$).

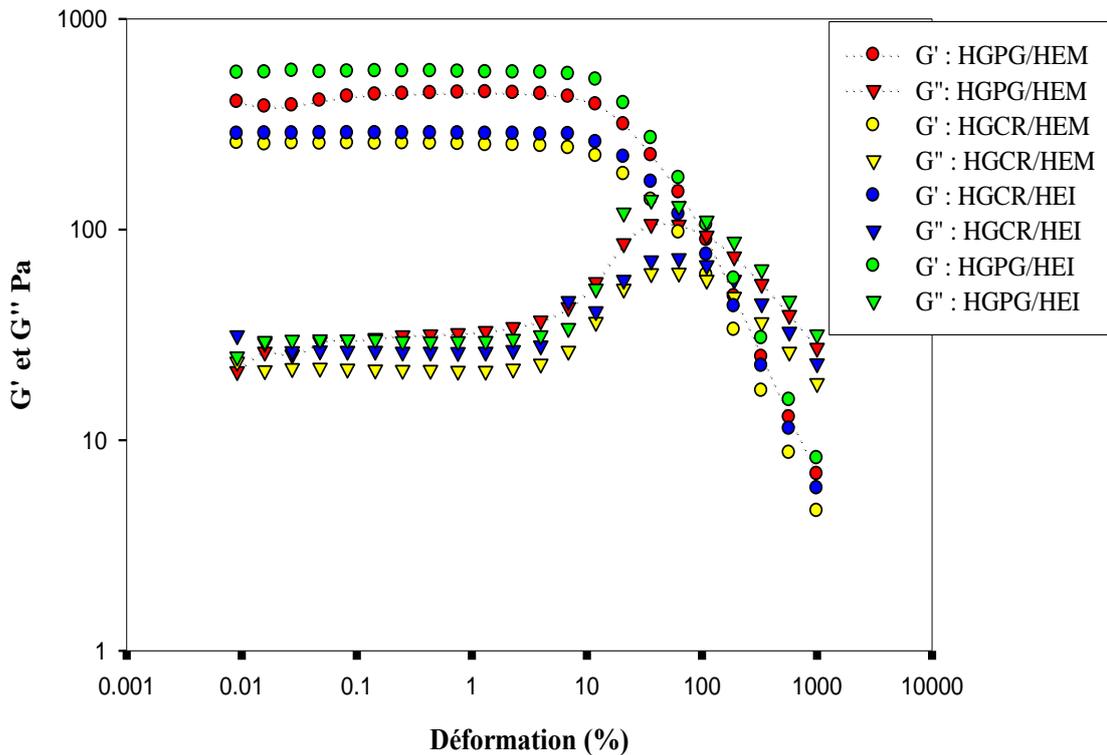


Figure 3.8 : Variation des modules de conservation (G') et de perte (G'') des hydrogels préparés en fonction de la déformation.

Ensuite, l'augmentation de la déformation de 10 à 100 %; entraîne une diminution des modules d'élasticité G' et l'augmentation des modules de perte G'' jusqu'à où les courbes se croisaient, ce point d'intersection correspond au « point de gel ». A partir de ce point et avec l'augmentation de la déformation, les modules visqueux deviennent supérieurs aux modules d'élasticité $G'' > G'$, indiquant une rupture des liaisons entre les chaînes, ce qui signifie que les hydrogels sont incapables à retrouver leur forme initiale [8] et que les produits des hydrogels sont libérés.

3.4.4. Contrôle microbiologique

Les résultats de caractérisation microbiologique des hydrogels préparés sont présentés dans le tableau 3.7

Tableau 3.7 : Résultats de l'analyse microbienne des hydrogels à base des huiles essentielles du *J. oxycedrus* L.

| Germes recherchés | Normes | F1 | | F2 | | F3 | | F4 | |
|-----------------------------|---------|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|
| | (UFC/g) | (UFC/g) | | (UFC/g) | | (UFC/g) | | (UFC/g) | |
| | | J0 | J30 | J0 | J30 | J0 | J30 | J0 | J30 |
| <i>DGAT</i> | < 200 | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS |
| <i>DLM</i> | < 20 | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS |
| <i>S. aureus</i> | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS |
| <i>E. coli</i> | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS |
| <i>P. aeruginosa</i> | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS | ABS |

F1: HGPG/HEM; F2: HGCR/HEM; F3: HGPG/HEI; F4: HGCR/HEI; UFC: unité formant Colonies; DGAT : Dénombrement des germes aérobies totaux ; DLM : Dénombrement des levures et moisissures ; ABS : Absence .

Les résultats obtenus montrent l'absence totale d'une croissance bactérienne ou fongique durant la période d'étude (un mois). Ces résultats sont dus à l'effet antimicrobien des huiles essentielles du Genévrier oxycèdre.

Nombreuses études ont confirmé l'utilisation des huiles essentielles dans les formulations cosmétiques et dermatologiques en tant qu'agents conservateurs naturels [28], [78], [185]. Selon Sharmeen *et al.*, (2021) [48], les huiles essentielles peuvent être utilisées seules ou en combinaison avec d'autres conservateurs dans les formulations dermato-cosmétiques, en raison de leurs propriétés antimicrobiennes.

3.5. Résultats des activités biologiques *in vitro*

3.5.1. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

La détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des baies du Genévrier oxycèdre a été effectuée par la technique de diffusion sur

gélose, en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (mm) ainsi que la concentration minimal inhibitrice ($\mu\text{l/ml}$) vis-à-vis six souches microbiennes de référence (ATCC) et trente-quatre souches isolats prélevées des plaies infectées chez les brûlés au centre de brûlure de Douera, Alger, Algérie.

3.5.1.1. Effet antimicrobien contre les souches de références

Les résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du Genévrier oxycèdre vis-à-vis les souches de références sont résumées dans le Tableau 3.8.

Parmi les souches Gram positif testés, *S. aureus* ATCC 25923 est la plus sensible vis-à-vis les huiles essentielles pures des baies mûres et immatures avec des zones d'inhibitions de $29,50 \pm 0,36$ mm et de $26,00 \pm 1,50$ mm, respectivement.

Tandis que, pour les souches Gram négatif, *E. coli* ATCC 25922 est la plus sensible vis-à-vis ces huiles essentielles pures (HEM et HEI) avec zones d'inhibitions de $19,57 \pm 0,43$ mm et $18,13 \pm 0,42$ mm, respectivement. D'après ces résultats, nous avons constaté que l'huile des baies mûres a montré des zones d'inhibition plus larges que l'huile des baies immatures.

L'huile essentielle des baies immatures a inhibé la levure *C. albicans* ATCC1023 avec une zone d'inhibition de $20,50 \pm 0,28$ mm contre seulement $18,50 \pm 0,68$ mm pour l'huile essentielle pure des baies mûres.

Les bactéries Gram positif se sont avérées plus sensibles que les bactéries Gram négatif. En effet, nous avons enregistré des CMI moins basses de $0,62$ $\mu\text{l/ml}$ contre $1,25$ $\mu\text{l/ml}$ pour les bactéries Gram négatif. Par ailleurs, *C. albicans* s'est avérée sensible aux deux huiles essentielles mais avec des CMI plus élevées de $2,5$ $\mu\text{l/ml}$.

Tableau 3.8: Détermination de la concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{l/ml}$) et les diamètres des zones d'inhibition (mm) des huiles essentielles de *J. oxycedrus* L. contre les souches de référence

| Souches | Concentration ($\mu\text{l/ml}$) et Zones d'inhibitions (mm) | | | | | | | | | | | |
|--|--|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------|---------------------|
| | Contrôle (+) | | Pure (10) | | D1 (5) | | D2 (2,5) | | D3 (1,25) | | D4 (0,62) | |
| | CTZ | L | HEM | HEI | HEM | HEI | HEM | HEI | HEM | HEI | HEM | HEI |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | 29,00 ^{***} $\pm 0,00$ | - | 29,50 ^{***} $\pm 0,36$ | 26,00 ^{***} $\pm 1,50$ | 24,30 ^{***} $\pm 0,61$ | 22,30 ^{***} $\pm 0,14$ | 18,50 ^{**} $\pm 0,04$ | 17,50 [*] $\pm 1,50$ | 13,50 [*] $\pm 0,86$ | 12,50 [*] $\pm 0,16$ | 11,07 $\pm 0,16$ | 10,07 $\pm 0,16$ |
| <i>S. aureus</i> ATCC 6538 | 28,00 ^{***} $\pm 0,05$ | - | 27,11 ^{***} $\pm 0,26$ | 25,49 ^{**} $\pm 0,51$ | 22,56 ^{**} $\pm 0,17$ | 18,50 ^{**} $\pm 0,12$ | 16,40 ^{**} $\pm 1,91$ | 15,04 ^{**} $\pm 1,19$ | 12,13 $\pm 0,56$ | 10,50 $\pm 0,64$ | 10,00 $\pm 0,17$ | 09,50 $\pm 0,87$ |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | 28,50 ^{***} $\pm 0,00$ | - | 25,13 ^{***} $\pm 0,11$ | 23,87 ^{**} $\pm 0,16$ | 21,23 ^{***} $\pm 1,32$ | 20,53 ^{***} $\pm 0,58$ | 17,20 ^{**} $\pm 0,51$ | 16,50 ^{**} $\pm 0,14$ | 13,06 [*] $\pm 0,12$ | 11,56 [*] $\pm 0,49$ | 10,00 $\pm 0,25$ | 09,00 $\pm 0,50$ |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 24,00 ^{***} $\pm 0,05$ | - | 19,57 ^{**} $\pm 0,43$ | 18,13 [*] $\pm 0,42$ | 17,25 [*] $\pm 0,76$ | 15,05 [*] $\pm 1,19$ | 12,50 [*] $\pm 0,05$ | 10,50 [*] $\pm 1,07$ | 10,75 \pm 01,07 | 09,75 $\pm 0,50$ | 07,00 $\pm 0,50$ | 07,00 $\pm 0,50$ |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | 24,50 ^{**} $\pm 0,00$ | - | 18,23 ^{**} $\pm 0,16$ | 17,50 ^{**} $\pm 0,50$ | 14,75 [*] $\pm 1,25$ | 14,75 $\pm 1,25$ | 12,13 [*] $\pm 0,66$ | 12,13 [*] $\pm 0,66$ | 09,25 $\pm 1,09$ | 08,50 $\pm 1,50$ | 07,00 $\pm 0,05$ | 07,00 $\pm 0,00$ |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | - | 24,50 ^{**} $\pm 0,00$ | 18,50 ^{**} $\pm 0,68$ | 20,50 [*] $\pm 0,28$ | 14,59 [*] $\pm 1,87$ | 15,00 $\pm 0,00$ | 12,83 $\pm 0,09$ | 13,00 $\pm 0,50$ | - | - | - | - |

Chaque valeur représente la moyenne \pm Ecart-type (n = 3). *: p \leq 0,05; **: p \leq 0,01; ***: p \leq 0,001; **HEM**: Huile essentielle des baies mûres; **HEI**: huile essentielle des baies immatures ; **D**: dilution; **Pure**: 10 $\mu\text{l/ml}$; **D1**: 5 $\mu\text{l/ml}$; **D2**: 2,50 $\mu\text{l/ml}$; **D3**: 1,25 $\mu\text{l/ml}$; **D4**: 0,62 $\mu\text{l/ml}$; **CTZ**: Ceftriaxone 1g; **L** : Lamidaz 250mg ; (-) : Pas d'inhibition.

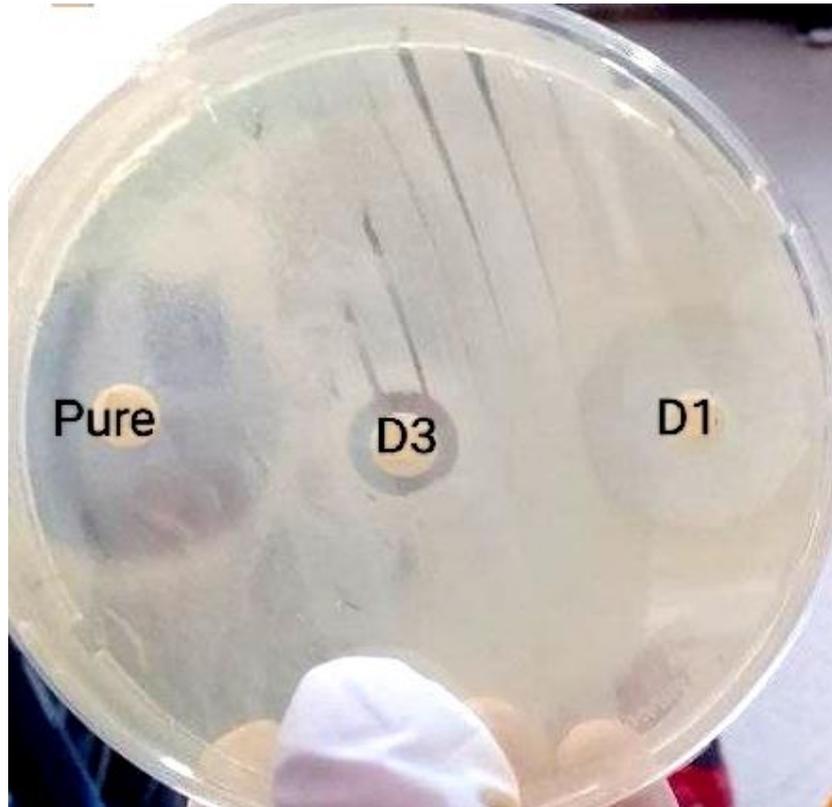


Figure 3.09 : Effet antibactérien de l'huile essentielle des baies mûres sur
S. aureus 25923.

Les résultats obtenus démontrent clairement que les huiles essentielles du Genévrier oxycèdre présentent une bonne activité antimicrobienne (Figure 3.9).

Les analyses statistiques ont montrés que les huiles essentielles pures et la Ceftazidime possèdent un pouvoir antibactérien hautement significatif contre les souches Gram positif ($p \leq 0,001$). Tandis que, cet effet est moins important contre les bactéries Gram négatif ($p \leq 0,01$). Egalement, l'huile essentielle pure des baies immatures a montré un pouvoir antifongique modéré contre la levure *C. albicans* ATCC 1023 par rapport l'antifongique commercialisé Lamidaz qui a dévoilé l'existence d'un effet très significatif ($p \leq 0,001$).

3.5.1.2. Effet antimicrobien contre des souches cliniques

a. Isolement et identification

Durant une période d'étude de six mois allant d'Octobre 2019 à Mai 2020, trente-neuf (39) prélèvements ont été isolés à partir des plaies infectées par un écouvillonnage cutané chez les brûlés, au niveau du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Douera à Alger. L'identification des souches a été déterminée par les tests morphologiques et biochimiques puis confirmé par la galerie biochimique (API) : APIStaph, API20NE et API20E. Après cultures, isolements et identifications, nous avons obtenus ces résultats :

Sur un total de trente-neuf (39) prélèvement, trente-quatre (34) souches se sont révélés positifs avec un taux de 87,18%, tandis que 12,83% sont négatifs (Figure.3.10), dont 53% (18/34) sont des bactéries Gram négatif et 47% (16/34) sont des bactéries Gram positif.

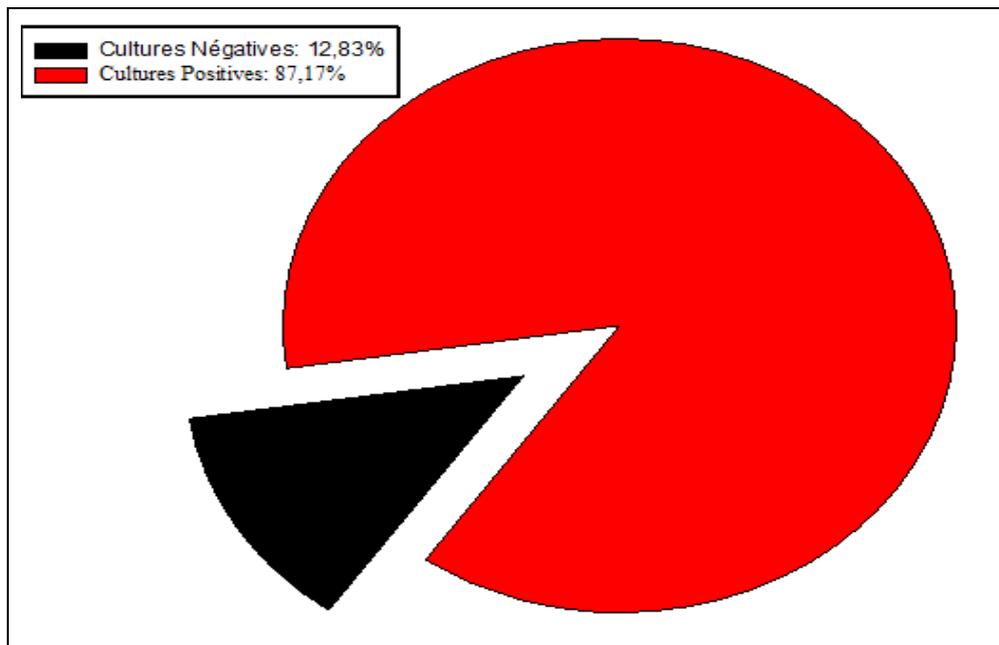


Figure 3.10 : Répartition des résultats des prélèvements cutanés réalisés

Ce résultat montre clairement que la majorité des prélèvements cutanés réalisés sont positifs (87,18%). Ce qui concorde avec le résultat Tchakal-Mesbahi A. *et al.*,(2021) [186], dans une étude effectuée au centre des grands brûlés de l'Hôpital Central de l'Armée Docteur. Mohamed Seghir Nekkache d'Alger, où le

pourcentage des écouvillonnages positifs était de 79,12%. Un taux d'écouvillonnages positifs plus élevé (96%) a été trouvé par Agnihotri *et al.*, (2004) [187], lors d'une étude réalisée au Centre Hospitalo-Universitaire des brûlures en Inde. Tandis que, c'est moins faible dans une étude menée par El Hamzaoui *et al.*, (2020) [188], au Service de Brûlure et Chirurgie Plastique à l'hôpital de Mohammed V de Meknes en Maroc, avec un taux de 68,12%.

Ces variations aux résultats des cultures positives chez les brûlés, pourraient être expliquées par plusieurs facteurs. Parmi ces facteurs, les critères de sélection des patients, l'état immunitaire des patients, la gravité de la brûlure [189], les protocoles de prévention des infections et d'hygiène hospitalière spécifique à chaque établissement, les méthodes des prélèvements utilisés par les personnels soignant et la période d'étude considérée [190].

b. Répartition des souches isolées

L'étude bactériologique a montré que parmi les (34) souches bactériennes isolées, *Staphylococcus aureus* était la principale bactérie isolée avec un pourcentage de 35,29%, suivie par *Pseudomonas aeruginosa* (17,64%), *Proteus mirabilis* (14,70%), les deux bactéries *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus epidermidis* avec un pourcentage d'isolement de 11,76%, et *Acinetobacter baumannii* avec un taux assez bas de 6,67% (Figure 3.11).

Staphylococcus aureus et *Pseudomonas aeruginosa* sont les deux germes les plus isolés des plaies infectés chez les brûlés. Ces résultats concordent avec l'étude menée par Bourji *et al.*, (2020) [191], au niveau du Centre de Soins Intensifs au Liban, qui montre que le *S. aureus* et le *P. aeruginosa* étaient les deux principaux germes isolés chez les patients brûlés. En outre, Gong *et al.*, (2013) [136], confirment nos résultats par une étude réalisé en Chine, sur les patients hospitalisés au niveau de l'unité des Soins Intensifs et le Service des grands brûlés, *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont les deux germes les plus incriminées dans les infections des plaies chez les brûlés. En revanche, Ces résultats contrastent avec le rapport d'Elmanam *et al.*, (2013) [192], où *P. aeruginosa* était la souche la plus isolée dans les plaies de brûlure, suivie par les entérobactéries. D'après l'étude de Karir *et al.*, [193] menée dans le service de réanimation des brûlés, en

Tunisie, le *S. aureus* était le deuxième germe incriminé dans les infections chez le brûlé après le *P. aeruginosa*. Cette étude confirme également nos résultats dévoilant que *A. baumannii* est la souche la moins isolée.

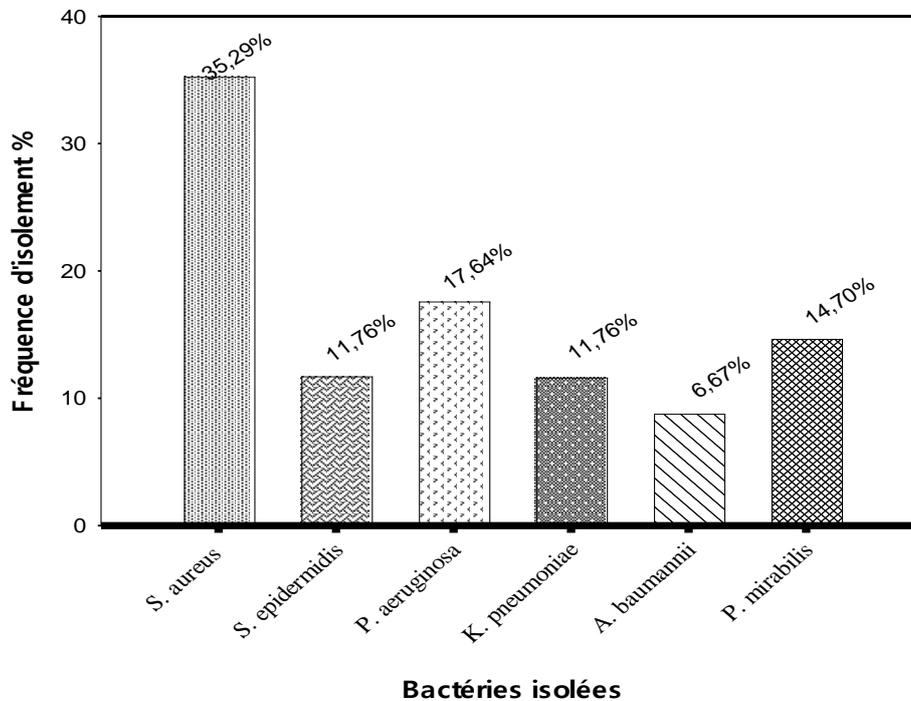


Figure 3.11 : Répartition des bactéries isolées des plaies infectées chez les brûlés

c. Profil de résistance aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité et de la résistance des bactéries isolées des plaies infectées chez les brûlés aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Les résultats de l'antibiogramme ont révélé des niveaux de résistances très élevés à la majorité des antibiotiques testés (Tableau 3.9). Un taux de résistance de 100% a été enregistré pour la totalité des souches vis-à-vis la Pénicilline et l'Ampicilline.

Pour les bactéries Gram-positif, les souches de *S. aureus* et de *S. epidermidis* ont présenté une résistance à la Clindamycine, l'Erythromycine, la Chloramphénicol, et à la Ciprofloxacine avec un taux de résistance allant de 60 à 80%. Cependant, elles se sont avérées sensibles à la Vancomycine, la Colistine, la Pristinamycine, la Teicoplanine, la Linézolide et l'Imipénème: à l'exception de 40% des souches de *S. aureus* qui se sont trouvées résistantes à l'Imipénème.

Tableau 3.9 : Profil de résistance des bactéries isolées des plaies infectées chez les brûlés aux différents antibiotiques

| Catégories des antibiotiques | Antibiotiques | Résistance de la bactérie isolée (%) | | | | | |
|--------------------------------------|------------------|--------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Carbapénèmes | Imipinème | 40,00 | 0,00 | 33,33 | 75,00 | 40,00 | 100,00 |
| Aminoglycosides | Amikacine | 40,00 | 50,00 | 66,66 | 87,50 | 60,00 | 66,66 |
| | Gentamicine | 50,00 | 25,00 | 50,00 | 62,50 | 100,00 | 100,00 |
| Fluoroquinolones | Levofloxacin | 20,00 | 75,00 | 50,00 | 62,00 | 60,00 | 66,66 |
| | Ciprofloxacine | 80,00 | 75,00 | 50,00 | 50,00 | 60,00 | 100,00 |
| Lincosamides | Clindamycine | 70,00 | 75,00 | 50,00 | 50,00 | 40,00 | - |
| Macrolides | Erythromycine | 70,00 | 50,00 | 66,66 | - | 60,00 | - |
| Glycopeptides | Teicoplanine | 0,00 | 0,00 | 50,00 | 12,50 | - | - |
| | Vancomycine | 0,00 | 0,00 | 50,00 | - | - | - |
| Tetracyclines | Tétracycline | 20,00 | 25,00 | 100,00 | 87,50 | - | 66,66 |
| Oxazolidinones | Linezolid | 0,00 | - | - | - | - | - |
| Polypeptides (Polymyxine) | Colistine | 0,00 | - | 33,33 | 37,50 | 40,00 | 33,33 |
| Autres | Prestinamycine | 0,00 | 0,00 | - | - | - | - |
| | Cefixime | 30,00 | 25,00 | 50,00 | 80,00 | 80,00 | - |
| | Triméthoprime+ | 30,00 | 75,00 | 100,00 | 62,50 | 60,00 | 66,66 |
| | Sulfaméthoxazole | | | | | | |
| | Acide fusidique | 20,00 | 50,00 | 83,33 | 87,50 | 60,00 | 33,33 |
| | Chloramphénicol | 60,00 | 75,00 | - | 100,00 | - | 100,00 |
| | Penicilline | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| | Ampicilline | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |

01: *S. aureus*; 02: *S. epidermidis*; 03: *P. mirabilis*; 04: *P. aeruginosa*; 05 : *K. pneumoniae*; 06: *A. baumannii*, (-) : Non testé.

Plusieurs études confirment nos résultats sur les taux élevés de résistance qui peuvent aller jusqu'à 80% vis-à-vis la Clindamycine, l'Erythromycine, la Chloramphénicol, et à la Ciprofloxacine [136], [191], [193].

Concernant la sensibilité des *S. aureus*, Gong *et al.*, (2014) [136], ont indiqué que les *S. aureus* isolés des patients brûlés étaient très sensibles aux Colistine, Vancomycine et aux Teicoplanine. Aussi, Bordji *et al.*, (2020) [191] ont trouvés que la colistine et le linézolide étaient les molécules les plus actives pour les SARM.

Parmi les bactéries Gram négatif, *Proteus mirabilis* et *Klebsiella pneumoniae* ont présenté des niveaux intermédiaires de résistante (50 à 60%) aux Fuoroquinolones, à l'Erytromycine et à la Clindamycine. Les souches de *Klebsiella pneumoniae* ont présenté un haut niveau de résistance aux Céfixime et Gentamicine (80% et 100%, respectivement), néanmoins, elles sont très sensibles à la Colistine. *Proteus mirabilis* a montré une résistante totale (100%) à la Triméthoprim-Sulfaméthoxazole et à la Tétracycline.

Pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, la résistante reste élevée (plus de 75%) à l'Imipenème, à l'Amikacine, à la Tetracycline, à la Cefixime, et à l'Acide fusidique, cependant ces souches ont exprimé une sensibilité importante à la Colistine et à la Teicoplanine (62,5% et 87,5%, respectivement). Par ailleurs, les souches des *Acinetobacter baumannii*, ont montré une résistance totale de 100% à la Ciprofloxacine, à la Gentamicine, à l'Imipenème, et à la Chloramphénicol. Les molécules les plus actives vis-à-vis ces souches sont l'acide fusidique et la Colistine.

D'après ces résultats, les *Acinetobacter baumannii* et les *Pseudomonas aeruginosa* ont montré des niveaux de résistance plus élevés aux différentes classes des antibiotiques testées. En outre, toutes les bactéries testées sont considérées comme multi-résistantes.

Des résultats similaires ont montré que les entérobactéries (*K. pneumoniae* et *P. mirabilis*) prélevés des plaies infectées chez les brûlés présentaient des niveaux élevés de résistance aux agents antimicrobiens, à l'exception de la colistine avec des taux de résistances moins faibles [138], [193], [194].

Ainsi, nos données ont confirmé plusieurs études dans les quelles le *Acinetobacter baumannii* a montré la plus grande résistance à la majorité des antibiotiques.

En effet, l'étude réalisé par Bakour *et al.*, (2014) [195] au niveau de l'Hôpital de Béni-Messous à Alger, a montré clairement la propagation d'isolats cliniques de *A. baumannii* résistants aux carbapénèmes et une isolat résistant à la colistine (MIC de 16mg/L). L' étude de Bandy *et al.*, (2020) [194], sur les infections chez les brulés en Arabie Saoudite, a également montré que les isolats de *A. baumannii* ont étaient hautement résistants aux antibiotiques testés. Un taux de résistante dépasse le 95% aux Carbapénèmes et 98% vis-à-vis la 3^{ème} génération de céphalosporines, tandis que le taux de résistance vis-à-vis la colistine est plus faible (4%) que nos résultats (33%).

Nos isolats de *P. aeruginosa* ont montré également une haute résistance aux Carbapénèmes, aux Aminoglycosides et aux Céphalosorines de 3^{ème} génération (plus de 75%). Ceci rejoint l'étude de Tchakal-Mesbahi *et al*, (2021) au niveau du département des brulures à l'hôpital militaire d'Alger où les taux de résistance des *P. aeruginosa* étaient de 80% à 100% pour tous les antibiotiques testés, sauf à la colistine avec une sensibilité totale de 100%. Pour la colistine nos résultats montrent une résistance de 37,5%. Ce qui est proche des résultats trouvés en Egypte avec un taux de résistance de 28,7% à 36,4% [196].

