

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

Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et la Vie

Département de Biotechnologie

et Agro-Ecologie



Laboratoire des Sciences Animales & Recherche en Biobanking

Laboratoire de Biotechnologie de Productions Végétales

Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du Diplôme de
Master Académique en Biotechnologies
Biotechnologies et pathologies moléculaires

THEME

Étude des propriétés pharmaco-toxicologiques des essences aromatiques
in vitro, in vivo et in silico.

Présenté par

DIB Fadila Aya & GUERMACHE Chahrazed

Date de Soutenance = 07/2025

Devant le jury composé de :

Mme MAKHLOUF C.	MCA	Présidente	Univ. Blida 1
Mme ROUAKI K.	MCA	Examinatrice	Univ. Blida 1
M. BOKHATAM M.	Pr	Promoteur	Univ. Blida 1
Mme. AFER M.	MAA	Co-Promotrice	EHS ElKettar

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement les membres de ce respectueux jury :

► Notre promoteur et co-promotrice pour avoir encadré ce mémoire, votre disponibilité et vos conseils éclairés dispensés à notre égard. Nous vous prions de croire à notre profond respect et à nos sincères remerciement et gratitude.

► Mme l'examinatrice. Nous sommes très honorées et heureuses que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire de master en Biotechnologies.

► Mme la présidente du jury. Vous nous avez honoré d'avoir examiné notre mémoire de fin d'études ; Nous vous sommes très reconnaissantes et nous vous adressons nos meilleurs remerciements.

► Nous vifs et sincères remercions à la responsable du laboratoire recherche et développement, pour son accueil, sa disponibilité et ses conseils éclairés dans la réalisation des préparations dermocosmétiques.

► Un immense remerciement s'adresse au chef de service du laboratoire central de l'EHS El Kettar, ainsi que tous les membres du laboratoire pour leur précieuse aide dans le screening antibactérien et l'identification des espèces bactériennes.

► Sincères et profonds remerciements s'adresseront aussi au chef de service de toxicologie, ainsi tous les membres du Centre.

► Nous adressons nos sincères remerciements à Pr. BENZEMRANE, chef de service d'orthopédie B du CHU de Douéra, pour son accueil, et tout particulièrement le coordinateur, pour son accompagnement lors des prélèvements purulents des pieds diabétiques.

► Nous adressons nos vifs remerciements et notre profonde reconnaissance à tout le corps enseignant de la Faculté, et à tous nos enseignants.

DEDICACES

Avant toute chose, je rends grâce à Allah, Le Très-Haut, pour Sa miséricorde infinie, pour m'avoir guidée, protégée et accordé la force, la patience et la persévérance nécessaires à l'accomplissement de ce travail. Sans Sa volonté, rien n'aurait été possible. Alhamdoulillah pour chaque étape franchie.

À ma précieuse mère Madjeda,

Ma lumière dans l'obscurité, mon refuge dans l'épreuve. Tu es l'incarnation de la douceur, du sacrifice et de l'amour inconditionnel. Tes invocations m'ont portée plus loin que je ne l'aurais cru possible. Ce travail est autant le tien que le mien. Qu'Allah te préserve et te comble de santé, de paix et de longue vie.

À mon cher père sofiane,

Pour ton soutien discret mais constant, pour ta force rassurante et tes sacrifices silencieux. Merci d'avoir toujours cru en moi, même sans le dire. Qu'Allah te récompense pour tout.

À mes frères,

Merci pour votre affection, vos conseils simples mais justes, et votre soutien indéfectible. Votre présence a toujours été un pilier dans mon parcours.

À mes cousines,

Pour votre tendresse, vos sourires et vos encouragements spontanés, qui ont allégé bien des moments de doute. Vous avez été, sans le savoir, des sources de motivation et ma bulle de positivité.

À mon oncle Bilel,

Celui qui a été comme un deuxième père pour moi. Ton soutien constant, ta générosité et ta bienveillance m'ont profondément touchée. Qu'Allah te récompense pour tout ce que tu as fait pour moi, dans l'ombre et dans la lumière.

À ma binôme,

Complice de cette aventure, avec qui j'ai traversé les moments de doute, de fatigue, mais aussi de réussite. Merci pour ta détermination, ta patience et ton énergie tout au long de ce chemin partagé.

Et enfin, à mes regrettés grands-pères,

Qu'Allah leur accorde Son pardon et les accueille dans Son vaste paradis. J'aurais tant souhaité qu'ils soient présents pour partager cette réussite. Leur absence est lourde, mais leur souvenir continue d'éclairer mon cœur. Ce travail leur est dédié, avec amour et respect.

FADILA AYA

DEDICACES

Avant toute chose je tiens à remercier Allah, de m'avoir donnée la force et le courage de mener à bien ce modeste travail Je souhaite dédie ce travail à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de cette expérience

À mes chers parents Hayet et Fateh,
piliers de ma vie pour leur amour inconditionnel leur patience infinie et leur encouragements constants qui m'ont donné la force et la détermination d'avancer

À ma famille,
pour avoir été ce pilier solide dans les moments de doute comme dans les instants de joie.

Un merci tout particulier à mon frère Abdelali et à ma sœur Samira et a mes tantes pour leur présence constante, leur soutien sincère et leurs encouragements précieux. Votre bienveillance et votre confiance ont été un moteur essentiel tout au long de ce parcours.

À ma binôme Aya,
avec qui j'ai partagé ce chemin, ses haut et ses bas, ses doutes et ses victoires, malgré les nombreux obstacles, nous n'avons jamais cessé d'avancer. Merci pour ton courage et ta belle énergie

À mes grands parents
Que dieu repose leurs âmes j'aurai tant aimé qu'ils soient présents pour voir ma réussite et en être fiers.
Leur souvenir m'accompagne chaque jour, et ce travail leur est aussi dédié.

Et enfin, À mes enseignants et encadrants, académique et professionnelle pour leur expertise précieuse leurs conseils avisé et l'opportunité qu'ils m'ont offerte de grandir dans un environnement stimulant.

CHAHRAZED

RESUME

Les ulcères du pied diabétique sont l'une des complications les plus fréquentes et graves du diabète sucré, notamment chez les patients atteints de neuropathie périphérique et/ou de maladie artérielle périphérique. Les ulcères du pied diabétique ont un impact négatif considérable sur la vie des patients et sont hautement vulnérables à l'infection.

Le traitement repose essentiellement sur un contrôle strict de la glycémie, des soins locaux appropriés, la prévention ou le traitement des infections. Dans ce contexte thérapeutique rigoureux, l'usage des huiles essentielles peut parfois être envisagé comme un complément.

L'objectif de notre travail consiste à évaluer le pouvoir inhibiteur des huiles essentielles sur la croissance des bactéries isolées des infections du pied diabétique. Les huiles aromatiques ont présenté une activité antibactérienne très faible, limitée exclusivement à *Staphylococcus aureus*, avec des diamètres de zone d'inhibition modestes, avec un effet dose-dépendant. Même constat en utilisant la technique de micro-atmosphère.

Par ailleurs, des préparations topiques à base des essences végétales ont été formulées. Au final, nous signalons la nécessité de mener d'autres essais pour valider ces données expérimentales et des formulations optimales ainsi que le profil de tolérance.