- Détection phénotypiques de résistance des *S. aureus* (SARM)

Les résultats obtenus de l'antibiogramme montrent que certaines souches de *S. aureus* ont présenté une résistance à la céfoxitine avec un diamètre inférieur à 22 mm, ce qui suggère une méticillino-résistance.

Dans notre étude, la prévalence des *S. aureus* résistant à la méthicilline est de 58,33%, alors que 41,67% sont des SASM (Figure 3.12). Ces résultats corrélent avec ceux de Krir *et al.*,(2019) [193], en Tunisie avec un pourcentage de 60%. Par contre, le pourcentage des SARM est inférieur à celui de Tchakal-mesbahi *et al.*,(2021) [186] estimé de 74%.

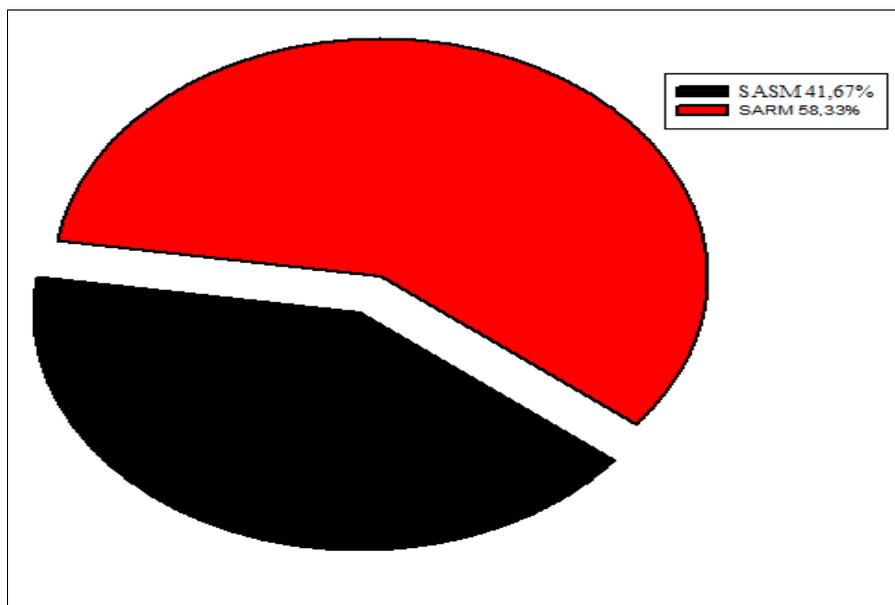


Figure 3.12 : Répartition des souches de *Staphylococcus aureus* selon la résistance et la sensibilité à la méthicilline

▪ Détection phénotypique des BLSE chez les BGN

Pour les souches des entérobactéries, le test de synergie a été positif pour 20% de *P. mirabilis* et 50% de *K. pneumoniae*. Plusieurs auteurs ont également confirmé l'émergence de *K. pneumoniae* de type BLSE chez les patients brûlés [138], [186], [197].

Alors que pour les bactéries Gram négatifs non fermentatif, nous avons enregistré un taux élevé des BLSE⁺ (60%) par *P. aeruginosa*. Tandis que, aucune souche BLSE n'a été détectée chez *A. baumannii* (BLSE⁻). Nos pourcentages sont inférieurs à ceux retrouvés par Tchakal-mesbahi et *al.*, (2021) [159], où la totalité des souches étaient BLSE positif sur les souches de *P. aeruginosa* isolés des patients brûlés à l'hôpital militaire d'Alger. Nos résultats relatifs à la souche *A. baumannii*, peuvent être expliqué par la production de la céphalosporinase [194].

d. Activité antibactérienne des huiles essentielles

Les résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des baies de *J. oxycédrus* L. vis-à-vis des souches cliniques isolées des plaies infectées chez les brûlés sont résumés dans le Tableau (3.10).

Tableau 3.10: Activité antibactérienne des huiles essentielles des baies mûres et immatures vis-à-vis les bactéries isolats des plaies infectés chez les brûlés.

| Isolats cliniques | Concentration (µl/ml) et diamètres d'inhibitions (mm) | | | | | | | | | |
|------------------------------|---|--|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------|-----|
| | | (%) | Pure | | D ₁ | | D ₂ | | D ₃ | |
| | | | HEM | HEI | HEM | HEI | HEM | HEI | HEM | HEI |
| <i>S. aureus</i> | (100%) | 14,83 ^{***} ±1,09 | 14,50 ^{***} ±0,73 | 13,16 ^{**} ±0,76 | 12,52 ±0,57 | 11,33 ±0,76 | 10,05 ±0,41 | 07,00 ±0,00 | 06,00 ±0,00 | |
| <i>S. epidermidis</i> | (100%) | 16,16^{***} ±0,60 | 15,73 ^{**} ±0,41 | 13,83 ^{**} ±0,28 | 12,86 [*] ±0,27 | 12,66 [*] ±0,57 | 10,05 ±0,41 | 11,16 ±0,50 | 09,16 ±0,50 | |
| <i>P. aeruginosa</i> | (100%) | 14,11 ^{**} ±0,72 | 12,09 ±0,83 | 12,50 ±0,50 | 10,03 ±0,57 | 07,16 ±0,76 | 07,00 ±0,00 | 06,00 ±0,00 | 06,00 ±0,00 | |
| <i>K. pneumoniae</i> | (60%) | 13,05 ^{**} ±0,41 | 12,50 ±0,50 | 12,60 [*] ±0,28 | 11,50 ±0,05 | 07,00 ±0,25 | 06,00 ±0,00 | 06,00 ±0,00 | 06,00 ±0,00 | |
| <i>K. pneumoniae</i> | (40%) | 15,50 ^{***} ±0,50 | 14,05 ^{**} ±0,41 | 14,00 ±0,25 | 13,33 ±0,50 | 11,33 ±0,57 | 10,50 ±0,50 | 07,50 ±0,50 | 06,00 ±0,50 | |
| <i>P. mirabilis</i> | (75%) | 13,25 ^{**} ±0,90 | 13,05 ±0,41 | 12,33 ±0,28 | 11,03 ±0,57 | 08,00 ±0,00 | 08,00 ±0,00 | 07,00 ±0,00 | 06,00 ±0,00 | |
| <i>P. Mirabilis</i> | (25%) | 14,83 ^{***} ±0,28 | 14,05 ^{**} ±0,41 | 13,16 [*] ±0,57 | 11,17 ±0,50 | 11,08 ±0,52 | 10,50 ±0,33 | 07,66 ±0,28 | 06,00 ±0,00 | |
| <i>A. Baumannii</i> | (100%) | 13,44 ^{**} ±0,63 | 13,11 ±0,72 | 12,83 [*] ±0,28 | 11,33 ±0,28 | 08,00 ±0,00 | 07,66 ±0,28 | 06,00 ±0,00 | 06,00 ±0,00 | |

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart-type (n = 3). *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,001; Pure: 10 µl/ml; D: dilution; D₁: 5 µl/ml; D₂: 2,5 µl/ml; D₃: 1,25 µl/ml.

Les résultats ont indiqué que ces huiles essentielles étaient extrêmement efficaces contre toutes les bactéries multi-résistantes (BMR) testées avec des zones d'inhibition variant de 14 mm à 17 mm pour 10 µl/ml d'huile essentielle des baies mûres. Tandis que, pour l'huile essentielle des baies immatures les zones d'inhibition varient de 11 mm à 16 mm. Ces diamètres d'inhibition étaient parfois

plus larges que ceux obtenus avec certains antibiotiques synthétiques déjà testé contre ces souches.

Les souches de *Staphylococcus epidermidis* sont apparus plus sensibles vis-à-vis les deux huiles essentielles testées avec une faible concentration (CMI 1,25 µl/ml). Alors qu'une concentration plus élevée (CMI 2,5 µl/ml) a été enregistrée contre la totalité des souches de *Staphylococcus aureus*, 40% de *Klebsiella pneumoniae* et 25% de *Proteus mirabilis*. Cependant, nos données ont montré que ces huiles ont un effet modéré contre la totalité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Acinetobacter baumannii* (Figure 3.13), ainsi que contre (60%) des souches de *Klebsiella pneumoniae* et (75%) de *Proteus mirabilis* avec la même CMI de 5 µl/ml.

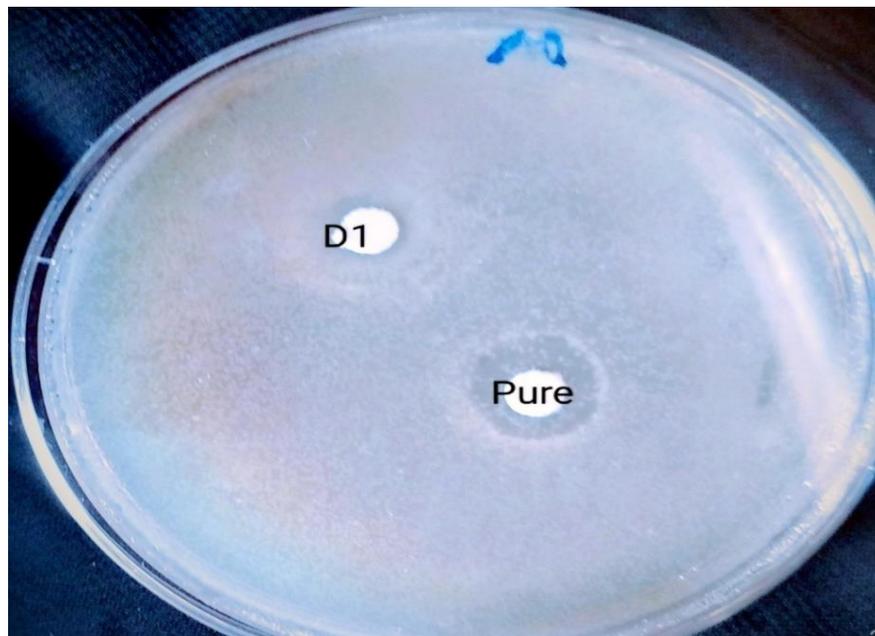


Figure 3.13 : Effet antibactérien de l'huile essentielle des immatures sur la souche *Acinetobacter baumannii*

L'analyse statistique a montré que les deux huiles essentielles pures présentent une différence hautement significative ($p < 0,001$) contre les bactéries Gram positifs testés. Alors que contre les bactéries Gram négatif, elles ont montrés un effet significativement modéré ($p < 0,01$).

D'après les résultats obtenus nous déduisons que les deux huiles essentielles des baies de *J. oxycedrus* ont un effet antimicrobien contre toutes les

bactéries testées de références et cliniques. Ce pouvoir antimicrobien des huiles essentielles est différent selon la souche microbienne testée et la concentration de l'huile essentielle. En effet, les diamètres des zones d'inhibitions diminuent graduellement avec les dilutions des huiles essentielles. Donc, les huiles essentielles pures sont les plus actives avec des zones d'inhibition plus larges. En outre, nos résultats sont en accord avec ceux de nombreuses études antérieures sur le pouvoir antimicrobien puissant des huiles essentielles contre les bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatif [5], [99], [174]. Cette différence de sensibilité des souches bactériennes aux huiles essentielles pourraient être dû à la constitution des membranes cellulaires externes. En effet, les bactéries Gram négatifs ont pourvu d'une couche de nature lipopolysaccharidique qui les rendent plus hydrophiles, ce qui empêche l'action des huiles essentielles qui sont hydrophobes [198].

Nos résultats corroborent avec d'autres études effectuées en Algérie [14], en Maroc [16], [21], [66], en Tunisie [199], en Bulgarie [175] et en Italie [106], portant sur l'effet des huiles essentielles de *J. oxycedrus*, qui ont démontré une activité antimicrobienne très intéressante contre plusieurs souches de référence et d'autres souches cliniques résistantes [14], [102].

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *J. oxycedrus* peut être dû à la richesse en monoterpènes hydrocarbonés et en particulier aux constituants majoritaires tel que l'alpha pinène et le germacrène connus pour leur forte activité antimicrobienne où probablement dû à l'effet synergique des constituants mineurs et majeurs de l'huile essentielle [5].

3.5.2. Activité anti-oxydante

L'activité anti-oxydante des huiles essentielles des baies de *J. oxycedrus* L. a été évaluée en utilisant le test de DPPH.

Le test DPPH est l'un des tests les plus utilisés à cause de sa simplicité et sa reproductibilité [200]. Afin de comparer le pouvoir anti-radicalaire des huiles essentielles des baies mûres et immatures de *J. oxycedrus* L., nous avons utilisé l'acide ascorbique comme antioxydant standard.

La valeur d'IC50 de chaque échantillon a été déterminée par le suivi de la mesure de l'absorbance par un spectrophotomètre à 517 nm. Puis à partir de ces valeurs obtenues, Nous avons calculé graphiquement le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de chaque échantillon (HEM, HEI et A. ascorbique). La figure 3.14 représente la variation du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration des huiles essentielles des baies de *J. oxycedrus* et de l'acide ascorbique.

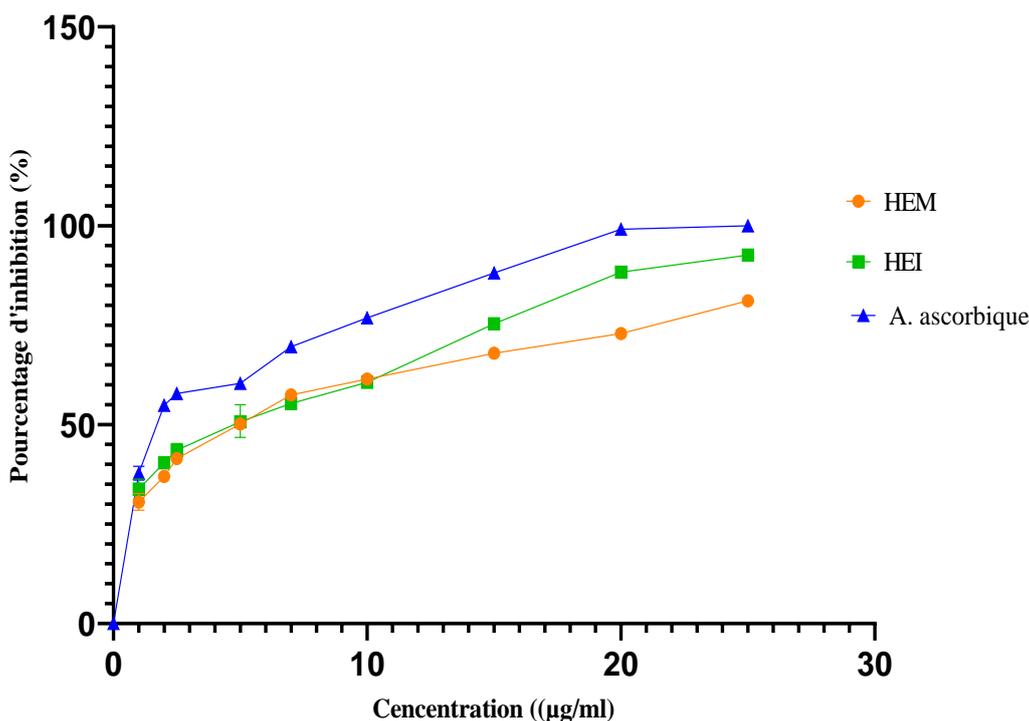


Figure 3.14 : Variation du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration des huiles essentielles de *J. oxycedrus* et de l'acide ascorbique.

Nous remarquons que les huiles essentielles de Genévrier oxycèdre ont un bon pouvoir réducteur qui augmente avec la concentration.

L'activité anti-radicalaire est estimée par la valeur IC50, elle exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% de la concentration en DPPH, donc plus la valeur de IC50 est faible plus l'activité anti-oxydante est grande. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau (3.11) et la Figure (3.15).

Tableau 3.11 : IC₅₀ des huiles essentielles de *J. oxycedrus* et l'Acide ascorbique

| Echantillon | IC ₅₀ (µg/ml) |
|---------------|--------------------------|
| HEM | 4,24 ± 0,03 |
| HEI | 4,04 ± 0,05 |
| A. ascorbique | 2,57 ± 0,02 |

Chaque valeur de l'IC₅₀ représente la moyenne ± Ecart-type (n = 3).

HEM : Huile essentielle mûres ; HEI : Huile essentielle immatures.

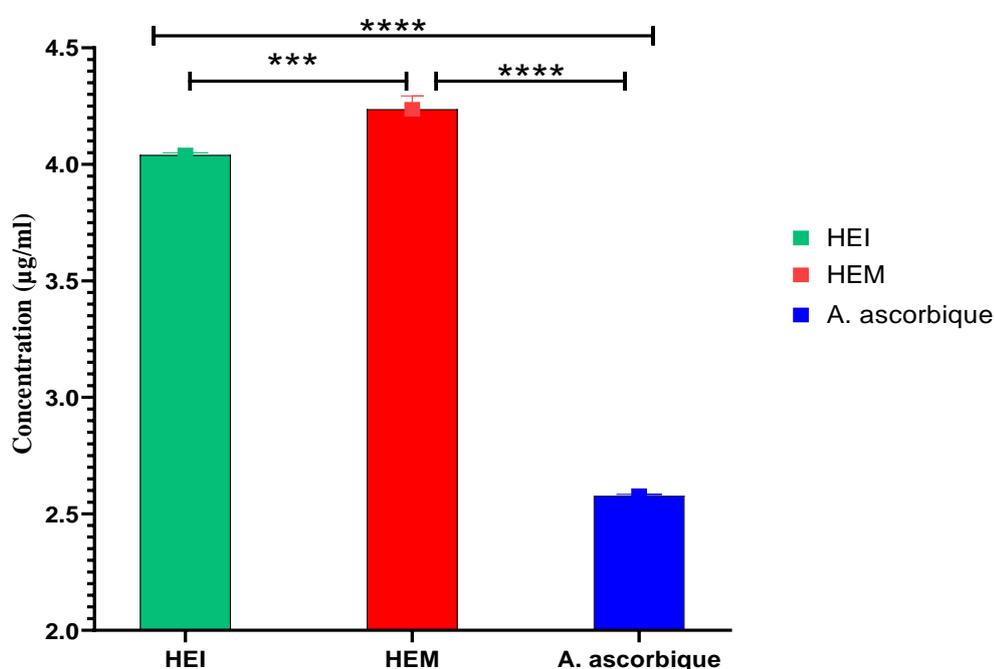


Figure 3.15 : IC₅₀ des huiles essentielles des baies mûres et immatures de *J. oxycedrus* et de l'acide ascorbique.

D'après ces résultats, les huiles essentielles des baies immatures et mûres présentent une activité anti-oxydante très intéressante avec une IC₅₀ de l'ordre de 4,04 ± 0,05 µg/ml et de 4,24 ± 0,03 µg/ml, respectivement. Néanmoins, ce pouvoir antioxydant des huiles essentielles étudiées reste inférieur à celui de l'acide ascorbique 2,57 ± 0,02.

L'analyse statistique (ANOVA) révèle que l'acide ascorbique a montré une forte activité anti-oxydante par rapport les deux huiles essentielles (p < 0,0001) et

que l'huile essentielle des baies immatures possède un bon pouvoir anti-radicalaire par rapport l'huile essentielle des baies mûres ($p < 0,001$).

La forte activité anti-oxydante des huiles essentielles des baies de Genévrier oxycèdre a été également signalée par des travaux antérieurs [104], [16]. L'étude réalisée par Loizzo *et al.*, (2007) [104], a montré que l'huile essentielle des baies matures de genévrier oxycèdre du Liban possède une bonne activité anti-radicalaire avec une IC_{50} de 7,42 $\mu\text{g/ml}$. Une autre étude effectuée par Rajouani *et al.*, (2015) [16] a montré que les huiles essentielles des baies immatures de deux régions marocaine (Ourika et Tighadwine) ont un potentiel antioxydant important avec des IC_{50} de 31,32 $\mu\text{g/ml}$ et de 31,96 $\mu\text{g/ml}$, respectivement.

De même Rahhal *et al.*, (2019) [66] ont montré que les huiles essentielles des feuilles des trois espèces du genre *Juniperus* du Maroc (*J. oxycedrus*, *Juniperus phoenicea* et *Juniperus thurifera*) possèdent un pouvoir antioxydant intéressant (IC_{50} de $12,07 \pm 0,74 \mu\text{g/ml}$ à $22,14 \pm 1,16 \mu\text{g/ml}$).

Cette forte capacité anti-radicalaire des huiles essentielles de Genévrier oxycèdre est fortement liée à leurs profils chimiques. Elle peut être due à l'un des constituants majoritaires ou minoritaires ou également à une synergie entre eux [66].

3.6. Activités biologiques *in vivo*

3.6.1. Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée

Le test de Draize cutanée est utilisé en dermatologie pour évaluer l'irritabilité d'un produit par la détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée (IPC). Les résultats du test de l'irritation cutanés primaires des hydrogels formulés chez les lapins, sont représentés dans le tableau 3.12

Cliniquement, il n'y a aucun signe d'irritation cutanée observé après l'application des hydrogels à base des huiles essentielles testés après 24h, 48h et 72 heures. D'après les résultats obtenus, les hydrogels formulés ont un IPC de 0.

Tableau 3.12 : Résultats de l'indice d'irritation cutanée

| Lot | 24 heures | | 48 heures | | 72 heures | |
|------------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| | Erythème | Œdème | Erythème | Œdème | Erythème | Œdème |
| 01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 03 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 04 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| IPC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Lot 01 : lapins traités par l'hydrogel (HGPG/HEI); Lot 02 : lapins traités par l'hydrogel (HGCR/HEI); Lot 03 : lapins traités par l'hydrogel (HGPG/HEM); Lot 04 : lapins traités par l'hydrogel (HGCR/HEM); (n=03/lot).

Selon le score de Draize, tous les hydrogels formulés à base des huiles essentielles du Genévrier oxycèdre sont classés comme non irritants, et les huiles essentielles du Genévrier oxycèdre à 0,3% peuvent être utilisés en toute sécurité dans les traitements des maladies dermatiques.

Une étude sur l'irritation cutanée de l'huile de Genévrier (*Juniperus occidentalis*), a montré que cette huile n'était pas irritante à une concentration de 0,5% [201].

3.6.2. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des hydrogels préparés à base des huiles essentielles des baies mûres et immatures du Genévrier oxycèdre a été évaluée par le modèle de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez les souris. Ce test concerne des inflammations aiguës locales, au cours desquelles l'histamine et les prostaglandines jouent un rôle important. Les résultats de l'activité anti-inflammatoire topique des hydrogels formulés sont consignés dans le tableau 3.13 :

Tableau 3.13 : Effet des hydrogels à base des huiles essentielles du *J. oxycedrus* sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton

| Traitement | Dose (mg) | Différence de poids (OD et OG) | Inhibition d'œdème (%) |
|--------------------|-----------|-----------------------------------|------------------------|
| HGC | 0,5 | 5,84 ± 0,32 | - |
| HGPG/HEM | 0,5 | 1,78 ± 0,36** | 56,01 |
| HGCR/HEM | 0,5 | 1,99 ± 0,25** | 53,66 |
| HGPG/HEI | 0,5 | 1,03 ± 0,13** | 60,33 |
| HGCR/HEI | 0,5 | 1,25 ± 0,21** | 59,33 |
| Diclofenac® | 0,5 | 1,64 ± 0,29** | 56,50 |

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart-type (n=3) ; OD : Oreille droite ; OG : oreille gauche ; **p ≤ 0,01 (comparé au groupe témoin); HGPG/HEM groupe traité par l'hydrogel à base de l'huile essentielle des baies mûres contenant le propylène glycol; HGCR/HEM : groupe traité par l'hydrogel à base de l'huile essentielle des baies mûres contenant le Cremophor®RH40; HGPG/HEI : groupe traité par l'hydrogel à base de l'huile essentielle des baies immatures contenant le propylène glycol; HGCR/HEI : groupe traité par l'hydrogel à base de l'huile essentielle des baies immatures contenant le Cremophor® RH40; G5 : Madecassol®.

Six heures après l'application de l'huile de croton sur l'oreille droite des souris par voie topique, les souris des cinq groupes prétraités localement par les hydrogels à base des huiles essentielles (HGPG/HEM, HGCR/HEM, HGPG/HEI et HGCR/HEI) et le gel de Diclolofinac de sodium® (1%) ont montré une réduction de poids d'oreilles très significatives (p < 0,01) de 1 à 2 mg par rapport au souris du groupe témoin traité par l'hydrogel seul avec un poids de 5,84 mg.

La réaction inflammatoire a été provoquée par l'huile de croton comme agent phlogogène (irritant) contenant principalement le 12- O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA). L'administration topique de TPA provoque un œdème aigue avec infiltration de leucocytes, agissant par le déclenchement de la protéine kinase C (PKC). Ce dernier stimule l'agent pro-inflammatoire le phospholipase A2 (PLA2),

qui catalyse l'hydrolyse des phospholipides membranaires en acide arachidonique. Cet acide arachidonique subit une oxydation enzymatique par les cyclooxygénases (COX2) ou par les lipooxygénases conduit à la formation des prostaglandines (PG), des éicosanoïdes, leucotriènes et cytokines [202].

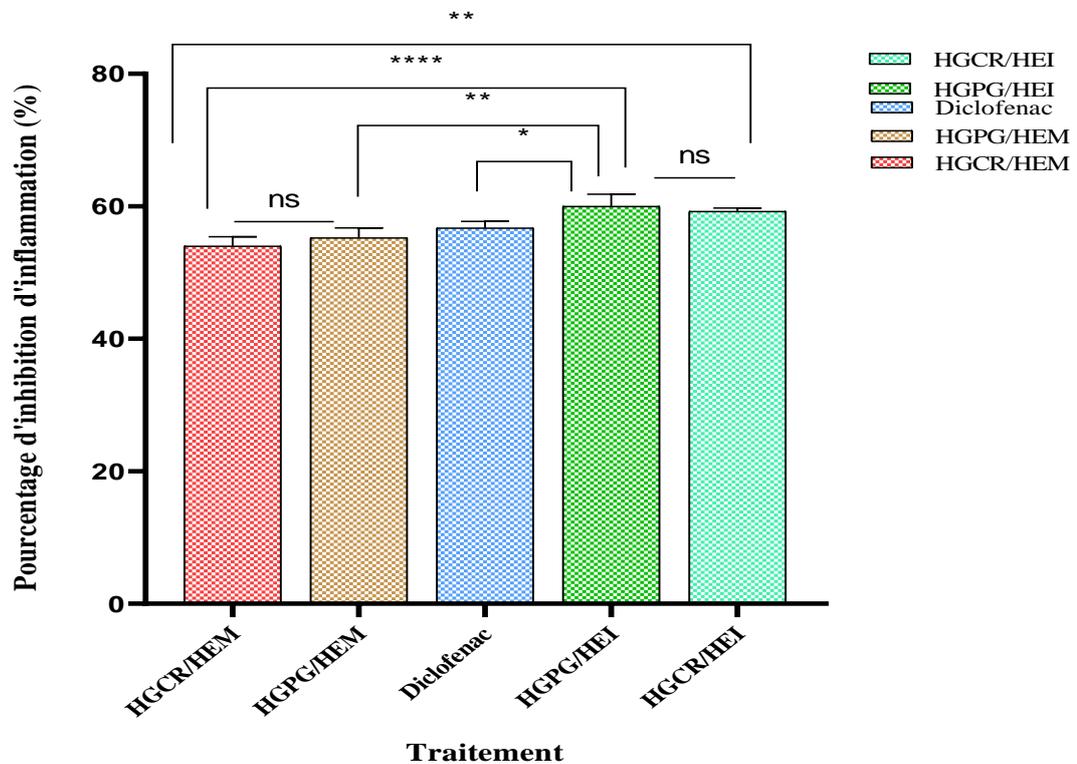


Figure 3.16: Pourcentage de réduction de l'inflammation par les hydrogels à base des huiles essentielles du Genévrier oxycède et le gel de Diclofenac® (1%) ; Chaque valeur représente la moyenne \pm Ecart-type (n=4) ; ns : différence non significative; * $p < 0,05$; ** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0,0001$ (Anova suivie par le test de Tukey)

D'après la Figure 3.16, le pourcentage d'inhibition de l'inflammation le plus faible est celui du groupe traité par l'hydrogel HGPG/HEM avec un pourcentage de 53%. Alors que, le pourcentage d'inhibition de l'inflammation le plus important est celui du groupe traité par hydrogel à base d'huile essentielle des baies immatures contenant le propylène glycol HGPG/HEI avec un pourcentage de 60,33%, suivi par le groupe traité par l'hydrogel HGCR/HEI avec un taux de 59,33%. Ces résultats sont meilleurs que ceux du produit anti-inflammatoire commercialisé Diclofenac de sodium® (1%) et l'hydrogel à base d'huile essentielle

des baies mûres HGPG/HEM avec un pourcentage d'inhibition d'inflammation de 56% et 55%, respectivement.

L'analyse statistique (ANOVA) suivie par le test (Post hoc, Tukey) révèle que l'hydrogel à base d'huile essentielle des baies immatures, contenant le propylène glycol possède un meilleur effet anti-inflammatoire ($p < 0,0001$) que le gel de Diclofénac® (1%) et les hydrogels à base d'huile essentielle des baies mûres.