Mots-clés = Plantes médicinales ; Huiles essentielles ; Diabète ; Infections du pied diabétique ; Pouvoir irritant.

ABSTRACT

Diabetic foot ulcers are one of the most common and severe complications of diabetes, particularly in patients with peripheral neuropathy and/or peripheral arterial disease. Diabetic foot ulcers have a significant negative impact on the patient's quality of life and are highly susceptible to infection.

Treatment primarily involves strict blood sugar control, appropriate local care, and the prevention or treatment of infections. In this rigorous therapeutic context, the use of essential oils may sometimes be considered as a complementary treatment.

The aim of our work was to evaluate the inhibitory effect of essential oils on the growth of bacteria isolated from diabetic foot infections. Aromatic oils showed very weak antibacterial activity, limited exclusively to *Staphylococcus aureus*, with modest inhibition zone diameters and a dose-dependent effect.

Furthermore, topical preparations based on plant essences were formulated. Ultimately, we highlight the need for further trials to validate these experimental data, optimal formulations, and the tolerance profile.

Keywords = Medicinal plants; Essential oils; Diabetes; Diabetic foot infections and ulceration ; Irritant potential.

ملخص

تُعد القرحة القدم السكري من أكثر المضاعفات شيوعاً وخطورة في مرض السكري، لا سيما لدى المرضى الذين يعانون من اعتلال الأعصاب الطرفية و/أو مرض الشرايين الطرفية. تؤثر القرحة القدم السكري بشكل سلبي كبير على حياة المرضى وهي عرضة بشدة للعدوى.

يعتمد العلاج بشكل أساسي على التحكم الصارم في مستويات السكر في الدم، والرعاية الموضعية المناسبة، والوقاية من العدوى أو علاجها. في هذا السياق العلاجي الصارم، قد يتم التفكير في استخدام الزيوت الأساسية كعلاج تكميلي في بعض الأحيان.

هدف عملنا هو تقييم تأثير الزيوت الأساسية المثبط على نمو البكتيريا المعزولة من عدوى القدم السكري، وتحديد خصائصها المضادة للالتهابات. أظهرت الزيوت العطرية نشاطاً ضئيلاً ضد البكتيريا، مقتصرًا حصرياً على المكورات العنقودية الذهبية، مع مناطق تثبيط صغيرة وأثر يعتمد على الجرعة.

علاوة على ذلك، تم تحضير مستحضرات موضعية تحتوي على الزيوت النباتية. في النهاية، نؤكد على ضرورة إجراء مزيد من التجارب للتحقق من هذه البيانات التجريبية، والصيغ المثلى، وملف التحمل.

الكلمات المفتاحية = النباتات الطبية؛ الزيوت الأساسية؛ مرض السكري؛ عدوى القدم السكري.

Table des Matières

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des Abréviations

Introduction	1
Chapitre 1 = Synthèse bibliographique	2
1.1. Définition des plaies	2
1.2. Plaies du pied diabétique	2
1.2.1. Physiopathologie	3
1.2.2. Neuropathie	4
1.2.3. Artériopathie	5
1.3. Infections des pieds diabétiques	5
Chapitre 2 = Matériel et méthodes	9
2.1. Matériel	9
2.1.1. Huile essentielle testée	9
2.1.2. Souches bactériennes	9
2.1.3. Animaux de laboratoire	9
2.1.4. Milieux de culture et produits chimiques	11
2.2. Méthodes	11
2.2.1. Evaluation des propriétés antimicrobiennes par aromatochrome	11
2.2.2. Evaluation des propriétés antimicrobiennes in vitro par microatmosphère	12
2.2.3. Préparations cosmétiques	13
2.2.4. Détermination du pouvoir toxicologiques des préparations topiques	14
2.2.4.1. Test d'irritation cutanée primaire chez le lapin	14
2.2.4.2. Détermination du pouvoir irritant oculaire par HET-CAM	15
2.2.5. Evaluation de l'activité antibactérienne in silico	16
2.2.6. Etude Statistique	17

Chapitre 3 = Résultats et Discussion	18
3.1. Pouvoir antibactérien des huiles essentielles in vitro	18
3.2. Détermination du pouvoir irritant des préparations dermocosmétiques	21
3.2.1. Indice d'irritation primaire cutané	21
3.2.2. Détermination du pouvoir irritant des préparations dermiques	22
3.3. Pouvoir antibactérien in silico par docking moléculaire	22
Conclusion	27
Références bibliographiques	28

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Principaux germes responsables en fonction de la situation clinique.

Tableau 2.1. Informations relatives aux lapins utilisés.

Tableau 2.2. Notation en fonction du temps et expression des résultats.

Tableau 3.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles en aromatogramme.

Tableau 3.2. Activité antibactérienne des huiles essentielles en microatmosphère.

Tableau 3.3. Résultats du docking moléculaire sur la protéine de liaison aux pénicillines.

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Lésions cliniques caractéristiques d'une infection du pied diabétique.

Figure 1.2. Physiopathologie de l'ulcère du pied diabétique.

Figure 2.1. Etapes de la réalisation de l'aromatogramme.

Figure 2.2. Dépôt du disque imprégné en huile sur le couvercle et incubation.

Figure 2.3. Etapes de la préparation des formulations dermiques à base d'huile essentielle.

Figure 2.4. Test d'irritation cutané primaire chez le lapin.

Figure 2.5. Structure 3D du récepteur protéique.

Figure 3.1. Interactions ligands-acides aminés du site actif de la protéine de liaison aux pénicillines.

LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC	American type culture collection
BMR	Bactérie multi-résistantes
DZI	Diamètre de zone d'inhibition
HE	Huile essentielle
HET-CAM	Hen's egg test on chorioallantoic membrane
IIP	Indice d'irritation primaire
KES	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i>
MH	gélose Muller-Hinton
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Économiques
PBP	Protéine de liaison aux pénicillines
UPD	Ulcère du pied diabétique

INTRODUCTION

De par le monde, l'incidence de l'ulcère du pied diabétique (UPD) est d'environ 4 à 15 % chez les diabétiques, la majorité survient dans le contexte d'un diabète de longue date, et l'ulcère demeure la porte d'entrée de nombreux pathogènes (Darbellay et al., 2011 ; Al-Mayahi et al., 2016). Parmi les espèces bactériennes incriminées dans les UPD, les bactéries à Gram positif sont les plus fréquentes, telles que le *Staphylococcus* qui est la plus communément identifiée, de façon isolée ou au sein d'une population polymicrobienne (Lee et al., 2023).

Par ailleurs, les traitements conventionnels (antibiotiques, désinfectants chimiques, pansements classiques) sont parfois coûteux, peu accessibles dans certaines régions, et ne favorisent pas directement la régénération tissulaire. Cela souligne un besoin urgent de solutions alternatives, efficaces et sûres, notamment dans un contexte mondial de crise de l'antibiorésistance (Cwajda-Białasik et al., 2022).

Face à ces limites, l'intérêt pour les thérapies naturelles, notamment les plantes médicinales et leurs distillats aromatiques ou huiles essentielles (HE), ne cesse de croître. Ces extraits naturels possèdent souvent des propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antioxydantes et cicatrisantes combinées. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que certaines HE inhibent efficacement la croissance de bactéries pathogènes multirésistantes (Chen et al., 2011 ; Chouhan et al., 2017 ; Andjić et al., 2022).