Ces résultats obtenus à travers ce test suggèrent que les hydrogels à base des huiles essentielles des baies de Genévrier oxycèdre pourraient agir sur les principaux médiateurs impliqués dans la réaction inflammatoire induite par huile de croton. Ces propriétés anti-inflammatoires des hydrogels formulés seraient liées au profil chimique des huiles essentielles.

Plusieurs travaux ont montré l'effet anti-inflammatoire des huiles essentielles [23]. Notamment, l'alpha-pinène qui a montré une activité anti-inflammatoire importante contre de nombreuses maladies inflammatoires [82], [203]. Dans une étude sur le modèle *in vivo* menée par kim et *al.*, (2015), pour tester les effets inhibiteurs de l'alpha-pinène sur les réponses inflammatoires induites par le lipopolysaccharide (LPS) à l'aide des macrophages péritonéaux chez les souris, les résultats ont montré que l'alpha-pinène a un effet inhibiteur sur la production d'interleukine-6 (IL-6) induite par le LPS, le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) et l'oxyde nitrique (NO). Aussi, il a inhibé la synthèse des expressions d'oxyde nitrique inductible (iNOS) et de cyclo-oxygénase-2 (COX-2). Ces résultats ont démontré clairement que l'alpha-pinène est capable de supprimer ou réduire les protéines kinases (MAPKs) et le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) dans les macrophages [82]. En outre, les sesquiterpènes tels que le β caryophyllène et le germacrène D exercent une activité anti-inflammatoire importante en inhibant l'infiltration inflammatoire et la surexpression COX-2 [204].

Des études antérieures sur les activités biologiques des extraits du genre *Juniperus* ont confirmé le pouvoir anti-inflammatoire du genévrier oxycèdre. En effet, l'étude effectuée par Djellouli et *al.*, (2022), sur l'effet anti-inflammatoire *in vitro* des extraits méthanoliques et aqueux de *J. oxycedrus* récolté à la région de Mascara, a montré que les deux extraits présentent une forte inhibition de la dénaturation de l'albumine [101]. Egalement, une autre étude sur l'effet anti-

inflammatoire des extraits méthanoliques du genre *Juniperus* de la Turquie, a montré des résultats satisfaisantes contre les inflammations aiguës induites par la carragénine [23].

D'après ces résultats les hydrogels formulés à base des huiles essentielles du Genévrier oxycèdre pourraient constituer une meilleure alternative dans les traitements des maladies anti-inflammatoires.

3.6.3. Evaluation de l'activité cicatrisante

L'évaluation du pouvoir cicatrisant des hydrogels à base des huiles essentielles de *J. oxycedrus* a été effectuée sur trois modèles chez le rat:

Deux modèles de plaies : des incisions linéaires suturés et des excisions circulaires avec une perte de la substance cutanée et un troisième modèle de la brûlure thermique.

L'évaluation de l'activité cicatrisante a été effectuée à travers des examens macroscopiques et microscopiques.

3.6.3.1. Evaluation macroscopique

Cette évaluation a été effectuée par le suivi de l'évolution de la surface des plaies, couleur et odeur ainsi que le temps requis pour la re-épithélialisation. Aucun signe d'infection n'a été observé et aucun cas de mortalité n'a été constaté au cours du déroulement du processus cicatriciel.

a. Model de cicatrisation sur incisions linéaires

Les résultats du suivi de l'évolution du processus cicatriciel des incisions linéaires selon l'outil d'évaluation des plaies de Bates-Jensen (BWAT), sont indiqués dans le Tableau 3.14 :

Tableau 3.14 : Résultats de l'évaluation des incisions selon l'outil de Bates-Jensen

| Paramètres de Description | G1 | | G2 | | G3 | | G4 | | G5 | | G6 | |
|--|-------------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|
| | J6 | J12 | J6 | J12 | J6 | J12 | J6 | J12 | J6 | J12 | J6 | J12 |
| Bordures de la plaie | 3,60 ±0,57 | 1,00 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 3,57 ±0,57 | 1,00 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 4,00 ±0,00 | 1,00± 0,00 | 4,33 ±0,13 | 2,00 ±0,00 |
| Sillon de la plaie | 3,01 ±0,01 | 1,67 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 3,10 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 2,66 ±0,57 | 1,00 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 2,00 ±0,00 | 4,50 ±0,00 | 1,66 ±0,57 |
| Type d'exsudat | 2,75 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 4,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 |
| Quantité d'exsudat | 2,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 2,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 2,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 2,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 2,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 1,33 ±0,57 |
| Couleur de la peau qui entoure la plaie | 2,50 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 2,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 2,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 2,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 2,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 2,00 ±0,00 |
| Œdème périphérique | 3,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 3,66 ±0,57 | 1,00 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 3,50 ±0,00 | 2,33 ±0,57 |
| Induration des bords de la plaie | 1,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 |
| Epithélialisation | 3,00 ±0,00 | 1,0 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 | 3,00 ±0,00 | 1,00 ±0,00 |
| Scores obtenus | 20,85** ± 0,58 | 8,67* ±0,58 | 20,66** ±0,57 | 08,00* ±0,00 | 20,67** ±0,57 | 08,00* ±0,00 | 19,66** ±1,15 | 8,00* ±0,57 | 21,00** ±0,00 | 09,00 ±0,00 | 26,33 ±0,33 | 12,33 ±0,57 |

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart-type. L'évaluation de chaque paramètre a été marquée sur une échelle de cinq points. 5 représente le résultat le plus grave et 1 représente le moins grave. Le premier jour tous les groupes ont présenté un score similaire de 33 points. G1: groupe traité par l'hydrogel HGPG/HEM ; G2 : groupe traité par l'hydrogel HGCR/HEM ; G3 : groupe traité par l'hydrogel HGPG/HEI ; G4 : groupe traité par l'hydrogel HGCR/HEI ; G5 : groupe traité par Madécassol ; G6 : groupe témoin traité par HG ; *p ≤ 0,05 ; **p ≤ 0,001 (Anova suivie par le test de Tukey).

L'évaluation repose sur l'observation quotidienne de l'état de plaie tels que : la couleur de plaie, les exsudats, les bords de plaie, l'œdème et le pourcentage de l'épithélialisation. Chacun de ces paramètres est noté de un (le moins grave) à cinq points (le plus grave).

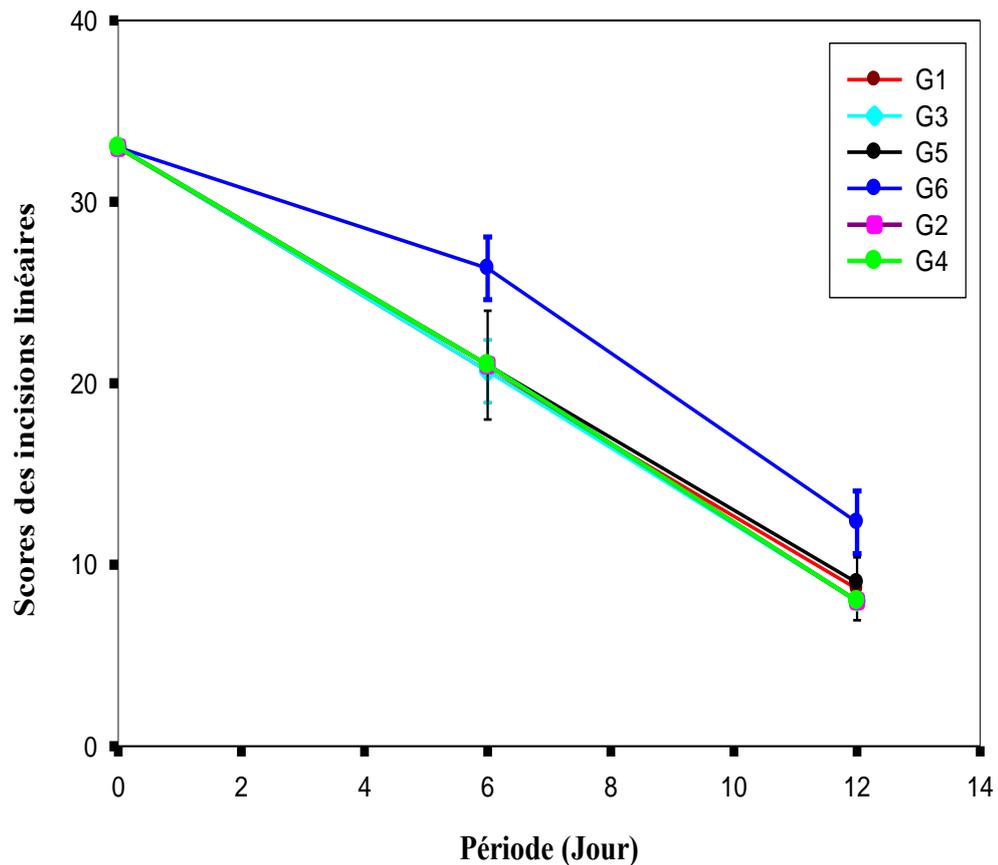


Figure 3. 17: Evaluation des incisions linéaires par les scores de Bates-Jensen(BWAT). G1: groupe traité par l'hydrogel HGPG/HEM ; G2 : groupe traité par l'hydrogel HGCR/HEM ; G3 : groupe traité par l'hydrogel HGPG/HEI ; G4 : groupe traité par l'hydrogel HGCR/HEI; G5 : groupe traité par Madécassol ; G6 : groupe témoin.

La figure 3.17 montre les résultats des scores obtenus selon l'outil de l'évaluation de BWAT. Nous avons constaté que le premier jour (J0) post-incision tous les groupes ont montrés un score de gravité de trente-trois points (des plaies sanglantes et œdémateuses).

Au sixième jour post-incision, les scores de la gravité des plaies des groupes traités sont très significativement inférieurs à ceux du groupe témoin ($p < 0,001$).

En effet, l'observation macroscopique des plaies des rats des groupes traités, a montré une amélioration dans l'aspect des plaies ; des contours de plaies bien définis, une absence des œdèmes et une épithélialisation de 50% à 70% (Figure 3.18). Les deux groupes (G2 et G4) traités par les huiles essentielles contenant le Cremophor® RH40 (HGCR/HEI et HGCR/HEM) ont montré des meilleurs scores de $19,66 \pm 1,15$ et de $20,6 \pm 1,15$, respectivement. Tandis que les plaies du groupe témoin, sont caractérisées par des plaies aux bords œdémateux d'une couleur rougeâtre et une épithélialisation de moins de 25% (score de $26,33 \pm 0,33$).

Au dixième jour post-incision, la cicatrisation des plaies a été clairement meilleure dans les groupes traités par les hydrogels à base des huiles essentielles et le groupe traité par le Madécasol®. Le groupe témoin a montré une cicatrisation complète le dernier jour de l'expérimentation (jour de sacrifice).

Une analyse statistique par le test ANOVA suivie par le test post-hock Tukey, a montré une différence très significative le sixième jour post-incision ($p < 0,001$) entre tous les groupes traités et le groupe témoin. Une légère avancée a été notée par les groupes traités par les hydrogels à base des huiles essentielles contenant le Cremophor® RH40 (F2 et F4) ($p 0,05$).

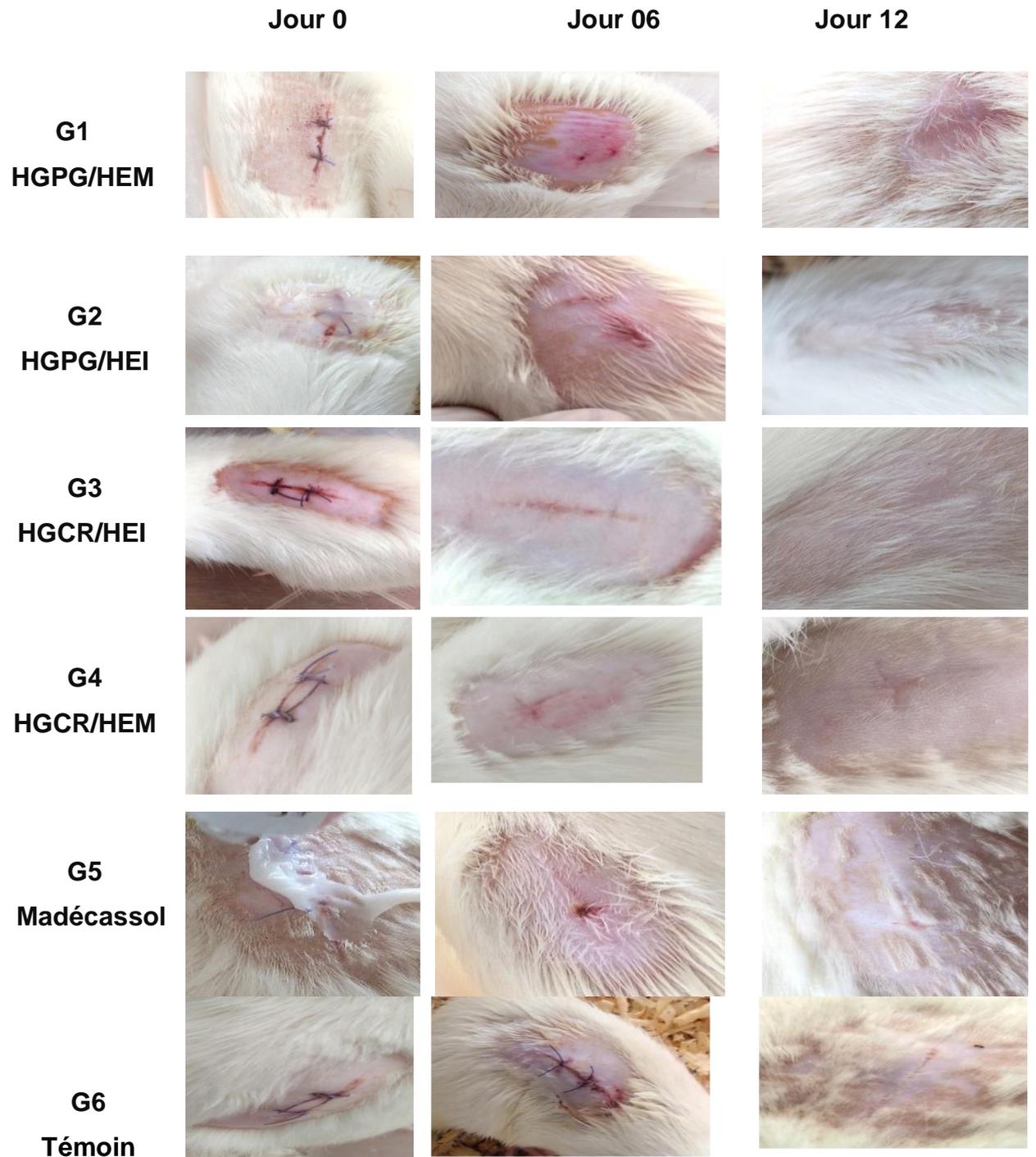


Figure 3.18 : Evolution du processus de cicatrisation des incisions linéaires.

a. Model de cicatrisation sur excisions circulaires

Le suivi de l'évolution de réduction des surfaces des plaies des excisions circulaires (mm²) et le pourcentage de contraction des plaies ont été noté dans le Tableau 3.15.

Tableau 3.15 : Surfaces moyennes et les pourcentages des contractions des plaies des excisions circulaires

| Groupe | Jour 0 | | Jour 6 | | Jour 12 | |
|-----------|--------------------|-------------|--------------------|----------------|--------------------|-------------|
| | Surface | Contraction | Surface | Contraction | Surface | Contraction |
| | (mm ²) | (%) | (mm ²) | (%) | (mm ²) | (%) |
| G1 | 314 ± 0,00 | - | 143 ± 10,50 | 56,25 ± 2,50* | 00 ± 0,00 | 100* |
| G2 | 314 ± 0,00 | - | 141 ± 12,00 | 55,33 ± 1,50* | 00 ± 0,00 | 100* |
| G3 | 314 ± 0,00 | - | 131 ± 09,75 | 59,57 ± 5,50** | 00 ± 0,00 | 100* |
| G4 | 314 ± 0,00 | - | 129 ± 08,35 | 61,14 ± 3,50** | 00 ± 0,00 | 100* |
| G5 | 314 ± 0,01 | - | 140 ± 10,58 | 54,38 ± 2,50* | 00 ± 0,00 | 100* |
| G6 | 314 ± 0,00 | - | 219 ± 12,35 | 30,11 ± 6,25 | 35 ± 14,58 | 86 |

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart-type ; G1 : (HGPG/HEM) ; G2 : (HGCR/HEM) ; G3 : (HGPG/HEI) ; G4 : (HGCR/HEI) ; G5 : Madecassol® ; G6 : Témoin ; Valeur significative **p ≤ 0,001 ; ***p ≤ 0,0001 (Comparé avec le groupe témoin).

Les résultats obtenus indiquent que les traitements appliqués permettent l'accélération de la cicatrisation par la réduction des surfaces des plaies (Figure 3.19).

Les premiers jours post-excision, aucune différence significative n'a été enregistrée entre tous les groupe (p = 0,78).

A partir du troisième jour jusqu'au sixième jour post-excision, un pourcentage de réduction des plaies important a été enregistré (plus de 54%) dans les groupes traités par les hydrogels à base des huiles essentielles et le groupe Madecassol® avec des surfaces de plaies de 129 ± 09,75 mm² à 143 ± 10,50 mm².

Ces résultats sont très significatifs ($p \leq 0,001$) par rapport au groupe témoin traité par l'hydrogel seul ($219 \pm 12,35 \text{ mm}^2$).

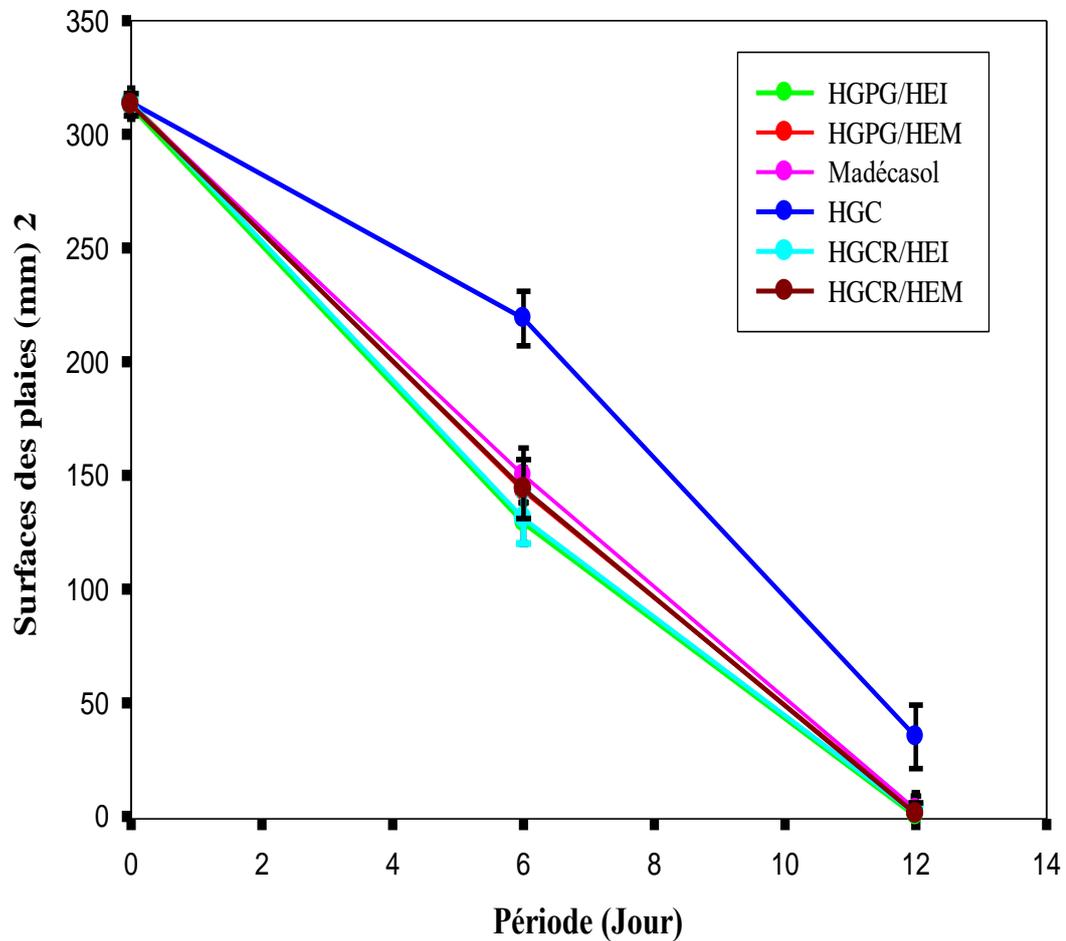


Figure 3.19 : Surfaces des plaies d'excisions circulaires

L'observation macroscopique des plaies le sixième jour post-excision a montré que les croûtes du groupe témoin sont épaisses et sèches, contrairement aux groupes traités par les hydrogels à base des huiles essentielles du genévrier oxycédré et le Madecassol® qui sont caractérisés par des croûtes molles et fines (Figure 3.20).



Figure 3.20: Evolution de processus de cicatrisation des excisions circulaires.

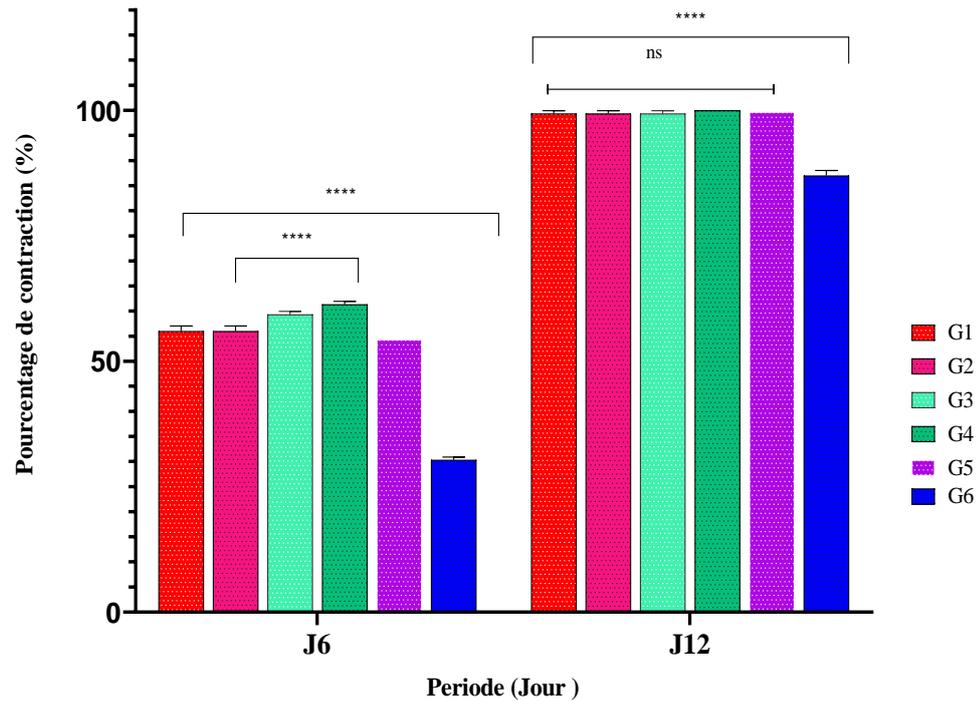


Figure 3.21 : Contraction des plaies d'excisions circulaires : G1 : (HGPG/HEM) ; G2 : (HGCR/HEM) ; G3 : (HGPG/HEI) ; G4 : (HGCR/HEI) ; G5 : Madecassol® ; G6 : Témoin ; ns : différence non significative ; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ (Anova suivie par le test de Tukey).

L'analyse statistique par ANOVA a confirmé que tous les groupes traités par les hydrogels à base des huiles essentielles et le produit de référence (Madecassol®) ont montré une évolution très significative le 6^{ème} et le 12^{ème} jour ($p < 0,001$) par rapport au groupe témoin.

c. Brûlure thermique

Le tableau 3.16 montre les résultats du suivi du processus de cicatrisation par la réduction des surfaces des plaies ainsi que la contraction des plaies en fonction du temps.

Durant les trois premiers jours de l'induction de la brûlure expérimentale, aucun changement significatif n'a été enregistré malgré l'application quotidienne des traitements.

Tableau 3.16 : Surfaces moyennes et les pourcentages des contractions des plaies des brûlures thermiques

| Groupes | Jour 6 | | Jour 12 | | Jour 21 | | Jour 28 | |
|-----------|--------------------|-------------|--------------------|--------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|
| | Surface | Contraction | Surface | contraction | Surface | Contraction | Surface | Contraction |
| | (mm ²) | (%) | (mm ²) | (%) | (mm ²) | (%) | (mm ²) | (%) |
| G1 | 198 ± 8,50 | 35± 1,50 | 110 ± 10,50 | 63,25±2,50** | 18± 3,00 | 94,00 | 00 ± 0,00 | 100 |
| G2 | 190 ± 2,57 | 37± 1,57 | 108 ± 12,00 | 65,33±1,50** | 08±3,00 | 97,33 | 00 ± 0,00 | 100 |
| G3 | 183 ± 5,23 | 40± 1,83** | 99 ± 09,75 | 67,57±3,50** | 03 ± 2,00 | 99,00*** | 00 ± 0,00 | 100 |
| G4 | 180 ± 4,58 | 41± 1,50** | 95 ± 08,35 | 68,14±3,50** | 02± 1,00 | 99,33*** | 00 ± 0,00 | 100 |
| G5 | 190 ± 7,13 | 37± 2,50 | 107 ± 8,57 | 64,3±2,50** | 19 ± 5,57 | 93,66 | 00±0,00 | 100 |
| G6 | 220 ± 7,00 | 20± 3,57 | 170 ± 13,57 | 43,11± 4,25 | 45±10,58 | 85,66 | 01± 0,00 | 99,99 |

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart-type ; G1 : (HGPG/HEM) ; G2 : (HGCR/HEM) ; G3 : (HGPG/HEI) ; G4 : (HGCR/HEI) ; G5 : Madecassol® ; G6 : Témoin ; Valeur significative *p ≤ 0,05 ; **p ≤ 0,001 ; ***p ≤ 0,0001 (Comparé avec le groupe témoin).

Une évolution significative du processus cicatriciel des plaies traités par les hydrogels à base des huiles essentielles et le Madecassol® a été enregistrée durant le période d'expérimentation par rapport au groupe témoin. En effet, une réduction importante de la surface initiale des plaies (300 mm²) a été remarqué le 12^{ème} jour avec une surface moyenne variant de 95 ± 08,35 mm² à 110 ± 10,50 mm². Alors que le groupe témoin a montré une réduction lente avec une surface moyenne de 220 ± 7,00 mm² (Figure 3.22).

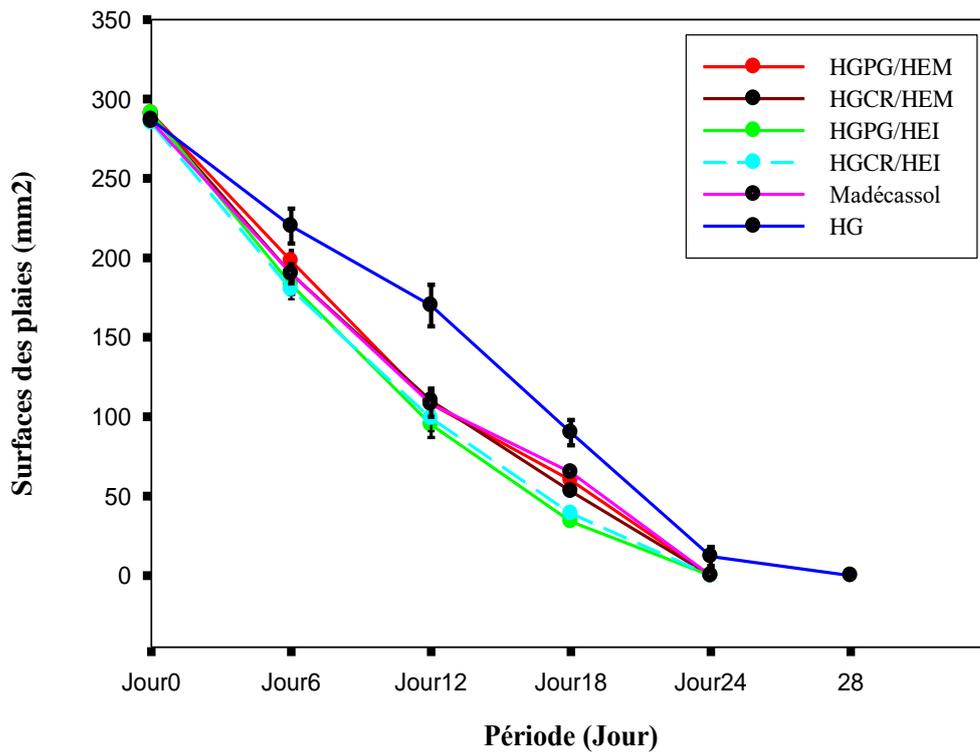


Figure 3.22 : Evolution de la surface de cicatrisation des plaies de brûlures thermiques

La cicatrisation la plus importante a été enregistrée avec les hydrogels à base d'huile essentielle des baies immatures (HGCR/HEI et HGPG/HEI) qui induisent une réparation tissulaire quasi complète au bout de 21 jours avec un pourcentage de contraction des plaies de 99,3% et de 99%, respectivement. L'hydrogel à base de l'huile des baies mûres contenant le Cremophor® RH40 a également montré un pourcentage de contraction important de 97,33% le 21^{ème} jour. L'hydrogel à base d'huile essentielle des baies mûres contenant le propylène glycol et le Madecassol® montrent une cicatrisation complète au bout du 24^{ème} jour (100%). Tandis que les plaies du groupe témoin traitées par l'hydrogel seul (HG) ont montré une cicatrisation complète le 28^{ème} jour (Figure 3.23).

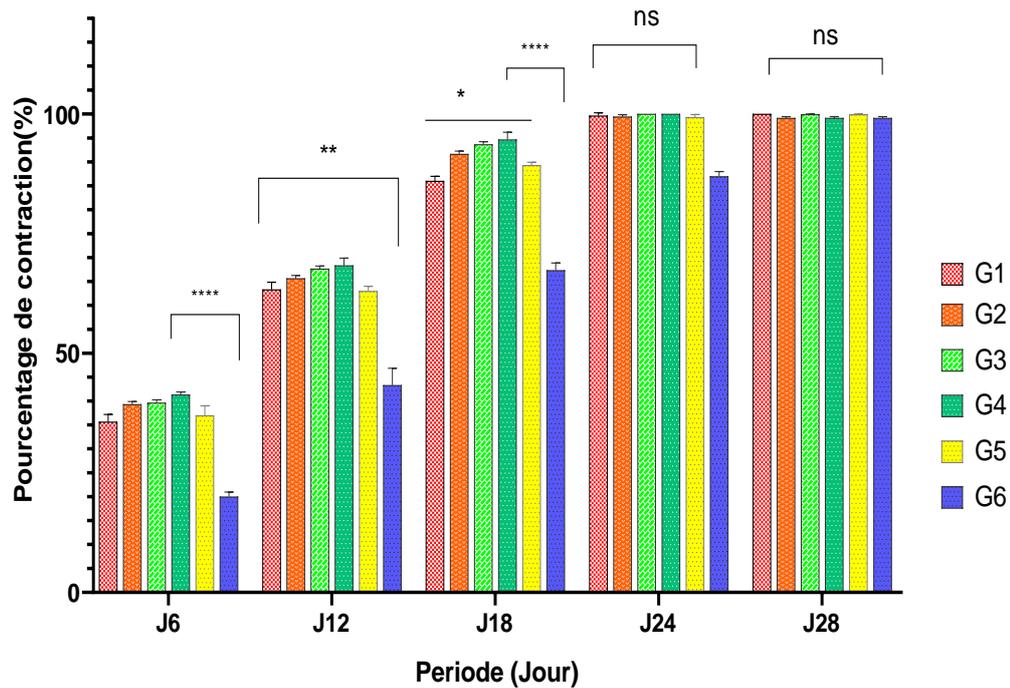


Figure 3.23 : Evolution de la contraction des surfaces plaies

G1 : (HGPG/HEM) ; G2 : (HGCR/HEM) ; G3 : (HGPG/HEI) ; G4 : (HGCR/HEI) ; G5 : Madecassol® ; G6 : Témoin ; Valeur significative * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$

L'observation macroscopique des plaies nous a permis de suivre l'évolution des plaies et de constater visuellement l'action des traitements utilisés sur le processus de cicatrisation. La Figure 3.24 représente une cicatrisation visuellement meilleure dans les groupes traités par les hydrogels à base de l'huile des baies immatures par rapport aux hydrogels à base de l'huile essentielle des baies mures et le Madécassol®.

Les plaies du groupe témoin sont recouvertes par des croûtes solides et sèches difficiles à détacher. En revanche, les croûtes des plaies traitées sont molles, fines et se décollent facilement.

L'analyse statistique par le test ANOVA suivi par le test post hoc Tukey, nous a permis de comparer les différents traitements utilisés, dont le meilleur est l'hydrogel à base de l'huile essentielle des baies immatures, suivi par le reste des traitements qui ont montré un effet semblable .

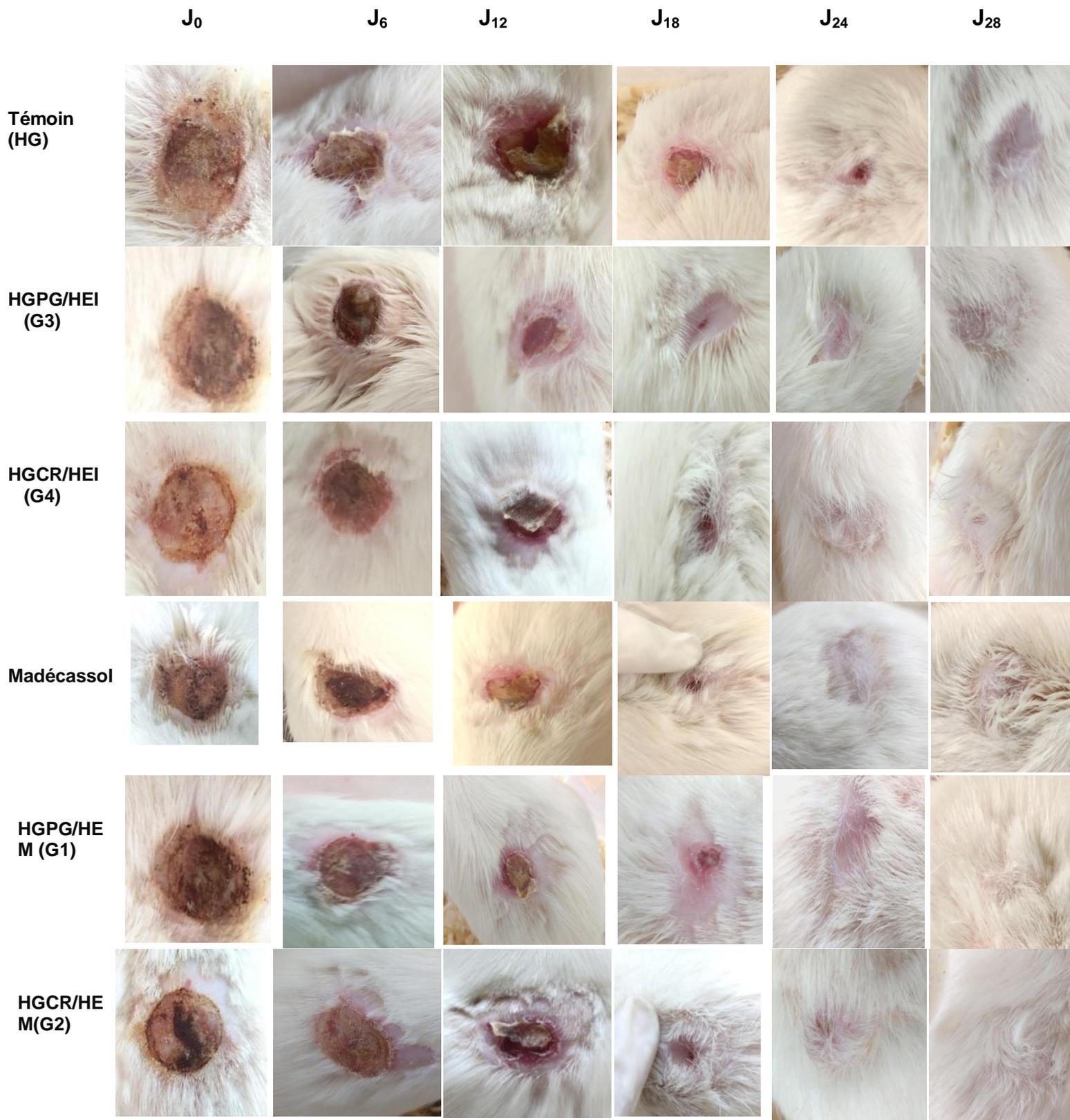


Figure 3.24: Evolution du processus de cicatrisation des plaies brûlées

3.6.3.2. Etude microscopique

L'évaluation histo-pathologique du processus de cicatrisation a été effectuée selon un système de notation proposé par Mari van et *al.*,(2021) [169], basé sur les paramètres suivants : Ré-épithélialisation, épaisseur de l'épiderme, disposition du tissu de granulation, la kératinisation de la couche cornée de l'épiderme, la présence des appendices cutanés et l'indice d'élévation de la cicatrice.

a. Evaluation des incisions linéaires (Plaies suturées)

Les résultats des scores histologiques des incisions linéaires sont représentés dans le tableau 3.17

Tableau 3.17 : Résultats des scores histologiques des plaies des incisions linéaires (12^{ème} jours)

| Traitement | RE Epith | Epais- Epi | Kératini- sation | T. G | Remodelage | IE- cicatrice | Score |
|-------------------|-------------|---------------|---------------------|-----------|------------|------------------|--------------------|
| HGPG/HEI | 2,00±0,00 | 1,66±0,57 | 2,00±0,00 | 2,00±0,00 | 1,00±0,00 | 0,00±0,00 | 8,66±0,57** |
| HGCR/HEI | 2,00±0,00 | 1,33±0,00 | 2,00±0,00 | 1,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 6,33±0,00** |
| HGPG/HEM | 2,00±0,00 | 1,00±0,00 | 2,00±0,00 | 2,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 7,00±0,00** |
| HGCR/HEM | 2,00±0,00 | 1,00±0,00 | 2,00±0,00 | 1,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 6,00±0,00** |
| Madécassol | 2,00±0,00 | 1,00±0,00 | 1,66±0,57 | 2,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 6,66±0,57** |
| HG | 2,00±0,00 | 0,33±0,00 | 1,33±0,50 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 3,66±0,57 |

Chaque valeur représente la moyenne \pm Ecart-type (n = 3). Re-Epith : Re-épithélialisation; Epai- Epi: Epaisseur de l'épiderme; TG : Tissu de Granulation ; IE- cicatrice : Indice d'élévation de la cicatrice; Mad : Madécassol® (1%) ; HGC : hydrogel de base ; **p \leq 0,01 (comparé au groupe témoin). Score : La moyenne de six paramètres indépendants (chaque paramètre est évalué par une fourchette de 2 points), ou le score total maximum est de 12 points.

D'après ces résultats, toutes les plaies traitées par les hydrogels à base des huiles essentielles et le gel de référence (Madécassol® 1%) ont montré un score

variant de 6/12 à 8/12, sauf les plaies du groupe témoin traitées par l'hydrogel seul (HG) qui ont présenté un faible score de 3,66/12.

Une re-épithélialisation complète de l'épiderme a été constatée dans tous les groupes (un score de 2/2), un léger degré de kératinisation de l'épiderme et un derme hypotrophique.

Les résultats indiquent que les plaies traitées avec les hydrogels à base des huiles essentielles et le Madécassol® montrent un épiderme légèrement hypertrophiques par rapport une peau saine avec un degré de différenciation épidermique important (Figure 3.25). De plus, le tissu de granulation est doté une quantité de collagène à orientation mixte (fibres de collagènes immatures). Ce tissu est dépourvu des appendices cutanés (sauf quelques follicules pileux observés dans le groupe traité par l'hydrogel à base de l'huile essentielle des baies immatures contenant le propylène glycol). D'après ces résultats on peut déduire que l'hypotrophie du derme avec une absence des appendices cutanés au niveau de tissu cicatriciel, ces résultats peut être justifie par un processus de maturation dans sa première phase de guérison [169].

Les plaies du groupe témoin montrent un épiderme hypotrophique avec un faible degré de différenciation épidermique (score 0/2), un derme hypotrophique dépourvu des appendices cutanés, avec une faible quantité de tissu de granulation, ce qui signifie que le processus cicatriciel est en cours dans les premiers étapes de guérison.

L'analyse statistique par le test ANOVA suivi par le test post hoc Tukey a montré une différence très significative entre les groupes traités et le groupe de contrôle ($p < 0,01$). Alors qu'aucune différence significative n'a été enregistrée entre les groupes traités.

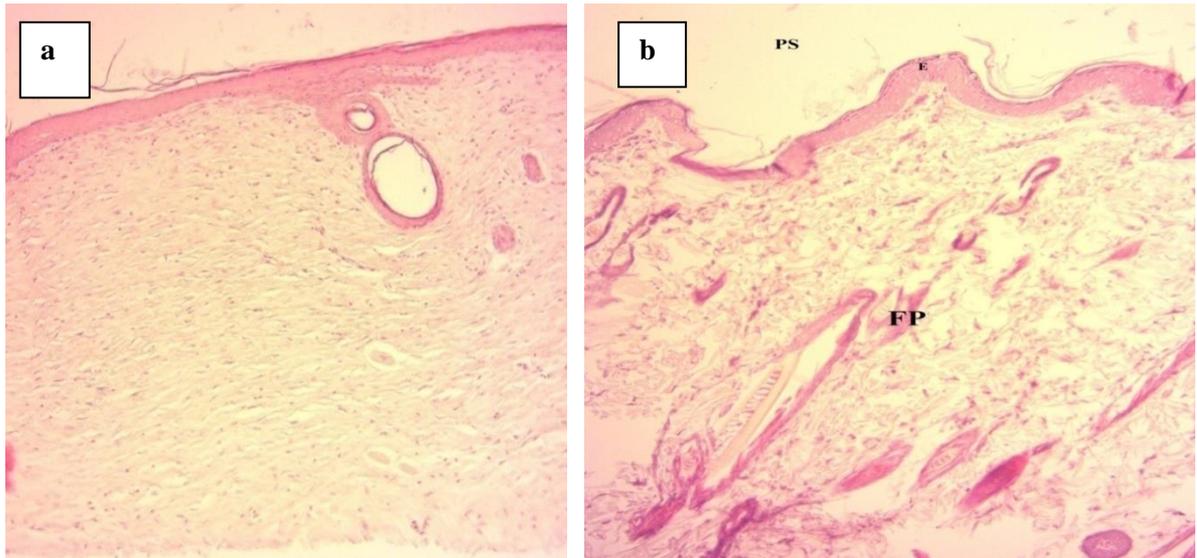


Figure 3.25 : Coupe histologique d'une plaie d'incision linéaire traitée par l'hydrogel à base d'huile essentielle des baies mûres de *J. oxycedrus* comparé avec une section d'une peau saine observée au microscope photonique (G: 40x H&E) ; **a.** Plaie d'incision linéaire traitée par l'hydrogel HGPG/HEM ; **b.** Coupe montrant une peau saine caractérisée par un épiderme reposant sur un tissu conjonctif lâche riche en appendices cutanées (follicules pileux, glandes sébacées) ; E: Epiderme; PS: peau saine; K : kératine; F : follicule pileux.

b. Evaluation histologique des excisions circulaires

Les résultats des scores histologiques obtenus par l'évaluation des plaies d'excision circulaire au 12^{ème} jours ont représentés dans le tableau 3.18 :

Les résultats obtenus montrent que les groupes traités par les hydrogels à base des huiles essentielles et le Madécassol® ont présenté des scores de 7/12 à 8/12.

Ces résultats sont hautement significatifs ($p < 0,001$) par rapport à ceux du groupe témoin traité par l'hydrogel seul (HG) avec un score de 1/12 (cicatrisation partielle).

Tableau 3.18 : Résultats des scores histologiques des plaies des excisions circulaires

| Traitement | Re-Epith | Epais- Epi | Kératin Isation | T. G | Remodelage | IE- cicatrice | Score |
|------------------|-----------|---------------|--------------------|-----------|------------|------------------|------------------|
| HGPG/HEI | 2,00±0,00 | 1,00±0,57 | 1,33±0,57 | 2,00±0,00 | 1,00±0,00 | 0,66±0,00 | 8,00±0,57** |
| HGCR/HEI | 2,00±0,00 | 1,33±0,00 | 1,00±0,00 | 2,00±0,00 | 1,00±0,00 | 0,66±0,00 | 8,00±0,57** |
| HGPG/HEM | 2,00±0,00 | 1,33 ±0,57 | 1,33±0,00 | 2,00±0,00 | 1,00±0,00 | 0,33±0,00 | 8,00±0,33** |
| HGCR/HEM | 2,00±0,00 | 1,00±0,00 | 1,00±0,00 | 2,00±0,00 | 1,00±0,00 | 0,66±0,57 | 7,66±0,57** |
| Madécasol | 2,00±0,00 | 1,00±0,00 | 0,66±0,00 | 2,00±0,00 | 1,00±0,00 | 0,33±0,00 | 7,00±0,01** |
| HGC | 1,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 1,00±0,00 |

Chaque valeur représente la moyenne \pm Ecart-type (n = 3). Re-Epith : Re-épithélisation; Epais- Epi: Epaisseur de l'épiderme; IE-cicatrice : indice d'élévation de la cicatrice; Mad : Madécassol (1%) ; HGC : hydrogel de base Score : La moyenne de six paramètres indépendants (chaque paramètre est évalué par une fourchette de 2 points), ou le score total maximum est de 12 points;**p \leq 0,01 (comparé au groupe témoin)

La Figure 3.26, Figure 3.27 et la Figure 3.28, montrent les coupes histologiques des groupes traités par les hydrogels à base de l'huile essentielle des baies mûres et immatures et le Madécassol®, respectivement. Les plaies de ces groupes traités ont présentés une re-épithélialisation complète avec un épiderme légèrement hypertrophique (un degré important de différenciation épidermique mais un faible degré de kératinisation de la couche cornée) recouvrant un tissu cicatriciel doté une quantité de fibres de collagènes à orientation mixte. On note également la présence des fibroblastes, des néo-vaisseaux sanguins et quelques follicules pileux. Néanmoins, ces groupes ont montrés une cicatrisation du derme légèrement hypotrophique avec épaisseur moyenne du derme cicatrisé est inférieure à celle du derme d'une peau saine. Ces résultats confirment que la cicatrisation est en cours dans les premières étapes de guérison et de la préparation cellulaire [133].

Tandis que, les plaies du groupe témoin présentent une cicatrisation partielle avec une infiltration inflammatoire intense au niveau du tissu cicatriciel, une faible quantité de collagène accumulé et peu de néo vaisseaux. Ces critères histologiques sont considérés comme un signe de retard de guérison (Figure 3.29).

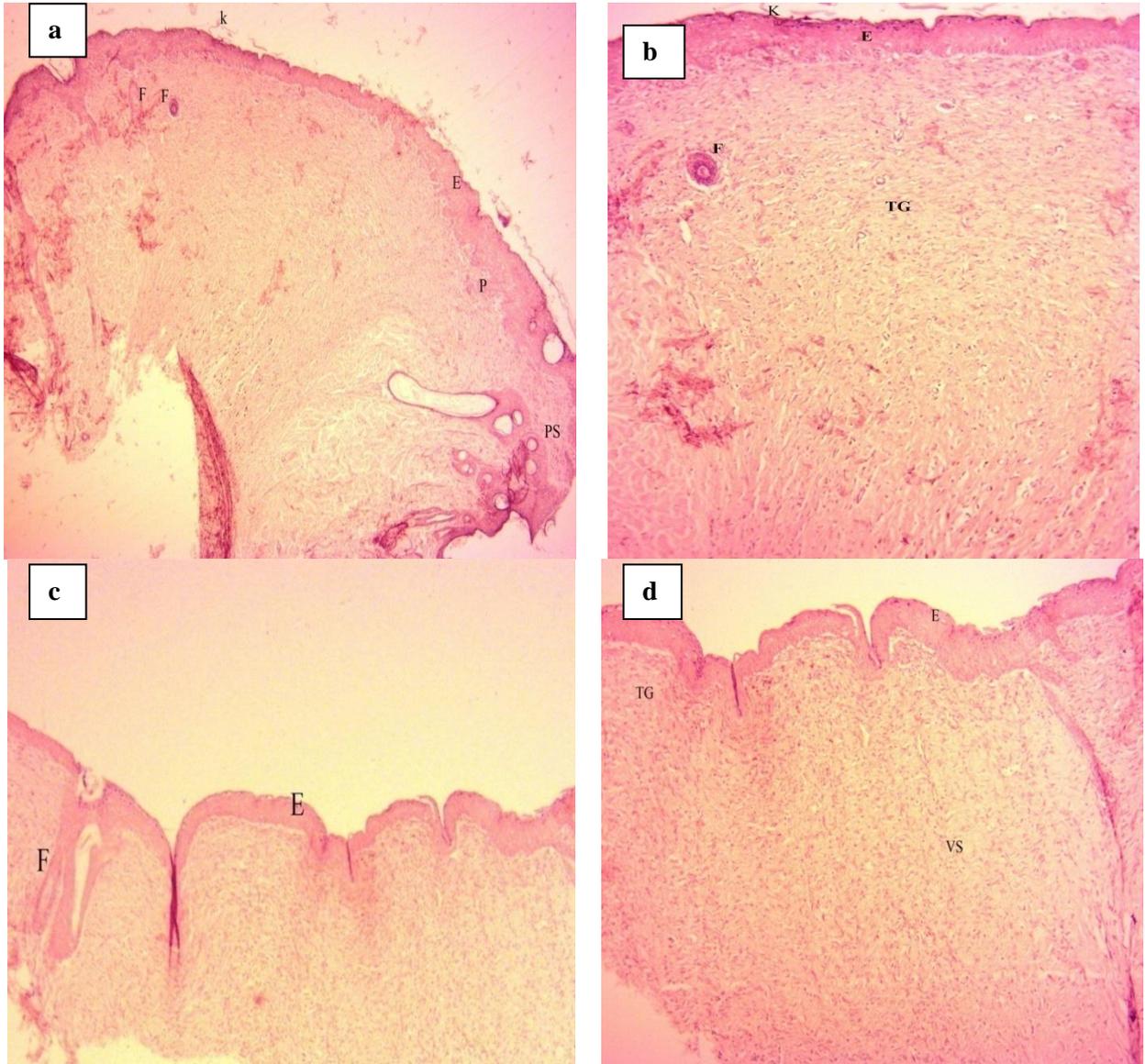


Figure 3. 26: Coupes histologiques des plaies d'excision traitées par les hydrogels à base d'huile essentielle des baies mûres de *J. oxycedrus* observées au microscope photonique (G: 40x et 100x H&E). **(a et b)**. Plaies traitées par l'hydrogel HGPG/HEM; **(c et d)**. Plaies traitées par l'hydrogel HGCR/HEM.E: Epiderme; PS: peau saine; K : kératine; P : Papille dermique; F : follicule pileux; TG : tissu de granulation; VS : Vaisseaux sanguins.

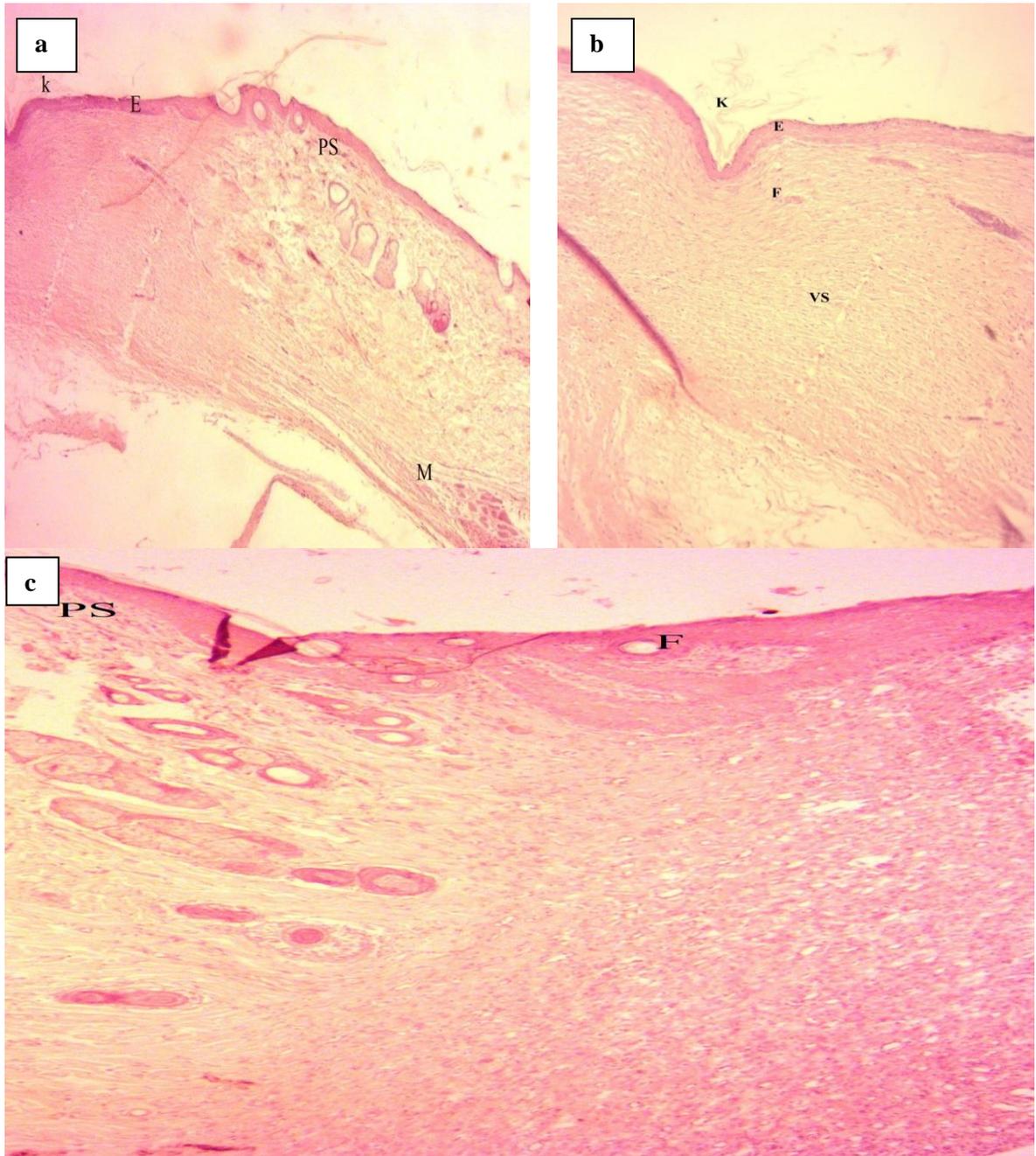


Figure 3.27 : Coupes histologiques des plaies d'excisions circulaires traitées par les hydrogels à base de l'huile essentielle des baies immatures de *J. oxycedrus* observées au microscope photonique (H&E). **(a et b)**. Plaies traitées par l'hydrogel HGPG/HEI (G: 4x et 10x); **c**. Plaies traitées par l'hydrogel HGCR/HEI (G:10x).E: Epiderme; PS: peau saine; K: kératine; P: Papille dermique; F: follicule pileux; TG: tissu de granulation; VS : Vaisseaux sanguins; M: Muscle

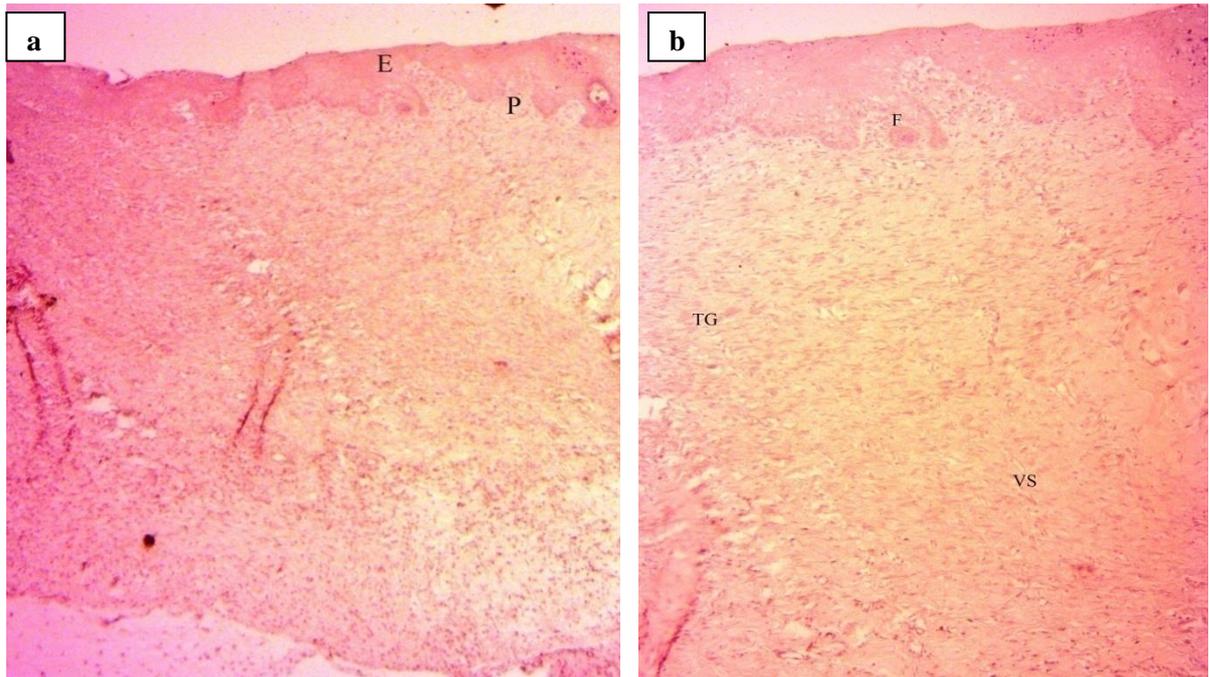


Figure 3.28 : Coupes histologiques des plaies d'excision traitées par le Madécassol® observées au microscope photonique (**a.** G: 40x et **b.** G:100x H&E). E: Epiderme; P: Papille dermique; F: follicule pileux; TG: tissu de granulation; VS : Vaisseaux sanguins.