Aussi, l'incorporation des HE dans des formulations topiques constitue une stratégie particulièrement intéressante pour le traitement local des UPD. Ces formulations permettent une libération contrôlée des principes actifs, une pénétration cutanée améliorée, et une action prolongée au site de la plaie. Ces formulations naturelles sont bien tolérées, et répondent à une demande croissante de produits naturels, sûrs et efficaces (Miraj et al., 2023 ; Andjić et al., 2021).

A cet effet, notre travail de recherche vise un double objectif :

- Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielle sur des bactéries isolées, *in vitro*, par la technique d'aromatogramme et de microatmosphère, et *in silico*.
- Préparation de formulations dermiques à base d'HE, et évaluation de leur pouvoir irritant.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Définition des plaies

Les causes d'apparition des plaies sont de diverses natures telles que les agressions extérieures (éraflures), l'apparition spontanée (escarres) ou post-opératoire (incisions).

En fonction de ces causes, les plaies sont réparties en 4 groupes : traumatiques, post-opératoires, brûlures et dermabrasions. Selon l'importance de la blessure, les plaies de la peau sont hiérarchisées en fonction de la profondeur des couches atteintes. Les blessures du 1^{er} degré concernent uniquement l'épiderme.

Les blessures du 2^{ème} degré concernent les plaies dont l'épiderme est détruit ainsi qu'une partie du derme sous-jacent. Une dégradation totale de l'épiderme et du derme définit une blessure du 3^{ème} degré (Aubert, 2014).

1.1.1. Plaies aiguës

Elles résultent d'une blessure chirurgicale ou traumatique et progresse à travers les phases de cicatrisation ; elles cicatrisent normalement en 6 à 8 semaines (plaies traumatologiques, plaies opératoires et brûlures) (Kastit, 2018).

1.1.2. Plaies chroniques

Les plaies chroniques (escarres et ulcères) ne traversent pas les stades de cicatrisation dans l'ordre ou dans le temps, elles n'arrivent pas à cicatriser après 6 à 8 semaines.

Des maladies sous-jacentes (diabète, insuffisance veineuse/artérielle) ou des facteurs externes contribuent à la défaillance du processus de guérison ; toute plaie aiguë peut se chroniciser.

Le potentiel de guérison va dépendre des conditions locales et de l'état général du patient. La présence de certains facteurs locaux ou généraux peut être un indicateur des plaies à risque qui présentent peu de chance de guérison spontanée (Vézina, 2006).

1.2. Plaies du pied diabétique

La notion de « pied diabétique » regroupe l'ensemble des affections atteignant le pied, directement liées aux conséquences de la maladie diabétique.

L'infection du pied diabétique se définit par l'invasion et la multiplication de micro-organismes entraînant une réponse inflammatoire allant jusqu'à la destruction des tissus atteints (figure 1.1). L'infection du pied chez les patients diabétiques est une problématique fréquente, à forte morbidité et dont les coûts pour la santé publique sont élevés (Boukhris et al., 2018).



Figure 1.1. Lésions cliniques caractéristiques d'une infection du pied diabétique : nécrose, ulcération et purulence (Zanella et al., 2016).

1.2.1. Physiopathologie

Les patients diabétiques sont plus exposés que la population générale aux infections et en particulier à celles localisées au niveau du pied. Le mécanisme physiopathologique (figure 1.2) de l'infection du pied diabétique fait encore l'objet de controverses.

Pour certains auteurs, la fréquence des infections chez le patient diabétique serait en rapport avec un déficit des mécanismes cellulaires de défense majoré par l'hyperglycémie, capable d'altérer les fonctions des leucocytes (Aragon-Sanchez, 2010).

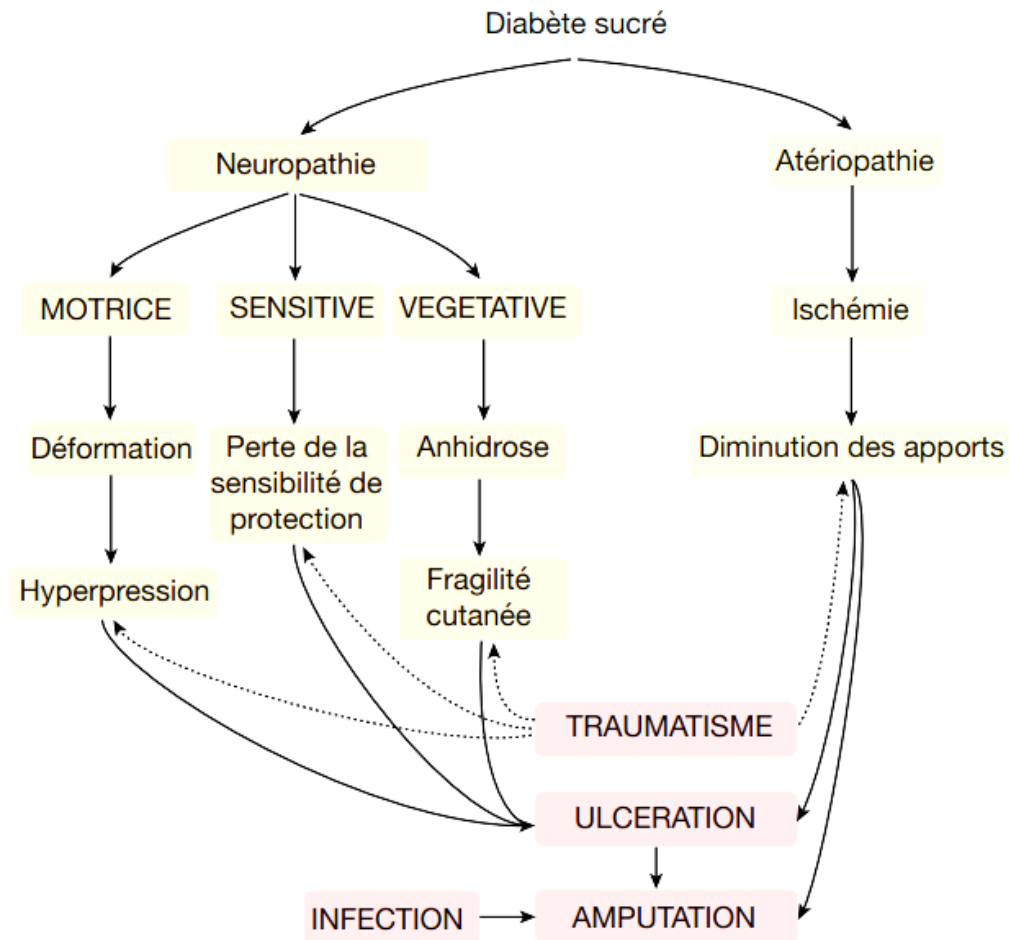


Figure 1.2. Physiopathologie de l'ulcère du pied diabétique (Martini et Senneville, 2018).

1.2.2. Neuropathie

En cas d'hyperglycémie de longue durée, une partie du glucose est transformée par l'aldose réductase en sorbitol.

Le sorbitol est ensuite réduit par la sorbitol-déhydrogénase en fructose (polyol pathway). Le tissu nerveux est dépourvu de sorbitol-déhydrogénase et, par conséquent, le sorbitol s'accumule dans les fibres nerveuses et dans les cellules de Schwann.