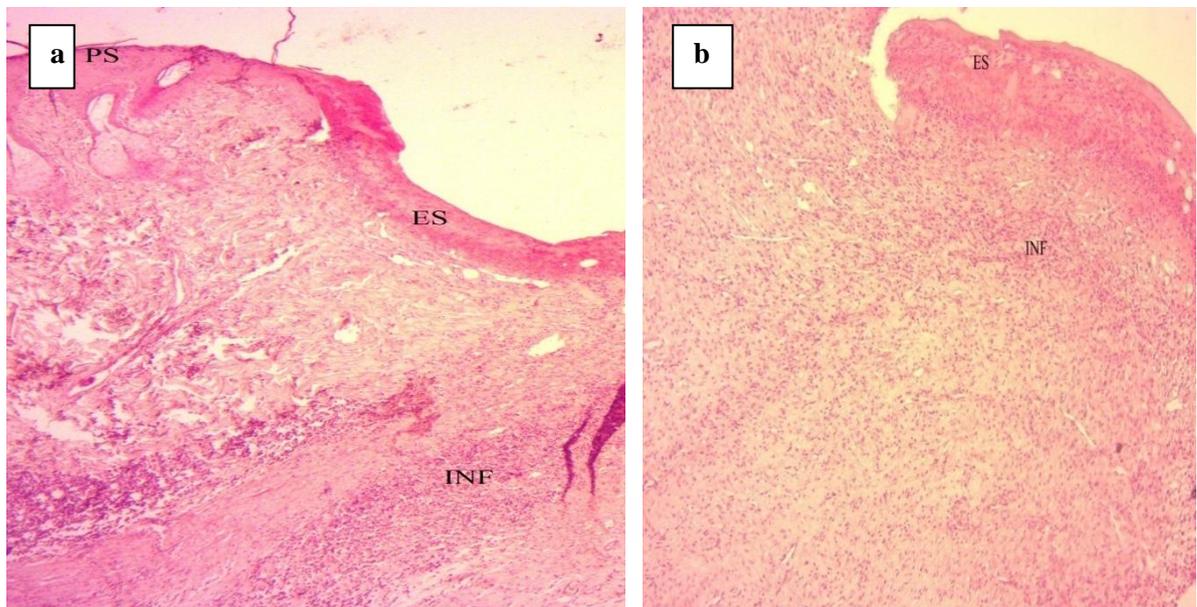


Figure 3.29 : Coupes histologiques des plaies du groupe témoin traité par l'hydrogel seul (HGC) observés au microscope photonique (**a.** G: 40x et **b.** G: 100x H&E), ces coupes montrent une cicatrisation incomplète avec des escarres et infiltration inflammatoire profonde.

L'analyse statistique par le test ANOVA suivi par le test post hoc Tukey a montré une différence très significative entre les groupes traités et le groupe témoin ($p < 0,001$).

c. Evaluation histologique des brûlures thermiques

Les résultats des scores histologiques obtenus par l'évaluation de la cicatrisation des plaies des brûlures thermiques sont représentés dans le tableau 3.19 :

Tableau 3.19: Résultats des scores histologiques des brûlures thermiques

| Traitement | Ré-E | Epais-Epi | Kérati- nisation | T.G | Remodelage | IE-C | Score |
|-------------------|-----------|------------|---------------------|-----------|------------|------------|-------------------|
| HGPG/HEI | 2,00±0,00 | 1,33±0,00* | 2,00±0,00 | 2,00±0,00 | 2,00±0,00* | 2,00±0,00* | 11,33±0,00 |
| HGCR/HEI | 2,00±0,00 | 1,66±0,57* | 2,00±0,00 | 2,00±0,00 | 2,00±0,00* | 2,00±0,00* | 11,66±0,00 |
| HGPG/HEM | 2,00±0,00 | 1,66±0,00* | 2,00±0,00 | 2,00±0,00 | 1,00±0,00* | 1,33±0,00* | 10,00±0,00 |
| HGCR/HEM | 2,00±0,00 | 1,66±0,00* | 2,00±0,00 | 2,00±0,00 | 1,00±0,00* | 1,66±0,00* | 10,33±0,57 |
| Madécassol | 2,00±0,00 | 1,33±0,00* | 2,00±0,00 | 2,00±0,00 | 1,33±0,00* | 1,66±0,00* | 10,33±0,00 |
| HG | 2,00±0,00 | 0,33±0,00 | 2,00±0,00 | 2,00±0,00 | 1,00±0,00 | 0,00±0,00 | 7,33±0,57 |

Chaque valeur représente la moyenne \pm Ecart-type ($n = 3$); IE-C : Indice d'élévation de la cicatrice; Re-E: Ré-épithélialisation d'épiderme; Epais-E: Epaisseur d'épiderme; T.G : Tissu de granulation; HGC : hydrogel de base; Score : La moyenne de six paramètres indépendants (chaque paramètre est évalué par une fourchette de 2 points), ou le score total maximum est de 12 points * $p \leq 0,01$ (comparé au groupe témoin)

D'après les résultats obtenus, tous les plaies présentent des scores identiques pour les paramètres suivants: la ré-épithélialisation, la kératinisation et le tissu de granulation. En effet, une re-épithélialisation complète a été observés de tous les plaies des différents groupes avec un degré de différenciation épidermique bien marqué. De plus, une kératinisation de la couche cornée et la

présence d'un tissu de granulation mature sont également notés (aucune différence significative n'a été enregistrée, $p > 0,05$). Néanmoins, une différence très significative ($p < 0,01$) a été enregistrée entre les groupes traités et le groupe témoin pour les restes des paramètres : l'épaisseur de l'épiderme, le remodelage et l'indice d'élévation de la cicatrice.

Les plaies traitées par les hydrogels à base de l'huile essentielle des baies immatures montrent les meilleurs scores histologiques de 11,33 à 11,66/12. En effet, ces plaies montrent une épaisseur épidermique de taille normale à légèrement hypertrophique par rapport une peau saine, ainsi qu'on note la présence des invaginations (papilles dermiques) caractéristiques d'un épithélium épidermique mature (Figure 3.30). Le tissu cicatriciel est riche en collagène mature avec la présence de tissu adipeux et des appendices cutanés, qui sont des principaux paramètres histologiques permettant la restauration et l'intégrité de la peau [169]. Ainsi que, l'épaisseur du derme est de taille normale par rapport l'épaisseur du derme d'une peau saine. Ces critères histologiques sont considérés comme des indicateurs clés de la bonne cicatrisation [169].

Les hydrogels à base de l'huile essentielle des baies mûres et le Madécassol® ont montrés un score de 10 à 10,33/12, avec un épiderme légèrement hypertrophique (score de 1,33 à 1,66) et un derme hypertrophique, ce qui est considéré comme un indicateur d'une production excessive de collagène. Aussi, on note la présence de quelques follicules pileux. Ces résultats signifient que le processus de cicatrisation est encours dans les derniers stades de maturation (Figure 3.31 et Figure 3.32).

Tandis que, le score le plus faible (7,33/12) a été enregistré par les plaies du groupe témoin traitées par l'hydrogel seul (HG) avec un épiderme hypotrophique par rapport à l'épiderme d'une peau saine et un derme hypotrophique, dépourvu de tous appendices cutanés. Ces résultats pourraient être justifiés par une cicatrisation dans ses premières étapes de maturation. (Figure 3.33).

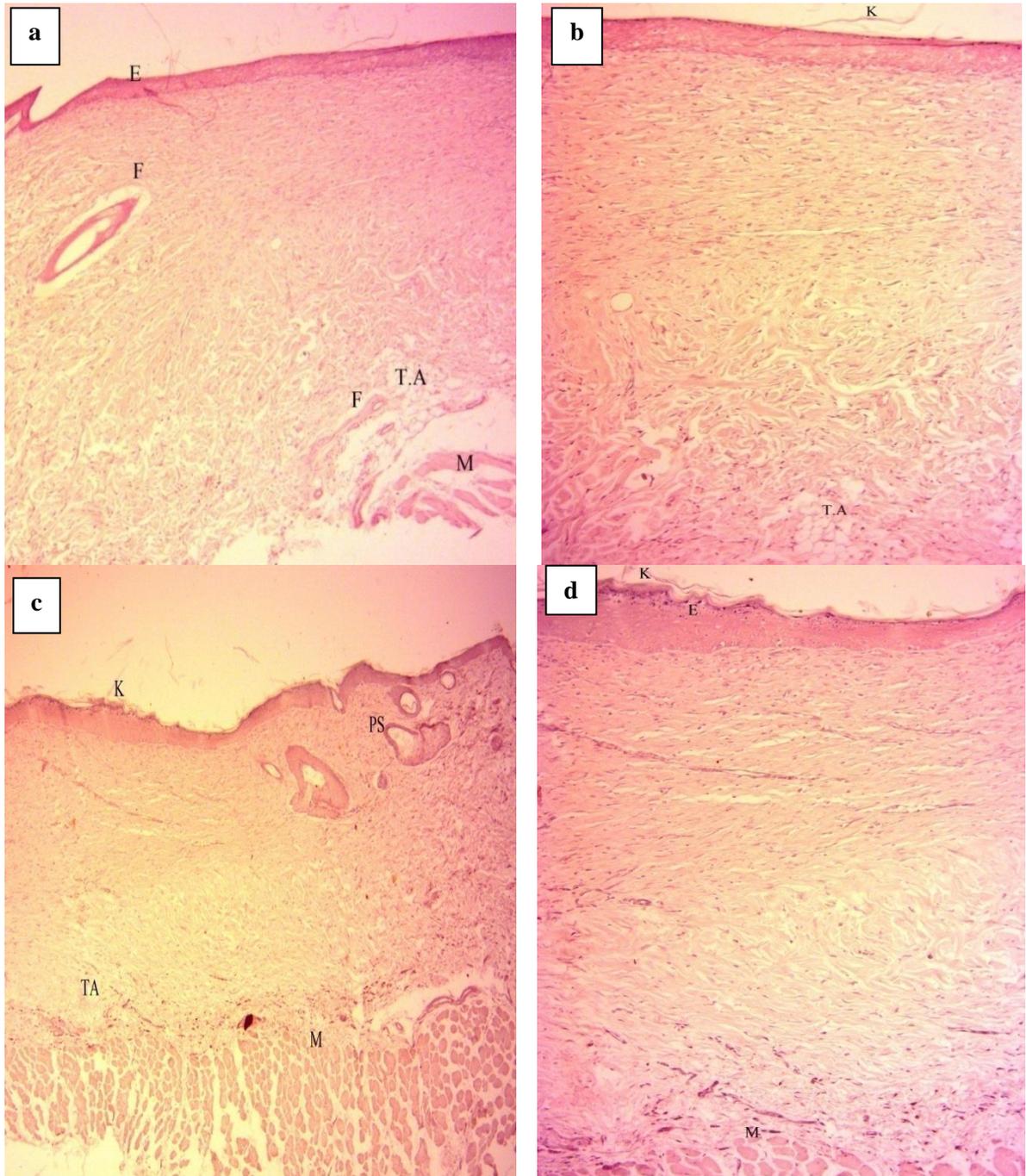


Figure 3.30 : Coupes histologiques des plaies brûlées traitées par les hydrogels à base d'huile essentielle des baies immatures de *J. oxycedrus* observés au microscope photonique (G : 40x et 100x) ; **(a et b)**. Plaies traitées par l'hydrogel HGPG/HEI; **(c et d)**. Plaies traitées par l'hydrogel HGCR/HEI. E: Epiderme; PS: peau saine; K : kératine; F : follicule pileux; TA : tissu adipeux; M : Muscle.

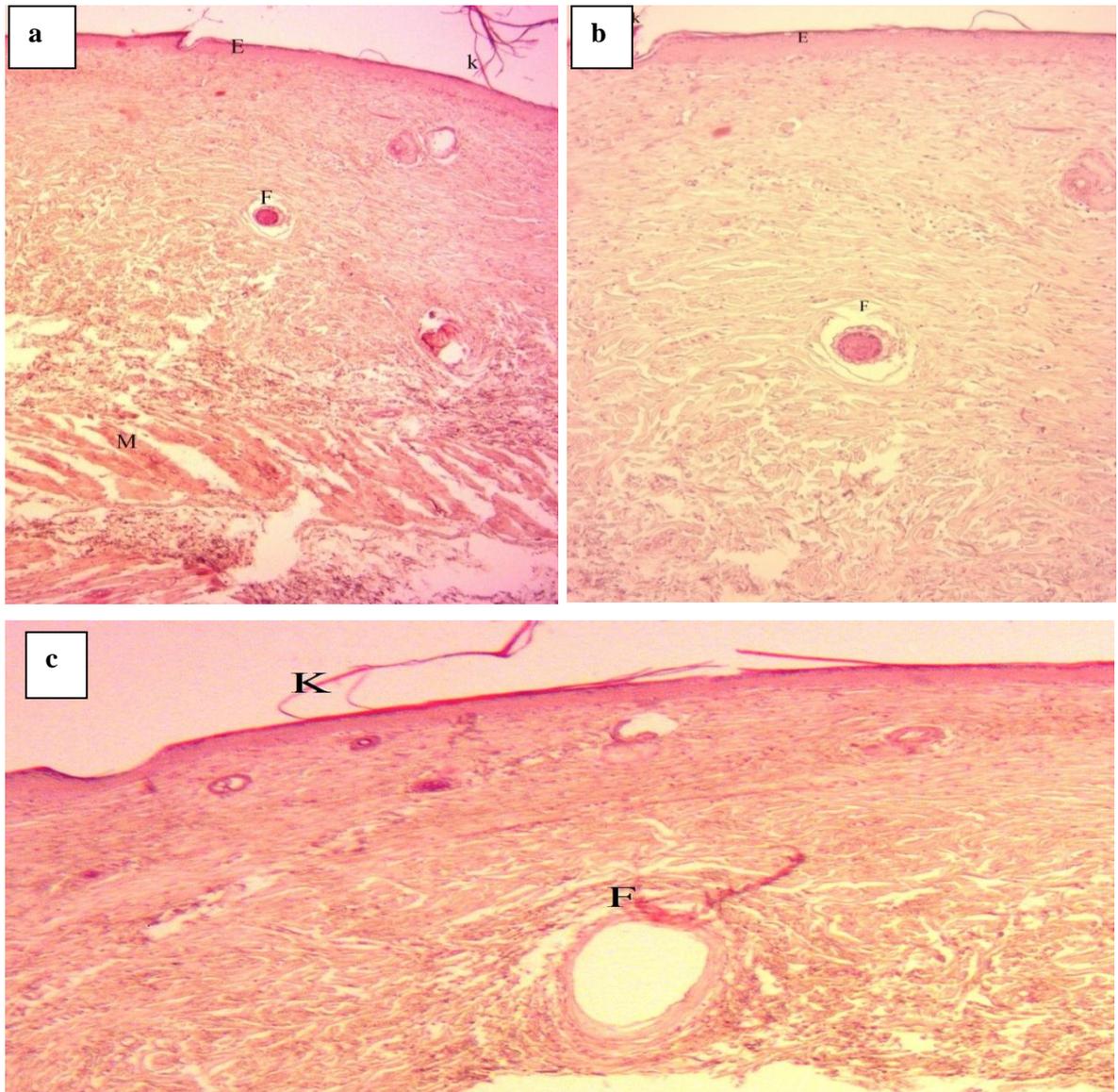


Figure 3.31 : Coupes histologiques des plaies brûlées traitées par les hydrogels à base d'huile essentielle des baies mûres de *J. oxycedrus* observés au microscope optique (G : 40x et 100x). **(a et b)**. Plaies traitées par l'hydrogel HGPG/HEM; **c**. Plaie traitée par l'hydrogel HGCR/HEM (G: 10x). E. Epiderme; K. kératine; F. follicule pileux; M: Muscle.

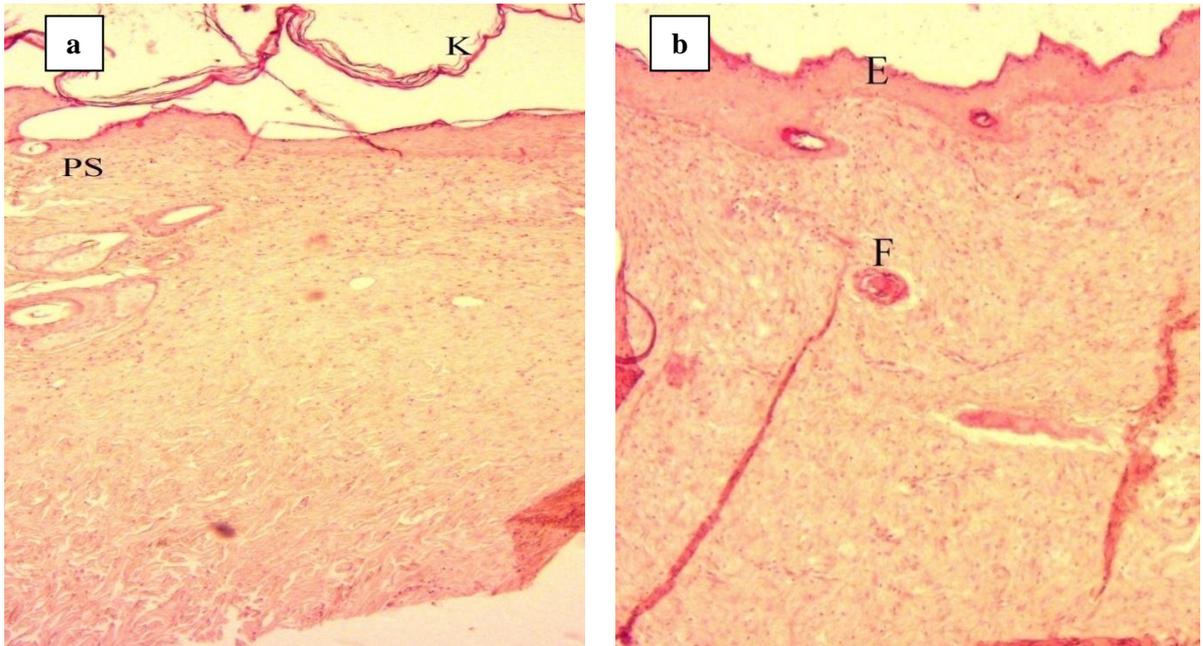


Figure 3.32: Coupes histologiques des plaies brûlées traitées par le Madécassol® observées au microscope photonique (**a.** G: 40x et **b.** G : 100x HE). E: Epiderme; K: Kératine; PS: Peau saine; F: Follicule pileux.

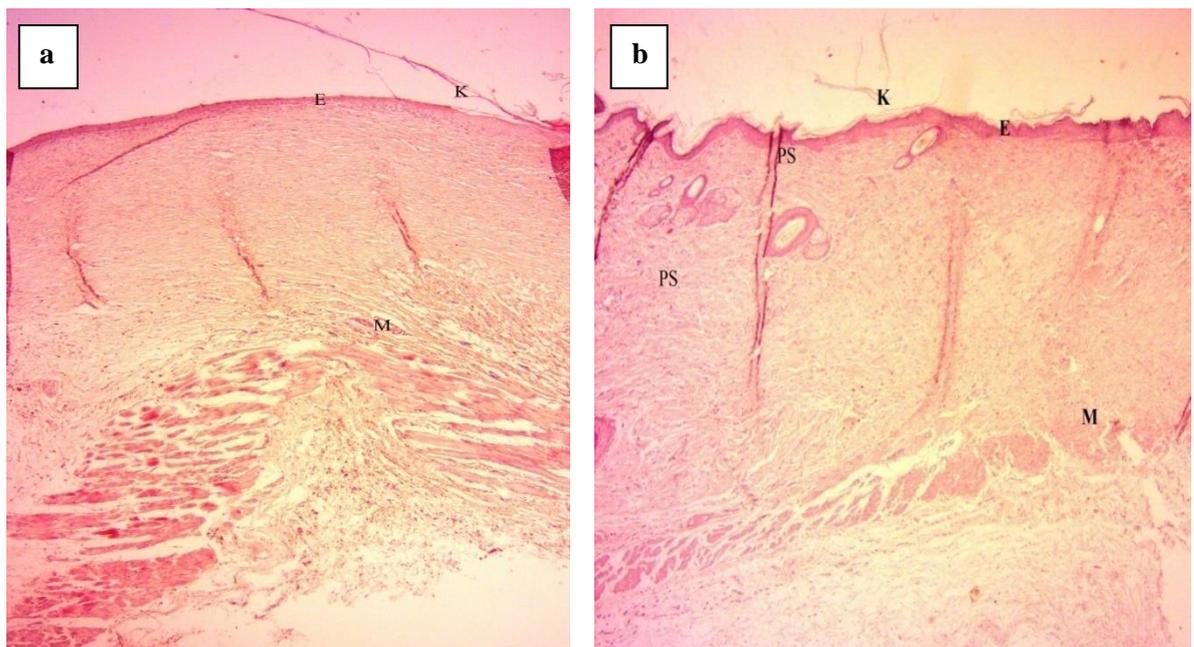


Figure 3.33: Coupes histologiques des plaies brûlées du groupe témoin traitées par l'hydrogel seul (HG) observés au microscope photonique ; (**a et b.** G: 4x HE). M: Muscle; E: Epiderme; K: Kératine; PS: Peau saine.

L'analyse statistique par le test ANOVA suivi par le test post hoc Tukey, nous a permis de comparer les scores des coupes histologiques, où les meilleurs score

obtenus sont ceux des hydrogels à base de l'huile essentielle des baies immatures, suivi par l'hydrogel à base de l'huile essentielle des baies mûres.

Les résultats de cette partie d'étude montrent l'efficacité des hydrogels formulés à base des huiles essentielles de *J. oxycedrus* (0,3%) dans le traitement des différents types des plaies (incision, excision et brûlures thermique) par l'accélération du processus de cicatrisation et l'optimisation de la réparation cutanée. Ces résultats obtenus peuvent être justifié non seulement aux propriétés biologiques antimicrobienne, anti-oxydante, anti-inflammatoire et cicatrisante des huiles essentielles de Genévrier oxycèdre, mais aussi aux avantages de l'utilisation du gel (hydrogel) comme un système d'administration des principes actifs très utile et convenable pour les plaies (un environnement humide et une meilleure absorption des exsudats).

Une étude similaire menée par Tumen et *al.*,(2012) [24], sur les huiles essentielles des baies du genre *Cupressus* et *Juniperus* de Turquie, pour tester leur effet cicatrisant *in vivo* par l'induction des plaies d'excision circulaire et des plaies d'incision linéaire. Les résultats ont montrés que seules les huiles essentielles de *Juniperus oxycedrus* et *Juniperus phœnicea* ont un effet cicatrisant et anti-inflammatoire significatifs. Une autre étude récente effectuée en Arabie saoudite sur l'utilisation d'un pansement à application topique sous forme d'une nanoparticule d'argent (AgNPs) à base de l'extrait aqueux de *Juniperus excelsa* en combinaison avec des antibiotiques pour traiter les plaies infectées par des bactéries multi-résistantes chez les diabétiques. Les résultats montrent que ce pansement a inhibé toutes les bactéries MR isolées.

Nombreuses études sont effectuées sur l'utilisation des huiles essentielles en dermatologie comme produits cicatrisants. En particulier, l'alpha pinène du groupe de monoterpènes, qui est considéré comme une molécule thérapeutique prometteuse grâce à ces propriétés pharmacologiques et biologiques [203], [205]. Salas et *al.*, (2021) [205], ont trouvés que l' α pinène et l' α phellandrène favorisent la migration des fibroblastes vers le site endommagé et les rendent actifs par la production du collagène, qui aboutit à l'accélération de contraction des plaies. En outre, Ozbek et *al.*, (2017) [203], ont trouvé que l' alpha pinène montre une activité anti-inflammatoire intéressante à une dose de 0,5ml/kg.

D'après ces travaux les huiles essentielles du genre *Juniperus* ont un pouvoir cicatrisant intéressant par l'accélération de la contraction des plaies et l'inhibition de la croissance microbienne.

CONCLUSION

Les travaux de cette thèse s'articulent autour de la valorisation des vertus thérapeutiques de *Juniperus oxycedrus* L. arbrisseau dioïque largement utilisé comme agent antimicrobien et cicatrisant en dermatologie humaine et vétérinaire dans les soins traditionnels.

Cette étude a porté sur deux volets, le premier concernait l'étude microscopique de *J. oxycedrus*, l'extraction, ainsi que la caractérisation phytochimique des huiles essentielles et le deuxième volet traitait l'évaluation de certaines propriétés biologiques et pharmacologiques.

L'étude microscopique de baies mûres et immatures de *J. oxycedrus* a montré la structure sécrétrice des huiles essentielles sous forme de poches schizogènes.

Les résultats de l'analyse chimique de la composition des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG/MS) ont permis d'identifier 49 composés dont 30 composés pour l'huile essentielle des baies mûres et 45 composés pour l'huile essentielle des baies immatures correspondant respectivement à 99,99% et 99,98% de l'ensemble des constituants contenus dans les huiles essentielles. Les deux huiles essentielles des baies mûres et immatures sont riches en monoterpènes hydrocarbonés avec un pourcentage de 75,40% et de 52,36%, respectivement. L'alpha Pinène (56,39%, 52,36%); le Germacrène D (14,21%, 21,25%); le β -Myrcène (10,39%, 8,44%) et le δ -Cadinène (2,09%, 4,57%) apparaissent comme des constituants majoritaires commun pour les deux huiles essentielles des baies mûres et immatures, mais avec différences dans les proportions.

Cette étude a permis la formulation d'hydrogels à base des huiles essentielles de Genévrier oxycède (0,3%) comme agent cicatrisant des plaies. Ainsi, ces formulations présentent des propriétés rhéologiques spécifiques adaptées à une application topique. Des hydrogels topiques à base de Carbopol® ultrèz 10 comme agent gélifiant contenant des émulsifiants (surfactant et des co-surfactants) et des huiles essentielles comme principes actifs ont été développés

avec succès. Les résultats rhéologiques montrent que ces hydrogels obtenus sont homogènes et présentent des comportements rhéofluidants de type pseudo-plastique exprimés par le test d'écoulement, une faible viscosité ainsi qu'un pH adapté à la peau. Ces propriétés permettent aux hydrogels formulés de traverser facilement les couches de la peau et de libérer leurs contenus en principes actifs (huile essentielle) sans l'excès de frottement et avec une faible force d'application. De plus, les tests de la stabilité et les contrôles microbiologiques des hydrogels ont révélé une bonne stabilité et une conformité microbiologique.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles du Genévrier oxycèdre a été testée par la méthode de diffusion en milieu solide vis-à-vis des souches standardisées et des souches multi-résistantes isolées des plaies infectées chez les brûlés au niveau du Centre Hospitalo-universitaire (CHU) de Douéra (Alger). La première étape consistait à évaluer l'incidence et la prévalence des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques responsables des infections des plaies chez les patients brûlés pour entamer dans une seconde étape, l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis des souches multi-résistantes.

Les résultats de l'écouvillonnage cutané chez les brûlés sont montrés que les bactéries Gram négatif sont les plus dominantes par rapport aux bactéries Gram positif avec une fréquence d'isolement de 53% et de 47%, respectivement. *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus dominante avec un pourcentage de 35,29%, suivi par *Pseudomonas aeruginosa* (17,64%) et *Proteus mirabilis* (14,70%). Les deux bactéries *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus epidermidis* sont représentées avec un taux de 11,76% et *Acinetobacter baumannii* avec un taux de 6,67%.

Des taux alarmants de la multi-résistance bactérienne ont été enregistrés pour l'ensemble des souches isolées. Une résistante modérée à l'Imipénème de *S. aureus* (40%) a été enregistrée. Ainsi, ces souches ont montré une fréquence de résistance élevée à la méticilline (SARM) estimée à 58,33%. Parmi les bactéries Gram négatif, les souches de *Klebsiella pneumoniae* ont présenté un niveau élevé de résistance qui varie entre 80% et 100% au Céfixime et à la Gentamicine, respectivement. Tandis que, *Proteus mirabilis* a montré une résistante totale à la Triméthoprim-Sulfaméthoxazole et à la Tétracycline (100%).

La recherche phénotypique d'entérobactéries productrices de BLSE a permis de révéler un taux de 50% pour les souches de *K. pneumoniae* et un faible taux de 20% pour les souches *P. mirabilis*. Les taux de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à l'Imipénème, à l'Amikacine, à la Tétracycline, à la Cefixime et à l'Acide Fusidique étaient très élevés, avec un pourcentage de plus de 75%. Les souches de *Acinetobacter baumannii*, ont montré une résistance totale de 100% vis-à-vis de la Ciprofloxacine, de la Gentamicine, de l'Imipénème, et au Chloramphénicol. Nous avons enregistré un taux élevé des phénotypes de production des BLSE⁺ pour *P. aeruginosa* (60%). Tandis qu'aucune souche BLSE n'a été détectée chez *A. baumannii* (BLSE⁻).

L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* montrent que les huiles essentielles des baies matures et immatures de *J. oxycedrus* ont exercé un pouvoir inhibiteur élevé sur la totalité des souches de référence et les souches multi-résistantes. Cependant, les zones d'inhibition varient en fonction du germe et de la concentration de l'huile essentielle testée.