En outre, une microangiopathie cause des lésions ischémiques des nerfs, et qui est la conséquence de la glycosylation non-enzymatique de la membrane basale des capillaires et de la matrice endoneurale (Van Damme and Limet, 2005).

La majorité des infections se déclarent chez des patients présentant des pieds neuropathiques ou neuro-ischémiques dont les ulcérations servent de porte d'entrée. L'atteinte neuropathique est mixte : sensitive, motrice et végétative.

L'atteinte sensitive entraîne une perte de la sensibilité thermo-algique et proprioceptive tandis que l'atteinte motrice provoque la modification de l'architecture du pied et l'ankylose progressive des articulations du pied et de la cheville, avec le déplacement antérieur du poids du corps à la marche. L'atteinte neurovégétative, de par la diminution de la sudation, conduit à une sécheresse cutanée qui favorise le développement d'hyperkératose au niveau des zones de contrainte.

L'ensemble a pour conséquence l'augmentation des pressions plantaires et le temps de contact pied/sol. L'insuffisance vasculaire fragilise les tissus cutanés et limite l'augmentation du flux sanguin nécessaire à la cicatrisation en cas d'effraction cutanée, de traumatisme ou d'infection (Aragon-Sanchez et al., 2008).

1.2.3. Artériopathie

Se définit par des lésions sténosantes ou occlusives dues à un athérome et affectant les artères des membres inférieurs (Amarir, 2014). L'athérosclérose chez les patients diabétiques ne diffère pas de celle des non-diabétiques sur le plan anatomopathologique. En revanche, elle est plus précoce, plus sévère, et la répartition homme/femme est plus "égalitaire". Elle touche beaucoup plus fréquemment les artères de jambe, et sa fréquente association à la neuropathie explique l'absence de douleur en cas d'ulcération et l'absence de claudication intermittente. Dans l'étude d'Apelqvist, 50 % des patients porteurs d'une gangrène n'avaient pas de douleur de décubitus (Jacqueminet et al., 2002).

Au total, la neuropathie et l'artériopathie sont les deux principaux facteurs pathogènes des troubles trophiques du pied diabétique.

On distingue ainsi le « pied neuropathique pur » (environ 40 % des cas) et le « pied ischémique pur » (le plus rare, environ 15 % des cas). Le plus souvent la neuropathie et l'artériopathie co-existent, donnant l'aspect du « pied neuro-ischémique » (environ 45 % des cas) (Malgrange, 2008).

1.3. Infections des pieds diabétiques

L'infection est définie par l'invasion des tissus par des micro-organismes et leur multiplication, s'accompagnant d'une destruction tissulaire ou d'une réponse inflammatoire de l'hôte (Senneville, 2008 ; Lee et al., 2023).

L'infection est une complication majeure des plaies chroniques du pied diabétique. Elle est, dans la grande majorité des cas, secondaire à une plaie, et non sa cause. Le facteur déclenchant est d'abord une blessure mécanique donnant accès à l'infection, qui se propage ensuite aux tissus. Mais, parfois, une mycose interdigitale ou unguéale peut se surinfecter et donner naissance secondairement à une plaie (Jacqueminet et al., 2002).

1.3.1. Classification des infections du pied diabétique

1.3.1.1. Infections superficielles

Elles concernent les couches tissulaires au-dessus de l'aponévrose superficielle, séparant l'hypoderme de la couche musculaire sous-jacente, réalisant des tableaux de dermo-hypodermite bactérienne aiguë (Ha Van, 2008).

- Dermo-hypodermite bactérienne : C'est l'atteinte de l'hypoderme correspondant à la couche tissulaire située entre l'épiderme et l'aponévrose superficielle (Lipsky, 2008).
- Dermo-hypodermite bactérienne nécrosante (DHBN) : Ce sont des infections rares de la peau et des tissus sous-jacents extensives et graves qui nécessitent une prise en charge médico-chirurgicale. Les DHBN regroupent plusieurs entités que l'on différencie en fonction de l'atteinte en profondeur des tissus cutanés et sous-cutanés.
- Fasciite nécrosante : c'est une infection grave des tissus sous cutanés profonds et des fascias hypodermiques, avec nécrose cutanée secondaire ; les muscles sous-jacents seront épargnés jusqu'à un stade avancé (Martin et al., 2017).

1.3.1.2. Infections profondes

Elles touchent l'aponévrose superficielle, les muscles ou les structures ostéo-articulaires (Van, 2011).

Trois formes d'infection sont décrites :

- La gangrène humide : définie par la présence de tissus nécrotique noirâtres. Les lésions sont rapidement évolutives avec décollement et pus grisâtre d'odeur nauséabonde, pouvant aboutir à une dégradation rapide de l'état général avec sepsis, déséquilibre métabolique et insuffisance rénale.
- Les collections purulentes : peuvent se présenter sous la forme d'abcès (forme collectée) ou de phlegmon (forme circonscrite par les structures tissulaires) dans les parties molles du pied, voire de la jambe, parfois difficile à mettre en évidence cliniquement et pouvant nécessiter le recours à des examens d'imagerie (Richard et al., 2007).

- Ostéite et l'ostéo-arthrite : c'est une complication potentielle de toute plaie infectée du pied diabétique. En effet, l'ostéite du pied diabétique touche 30 à plus de 60% des patients. Elle doit être recherchée systématiquement (Senneville, 2008). L'ostéite survient en présence d'une ulcération du pied, elle correspond à l'extension d'une infection des tissus mous aux structures osseuses sous-jacentes à travers la corticale puis jusqu'au canal médullaire (Harteman, 2008).

1.3.2. Germes en causes

1.3.2.1. Cocci à Gram positif

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positifs immobiles, en générales groupés en petits amas (grappe de raisin), catalase (+), aérobies facultatives et fermentant les glucides (Elliott et al., 2012). Ils peuvent être répartis en souches pathogènes et relativement non pathogènes sur la base de la synthèse de coagulase.

Les infections humaines à *S. aureus* sont fréquentes (infection suppurative, infection cutanées, surinfection des plaies chirurgicales et les intoxications) mais restent généralement localisées. Elles ont des conséquences graves lorsque la bactérie envahit la circulation sanguine induisant une bactériémie suivie d'abcès interne si non traitée (Lenvinson, 2014).

Les staphylocoques à coagulase négatif (SCN), le plus souvent *Staphylococcus epidermidis* qui est commensale de la peau et qui peut être contaminant des hémocultures en cas de mauvaise aseptie du prélèvement, n'est pris en considération ou incriminé dans une bactériémie que dans certains conditions (immunodépression, le port de cathéter) et que lorsqu'il est isolé à partir de plusieurs flacons d'une même série d'hémoculture (SFM, 2018).

1.3.2.2. Bactérie à Gram négatif

Les entérobactéries sont des bactéries à Gram négatif, non sporulées et anaérobies facultatives. Elles sont oxydase négative, catalase positive, fermentent le glucose et réduisent les nitrates en nitrites. Dans cette famille sont retrouvées des espèces d'importance médicale tels que *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Yersinia pestis* (Limeres, 2017).

Les entérobactéries sont aussi bien retrouvées dans l'environnement que chez l'homme. En effet, de nombreux membres de cette famille sont des composants essentiels de la flore intestinale et naso-pharyngée, entreprenant diverses interactions avec leur hôte ; ils peuvent donc être commensaux, pathogènes opportunistes ou pathogènes strictes.

Les espèces appartenant à cette famille peuvent causer diverses infections, qu'elles soient nosocomiales ou communautaires, allant de la bactériémie à l'endocardite, en passant par les infections des voies respiratoires, de la peau, des tissus mous et des voies urinaires (Donnenberg, 2015).

Les *Pseudomonas aeruginosa* font partie de la famille des Pseudomonaceae (Delarras, 2007). Ce sont des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts, oxydase positive, mobiles par un flagelle polaire, se cultivent sur milieux ordinaires à une température optimale de croissance de 30° C. L'une des caractéristiques de l'espèce *P. aeruginosa* est la production d'un pigment bleu ou pyocyanine. C'est une bactérie répandue dans la nature. On la trouve aussi dans l'environnement hospitalier. *P. aeruginosa* possède des fimbriaes qui permettent l'adhésion aux muqueuses. Certaines souches sont entourées d'une pseudocapsule polysaccharidique qui augmente l'adhésion de la bactérie et exerce une action antiphagocytaire. La bactérie produit plusieurs toxines cytotoxiques : deux hémolysines et l'exotoxine A (Fauchère and Avril, 2002).

Les *Acinetobacter baumannii* font partie de la famille des Moraxellaceae (Delarras, 2007). Ce sont des bacilles à Gram négatif d'aspect coccoïde. Ces bacilles sont dépourvus de flagelles, aérobies stricts, non fermentaires, ne réduisent pas le nitrate et sont oxydase négatif (Denis et al, 2007). Leur culture est facile sur les milieux usuels, et donne des colonies lisses, muqueuses, blanc-jaunâtre et d'aspect butyreux. *A. baumannii* est retrouvé au sien de la flore cutanée commensale de 25% des individus. Très répandu dans l'environnement hospitalier, *Acinetobacter* peut se développer dans des solutions antiseptiques, dans des savons liquides et coloniser les appareils médicaux et les mobiliers, et les sols (Fauchère et Avril, 2002). Il est doté d'un lipopolysaccharide aux propriétés d'endotoxine et une capsule protège la bactérie de la phagocytose (Denis, 2007).

Tableau 1.1. Principaux germes responsables en fonction de la situation clinique (Van, 2011).

	Cocci Gram +	Bacilles Gram - (entérobactéries)	Anaérobies strictes
Infection superficielle	X		
Infection chronique ou déjà traitée	X	X	
Infection sévère et/ou nécrose	X	X	X

Chapitre 2

MATERIEL ET METHODES

Notre stage pratique de PFE s'est étalé sur une période de 5 mois, et a été effectué dans plusieurs structures sanitaires et laboratoires de recherche.

2.1. Matériel

2.1.1. Huile essentielle testée

L'extraction des huiles essentielles constitue une étape fondamentale pour la valorisation des plantes aromatiques et médicinales. La méthode utilisée est la distillation par entraînement à la vapeur d'eau, qui repose sur la volatilisation des composés aromatiques à une température inférieure à leur point d'ébullition, permettant ainsi leur séparation sans dégradation thermique. Cette technique présente l'avantage de préserver l'intégrité chimique des molécules fragiles et d'obtenir un distillat composé d'huile essentielle et d'hydrolat.

Les huiles essentielles proviennent d'une société de production et d'extraction des huiles essentielles et eaux aromatique dans la région de Blida.

Ces huiles aromatiques ont été obtenues par technique d'entraînement à la vapeur d'eau de la partie aérienne dans un alambic extraction sous pression.

La conservation des huiles aromatique a été faite dans des flacons teintés à température ambiante pour éviter toute oxydation ou contamination.

2.1.2. Souches bactériennes

Nous avons utilisé plusieurs espèces bactériennes, à savoir des bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif provenant des prélèvements purulents.

Certaines espèces sont de référence ATCC (American type culture collection).

2.1.3. Animaux de laboratoire

Le lapin est l'un des animaux de laboratoire historiquement utilisés dans l'évaluation de la tolérance cutanée des substances chimiques, pharmaceutiques et cosmétiques. Son choix repose sur la sensibilité particulière de sa peau, relativement fine et glabre sur certaines zones, ce qui en fait un modèle expérimental adapté pour étudier les réactions inflammatoires locales induites par l'application d'un produit.

Le lapin a été largement utilisé dans les tests de tolérance cutanée et oculaire, notamment à travers le test de Draize, pour évaluer le potentiel irritant des produits chimiques, pharmaceutiques et cosmétiques.

Pour évaluer les propriétés toxicologiques des HE et préparation dermocosmétiques, nous avons utilisé trois types d'animaux à savoir des souris et des rats, et des lapins. Toutes les informations relatives aux animaux utilisés sont rapportées dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1. Informations relatives aux lapins utilisés.

Race des lapins	Albinos
Nom scientifique	<i>Oryctolagus Cuniculus</i>
Souche	New Zealand White (NZW)
Poids (g)	2880 - 3000
Sexe	Mâles et femelles
Nourriture	Granulés

2.1.4. Milieux de culture et produits chimiques

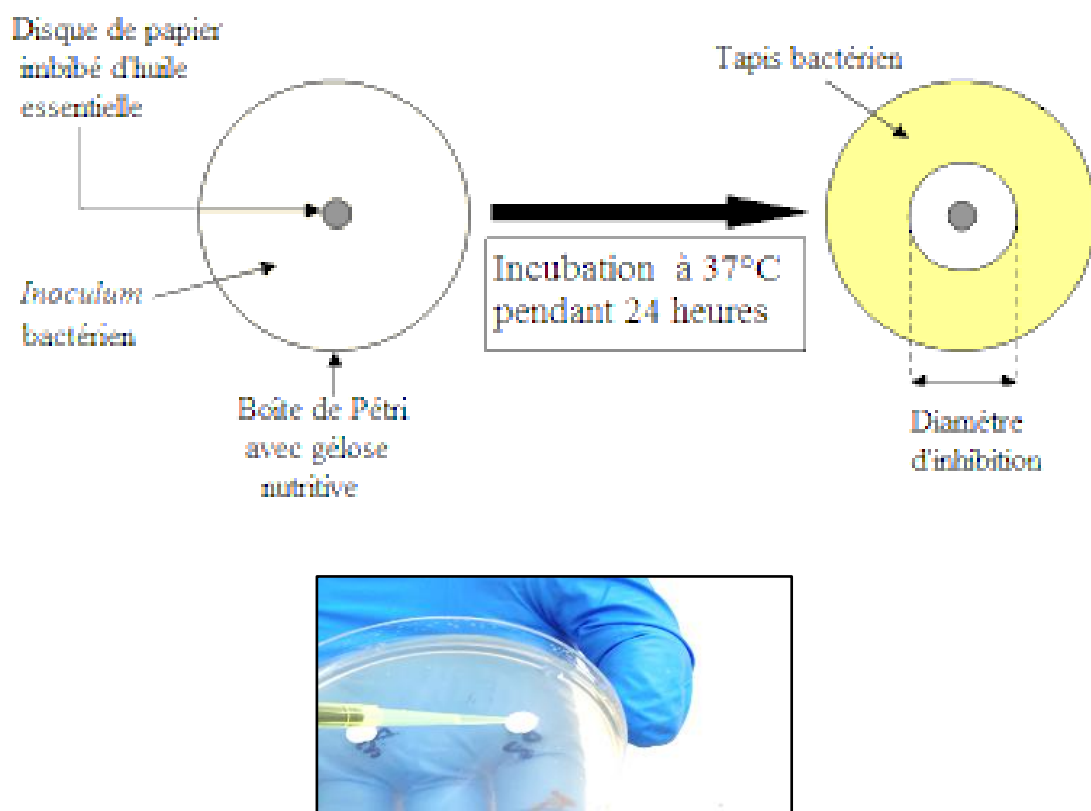
Le milieu de culture utilisé pour le screening antibactérien est la gélose Muller-Hinton (MH). D'autres milieux de culture (gélose nutritive, gélose Hektoen, gélose au sang frais ou cuit, gélose Chapman) ont été utilisées pour l'identification des colonies bactériennes isolées. Aussi, nous avons utilisé plusieurs antibiotiques comme contrôle positif.