L'étude du pouvoir anti-radicalaire par le test de DDPH, a dévoilé que les huiles essentielles de *J. oxycedrus* possèdent une forte activité anti-oxydante représentée par des IC₅₀ très intéressantes de IC₅₀ = 4,24 ± 0,03 µg/ml et IC₅₀ = 4,04 ± 0,05 µg/ml pour l'huile essentielle des baies immatures et l'huile essentielle des baies mûres, respectivement, mais ces résultats sont inférieurs à ceux de l'acide ascorbique avec IC₅₀ = 2,40 ± 0,022 µg/ml.

Sur le plan pharmaco-toxicologique, les résultats des tests *in vivo* sont effectués afin d'évaluer l'irritabilité cutanée et de déterminer l'activité anti-inflammatoire et cicatrisante des hydrogels formulés, ont montré que les hydrogels à base des huiles essentielles de *J. oxycedrus* à une concentration de 0,3%, sont non irritants et peuvent être utilisés en toute sécurité. Le pouvoir anti-inflammatoire des hydrogels à base d'huile essentielle des baies immatures a dévoilé une action très positive sur la réduction des œdèmes avec un pourcentage d'inhibition d'inflammation important de 59,33% et de 60,33%. Tandis que, les hydrogels à base de l'huile essentielle des baies matures montrent un résultat proche à celui obtenu par le produit anti-inflammatoire commercialisé, le gel Diclofenac de Sodium à 1% avec une réduction de 56,01% et 56,50%, respectivement.

De même, cette étude a permis la mise en évidence de l'effet cicatrisant puissant des hydrogels à base des huiles essentielles de Genévrier oxycèdre (0,3%) sur les trois types de plaies (incisions linéaires, excisions circulaires et brûlure thermique) chez le rat.

Les résultats des examens macroscopiques du processus cicatriciel des incisions linéaires selon l'outil d'évaluation des plaies de Bates-Jensen (BWAT) et les examens microscopiques ont confirmé que les groupes traités par les hydrogels à base des huiles essentielles et le groupe traité par le produit de référence Madécassol® (1%) ont cicatrisé de façon semblable, avec une légère avancée enregistrée par les groupes traités par les hydrogels à base des huiles essentielles contenant le Cremophor® RH40 (F2 et F4).

L'évaluation de l'effet cicatrisant des hydrogels à base des huiles essentielles de Genévrier oxycèdre testés sur les plaies des excisions circulaires chez le rat, a montré que le groupe traité par l'hydrogel à base d'huile essentielle des baies immatures contenant le cremophor® RH40 (HGCR/HEI) possède un excellent pouvoir cicatrisant par une cicatrisation presque complète au 11^{ème} jour post-excision. Tandis que, les groupes traités restant ont montré une cicatrisation complète le 12^{ème} jour post-excision.

L'étude de l'effet cicatrisant des hydrogels à base des huiles essentielles de Genévrier oxycèdre sur les plaies des brûlures thermiques chez les rats, a dévoilé une action cicatrisante très importante par les hydrogels à base d'huile essentielle des baies immatures (HGCR/HEI et HGPG/HEI) où la cicatrisation était quasi complète au bout de 21 jours post-brûlure. Tandis qu'un retard de cicatrisation (deux à trois jours) a été enregistré pour le reste des groupes. Ce résultat a été confirmé par l'étude microscopique où les meilleurs scores histologique sont été obtenus (11,66/12 et 11,33/12) par ces groupes traités par les hydrogels à base de l'huile essentielle des baies immatures (HGCR/HEI et HGPG/HEI) respectivement.

Ces hydrogels formulés présentent des propriétés pharmacologiques et biologiques très intéressantes dans la cicatrisation des plaies. Les résultats de cette étude ouvrent la voie à de nouvelles perspectives dans le domaine de leur exploitation dans l'industrie pharmaceutique.

Cette étude mérite d'être poursuivie et détaillée par rapport à quelques points :

- Evaluation de la stabilité physique des hydrogels.
- Des essais cliniques pour confirmer l'efficacité de ces hydrogels comme un traitement cicatrisant apparaissent nécessaires.
- Etude des mécanismes d'action des huiles essentielles et l'optimisation de la formulation pour une meilleure efficacité thérapeutique.
- Enfin, il est souhaitable de prévaloir ce produit sur le plan économique.

APPENDICE A

LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

| | |
|----------------|---|
| AFNOR | : Association Française de Normalisation |
| ATCC : | : American Type Culture Collection (catalogue de microorganismes) |
| BMR | : Bactéries multi-résistantes |
| CGSM | : Chromatographie en phase Gazeuse couplée au Spectromètre de Masse |
| CR | : Cremophor RH40 |
| °C | : Degrés Celsius |
| DO | : Densité optique |
| HE | : Huile essentielle |
| HG | : Hydrogel |
| HEI | : Huile essentielle des baies immatures |
| HEM | : Huile essentielle des baies mures (mûres) |
| Kg | : Kilogramme |
| PG | : Propylène glycol |
| cm | : centimètre |
| g | : gramme |
| mm | : millimètre |
| mn | : minute |
| ml | : millilitre |
| nm | : nanomètre |
| η app: | : Viscosité apparente |
| μ l | : microlitre |
| $\dot{\gamma}$ | : Vitesse de cisaillement |

APPENDICE B

APPAREILLAGE, VERRERIE ET CONSOMMABLES

1. Liste des appareillages

- Agitateur magnétique
- Balance de précision
- Bec bunsen
- Bain marie
- Chauffe ballon
- Chromatographe en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse
- Etuve bactériologique
- Etuve d'incubation
- Hydrodistillateur type Clevenger
- Microscope photonique
- Microtome
- Plaque chauffante
- Réfrigérant
- Rhéomètre
- Spectrophotomètre UV-Visible
- Vortex

2. Liste de la verrerie et consommables

- Aiguille et fil chirurgical
- Ampoule à décanté
- Anse de platine
- Béchers 50ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml
- Boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre
- Cassettes
- Disques d'antibiogrammes (Standard positif) et stériles de 6mm de diamètre
- Ecouvillons Stériles
- Erlen mayer 100 ml, 250 ml
- Galeries biochimiques (Api Staph, Api 20 E et Api 20 NE)
- Gants
- Lames de rasoir
- Lames en verre et lamelles
- Micropipettes
- Moules métalliques
- Pincés
- Pipettes graduées stériles
- Seringues (1ml, 5 ml et 10 ml)
- Tubes à essai

3. Liste des réactifs

- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH+)
- Acétone
- Acide ascorbique

- Alcools (85°,95°et 100°)
- Bouillon nutritif (BN)
- Carbopol ultrèz 10
- Calmivet® (Acepromazine 0,5%)
- CremophorRH40
- Diméthylsulfoxyde (DMSO)
- Eau de Javel à 12°
- Eau distillée
- Eau physiologique 0,9%
- Ethanol
- Formol 10%
- Fushine
- Gélose Mueller Hinton (GMH)
- Gélose nutritive (GN)
- Glycérol
- Hematoxylène
- Huile de croton
- Huile de paraffine
- Madécassol® (Hydrocotyle 1%)
- Milieux de cultures (Cétrimide, Chapman, Mac Conkey, Gélosé aux peptones de caséine et de soja et gélose au sang frais et cuit)
- Paraffine
- Propylène Glycol
- Tocophérol
- Vert de méthyle

APPENDICE C

CONDITIONS OPERATOIRES DU GCMS

1. Injecteur

Température 250°C

Mode d'injection : Split.1 ; 20

Volume injecté : 0,2 µl

2. Colonne

Type : HP-5MS

Dimensions : long 30 m * D int 0.25 mm * épaisseur film 0.25 µm

Phase stationnaire : 5% Phényl95% diméthylpolysiloxane. (Autre : Spécifier)

3. Température du four

Température est 60°C pendant 8min, 2°C/min jusqu'à 250°C., isotherme pendant 10 min.

Durée d'analyse : 113 min

Gaz vecteur : Hélium pureté : N6.0; Débit GV : 0.5 ml/min.

4. Détecteur de masse

Mode d'analyse : Scan TIC (de 30 à 550)

Délai du solvant : 3.5min

Température de l'interface : 280 °c

Type d'ionisation : Impact électronique

Intensité du filament : 70 év

Type de l'analyseur de masse : Quadripôles

Température de la source : 230 °c

5. Equipement

Chromatographe : Hewlett Packard Agilent 6890 plus ; Spectromètre de masse : Hewlett Packard Agilent 5973.



APPENDICE D

Teneur en eau et rendement en huile essentielle

1. Teneur en eau des baies mûres de *Juniperus oxycedrus* L.

| Essai | PF (mg) | PS (mg) | Teneur en eau (%) |
|------------|---------|---------|-------------------|
| Essai 1 | 100,09 | 89,13 | 10,96 |
| Essai 2 | 100,00 | 89,14 | 10,86 |
| Essai 3 | 100,10 | 89,34 | 10,76 |
| Moyenne | 100,063 | 89,203 | 10,86 |
| Ecart-type | 0,05 | 0,11 | 0,10 |

PF : Poids de la plante fraîche, **PS** : Poids de la plante sèche.

2. Teneur en eau des baies immatures de *Juniperus oxycedrus* L.

| Essai | PF (mg) | PS (mg) | Teneur en eau (%) |
|------------|---------|----------|-------------------|
| Essai 1 | 99,98 | 49,79 | 50,2001 |
| Essai 2 | 100,01 | 49,79 | 50,2149 |
| Essai 3 | 100,00 | 50,39 | 50,6010 |
| moyenne | 99,9966 | 49,65633 | 50,3420 |
| écart-type | 0,015 | 0,222 | 0,22 |

PF : Poids de la plante fraîche, **PS** : Poids de la plante sèche

3. Rendement en huile essentielle des baies mûres de *J. oxycedrus* L.

| Essai | P_F (g) | P_{HE} (g) | Rendement en HE (%) |
|--------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Essai 1 | 100,00 | 1,001 | 1,00 |
| Essai 2 | 100,01 | 0,937 | 0,93 |
| Essai 3 | 100,00 | 1,077 | 1,07 |
| moyenne | 100, | 1,005 | 1,005 |
| écart-type | 0,005 | 0,0700 | 0,0701 |

P_F: Poids frais; **P_{HE}**: Poids d'huile essentielle ; HE : Huile essentielle

4. Rendement en huile essentielles des baies immatures de *J. oxycedrus* L.

| Essai | P_F (g) | P_{HE} (g) | Rendement en H(%) |
|--------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Essai 1 | 100,02 | 1,21 | 1,2097 |
| Essai 2 | 100,07 | 1,19 | 1,1894 |
| Essai 3 | 99,96 | 1,22 | 1,2207 |
| moyenne | 100,016 | 1,2066 | 1,2066 |
| écart-type | 0,056 | 0,0152 | 0,0158 |

P_F: Poids frais; **P_{HE}**: Poids d'huile essentielle ; HE : Huile essentielle

APPENDICE E

Antibiogramme des souches isolées des plaies chez les brûlés

1. Résultat de l'antibiogramme de la souche isolat *S. épidermidis*



Laboratoire d'Analyses Médicales
Dr RAS EL DJEBEL Youcef
Pharmacien Biologiste
Ancien Chef De Service Des Laboratoires Militaires

N°0055

Médecin Prescripteur : _____ Date : 6/15/2020
Nom: _____
Prénom: _____
Age: 45 ans

MICROBIOLOGIE

| | Résultats | Unités | Valeurs de référence |
|---|---|--------|----------------------|
| ETUDE CYTO-BACTERIOLOGIQUE DE PUS | | | |
| EXAMEN MACROSCOPIQUE | écouvillonnage purulent(genou gauche) écouvill | | |
| EXAMEN MICROSCOPIQUE | . | | |
| - LEUCOCYTES : | Présence | | |
| - BACTERIES : | Présence | | |
| CULTURE | Positive | | |
| GERME IDENTIFIER | Staphylococcus epidermidis Staphyloc | | |
| Antibiogramme Staphylocoque | | | |
| Antibiogramme staphylocoque | | | |
| Penicilline | résistant | | |
| Teicoplanine (Targocid) | Sensible | | |
| Tetracycline | Sensible | | |
| Rifamycine | Sensible | | |
| Ac fusidique (fusidine) | Résistant | | |
| Prestinamycine (pyostacine) | Sensible | | |
| Amikacine | Résistant | | |
| Sulfamide +trimethoprim (Bactrim) | Résistant | | |
| Ofloxacin (Ofloset) | Résistant | | |
| Chloramphénicol | Résistant | | |
| Oxacelline | Résistant | | |
| Céfoxitine | Résistant | | |
| Gentamycine | Résistant | | |
| Clindamycine | Résistant | | |
| Erytromycine | Résistant | | |
| kanamycine | Résistant | | |
| Vancomycine | Sensible | | |
| Fosfomycine | Résistant | | |

2. Résultat de l'antibiogramme de la souche *Acinetobacter*

 **Laboratoire d'Analyses Medicales**
 Dr RAS EL DJEBEL Youcef
Pharmacien Biologiste
Ancien Chef De Service Des Laboratoires Militaires

Medecin Prescripteur : _____ N°0577

Date : 20/02/2020
 Nom: [REDACTED]
 Prénom: [REDACTED]
 Age: 18 ans

MICROBIOLOGIE

| | Résultats | Unités | Valeurs de référence | Antériorités |
|--|-------------------------|--------|----------------------|--------------|
| EXAMEN MACROSCOPIQUE | Ecouvillonnage purulent | | | |
| EXAMEN MICROSCOPIQUE | | | | |
| - LEUCOCYTES : | Présence des PN | | | |
| - BACTERIES : | Présence | | | |
| CULTURE | Positive | | | |
| GERME IDENTIFIER | Acinetobacter sp | | | |
| ANTIBIOGRAMME PSEUDOMENAS + ACINETOBACTER | | | | |
| Antibiogramme | | | | |
| IMIPENEME | Résistant | | | |
| CHLORAMPHINICOL | Résistant | | | |
| GENTAMYCINE 10µG | Résistant | | | |
| AMIKACINE | Résistant | | | |
| COLISTINE | Sensible | | | |
| CEFTAZIDIME | Résistant | | | |
| RIFAMPYCINE | Résistant | | | |
| TICARCILINE | Résistant | | | |
| TICARCILLINE +AC CLAVULANIQUE | Résistant | | | |
| PIPERACILLINE 100µG | Résistant | | | |
| TOBRAMYCINE 10µG | Résistant | | | |
| NETILMICINE | Résistant | | | |
| CIPROFLOXACINE 5µG | Résistant | | | |
| LEVOFLOXACINE 5µG | Sensible | | | |
| FOSFOMYCINE 200µG | Résistant | | | |



LABORATOIRE D'ANALYSE MEDICALE
 Tel: 023 32 89 16
 Y. RAS EL DJEBEL
 01, Rue des Freres Larichaoui
 Douéra - ALGER
 Agrement : 5848

LABORATOIRE D'ANALYSE MEDICALE Douéra (En face l'Hopital acoté de la polyclinique)
 01, RUE LAICHAOUI Douéra

3. Résultat de l'antibiogramme de la souche isolat *P. aeruginosa*



Laboratoire d'Analyses Medicales
 Dr RAS EL DJEBEL Youcef
Pharmacien Biologiste
Ancien Chef De Service Des Laboratoires Militaires

Médecin Prescripteur :

N°0220

Date : 05/05/2020
 Nom : [REDACTED]
 Prénom : A. [REDACTED]
 Age: 26 ans

MICROBIOLOGIE

| | Résultats | Unités | Valeurs de référence | Antériorités |
|--|-------------------------|--------|----------------------|--------------|
| ETUDE CYTO-BACTERIOLOGIQUE DE PUS | | | | |
| EXAMEN MACROSCOPIQUE | Ecouvillonnage purulent | | | |
| EXAMEN MICROSCOPIQUE | | | | |
| - LEUCOCYTES : | Présence des PN | | | |
| - BACTERIES : | Présence | | | |
| CULTURE | Positive | | | |
| GERME IDENTIFIER | Pseudomonas aeruginosa | | | |
| ANTIBIOGRAMME PSEUDOMENAS + ACINETOBACTER | | | | |
| Antibiogramme : | | | | |
| IMIPENEME | Résistant | | | |
| CHLORAMPHINICOL | Résistant | | | |
| GENTAMYCINE 10µG | Résistant | | | |
| AMIKACINE | Résistant | | | |
| COLISTINE | Sensible | | | |
| CEFTAZIDIME | Résistant | | | |
| RIFAMPYCINE | Résistant | | | |
| TICARCILINE | Résistant | | | |
| TICARCILLINE +AC CLAVULANIQUE | Résistant | | | |
| PIPERACILLINE 100µG | Résistant | | | |
| TOBRAMYCINE 10µG | Résistant | | | |
| NETILMICINE | Résistant | | | |
| CIPROFLOXACINE 5µG | Sensible | | | |
| LEVOFLOXACINE 5µG | Sensible | | | |
| FOSFOMYCINE 200µG | Résistant | | | |

Adresse : 01. RUE LAICHAOUI Douéra (En face l'Hopital acoté de la polyclinique)

APPENDICE F

ETUDE STATISTIQUE

1. Rendement en huile essentielle

Test de Student

| Table t test | HEI Vs. HEM |
|---------------------------|-------------|
| Valeur de P | 0,0494 |
| Résumé | * |
| Signification (P < 0,05)? | Oui |

La différence moyenne est significative au niveau 0,05; Une différence significative entre le rendement de l'huile essentielle des baies immatures et celui de l'huile essentielle des baies mûres.

2. Activité antimicrobienne

2.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis la souche *S. aureus*

ATCC 25923

| Test | Somme des carrées | Ddl | Moyenne des carrées | F | Valeur de P |
|--------------------------------|-------------------|-----|---------------------|------------------|-------------|
| ANOVA | | | | | |
| Traitement (entre les groupes) | 84,25 | 3 | 28,08 | F (3, 8) = 50,92 | P<0,0001 |
| (intra- groupes) | 4,412 | 8 | 0,5515 | | |
| Total | 88,66 | 11 | | | |

La différence moyenne est significative au niveau 0,05 ; (p<0,0001) : L'hypothèse H0 est fortement rejetée, donc les HEs testées ont un effet antibactérien

Tests Post Hoc

Comparaisons multiples (Tukey)

| Test de comparaisons multiples | Diff. Moyenne | 95.00% CI of diff. | Signification | Résumé | Valeur de P | |
|--------------------------------|---------------|--------------------|---------------|--------|-------------|-----|
| HEM p vs. HEI p | 3,150 | 1,208 à 5,092 | Oui | ** | 0,0037 | A-B |
| HEM p vs. D1HEM | 5,000 | 3,058 à 6,942 | Oui | *** | 0,0002 | A-C |
| HEM p vs. D1HEI | 7,233 | 5,292 à 9,175 | Oui | **** | <0,0001 | A-D |
| HEI p vs. D1HEM | 1,850 | -0,09169 à 3,792 | Non | Ns | 0,0619 | B-C |
| HEI p vs. D1HEI | 4,083 | 2,142 à 6,025 | Oui | *** | 0,0007 | B-D |
| D1HEM vs. D1HEI | 2,233 | 0,2916 à 4,175 | Oui | * | 0,0256 | C-D |

La différence moyenne est significative au niveau 0,05 ; Huile essentielle des baies mûres (HEM) a un effet antibactérien plus puissant que celui obtenu par l'HE des baies immatures (HEI) ; ns : une différence non significative.

2.2. Activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis les souches isolats de *S. aureus*

| ANOVA | Somme des carrées | Ddl | Moyenne des carrées | F | Valeur de P |
|--------------------------------|-------------------|-----|---------------------|-------------------|-------------|
| Traitement (entre les groupes) | 206,1 | 5 | 41,21 | F (5, 66) = 445,3 | P<0,0001 |
| (intra- groupes) | 6,109 | 66 | 0,09255 | | |
| Total | 212,2 | 71 | | | |

La différence moyenne est significative au niveau 0,05 ; ($p < 0,0001$) : L'hypothèse H_0 est fortement rejetée, donc les huiles essentielles ont un effet antibactérien hautement significatif.

Test Post Hoc

Comparaisons multiples (Tukey)

| Test de comparaisons multiples | Diff, de Moyenne | Intervalle de Confiance à 95.00% | Signification | Résumé | Valeur de P | |
|--------------------------------|------------------|----------------------------------|---------------|--------|-------------|-----|
| HEM vs. HEI | 0,2944 | -0,07010 à 0,6590 | Non | Ns | 0,1817 | A-B |
| HEM vs. D1HM | 1,654 | 1,290 à 2,019 | Oui | **** | <0,0001 | A-C |
| HEM vs. D1HI | 2,245 | 1,880 à 2,609 | Oui | **** | <0,0001 | A-D |
| HEM vs. D2HM | 3,564 | 3,199 à 3,928 | Oui | **** | <0,0001 | A-E |
| HEM vs. D2HI | 4,772 | 4,408 à 5,137 | Oui | **** | <0,0001 | A-F |
| HEI vs. D1HM | 1,360 | 0,9952 à 1,724 | Oui | **** | <0,0001 | B-C |
| HEI vs. D1HI | 1,950 | 1,586 à 2,315 | Oui | **** | <0,0001 | B-D |
| HEI vs. D2HM | 3,269 | 2,905 à 3,634 | Oui | **** | <0,0001 | B-E |
| HEI vs. D2HI | 4,478 | 4,113 à 4,842 | Oui | **** | <0,0001 | B-F |
| D1HM vs. D1HI | 0,5906 | 0,2260 à 0,9551 | Oui | *** | 0,0002 | C-D |
| D1HM vs. D2HM | 1,910 | 1,545 à 2,274 | Oui | **** | <0,0001 | C-E |
| D1HM vs. D2HI | 3,118 | 2,754 à 3,483 | Oui | **** | <0,0001 | C-F |
| D2HM vs. D2HI | 1,208 | 0,8438 à 1,573 | Oui | **** | <0,0001 | E-F |

$p < 0,0001$: Une différence hautement significative entre les huiles essentielles pures et les huiles essentielles diluées.

3. Activité anti-oxydante

| ANOVA | Somme des carrées | Ddl | Moyenne des carrées | F | P |
|--------------------------------|-------------------|-----|---------------------|-----------------|--------------|
| Traitement (entre les groupes) | 6,047 | 2 | 3,023 | F (2, 6) = 2350 | $p < 0,0001$ |
| (intra- groupes) | 0,007719 | 6 | 0,001287 | | |
| Total | 6,055 | 8 | | | |

$p < 0,0001 \ll 0,05$, Hypothèse (H_0) est fortement rejetée, donc tous les produits testés ont des effets Antioxydants différents.

Test Post Hoc

Comparaisons multiples (Test de Tukey)

| Test de comparaisons Multiples | Diff, de Moyenne | Intervalle de confiance 95,00% | Signification | Résumé | Valeur de P | |
|--------------------------------|------------------|--------------------------------|---------------|--------|-------------|-----|
| HEI vs. HEM | -0,1961 | -0,2859 à -0,1062 | Oui | ** | 0,0013 | A-B |
| HEI vs. A. A | 1,632 | 1,543 à 1,722 | Oui | **** | <0,0001 | A-C |
| HEM vs. A. A | 1,829 | 1,739 à 1,918 | Oui | **** | <0,0001 | B-C |

AA : acide ascorbique. $p \ll 0,05$: il ya une différence hautement significative entre l'AA et les huiles essentielles, aussi une différence fortement significative entre l'HE des baies immatures et celui des baies mûres.

4. Activité anti-inflammatoire

➤ Résultats de comparaison par ANOVA

| Table ANOVA | Somme des carrées | ddl | Moyenne des carrées | F | P |
|--------------------------------|-------------------|-----|---------------------|-------------------|----------|
| Traitement (entre les groupes) | 104,7 | 4 | 26,18 | F (4, 15) = 14,96 | P<0,0001 |
| (intra- groupes) | 26,25 | 15 | 1,750 | | |
| Total | 131,0 | 19 | | | |

$p < 0,0001 \ll 0,05$, Hypothèse (H_0) est fortement rejetée, donc tous les produits testés ont des effets anti-inflammatoires différents.

Tests Post Hoc

Comparaisons multiples (Test de Tukey)

| Tests de comparaisons multiples | Diff, de moyenne | Intervalle de confiance à 95% | Signifi-cation | Résumé | Valeur de P | |
|---------------------------------|------------------|-------------------------------|----------------|--------|-------------|-----|
| Diclf vs. HGPG/HEI | -3,250 | -6,138 à -0,3615 | Oui | * | 0,0241 | A-B |
| Diclfe vs. HGCR/HEI | -2,500 | -5,388 à 0,3885 | Non | ns | 0,1061 | A-C |
| Diclf vs. HGPG/HEM | 1,500 | -1,388 à 4,388 | Non | ns | 0,5173 | A-D |
| Diclfc vs. HGCR/HEM | 2,750 | -0,1385 à 5,638 | Non | ns | 0,0657 | A-E |
| HGPG/HEI vs. HGCR/HEI | 0,7500 | -2,138 à 3,638 | Non | ns | 0,9260 | B-C |
| HGPG/HEI vs. HGPG/HEM | 4,750 | 1,862 à 7,638 | Oui | ** | 0,0011 | B-D |
| HGPG/HEI vs. HGCR/HEM | 6,000 | 3,112 to 8,888 | Oui | **** | <0,0001 | B-E |
| HGCR/HEI vs. HGPG/HEM | 4,000 | 1,112 à 6,888 | Oui | ** | 0,0051 | C-D |
| HGCR/HEI vs. HGCR/HEM | 5,250 | 2,362 à 8,138 | Oui | *** | 0,0004 | C-E |
| HGPG/HEM vs HGCR/HEM | 1,250 | -1,638 à 4,138 | Non | ns | 0,6742 | D-E |

La différence moyenne est significative au niveau 0,05 ; $p < 0,001$: H_0 est fortement rejetée, donc il y a une différence fortement significative entre les produits testés contenant l'HE des baies immatures et ceux contenant l'HE des baies mûres.

5. Activité cicatrisante

5.1. Excision Circulaire

➤ Contraction des plaies le sixième jour (post-excision)

| Test ANOVA | Somme des carrées | ddl | Moyenne des carrées | F | Valeur de P |
|--------------------------------|-------------------|-----|---------------------|-------------------|-------------|
| Traitement (entre les groupes) | 1929 | 5 | 385,8 | F (5, 12) = 694,5 | P<0,0001 |
| (intra- groupes) | 6,667 | 12 | 0,5556 | | |
| Total | 1936 | 17 | | | |

$p < 0,0001 < 0,05$, Hypothèse (H_0) est fortement rejetée, donc les produits testés ont des effets hautement significatifs dans la réduction des plaies.

Tests Post Hoc

Comparaisons multiples (Test de Tukey)

| Tests de comparaisons multiples | Diff, de moyenne | Intervalle de confiance à 95% | Signification | Résumé | Valeur de P | |
|---------------------------------|------------------|-------------------------------|---------------|--------|-------------|-----|
| G1 vs. G2 | 0,000 | -2,044 à 2,044 | Non | ns | >0,9999 | A-B |
| G1 vs. G3 | -3,333 | -5,378 à -1,289 | Oui | ** | 0,0015 | A-C |
| G1 vs. G4 | -5,333 | -7,378 à -3,289 | Oui | **** | <0,0001 | A-D |
| G1 vs. G5 | 1,667 | -0,3775 à 3,711 | Non | ns | 0,1376 | A-E |
| G1 vs. G6 | 25,67 | 23,62 à 27,71 | Oui | **** | <0,0001 | A-F |
| G2 vs. G3 | -3,333 | -5,378 à -1,289 | Oui | ** | 0,0015 | B-C |
| G2 vs. G4 | -5,333 | -7,378 à -3,289 | Oui | **** | <0,0001 | B-D |
| G2 vs. G5 | 1,667 | -0,3775 à 3,711 | Non | ns | 0,1376 | B-E |
| G2 vs. G6 | 25,67 | 23,62 à 27,71 | Oui | **** | <0,0001 | B-F |
| G3 vs. G4 | -2,000 | -4,044 à 0,04417 | Non | ns | 0,0564 | C-D |
| G3 vs. G5 | 5,000 | 2,956 à 7,044 | Oui | **** | <0,0001 | C-E |
| G3 vs. G6 | 29,00 | 26,96 à 31,04 | Oui | **** | <0,0001 | C-F |
| G4 vs. G5 | 7,000 | 4,956 à 9,044 | Oui | **** | <0,0001 | D-E |
| G4 vs. G6 | 31,00 | 28,96 à 33,04 | Oui | **** | <0,0001 | D-F |
| G5 vs. G6 | 24,00 | 21,96 à 26,04 | Oui | **** | <0,0001 | E-F |

La différence moyenne est significative au niveau 0,05. $p < 0,0001 \ll 0,05$, Hypothèse (H_0) est fortement rejetée, il ya une différence hautement significative entre les groupes traités et le groupe témoin.