2.2. Méthodes

2.2.1. Evaluation des propriétés antimicrobiennes par aromatoگرامme

L'activité antibactérienne des huiles a été évaluée *in vitro* par la méthode de diffusion en milieu gélosé (aromatoگرامme) (figure 2.1). Après isolement et identification, une suspension bactérienne a été ensemencée en nappe sur des boîtes de gélose MH (Lopez et al., 2005).

Des disques de papier stériles ont été imprégnés avec cinq volumes croissants d'HE pures, et déposés stérilement sur la surface de l'agar. Des disques imprégnés d'antibiotiques standards ont été utilisés en parallèle comme témoins positifs de sensibilité. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures, puis les diamètres des zones d'inhibition (en mm) autour de chaque disque ont été mesurés à l'aide d'une règle.



Dépôt du disque imprégné en huile essentielle.

Figure 2.1. Etapes de la réalisation de l'aromatoگرامme *in vitro*.

2.2.2. Evaluation des propriétés antimicrobiennes *in vitro* par microatmosphère

L'évaluation de l'activité antibactérienne des HE a été réalisée par la méthode de la microatmosphère, une technique basée sur la volatilisation des composés aromatiques actifs (Lopez et al., 2005). Cette méthode permet de tester l'effet des vapeurs d'HE sur la croissance bactérienne, sans contact direct avec le milieu gélosé.

Sur la face intérieure du couvercle de chaque boîte de Pétri, un disque stérile a été déposé (figure 2.2.), puis imprégné avec des volumes croissants d'HE. Les couvercles ont ensuite été replacés hermétiquement sur les boîtes pour permettre la diffusion des vapeurs volatiles dans l'espace fermé. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures, en position inversée pour éviter tout contact entre le disque et la surface du milieu.

À l'issue de l'incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque central, en millimètres. Plus la zone claire est étendue, plus l'effet antibactérien de l'HE est jugé puissant.

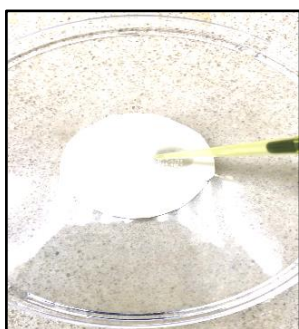
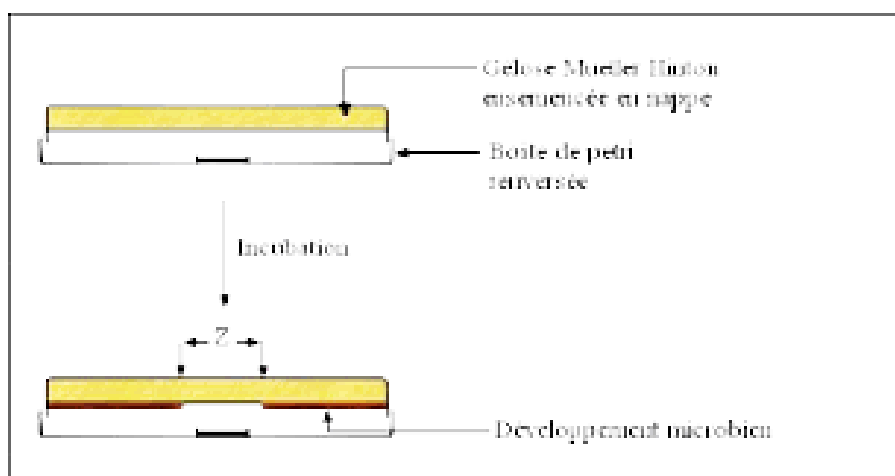


Figure 2.2. Dépôt du disque imprégné en huile sur le couvercle et incubation.

2.2.3. Préparations cosmétiques

La préparation d'une forme cosmétique à base d'HE repose sur une émulsion huile-dans-eau (O/W), organisée en trois phases : aqueuse, huileuse, et de finition (phase C) (figure 2.3). Dans un bécher en verre propre, nous avons pesé successivement les composants de la phase aqueuse. Le bécher est placé sur un agitateur magnétique chauffant, puis chauffé jusqu'à 80 °C tout en maintenant une agitation constante, jusqu'à dissolution homogène de tous les ingrédients. Pendant ce temps, dans un second bécher, nous avons pesé les ingrédients de la phase huileuse. Cette phase sera aussi chauffée à 80 °C, jusqu'à ce que tous les composants solides fondent complètement et que le mélange devienne limpide. Lorsque les deux phases sont à température égale, nous avons versé lentement la phase huileuse dans la phase aqueuse, sous forte agitation mécanique afin de favoriser la formation d'une émulsion stable. Enfin, la phase C sera préparée. Cette phase sera ajoutée au mélange émulsionné encore chaud, sous agitation constante, pour permettre la gélification progressive et l'ajustement de la viscosité. Lorsque la préparation a atteint une température de 45–50 °C, nous avons ajouté l'HE (thermosensible) pour préserver ses propriétés volatiles. Le contrôle du pH est effectué à l'aide d'un pH-mètre calibré.

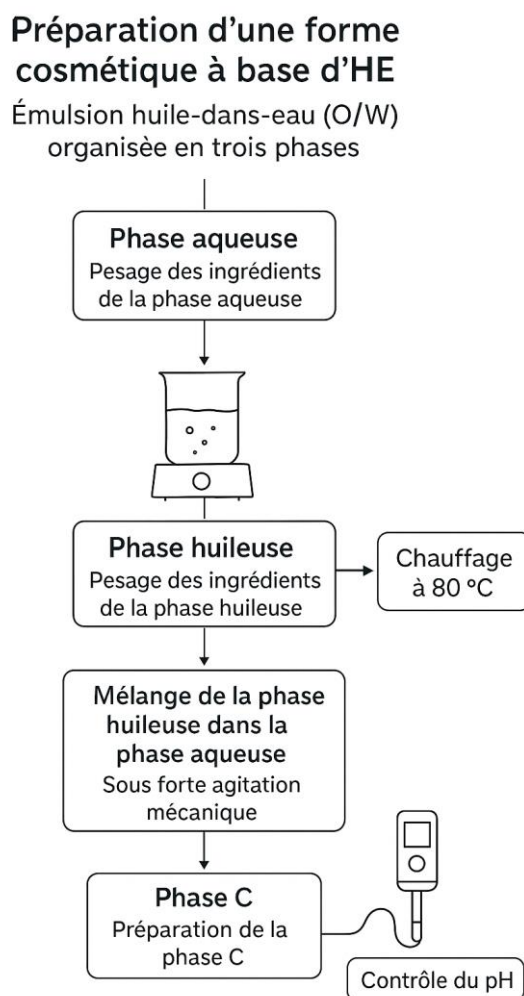


Figure 2.3. Etapes de la préparation dermique à base d'huile essentielle.

2.2.4. Détermination du pouvoir toxicologiques des préparations topiques

2.2.4.1. Test d'irritation cutanée primaire chez le lapin

L'évaluation de l'indice d'irritation cutanée primaire (IIPC) a été réalisée sur des lapins adultes (OCDE, 2015). La veille de l'application du produit, les animaux ont été pesés afin d'enregistrer leur poids initial. Ensuite, la zone dorsale et les flancs ont été rasés à la tondeuse, en dégagant une surface de 14 cm × 14 cm.

Le jour de l'application, trois scarifications superficielles, espacées d'environ 0,5 cm et longues de 2,5 cm, ont été réalisées à droite de l'axe vertébral à l'aide d'un vaccinostyle. Ces incisions de l'épiderme ont été faites sans saignement, afin de simuler une peau légèrement altérée.

La gaze imprégnée a été appliquée sur la peau, puis maintenue en place à l'aide d'un dispositif de pansement occlusif, garantissant un bon contact cutané. Quatre lectures d'observation ont été réalisées à des intervalles définis. La première lecture a eu lieu 4 h après l'application, avec le retrait du pansement et des gazes, suivi d'un rinçage doux à l'eau pour éliminer les résidus.

Les trois lectures suivantes ont été faites à 24 h, 48 h et 72 h après le traitement.

À chaque point de lecture, des observations cliniques précises ont été effectuées sur les zones scarifiées et non scarifiées. Les réactions cutanées ont été évaluées à l'aide d'une échelle de scores standardisée.

Pour le calcul de l'indice d'irritation primaire, le score total obtenu (érythème + œdème, sur les deux types de zones) est additionné, puis divisé par 8 (nombre total de mesures : 2 observations × 2 zones × 2 lésions).

Indice d'irritation primaire (IIP) = Score total / 8

- Interprétation des résultats :

$IIP \leq 0,5 \rightarrow$ Non irritant ; $0,5 < IIP \leq 2 \rightarrow$ Légèrement irritant ; $2 < IIP \leq 5 \rightarrow$ Irritant ; $5 < IIP \leq 8 \rightarrow$ Très irritant.

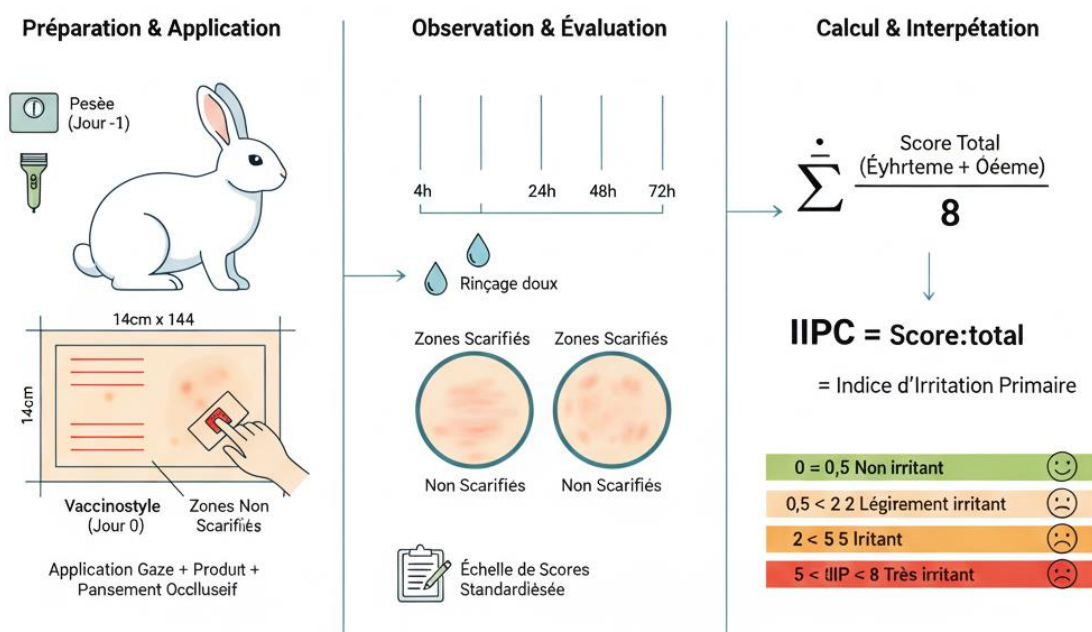


Figure 2.4. Test d'irritation cutané primaire chez le lapin.

2.2.4.2. Détermination du pouvoir irritant oculaire par HET-CAM

L'objectif de ce protocole est d'évaluer l'irritation potentielle des préparations dermiques formulées. Ce test remplace les modèles d'irritation oculaire sur animaux vivants par une méthode alternative fondée sur l'observation de la toxicité locale sur la membrane chorioallantoïque (CAM) d'œufs embryonnés de poule. Trois effets caractéristiques sont recherchés : l'hyperémie, l'hémorragie et la coagulation. Le temps d'apparition de chacun de ces signes est noté, puis un score d'irritation est calculé pour chaque échantillon testé (Luepke, 1985).

Tableau 2.2. Notation en fonction du temps et expression des résultats (Steiling et al., 1999).

Phénomène	Temps	Classification
Hyperémie	$T \leq 30 \text{ s}$	Pratiquement non irritant
	$30 \text{ s} < T \leq 2 \text{ min}$	
	$2 \text{ min} < T \leq 5 \text{ min}$	
Hémorragie	$T \leq 30 \text{ s}$	Faiblement irritant
	$30 \text{ s} < T \leq 2 \text{ min}$	
	$2 \text{ min} < T \leq 5 \text{ min}$	
Coagulation	$T \leq 30 \text{ s}$	Modérément irritant.
	$30 \text{ s} < T \leq 2 \text{ min}$	
	$2 \text{ min} < T \leq 5 \text{ min}$	
Irritant.		

Après application, les réactions de la membrane CAM ont été immédiatement observées à l'œil nu pendant 5 minutes.

Le temps d'apparition de chacun des trois effets est enregistré en secondes, et le score d'irritation (N) est calculé. Les produits sont ensuite classés selon la notation rapportée dans le tableau 2.2.