➤ Contraction des plaies le deuxième jour (post-excision)

| Table ANOVA | SS | DF | MS | F | Valeur de P |
|--------------------------------|-------|----|--------|-------------------|-------------|
| Traitement (entre les groupes) | 393,8 | 5 | 78,76 | F (5, 12) = 202,5 | P<0,0001 |
| (intra- groupes) | 4,667 | 12 | 0,3889 | | |
| Total | 398,4 | 17 | | | |

Tests Post Hoc
Comparaisons multiples (test de Tukey)

| Test de comparaisons multiples | Diff. de moyenne | Intervalle de confiance à 95% | Signification | Résumé | Valeur de P | Groupes |
|--------------------------------|------------------|-------------------------------|---------------|--------|-------------|---------|
| G1 vs. G2 | 0,000 | -1,710 à 1,710 | Non | Ns | >0,9999 | A-B |
| G1 vs. G3 | 0,000 | -1,710 à 1,710 | Non | Ns | >0,9999 | A-C |
| G1 vs. G4 | -0,6667 | -2,377 à 1,044 | Non | Ns | 0,7751 | A-D |
| G1 vs. G5 | -0,3333 | -2,044 à 1,377 | Non | Ns | 0,9838 | A-E |
| G1 vs. G6 | 12,33 | 10,62 à 14,04 | Oui | **** | <0,0001 | A-F |
| G2 vs. G3 | 0,000 | -1,710 à 1,710 | Non | Ns | >0,9999 | B-C |
| G2 vs. G4 | -0,6667 | -2,377 à 1,044 | Non | Ns | 0,7751 | B-D |
| G2 vs. G5 | -0,3333 | -2,044 à 1,377 | Non | Ns | 0,9838 | B-E |
| G2 vs. G6 | 12,33 | 10,62 à 14,04 | Oui | **** | <0,0001 | B-F |
| G3 vs. G4 | -0,6667 | -2,377 à 1,044 | Non | Ns | 0,7751 | C-D |
| G3 vs. G5 | -0,3333 | -2,044 à 1,377 | Non | Ns | 0,9838 | C-E |
| G3 vs. G6 | 12,33 | 10,62 à 14,04 | Oui | **** | <0,0001 | C-F |
| G4 vs. G5 | 0,3333 | -1,377 à 2,044 | Non | Ns | 0,9838 | D-E |
| G4 vs. G6 | 13,00 | 11,29 à 14,71 | Oui | **** | <0,0001 | D-F |
| G5 vs. G6 | 12,67 | 10,96 à 14,38 | Oui | **** | <0,0001 | E-F |

G1: HGPG/HEM ; G2 : HGCR/HEM ; G3 : HGPG/HEI ; G4 : HGCR/HEI ; G5 : Madécassol ; p<0,0001 (Ho est fortement rejetée) : une différence hautement significative entre les groupes testés et le groupe témoin (tous les produits testés et le produit de référence ont des effets cicatrisants semblables).

5.2. Brûlure thermique

➤ Contraction des plaies le deuxième jour (post-brûlure)

| Table ANOVA | Somme des carrées | ddl | Moyenne des carrées | F | Valeur de P |
|--------------------------------|-------------------|-----|---------------------|-------------------|-------------|
| Traitement (entre les groupes) | 1310 | 5 | 262,1 | F (5, 12) = 84,24 | P<0,0001 |
| (intra- groupes) | 37,33 | 12 | 3,11 | | |
| Total | 1348 | 17 | | | |

$p < 0,0001 \ll 0,05$, Hypothèse (H_0) est fortement rejetée, donc tous les produits testés ont des effets cicatrisants différents

Test Post Hoc

Comparaisons multiples

| Tests de comparaisons multiples | Diff, de moyenne | Intervalle de confiance à 95% | Signification | Résumé | Valeur de P | Groupes |
|---------------------------------|------------------|-------------------------------|---------------|--------|-------------|---------|
| G1 vs. G 2 | -2,333 | -7,171 to 2,504 | Non | Ns | 0,6018 | A-B |
| G1 vs. G3 | -4,333 | -9,171 à 0,5041 | Non | Ns | 0,0892 | A-C |
| G1 vs. G4 | -5,000 | -9,837 à -0,1626 | Oui | * | 0,0414 | A-D |
| G1 vs. G5 | 0,3333 | -4,504 à 5,171 | Non | Ns | 0,9999 | A-E |
| G1 vs. G6 | 20,00 | 15,16 à 24,84 | Oui | **** | <0,0001 | A-F |
| G2 vs. G3 | -2,000 | -6,837 à 2,837 | Non | Ns | 0,7329 | B-C |
| G2 vs. G4 | -2,667 | -7,504 à 2,171 | Non | Ns | 0,4720 | B-D |
| G2 vs. G5 | 2,667 | -2,171 à 7,504 | Non | Ns | 0,4720 | B-E |
| G2 vs. G 6 | 22,33 | 17,50 à 27,17 | Oui | **** | <0,0001 | B-F |
| G3 vs. G4 | -0,6667 | -5,504 à 4,171 | Non | Ns | 0,9967 | C-D |
| G3 vs. G5 | 4,667 | -0,1707 à 9,504 | Non | Ns | 0,0609 | C-E |
| G3 vs. G6 | 24,33 | 19,50 à 29,17 | Oui | **** | <0,0001 | C-F |
| G4 vs. G5 | 5,333 | 0,4959 à 10,17 | Oui | * | 0,0280 | D-E |
| G4 vs. G6 | 25,00 | 20,16 à 29,84 | Oui | **** | <0,0001 | D-F |
| G5 vs. G6 | 19,67 | 14,83 à 24,50 | Oui | **** | <0,0001 | E-F |

$p < 0,0001$ (H_0 est hautement rejetée), une différence hautement significative entre les groupes traités et le groupe témoin traité par l'hydrogel de base.

➤ Contraction des plaies le 18^{ème} jour (post-brûlure)

| Table ANOVA | Somme des carrées | ddl | Moyenne des carrées | F | Valeur de P |
|--------------------------------|-------------------|-----|---------------------|-------------------|-------------|
| Traitement (entre les groupes) | 1554 | 5 | 310,9 | F (5, 12) = 279,8 | P<0,0001 |
| (intra- groupes) | 13,33 | 12 | 1,111 | | |
| Total | 1568 | 17 | | | |

p<0,0001 (H0 est hautement rejetée) une différence hautement significative.

Tests Post Hoc

Comparaisons multiples (Test de Tukey)

| Test de comparaisons multiples | Diff. de moyenne | Intervalle de confiance à 95% | Signification | Résumé | Valeur de P | Groupes |
|--------------------------------|------------------|-------------------------------|---------------|--------|-------------|---------|
| G1 vs. G2 | -5,667 | -8,558 à -2,776 | Oui | Ns | 0,0003 | A-B |
| G1 vs. G3 | -7,667 | -10,56 à -4,776 | Oui | Ns | <0,0001 | A-C |
| G1 vs. G4 | -8,667 | -11,56 à -5,776 | Oui | *** | <0,0001 | A-D |
| G1 vs. G5 | -3,333 | -6,224 à -0,4424 | Oui | * | 0,0210 | A-E |
| G1 vs. G6 | 18,67 | 15,78 à 21,56 | Oui | **** | <0,0001 | A-F |
| G2 vs. G3 | -2,000 | -4,891 à 0,8909 | Non | Ns | 0,2566 | B-C |
| G2 vs. G4 | -3,000 | -5,891 à -0,1091 | Oui | * | 0,0404 | B-D |
| G2 vs. G5 | 2,333 | -0,5576 à 5,224 | Non | Ns | 0,1437 | B-E |
| G2 vs. G6 | 24,33 | 21,44 à 27,22 | Oui | **** | <0,0001 | B-F |
| G3 vs. G4 | -1,000 | -3,891 à 1,891 | Non | Ns | 0,8461 | C-D |
| G3 vs. G5 | 4,333 | 1,442 à 7,224 | Oui | ** | 0,0031 | C-E |
| G3 vs. G6 | 26,33 | 23,44 à 29,22 | Oui | **** | <0,0001 | C-F |
| G4 vs. G5 | 5,333 | 2,442 à 8,224 | Oui | *** | 0,0005 | D-E |
| G4 vs. G6 | 27,33 | 24,44 à 30,22 | Oui | **** | <0,0001 | D-F |
| G5 vs. G6 | 22,00 | 19,11 à 24,89 | Oui | **** | <0,0001 | E-F |

La différence moyenne est significative au niveau 0,05 ; une différence hautement significative entre les groupes traités et le groupe témoin non traité.

REFERENCES

- [1]. Organization, W. H., "A global health guardian: Climate change, air pollution and antimicrobial resistance", WHO, ten years in public health (2017), 136–142.
- [2]. Albertyn, R., A. Berg, A. Numanoglu, and H. Rode, "Traditional burn care in sub-Saharan Africa : A long history with wide acceptance," *Burns*, (2015), 1–9.
- [3]. Lal, M., A. Borah, and S. K. Pandey, "Identification of a New High Essential Oil Yielding Variety 'Jor Lab AC-1' of *Acorus calamus* L.", *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, vol. 22, no. 3, (2019), 695–703.
- [4]. Khezri, K., M. R. Farahpour, and S. M. Rad, "Accelerated infected wound healing by topical application of encapsulated Rosemary essential oil into nanostructured lipid carriers", *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, vol. 47, no. 1, (2019), 980–988.
- [5]. Imane, N. I., H. Fouzia, L. F. Azzahra, E. Ahmed, G. Ismail, *et al.*, "Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of some essential oils against multidrug resistant bacteria", *European Journal of Integrative Medicine*, vol. 35, (April 2020), 101074.
- [6]. Boateng, J. and O. Catanzano, "Advanced therapeutic dressings for effective wound healing—a review", *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 104, no. 11, (2015), 3653–3680.
- [7]. Amany I. Raafat a, Eman Araby b, S. M. E., "Radiation Synthesis of Psyllium / Frankincense Essential Oil – Based Wound Dressing," *Arab Journal of Nuclear Sciences and Applications*, vol. 54, (2021), 19–36.
- [8]. Luo, F., T. L. Sun, T. Nakajima, T. Kurokawa, X. Li, *et al.*, "Tough polyion-complex hydrogels from soft to stiff controlled by monomer structure," *Polymer*, vol. 116, (2017), 487–497.
- [9]. Fadel, H., F. Benayache, J. C. Chalchat, G. Figueredo, P. Chalard, *et al.*, "Essential oil constituents of *Juniperus oxycedrus* L. and *Cupressus*

- sempervirens L. (Cupressaceae) growing in Aures region of Algeria”, *Natural Product Research*, vol. 35, no. 15, (2021), 2616–2620.
- [10]. Katerere, D. R. and D. Luseba, "*Ethnoveterinary botanical medicine: herbal medicines for animal health*", CRC Press, (2010).
- [11]. Taviano, M. F., A. Marino, A. Trovato, V. Bellinghieri, T. M. La Barbera, *et al.*, “Antioxidant and antimicrobial activities of branches extracts of five *Juniperus* species from Turkey”, *Pharmaceutical Biology*, vol. 49, no. 10, (2011), 1014–1022.
- [12]. Cavaleiro, C., E. Pinto, M. J. Gonçalves, and L. Salgueiro, “Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains”, *Journal of applied microbiology*, vol. 100, no. 6, (2006), 1333–1338.
- [13]. Alan, S., M. Kurkcuoglu, and Go. Sener, “Composition of the Essential Oils of *Juniperus oxycedrus* L . subsp . *oxycedrus* Growing in Turkey”, *Turk J Pharm Sci.*, vol. 13, no. 3, (2016), 300–303.
- [14]. Boudiba, S., A. N. Tamfu, B. Berka, K. Hanini, S. Hioun, *et al.*, “Anti-Quorum Sensing and Antioxidant Activity of Essential Oils Extracted From *Juniperus* Species, Growing Spontaneously in Tebessa Region (East of Algeria)”, *Natural Product Communications*, vol. 16, no. 6, (2021), 1–11.
- [15]. Najar, B., L. Pistelli, and J. Buhagiar, “Volatilomic Analyses of Tuscan *Juniperus oxycedrus* L. and in vitro Cytotoxic Effect of Its Essential Oils on Human Cell Lines”, *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, vol. 23, no. 4, (2020), 756–771.
- [16]. Rajouani, N., A. Benyamna, A. Romane, and H. Bouamama, “Chemical Composition , Antioxidant and Antibacterial Activity of *Juniperus oxycedrus* subsp . *oxycedrus* L . berry , essential oil from Morocco”, *J. Appl.Chem. Envir. Prot.*, vol. 1, no. 1, (2015), 9–19.
- [17]. Abdellah, F., B. Laid, S. M. Hammoudi, and R. Benaraba, “In vitro Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant activities of *juniperus oxycedrus* essential oil (Cade oil),” vol. 2, no. 6, (2018), 66–76.
- [18]. Guerroudj, S., M. Maatoug, K. Naceur, R. Chaibi, M. Khene, and A. Boualem, “Extraction, yield and chemical composition of essential oils of *Juniperus oxycedrus* L. from Tiaret region (Algeria),” *Ukrainian Journal of Ecology*, vol. 11, no. 10, (2021), 105–111.

- [19]. Ouair, D., A. Megherbi-Benali, S. Lotte, J. Gérard, and F. Toumi-Benali, "Activité antibactérienne de l'huile essentielle extraite de la sciure de bois de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*", CNRS, 2018, (2018).
- [20]. Boufares, K., A. Hassani, and A. S. Alem, "Essential oil composition and antimicrobial activities of some Cupressaceae species from Algeria against two phytopathogenic microorganisms," vol. 8, no. 2, (2019), 223–234.
- [21]. Mansouri, N., B. Satrani, M. Ghanmi, L. El Ghadraoui, A. Aafi, and A. Farah, "Valorization of the essential oils of Moroccan *Juniperus thurifera* and *Juniperus oxycedrus*," *Phytotherapie*, vol. 8, no. 3, (2010), 166–170.
- [22]. Al-snafi, A. E., "Pharmacological and Therapeutic Effects of *Juniperus Oxycedrus*" *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 05, no. 4. (April 2018), 2198-2205.
- [23]. Orhan, N., E. Akkol, and F. Ergun, "Evaluation of antiinflammatory and antinociceptive effects of some *Juniperus* species growing in Turkey", *Turk J Biol*, vol. 36, (2012), 719–726.
- [24]. Tumen, I., S. Ipek, H. Keles, and K. Esra, "A Therapeutic Approach for Wound Healing by Using Essential Oils of *Cupressus* and *Juniperus* Species Growing in Turkey", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, (2012), 1–7.
- [25]. Bland, J. S., "Phytonutrition, phytotherapy, and phytopharmacology", *Alternative therapies in health and medicine*, vol. 2, no. 6, (1996), 73–76.
- [26]. Ben El Mostafa, S. and A. Maamri, "Herbal Medicine in Chronic Diseases Treatment: Determinants, Benefits and Risks", *Disease Prevention and Health Promotion in Developing Countries*, (2020), 85–95.
- [27]. Nsagha, D. S., C. W. Ayima, T. Nana-Njamen, and J. C. N. Assob, "The role of traditional, complementary/alternative medicine in primary healthcare, adjunct to universal health coverage in Cameroon: a review of the literature", *American Journal of Epidemiology*, vol. 8, no. 1, (2020), 37–47.
- [28]. Cunha, C., H. M. Ribeiro, M. Rodrigues, and A. R. T. S. Araujo, "Essential oils used in dermocosmetics: Review about its biological activities", *Journal of Cosmetic Dermatology*, vol. 21, no. 2, (2022), 513–529.
- [29]. Dawood, M. A. O., M. F. El Basuini, S. Yilmaz, H. M. R. Abdel-Latif, M. Alagawany, *et al.*, "Exploring the roles of dietary herbal essential oils in

- aquaculture: A review”, *Animals*, vol. 12, no. 7, (2022), p 823.
- [30]. Bruneton, J., “Eléments de phytochimie et de pharmacologie”, Lavoisier. Techniques et documentation, Paris, vol. 405, (1997), 405-426.
- [31]. Sadgrove, N. J., G. F. Padilla-González, and M. Phumthum, “Fundamental chemistry of essential oils and volatile organic compounds, methods of analysis and authentication”, *Plants*, vol. 11, no. 6, (2022), p 789.
- [32]. Goodger, J. Q. D., A. M. Heskes, M. C. Mitchell, D. J. King, E. H. Neilson, and I. E. Woodrow, “Isolation of intact sub-dermal secretory cavities from *Eucalyptus*”, *Plant methods*, vol. 6, (2010), 1–10.
- [33]. Yousif, I. Z., S. E. Shahbaz, K. Region, N. Caledonia, and N. America, “comparative anatomical study of leaves in five cupressaceae gray . taxa in kurdistan region - iraq”, vol. 11, no. 1, (2023), 22–29.
- [34]. Jean-François, M. G., P. Roger, B. C. Isabelle, G. Frédéric, and J. Marc, “Biologie végétale: croissance et développement” (éd. 3e), Dunod, Éd. Paris, France, (2017), p 272.
- [35]. Tourte, Y., M. Bordonneau, M. Henry, and C. Tourte, “Le monde des végétaux: organisation, physiologie et génomique”, Dunod. Paris, France: Dunod, (2005).
- [36]. Güvenç, A. and H. Duman, “Morphological and anatomical studies of annual taxa of *Sideritis* L.(Lamiaceae), with notes on chorology in Turkey”, *Turkish Journal of Botany*, vol. 34, no. 2, (2010), 83–104.
- [37]. Turner, G. W., A. M. Berry, and E. M. Gifford, “Schizogenous secretory cavities of *Citrus limon* (L.) Burm. F. and a reevaluation of the lysigenous gland concept”, *International Journal of Plant Sciences*, vol. 159, no. 1, (1998), 75–88.
- [38]. Kotina, E. L., A. A. Oskolski, P. M. Tilney, and B.-E. Van Wyk, “Bark anatomy of *Adansonia digitata* L.(Malvaceae)”, *Adansonia*, vol. 39, no. 1, (2017), 31–40.
- [39]. Koçyiğit, M. and K. Tümer, “Sedef hastalığında kullanılan *Aloe vera*, *Smilax excelsa* ve *Juniperus oxycedrus* bitkilerinin yaprak anatomik özellikleri”, *Marmara Pharmaceutical Journal*, vol. 21, no. 3, (2017), 461–470.
- [40]. Mercado, M. I., G. Marcial, J. V Catalán, A. Grau, C. A. N. Catalán, and G. I. Ponessa, “Morphoanatomy, histochemistry, essential oil, and other secondary metabolites of *Artemisia copa* (Asteraceae)”, *Botany Letters*, vol.

168, no. 4, (2021), 577–593.

- [41]. Zhou, Y.-F., S.-L. Mao, S.-F. Li, X.-L. Ni, B. Li, and W.-Z. Liu, “Programmed cell death: A mechanism for the lysigenous formation of secretory cavities in leaves of *Dictamnus dasycarpus*”, *Plant Science*, vol. 225, (2014), 147–160.
- [42]. Turner, G. W., “A brief history of the lysigenous gland hypothesis”, *The Botanical Review*, vol. 65, (1999), 76–88.
- [43]. Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar, “Biological effects of essential oils—a review”, *Food and chemical toxicology*, vol. 46, no. 2, (2008), 446–475.
- [44]. Raut, J. S. and S. M. Karuppayil, “A status review on the medicinal properties of essential oils”, *Industrial Crops and Products*, vol. 62, (2014), 250–264.
- [45]. Başer, K. H. C. and F. Demirci, “Chemistry of essential oils,” *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, edited by Berger RG. New York: Springer, (2007), 43–86.
- [46]. Bauer, K., D. Garbe, and H. Surburg, “Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses,” 3rd ed. John Wiley & Sons, 2008, (2008), 1–290.
- [47]. Perrino, E. V, F. Valerio, S. Jallali, A. Trani, and G. N. Mezzapesa, “Ecological and biological properties of *Satureja cuneifolia* Ten. and *Thymus spinulosus* Ten: Two wild officinal species of conservation concern in Apulia (Italy). A preliminary survey”, *Plants*, vol. 10, no. 9, (2021), 1952.
- [48]. Sharmeen, J. B., F. M. Mahomoodally, G. Zengin, and F. Maggi, “Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals”, *Molecules*, vol. 26, no. 3, (2021), 666.
- [49]. Boukhatem, M. N., H. Chader, A. Houche, F. Oudjida, F. Benkebaili, and Y. Hakim, “Topical Emulsion Containing *Lavandula stoechas* Essential Oil as a Therapeutic Agent for Cutaneous Wound Healing,” *Multidisciplinary Scientific J*, vol. 4, no. 3, (2021), 288–307.
- [50]. Mancianti, F. and V. V. Ebani, “Biological activity of essential oils,” *Molecules*, vol. 25, no. 3. MDPI, (2020), 678.
- [51]. Raut, J. S. and S. M. Karuppayil, “A status review on the medicinal properties of essential oils,” *Industrial crops and products*, vol. 62, (2014), 250–264.

- [52]. Lucchesi, M. E., F. Chemat, and J. Smadja, "Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation," *Journal of Chromatography A*, vol. 1043, no. 2, (2004), 323–327.
- [53]. Jiang, Z., C. Kempinski, and J. Chappell, "Extraction and analysis of terpenes/terpenoids," *Current protocols in plant biology*, vol. 1, no. 2, (2016), 345–358.
- [54]. Farhat, A., "Vapo-diffusion assistée par micro-ondes: conception, optimisation et application", Thèse de Doctorat en Sciences (option: Sciences des Procédés, Sciences des Aliments), Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (France) & Ecole Nationale de Gabès (Tunisie), (2010).
- [55]. Mishra, A. and S. Parida, "Extraction Methods of Essential Oils from Aromatic Plants", *Aromatherapy and its Benefits*, (2021), 71–83.
- [56]. Richter, J. and I. Schellenberg, "Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography", *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 387, (2007), 2207–2217.
- [57]. Do, T. K. T., "Évaluation des performances de la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) dans l'analyse (qualitative et quantitative) des métabolites secondaires dans les extraits naturels", thèse de Doctorat en sciences (option: Chimie) Université de Nice-Sophia Antipolis, (2016).
- [58]. Tumen, I., S. Ipek, H. Keles, and K. Esra, "A Therapeutic Approach for Wound Healing by Using Essential Oils of *Cupressus* and *Juniperus* Species Growing in Turkey", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, (2012), 1–7.
- [59]. KHALED, B., "Extraction et étude phytochimique des huiles essentielles de certaines plantes steppiques et évaluation de leur efficacité comme biopesticides", Thèse de Doctorat en sciences biologiques (option: Biotechnologies végétales appliquées à l'amélioration des plantes) Université Ibn Khaldoun, Tiaret, (2020).
- [60]. Baptista-Silva, S., S. Borges, O. L. Ramos, M. Pintado, and B. Sarmiento, "The progress of essential oils as potential therapeutic agents: A review",

- Journal of Essential Oil Research, vol. 32, no. 4, (2020), 279–295.
- [61]. Ed-Dra, A., F. R. Filali, V. Lo Presti, B. Zekkori, L. Nalbone, *et al.*, “Effectiveness of essential oil from the artemisia herba-alba aerial parts against multidrug-resistant bacteria isolated from food and hospitalized patients,” *Biodiversitas*, vol. 22, no. 7, (2021), 2995–3005.
- [62]. Coelho, A., B. Helena, and L. S. Filho, “Artigo Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial patients”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 19, (2009), 236–241.
- [63]. Sienkiewicz, M., M. Łysakowska, E. Kowalczyk, G. Szymańska, E. Kochan, *et al.*, “The ability of selected plant essential oils to enhance the action of recommended antibiotics against pathogenic wound bacteria,” *Burns*, vol. 43, no. 2, (2017), 310–317.
- [64]. Borges, R. S., B. L. S. Ortiz, A. C. M. Pereira, H. Keita, and J. C. T. Carvalho, “*Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved,” *Journal of ethnopharmacology*, vol. 229, (2019), 29–45.
- [65]. Mey, C. A., B. N. Aghbash, G. Dehghan, A. Movafeghi, H. Talebpour, *et al.*, “Chemical compositions and biological activity of essential oils from four populations of *Satureja*”, *Journal of Essential Oil Research*, vol. 33, no. 2, (2021), 133–142.
- [66]. El Atki, Y., I. Aouam, F. El Kamari, A. Taroq, B. Lyoussi, *et al.*, “Phytochemistry, antioxidant and antibacterial activities of two Moroccan *Teucrium polium* L. subspecies: Preventive approach against nosocomial infections”, *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 13, no. 2, (2020), 3866–3874.
- [67]. Peña-Bautista, C., M. Baquero, M. Vento, and C. Cháfer-Pericás, “Free radicals in Alzheimer’s disease: Lipid peroxidation biomarkers,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 491, (2019), 85–90.
- [68]. Amarti, F., B. Satrani, M. Ghanmi, A. Aafi, A. Farah, *et al.*, “Activité antioxydante et composition chimique des huiles essentielles de quatre espèces de thym du Maroc”, *Acta botanica gallica*, vol. 158, no. 4, (2011), 513–523.
- [69]. Tu, W., H. Wang, S. Li, Q. Liu, and H. Sha, “The anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in chronic

- diseases,” *Aging and disease*, vol. 10, no. 3, (2019), 637.
- [70]. Schmeda-Hirschmann, G., C. Quispe, M. del P. C. Soriano, C. Theoduloz, F. Jiménez-Aspée, *et al.*, “Chilean *Prosopis mesocarp* flour: Phenolic profiling and antioxidant activity”, *Molecules*, vol. 20, no. 4, (2015), 7017–7033.
- [71]. Llana-Ruiz-Cabello, M., D. Gutiérrez-Praena, M. Puerto, S. Pichardo, Á. Jos, and A. M. Cameán, “In vitro pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line”, *Toxicology in vitro*, vol. 29, no. 4, (2015), 647–656.
- [72]. Rodrigues, L. B., A. O. B. P. B. Martins, J. Ribeiro-Filho, F. R. A. S. Cesário, F. F. e Castro, *et al.*, “Anti-inflammatory activity of the essential oil obtained from *Ocimum basilicum* complexed with β -cyclodextrin (β -CD) in mice”, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 109, (2017), 836–846.
- [73]. Pérez G, S., M. Zavala S, L. Arias G, and M. Ramos L, “Anti-inflammatory activity of some essential oils”, *Journal of Essential Oil Research*, vol. 23, no. 5, (2011), 38–44.
- [74]. Nunes, C. dos R., M. Barreto Arantes, S. Menezes de Faria Pereira, L. Leandro da Cruz, M. de Souza Passos, *et al.*, “Plants as sources of anti-inflammatory agents,” *Molecules*, vol. 25, no. 16, (2020), 3726.
- [75]. Rahman, M. M., S. Bibi, M. S. Rahaman, F. Rahman, F. Islam, *et al.*, “Natural therapeutics and nutraceuticals for lung diseases: traditional significance, phytochemistry, and pharmacology”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 150, (2022), p 113041.
- [76]. Tasic, M., I. Arsi, D. Pavlovi, S. Stojanovi, S. Najman, *et al.*, “Towards a modern approach to traditional use: in vitro and in vivo evaluation of *Alchemilla vulgaris* L . gel wound healing potential”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 238 (June 2019), p 111789.
- [77]. Ghosh, D., S. Mondal, and K. Ramakrishna, “A topical ointment formulation containing leaves extract of *Aegialitis rotundifolia* Roxb., accelerates excision, incision and burn wound healing in rats”, *Wound Medecine*, vol. 26, no. 1, (2019), p100168.
- [78]. Leal-cardoso, H., L. Diniz, J. Malveira, M. Linard, V. G. Portella, *et al.*, “The essential oil of *Croton zehntneri* and trans -anethole improves cutaneous wound healing,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 144, no. 2, (2012),

240–247.

- [79]. Abelan, U. S., A. C. de Oliveira, É. S. P. Cacoci, T. E. A. Martins, V. M. Giaccon, *et al.*, “Potential use of essential oils in cosmetic and dermatological hair products: A review,” *Journal of Cosmetic Dermatology*, vol. 21, no. 4, (2022), 1407–1418.
- [80]. Kashyap, N., A. Kumari, N. Raina, F. Zakir, and M. Gupta, “Prospects of essential oil loaded nanosystems for skincare,” *Phytomedicine Plus*, vol. 2, no. 1, (2022), p 100198.
- [81]. Guzmán, E. and A. Lucia, “Essential oils and their individual components in cosmetic products,” *Cosmetics*, vol. 8, no. 4, (2021), 114.
- [82]. Tashani, A. F. and H. A. Y. Faraj, “Morphological and Some Wood Properties of *Juniperus oxycedrus* Subsp. *Macrocarpa* in Derna Region, East Libya,” *Libyan Journal of Ecological & Environmental Sciences and Technology (LJEEST)*, vol. 2, no. 1, (2020), 18–26.
- [83]. Ouair, D. and L. Pignolet, “Durabilité naturelle et composition en extractibles du bois de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* du Nord-Ouest de l’Algérie,” *Bois & Forêts Des Tropiques* vol. 350, (2021), 57–69.
- [84]. P. Quezel et M. Gast, “Genévrier”, *Encyclopédie berbère*, (1998), 1–9.
- [85]. Hafsi, Z., S. Belhadj, A. Derridj, J. Mevy, A. Tonetto, *et al.*, “Étude de la variabilité morphologique (aiguilles , galbules) du complexe spécifique *Juniperus oxycedrus* L ., le Genévrier oxycède , au sein de sept populations d’Algérie,” *Revue d’Ecologie (Terre et Vie)*, vol. 72, no. 4, (2017), 353–373.
- [86]. Ortiz, A. C., G. Spampinato, C. Piñar, C. Jos, R. Quinto-canas, and E. Cano, “Taxonomy , ecology and distribution of *Juniperus oxycedrus* L. Group in the mediterranean basin using bioclimatic, phytochemical and morphometric approaches, with special reference to the iberian peninsula”, *Forests*, vol. 12, no. 6, (2021), p 703.
- [87]. Quézel, P., et Santa, S., “Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales”, Tome I. Édit. CNRS, Paris (1962), p 1–565.
- [88]. Klimko, M., K. Boratyńska, J. M. Montserrat, Y. Didukh, A. Romo, *et al.*, “Morphological variation of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean region”, *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, vol. 202, no. 2, (2007), 133–147.
- [87]. Adams, R. P., J. Altarejos, C. Fernandez, and A. Camacho, “The Leaf

- Essential Oils and Taxonomy of *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus*, subsp. *badia* (H. Gay) Debeaux, and subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball.," *Journal of Essential Oil Research*, vol. 11, no. 2, (1999), 167–172.
- [88]. Adams, R. P. and A. N. Tashev, "Geographic variation in leaf oils of *Juniperus deltoides* from Bulgaria, Greece, Italy and Turkey," *Phytologia*, vol. 94, no. 3, (2012), 310–318.
- [89]. Quezel, P. et Santa, S., "*Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*", Tome I. Paris: Centre national de la recherche scientifique, 1962, (1962).
- [90]. Ortiz, P. L., M. Arista, and S. Talavera, "Low reproductive success in two subspecies of *Juniperus oxycedrus* L.," *International Journal of Plant Sciences*, vol. 159, no. 5, (1998), 843–847.
- [91]. Arista, M., P. L. Ortiz, and S. Talavera, "Reproductive cycles of two allopatric subspecies of *Juniperus oxycedrus* (Cupressaceae)," *Flora*, vol. 196, no. 2, (2001), 114–120.
- [92]. Boudy, P., "Description forestière de l'Algérie et de la Tunisie," (No Title), (1955).
- [93]. Adams. RP, Andrea E. schwarzbach, "Chemotypes of *Juniperus oxycedrus* in Bulgaria and the antimicrobial activity of galbuli essential oils," *Industrial Crops and Products*, vol. 158, no. August, (2020), 1–11.
- [94]. Zellagui, A., S. Boulehal, M. M. Senoussi, M. Mokrani, H. Djebaili, and N. Basa, "Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Juniperus oxycedrus* ssp. *macrocarpa* (S. et Sm.) Ball. Growing in Oum El Bouaghi (Semi-arid area), Algeria," *Journal of Pharmaceutical Research International*, (2022), 1–7.
- [95]. Silva, F., S. Ferreira, J. A. Queiroz, and F. C. Domingues, "Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: Its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 60, no. 10, (2011), 1479–1486.
- [96]. Salido, S., J. Altarejos, M. Nogueras, A. Sánchez, C. Pannecouque, *et al.*, "Chemical studies of essential oils of *Juniperus oxycedrus* ssp. *badia*," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 81, no. 1, (2002), 129–134.
- [97]. Rahhal, R., H. E. L. Hajjouji, S. Gmouh, M. Hsaine, and H. Fougrach, "Chemical composition , antioxidant and antibacterial activities of the

- essential oils of *Juniperus phoenicea*, *Juniperus thurifera* and *Juniperus oxycedrus*,” *Mediterranean Journal of Chemistry*., vol. 9, no. 3, (2019), 190–198.
- [98]. Djellouli, S., K. S. Larbi, B. Meddah, A. Rebiai, A. T. Touil, and P. Sonnet, “Chemical composition, in vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* extracts from Algeria,” *European Journal of Biological Research*, vol. 12, no. 3, (2022), 271–281.
- [99]. Spengler, G., M. Gajdács, M. G. Donadu, M. Usai, M. Marchetti, *et al.*, “Evaluation of the antimicrobial and antivirulent potential of essential oils isolated from *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *macrocarpa* aerial parts,” *Microorganisms*, vol. 10, no. 4, (2022), 758.
- [100]. Adams, R. P., “Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry” *4Th Edition*., vol. 456. .Allured publishing corporation: Carol Stream, Illinois, (2007).
- [101]. Loizzo, M. R., R. Tundis, F. Conforti, A. M. Saab, G. A. Statti, and F. Menichini, “Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon,” *Food Chemistry*, vol. 105, no. 2, (2007), 572–578.
- [102]. Boti, J. B., A. Bighelli, C. Cavaleiro, L. Salgueiro, and J. Casanova, “Chemical variability of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* berry and leaf oils from Corsica, analysed by combination of GC, GC–MS and ¹³C-NMR,” *Flavour and fragrance journal*, vol. 21, no. 2, (2006), 268–273.
- [103]. Alberto Angioni, Andrea Barra, Maria T. Russo, Valentina Coroneo, Sandro Dessiä, A. P. C., “Chemical Composition of the Essential Oils of *Juniperus* from Ripe and Unripe Berries and Leaves and Their Antimicrobial Activity,” *J. Agric. Food Chem*, vol. 51, (2003), 3073–3078 3073.
- [104]. Boukhatem, M. N., M. S. Hamaidi, F. Saidi, and Y. Hakim, “Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l’huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie),” *Nature & Technology*, no. 3, (2010), 37.
- [105]. Satrani, B., M. Ghanmi, N. Mansouri, and N. Amusant, “Antioxidant properties of essential oils extracted from three species of moroccan junipers,” *Environmental Science: An Indian Journal*, vol. 11, no. 7, (2015), 239–247.

- [106]. Abdellah, F., B. Laid, S. M. Hammoudi, and R. Benaraba, "In vitro Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant activities of juniperus oxycedrus essential oil (Cade oil)," vol. 2, no. 6, (2018), 66–76.
- [107]. Darwish, R. S., H. M. Hammoda, D. A. Ghareeb, A. S. A. Abdelhamid, E. Moataz, *et al.*, "Efficacy-directed discrimination of the essential oils of three Juniperus species based on their in-vitro antimicrobial and anti-inflammatory activities," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 259, no. May, (2020), 1–12.
- [108]. Zampetti, A., A. Barone, D. Antuzzi, P. Amerio, A. Tulli, *et al.*, "Topical preparations for the treatment of psoriasis: results of a retrospective study over 15 years," *Journal of dermatological treatment*, vol. 19, no. 3, (2008), 134–140.
- [109]. McKnight, G., J. Shah, and R. Hargest, "Physiology of the skin," *Surgery (Oxford)*, vol. 40, no. 1, (2022), 8–12.
- [110]. Abdo, J. M., N. A. Sopko, and S. M. Milner, "The applied anatomy of human skin: A model for regeneration," *Wound Medicine*, vol. 28, (2020), 1–10.
- [111]. Riethmüller, C., "Assessing the skin barrier via corneocyte morphometry," *Experimental Dermatology*, vol. 27, no. 8, (2018), 923–930.
- [112]. Alexander, A., S. Dwivedi, T. K. Giri, S. Saraf, S. Saraf, and D. K. Tripathi, "Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 164, no. 1, (2012), 26–40.
- [113]. Kahraman, E., M. Kaykın, H. Şahin Bektay, and S. Güngör, "Recent advances on topical application of ceramides to restore barrier function of skin," *Cosmetics*, vol. 6, no. 3, (2019), 52.
- [114]. Brandner, J. M., M. Zorn-Kruppa, T. Yoshida, I. Moll, L. A. Beck, and A. De Benedetto, "Epidermal tight junctions in health and disease," *Tissue barriers*, vol. 3, no. 1–2, (2015), 974451.
- [115]. Twarog, C., "Particules Janus pour des applications industrielles: stabilité et incorporation de principes actifs," *Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université Lorraine, Nancy*, (2017).
- [116]. Tottoli, E. M., R. Dorati, I. Genta, E. Chiesa, S. Pisani, and B. Conti, "Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 8, (2020), 735.
- [117]. Rinnerthaler, M., J. Duschl, P. Steinbacher, M. Salzmann, J. Bischof, *et al.*,

- “Age-related changes in the composition of the cornified envelope in human skin,” *Experimental dermatology*, vol. 22, no. 5, (2013), 329–335.
- [118]. Draelos, Z. D. and I. Raymond, “The efficacy of a ceramide-based cream in mild-to-moderate atopic dermatitis,” *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, vol. 11, no. 5, (2018), 30.
- [119]. Zhong, S. P., Y. Z. Zhang, and C. T. Lim, “Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction,” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 2, no. 5, (2010), 510–525.
- [120]. Shirshin, E. A., Y. I. Gurfinkel, A. V. Priezzhev, V. V. Fadeev, J. Lademann, and M. E. Darvin, “Two-photon autofluorescence lifetime imaging of human skin papillary dermis in vivo: assessment of blood capillaries and structural proteins localization,” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, (2017), 1171.
- [121]. Rippa, A. L., E. P. Kalabusheva, and E. A. Vorotelyak, “Regeneration of dermis: scarring and cells involved,” *Cells*, vol. 8, no. 6, (2019), 607.
- [122]. Zimoch, J., D. Zielinska, K. Michalak-Micka, D. Rüttsche, R. Böni, *et al.*, “Bio-engineering a prevascularized human tri-layered skin substitute containing a hypodermis,” *Acta biomaterialia*, vol. 134, (2021), 215–227.
- [123]. Gholipourmalekabadi, M., M. Sameni, A. Hashemi, F. Zamani, A. Rostami, and M. Mozafari, “Silver- and fluoride-containing mesoporous bioactive glasses versus commonly used antibiotics: Activity against multidrug-resistant bacterial strains isolated from patients with burns,” *Burns.*, vol. 42, no. 1, (2016), 131–140.
- [124]. Dat, A. D., F. Poon, K. B. T. Pham, and J. Doust, “Aloe vera for treating acute and chronic wounds,” *Cochrane database of systematic reviews*, no. 2, (2012).
- [125]. Jia, Y., G. Zhao, and J. Jia, “Preliminary evaluation: The effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing,” vol. 120, (2008), 181–189.
- [126]. Singer, A. J. and R. A. F. Clark, “Cutaneous wound healing,” *New England journal of medicine*, vol. 341, no. 10, (1999), 738–746.
- [127]. Bahramsoltani, R., M. H. Farzaei, and R. Rahimi, “Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review,” (2014), 601–617.
- [128]. Pesteil, F., L. Vignaud, F. Bonté, and A. Desmoulière, “Rôles primordiaux

- des fibroblastes dermiques dans la cicatrisation cutanée,” *Revue francophone de cicatrisation*, vol. 1, no. 3, (2017), 45–49.
- [129]. Hayati, F., S. M. Ghamsari, M. M. Dehghan, and A. Oryan, “Effects of carbomer 940 hydrogel on burn wounds: an in vitro and in vivo study,” *Journal of Dermatological Treatment*, vol. 29, no. 6, (2018), 593–599. [130].
- [130]. Banozic, M., J. Babic, and S. Jokic, “Recent advances in extraction of bioactive compounds from tobacco industrial waste-a review,” *Industrial Crops and Products*, vol. 144, (2020), 112009.
- [131]. Negut, I., V. Grumezescu, and A. M. Grumezescu, “Treatment Strategies for Infected Wounds,” (2018), 1–23. [132]. Bacci, S., “Cutaneous wound healing: Cellular mechanisms and therapies (an update),” *Med. Res. Arch*, vol. 7, (2019), 12.
- [133]. Schilrreff, P. and U. Alexiev, “Chronic inflammation in non-healing skin wounds and promising natural bioactive compounds treatment,” *International journal of molecular sciences*, vol. 23, no. 9, (2022), 4928.
- [134]. Yali, G., C. Jing, L. Chunjiang, Z. Cheng, and L. Xiaoqiang, “ScienceDirect Comparison of pathogens and antibiotic resistance of burn patients in the burn ICU or in the common burn ward,” *Burns*, vol. 40, no. 3, (2013), 402–407.
- [135]. Uppal, S. K., S. Ram, B. Kwatra, S. Garg, and R. Gupta, “Comparative evaluation of surface swab and quantitative full thickness wound biopsy culture in burn patients,” *Burns*, vol. 33, no. 4, (2007), 460–463.
- [136]. Gupta, M., A. K. Naik, and S. K. Singh, “Bacteriological profile and antimicrobial resistance patterns of burn wound infections in a tertiary care hospital,” *Heliyon*, vol. 5, no. 12, (2019), 02956.
- [137]. Ernest, D., Olfert, E. D., B. M. Cross, and A. A. McWilliam, “Manuel sur le soin et l’utilisation des animaux d’expérimentation,” vol. (1), (1993).
- [138]. Bensalem-Bendjelloul, M., “Techniques histologiques: théorie et pratique,” Office des publications universitaires, (1998).
- [139]. Nee, M., “Plant alkaloids: A guide to their discovery and distribution. By Robert F. Raffauf.” Springer, (1998), 1998.
- [140]. S. A. Maisonneuve, “European pharmacopoeia,” vol. 3. Sainte-Ruffine, France, (1975), 68–80, 1975.
- [141]. AFNOR, “« Recueil de normes: les huiles essentielles. Tome 2.”

- Monographies relatives aux huiles essentielles», AFNOR: Paris, (2000), 661–663.
- [142]. Dob, T., D. Dahmane, T. Benabdelkader, and C. Chelghoum, “Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut,” *International Journal of Aromatherapy*, vol. 16, no. 2, (2006), 95–100.
- [143]. Brossard, D., C. Charrueau, J.-C. Chaumeil, S. Crauste-Manciet, and A. Le Hir, *Pharmacie galénique: Bonnes pratiques de fabrication des médicaments*. Elsevier Health Sciences, 2016, (2016).
- [144]. Lorenzo, D., D. Paz, P. Davies, R. Vila, S. Cañigüeral, and E. Dellacassa, “Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown from Uruguay,” *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 16, no. 5, (2001), 356–359.
- [145]. Michalak, M., K. Paradowska, and A. Zielinska, “Phenolic content , antioxidant activity and pharmaceutical availability of hydrogels with extracts of *Rosmarinus officinalis* L . and *Sambucus nigra* L . PHENOLIC CONTENT , Antioxidant Activity And Pharmaceutical Availability Of Hydrogels With Extracts Of R,” May, (2021).
- [146]. Li, H., T. Pan, Y. Cui, X. Li, J. Gao, *et al.*, “Improved oral bioavailability of poorly water-soluble glimepiride by utilizing microemulsion technique,” *International journal of nanomedicine*, vol. 11, (2016), 3777.
- [147]. Sounouvou, H. T., C. Defourny, F. Gbaguidi, E. Ziemons, and B. Evrard, “Development of a highly persistent silicone-based sprayable emulsion containing essential oils for treatment of skin infections,” vol. 596, no. December 2020, (2021).
- [148]. Tang, H., S. Xiang, X. Li, J. Zhou, and C. Kuang, “Preparation and in vitro performance evaluation of resveratrol for oral self-microemulsion,” *PLoS One*, vol. 14, no. 4, (2019).
- [149]. European pharmacopoeia, “European Directorate for the Quality of Medicines”, Council of Europe Strasbourg, France., (2008).
- [150]. Solomon, F. B., F. Wadilo, E. G. Tufa, and M. Mitiku, “Extended spectrum and metallo beta-lactamase producing airborne *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in restricted settings of a referral hospital: a neglected condition,” *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, vol. 6, (2017), 1–7.

- [151]. Marie, A., K. Abe, B. Justine, M. Sanogo, and K. M. Koffi, "Caractérisation phénotypique de 52 souches des Bacillus isolées à partir de racines fraîches de manioc cultivées en Côte d ' Ivoire Phenotypic characterization of 52 strains of Bacillus isolated from fresh cassava roots grown in Côte d ' Ivoire," *Int. J. Biol. Chem.Sci*, vol. 12, no. (October 2018), 2284–2293.
- [152]. Beveridge, T. J., "Use of the Gram stain in microbiology," *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 76, no. 3, (2001), 111–118.
- [153]. Dubey, D. and R. N. Padhy, "Antibacterial activity of Lantana camara L. against multidrug resistant pathogens from ICU patients of a teaching hospital," *Journal of Herbal Medicine*, vol. 3, no. 2, (2013), 65–75.
- [154]. Li, X., J. Zhang, Y. Zhang, J. Zhou, X. Li, *et al.*, "Methicillin-resistant Staphylococcus aureus of the clonal lineage ST5-SCCmecII-t2460 was associated with high mortality in a Wuhan hospital," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 52, no. 4, (2021), 1929–1936.
- [155]. Denis, F., M.-C. Ploy, C. Poyart, V. Cattoir, and C. Martin, "*Bactériologie médicale: techniques usuelles*". Elsevier Health Sciences, 2016, (2016).
- [156]. Jehl, F. and C. Cattoen, "Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie," *Recommandations 2016. V1*. (Février 2016), 117.
- [157]. Tchakal-mesbahi, A., M. Metref, and L. G. R. Singh, Vijay, KMarianna Almpani, "Characterization of antibiotic resistance profiles in Pseudomonas aeruginosa isolates from burn patients," *Burns*, (2021), 1–11.
- [158]. Yousfi, K., A. Touati, B. Lefebvre, P. Garneau, S. Brahmi, *et al.*, "Characterization of multidrug-resistant Gram-negative bacilli isolated from hospitals effluents: first report of a bla OXA-48 -like in Klebsiella oxytoca, Algeria," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 50, no. 1, (2019), 175–183.
- [159]. Ponce, A. G., R. Fritz, C. Del Valle, and S. I. Roura, "Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 36, no. 7, (2003), 679–684.
- [160]. Burits, M. and F. Bucar, "Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil," *Phytotherapy research*, vol. 14, no. 5, (2000), 323–328.
- [161]. Lan, W., Z. Zhaojun, and Z. Zesheng, "Characterization of antioxidant activity of extracts from Flos Lonicerae," *Drug development and industrial pharmacy*, vol. 33, no. 8, (2007), 841–847.
- [162]. Organisation for Economic Co-operation and Development, "OECD

guidelines for the testing of chemicals, section 4. Test no. 404: Acute dermal irritation/corrosion..” Paris, France. (2015).

- [163]. Draize, J. H., “Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 82, (1944), 377–390.
- [164]. Sosa, S., G. Altinier, M. Politi, A. Braca, I. Morelli, and R. Della Loggia, “Extracts and constituents of *Lavandula multifida* with topical anti-inflammatory activity,” *Phytomedicine*, vol. 12, no. 4, (2005), 271–277.
- [165]. Mekonnen, A., T. Sidamo, K. Asres, and E. Engidawork, “In vivo wound healing activity and phytochemical screening of the crude extract and various fractions of *Kalanchoe petitioides* A. Rich (Crassulaceae) leaves in mice,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 145, no. 2, (2013), 638–646.
- [166]. Pirbalouti, A. G., A. Koochpayeh, S. Azizi, and A. Golparvar, “Evaluation of the burn healing properties of *Arnebia euchroma* rolye (johnst) in diabetic rats,” in *Int Conference Biosci Biochem Bioinform*, 2011, (2011), 144–146.
- [167]. Vyver, M. Van De, K. Boodhoo, T. Frazier, K. Hamel, M. Kopcewicz, *et al.*, “Histology Scoring System for Murine Cutaneous Wounds,” vol.01, (2021), 1–12.
- [168]. GÜVENÇ, A., M. M. HÜRKÜL, and A. Erdem, “The leaf anatomy of naturally distributed *Juniperus L.*(Cupressaceae) species in Turkey,” *Turkish Journal of Botany*, vol. 35, no. 3, (2011), 251–260.
- [169]. Vasic, P. S. and D. V. Dubak, “Anatomical analysis of red Juniper leaf (*Juniperus oxycedrus*) taken from Kopaonik Mountain, Serbia,” *Turkish journal of botany*, vol. 36, no. 5, (2012), 473–479.
- [170]. Koçyiğit, M. and K. Tümer, “Leaf Anatomical Features of *Juniperus oxycedrus*, *Aloe vera* and *Smilax excelsa* used in psoriasis,” *Marmara Pharmaceutical Journal*, vol. 21, no. 3, (2017), 461–470.
- [171]. Svoboda, A. K. P. and G. Tomas, “Secretory Structures Of Aromatic And Medicinal Plants”, British Li. Middle Travelly, Beguildy, Knighton. MICROSCOPIX PUBLICATIONS, (2000).
- [172]. Svoboda, K. P., T. G. Svoboda, and A. D. Syred, *Secretory structures of aromatic and medicinal plants: a review and atlas of micrographs*. microscopix publications, 2000, (2000).
- [173]. Guerroudj, S., M. Maatoug, K. Naceur, R. Chaibi, M. Khene, and A.

- Boualem, "Extraction, yield and chemical composition of essential oils of *Juniperus oxycedrus* L. from Tiaret region (Algeria)," *Ukrainian Journal of Ecology*, vol. 11, no. 10, (2021), 105–111.
- [174]. Ramdani, M., T. Lograda, H. Silini, A. Zeraib, P. Chalard, *et al.*, "Antibacterial Activity of Essential oils of *Juniperus phoenicea* from Eastern Algeria," vol. 3, no. 11, (2013), 22–28.
- [175]. Zheljzkov, V. D., M. Kacaniova, I. Dincheva, T. Radoukova, I. B. Semerdjieva, *et al.*, "Essential oil composition , antioxidant and antimicrobial activity of the galbuli of six juniper species," *Industrial Crops & Products*, vol. 124, no. August, (2018), 449–458.
- [176]. Boufares, K., A. Hassani, and A. S. Alem, "Essential oil composition and antimicrobial activities of some Cupressaceae species from Algeria against two phytopathogenic microorganisms," vol. 8, no. 2, (2019), 223–234.
- [177]. Abbas, A. M., M. A. Seddik, A.-A. Gahory, S. Salaheldin, and W. S. Soliman, "Differences in the aroma profile of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) after different drying conditions," *Sustainability*, vol. 13, no. 9, (2021), 5083.
- [178]. Bouyahyaoui, A., "Contribution à la valorisation des substances naturelles : Etude des huiles essentielles des cupressacées de la région de l'Atlas algérien", Thèse doctorat, université de Mostaghanem, Algérie, (2017), 1–90.
- [179]. Llorens-Molina, J. A., B. Ygueravide, and S. Vacas, "Essential oil composition of berries of *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *oxycedrus* according to their ripening stage," *Journal of Essential Oil Research*, vol. 31, no. 4, (2019), 276–285.
- [180]. Adams, R. P., "*Junipers of the world: the genus Juniperus*", 4th Editio. Vancouver, B. C.: Trafford Publishing, 2014, (2014).
- [181]. Adams, R. P. and R. N. Pandey, "Analysis of *Juniperus communis* and its varieties based on DNA fingerprinting," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 31, no. 11, (2003), 1271–1278.
- [182]. Jahangir, M. A., I. S. Kazmi, L. N. Hospital, and A. Muheem, "Development and evaluation of ofloxacin topical gel containing wound healing modifiers from natural sources Development and evaluation of ofloxacin topical gel containing wound healing modifiers from natural sources," (October 2015).
- [183]. Souto, E. B. and R. H. Müller, "Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN®, NLC®)," *International journal of cosmetic science*, vol.

30, no. 3, (2008), 157–165.

- [184]. Anand, K., S. Ray, M. Rahman, A. Shaharyar, R. Bhowmik, *et al.*, “Nano-emulgel: Emerging as a Smarter Topical Lipidic Emulsion-based Nanocarrier for Skin Healthcare Applications” Vol. 14, No. 1.(2019),1-13.
- [185]. Kumar, S., M. Prasad, and R. Rao, “Topical delivery of clobetasol propionate loaded nanosponge hydrogel for effective treatment of psoriasis: Formulation, physicochemical characterization, antipsoriatic potential and biochemical estimation,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 119, (2021), 111605.
- [186]. Ross-Murphy, S. B., “Physical gelation of biopolymers,” *Food Hydrocolloids*, vol. 1, no. 5–6, (1987), 485–495.
- [187]. Campelo, M. da S., E. O. Melo, S. P. Arrais, F. B. S. A. do Nascimento, N. V. Gramosa, *et al.*, “Clove essential oil encapsulated on nanocarrier based on polysaccharide: A strategy for the treatment of vaginal candidiasis,” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 610, no.(2021).
- [188]. Tchakal-Mesbahi, A., M. A. Abdouni, and M. Metref, “Prevalence Of Multidrug-Resistant Bacteria Isolated From Burn Wounds In Algeria,” *Annals of Burns and Fire Disasters*, vol. 34, no. 2, (2021), 150.
- [189]. Agnihotri, N., V. Gupta, and R. M. Joshi, “Aerobic bacterial isolates from burn wound infections and their antibiograms -a five-year study,” *burns.*, vol. 30, (2004), 241–243.
- [190]. El Hamzaoui, N., A. Barguigua, S. Larouz, and M. Maouloua, “Epidemiology of burn wound bacterial infections at a Meknes hospital, Morocco,” *New Microbes and New Infections*, vol. 38, (2020), 100764.
- [191]. Hoque, M. N., M. I. Jahan, M. A. Hossain, and M. Sultana, “Genomic diversity and molecular epidemiology of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* DMC30b isolated from a hospitalized burn patient in Bangladesh,” *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, vol. 31, (2022), 110–118.
- [192]. Al-Rubaie, H. M. A. and A. F. Abbas, “Prevalence of carbapenemase genes blaOXA-51 and blaOXA23 in multi-drug resistance *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital environment,” *Appl. Biochem. Microbiol*, vol. 59, no. S1, (2023), 215–224.

- [193]. Bourgi, J., J. M. Said, C. Yaakoub, B. Atallah, N. Al Akkary, *et al.*, “Bacterial infection profile and predictors among patients admitted to a burn care center: A retrospective study,” *Burns*, vol. 46, no. 8, (2020), 1968–1976.
- [194]. Elmanama, A. A., N. A. A. Laham, and G. A. Tayh, “Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from burn units in Gaza,” *Burns*, vol. 39, no. 8, (2013), 1612–1618.
- [195]. Krir, A., S. Dhraief, A. A. Messadi, and L. Thabet, “Profil Bactériologique Et Résistance Aux Antibiotiques Bacteriological Profile And Antimicrobial Susceptibility Of Isolat-,” vol. XXXII, (September 2019), 197–202.
- [196]. Bandy, A., F. A. Wani, A. H. Mohammed, U. F. Dar, A. Mallick, *et al.*, “Bacteriological profile of wound infections and antimicrobial resistance in selected gram-negative bacteria,” vol. 22, no. 4, (2022), 576–586.
- [197]. Bakour, S., A. O. Olaitan, H. Ammari, A. Touati, S. Saoudi, *et al.*, “Emergence of Colistin- and Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 Clinical Isolate in Algeria: First Case Report,” *Microbial Drug Resistance*, vol. 21, no. 3, (2015), 279–285.
- [198]. Farhan, S. M., R. A. Ibrahim, K. M. Mahran, H. F. Hetta, and R. M. Abd El-Baky, “Antimicrobial resistance pattern and molecular genetic distribution of metallo- β -lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Minia, Egypt,” *Infection and Drug Resistance*, vol. 12, (2019), 2125.
- [199]. Gupta, A. R. and K. Ampofo, “Extended Spectrum β Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* Infections: a Review of the Literature,” *Journal of Perinatology*, (October 2003), 339-443.
- [200]. Kwiatkowski, P., M. Mnichowska-Polanowska, A. Pruss, H. Masiuk, M. Dzięcioł, *et al.*, “The effect of fennel essential oil in combination with antibiotics on *Staphylococcus aureus* strains isolated from carriers,” *Burns*, vol. 43, no. 7, (2017), 1544–1551.
- [201]. Benjemaa, M., M. Snoussi, H. Falleh, K. Hessini, K. Msaada, *et al.*, “Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of four essential oils collected in the North-East of Tunisia,” *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, vol. 25, no. 2, (2022), 338–355.
- [202]. Craig, A. M., J. J. Karchesy, L. L. Blythe, M. del Pilar González-Hernández, and L. R. Swan, “Toxicity studies on western juniper oil (*Juniperus*

- occidentalis) and Port-Orford-cedar oil (*Chamaecyparis lawsoniana*) extracts utilizing local lymph node and acute dermal irritation assays,” *Toxicology Letters*, vol. 154, no. 3, (2004), 217–224.
- [203]. Krimat, S., H. Metidji, C. Tigrine, D. Dahmane, A. Nouasri, and T. Dob, “Analyse chimique, activités antioxydante, anti-inflammatoire et cytotoxique d’extrait hydrométhanolique d’*Origanum glandulosum* Desf.,” *Phytotherapie*, March 2020, (2017), 1–8.
- [204]. Özbek, H. and B. SEVER YILMAZ, “Anti-inflammatory and hypoglycemic activities of alpha-pinene,” *ACTA Pharmaceutica Scientia*, vol. 55, no. 4, (2017).
- [205]. Kim, D.-S., H.-J. Lee, Y.-D. Jeon, Y.-H. Han, J.-Y. Kee, *et al.*, “Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF- κ B pathway in mouse peritoneal macrophages,” *The American journal of Chinese medicine*, vol. 43, no. 04, (2015), 731–742.
- [206]. Formisano, C., C. Sanna, M. Ballero, G. Chianese, C. Sirignano, *et al.*, “Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Onopordum illyricum* L.(Asteraceae), an Italian medicinal plant,” *Fitoterapia*, vol. 116, (2017), 61–65.
- [207]. Salas-Oropeza, J., M. Jimenez-Estrada, A. Perez-Torres, A. E. Castell-Rodriguez, R. Becerril-Millan, *et al.*, “Wound healing activity of α -pinene and α -phellandrene,” *Molecules*, vol. 26, no. 9, (2021), 2488.