2.2.5. Evaluation de l'activité antibactérienne *in silico*

L'évaluation *in silico* de l'activité antibactérienne des principaux composés bioactifs des huiles a été réalisée par docking moléculaire à l'aide de la plateforme SwissDock (Grosdidier et al., 2011). Les ligands testés comprenaient notamment le carvacrol, le thymol, le citral et le géraniol, connus pour leur potentiel antimicrobien, en comparaison avec l'amoxicilline comme témoin positif. Les structures tridimensionnelles des ligands ont été téléchargées de la base de données PubChem. Le récepteur cible sélectionné est la protéine de liaison à la pénicilline (PBP) (PDB ID = 4DKI). Le protocole de docking a été lancé en mode rigide pour la cible. Les complexes ligand-récepteur les plus stables ont été retenus sur la base du meilleur score d'affinité (ΔG). Les interactions moléculaires clés ont été analysées et visualisées à l'aide du logiciel Biovia Discovery Studio Visualizer, permettant d'interpréter les mécanismes d'ancrage moléculaire.

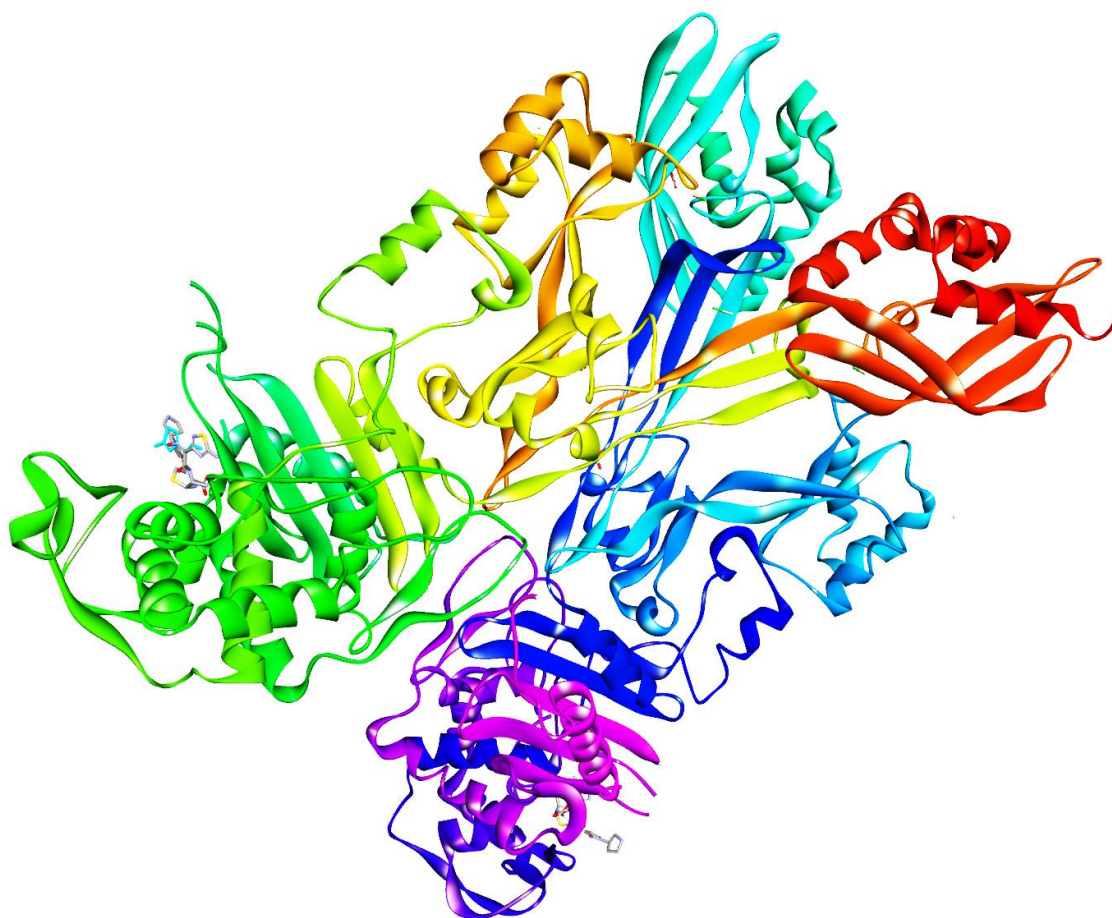


Figure 2.5. Structure 3D du récepteur protéique.

2.2.6. Etude Statistique

Les résultats de l'expérimentation animale sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-moyen. La signification statistique a été déterminée au moyen du test d'analyse de variance à deux facteurs (anova). Une $p < 0,05$ a été considérée comme différence significative.

Chapitre 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Pouvoir antibactérien des huiles essentielles *in vitro*

L'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles (HE) *in vitro* repose sur différentes méthodes permettant d'évaluer leur efficacité contre divers micro-organismes pathogènes. Parmi celles-ci, la méthode de diffusion en milieu gélosé constitue un test classique largement utilisé. Elle consiste à incorporer ou déposer une quantité définie d'huile essentielle sur une surface d'agarensemencé avec une souche bactérienne. Après incubation, le développement d'un halo d'inhibition autour du disque ou du puits traduit l'activité antibactérienne du composé testé.

Le tableau 3.1 présente les résultats de l'activité antimicrobienne des HE, dans un premier temps, par la technique d'aromatogramme (diffusion en milieu gélosé) contre les espèces bactériennes, en utilisant plusieurs volumes différents d'HE. L'efficacité est mesurée par le diamètre des zones d'inhibition en millimètres. A noter que le diamètre du disque (6 mm) a été inclus dans le calcul de la zone d'inhibition.

Tableau 3.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles en aromatogramme.

	Volume en huile essentielle (μ L/disque)				
	10	20	30	40	50
Bactéries					
<i>S. aureus</i>	11	11	11	12	12
Entérobactérie (KES)	-	-	-	-	-
<i>Proteus</i>	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i> (BMR)	-	-	-	-	-

ATCC = American type culture collection ; BMR = Bactérie multirésistante ; KES = *Klebsiella*,
Enterobacter, *Serratia*.

L'HE montre une activité antibactérienne très faible, limitée exclusivement à *S. aureus*, avec des diamètres très modestes, sans évolution significative malgré l'augmentation des volumes. Aucune inhibition n'a été observée pour les autres espèces bactériennes, même à la dose maximale, ce qui témoigne d'une activité restreinte.

La méthode de microatmosphère permet d'évaluer l'effet des composés volatils présents dans les huiles essentielles sur la croissance bactérienne. Dans ce cas, les micro-organismes sont cultivés sur un milieu gélosé, tandis que l'huile essentielle est placée sur un support séparé (par exemple, au niveau du couvercle de la boîte de Pétri). Durant l'incubation, les vapeurs volatiles diffusent dans l'atmosphère confinée de la boîte et exercent une action antimicrobienne. Cette approche est particulièrement adaptée à l'étude des huiles essentielles riches en monoterpènes et composés aromatiques volatiles, dont l'activité ne peut être correctement évaluée par simple diffusion dans l'agar.

Le tableau 3.2 présente les résultats de l'activité antimicrobienne des HE évaluées par la technique de microatmosphère (diffusion en phase vapeur).

Tableau 3.2. Activité antibactérienne des huiles essentielles en microatmosphère.

	Volume en huile essentielle (μ L/disque)		
	10	20	30
Bactéries			
<i>S. aureus</i>	-	-	-
Entérobactérie (KES)	-	-	-
<i>Proteus</i>	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC	-	-	-
<i>Klebsiella</i> (BMR)	-	-	-

ATCC = American type culture collection ; BMR = Bactérie multirésistante ; KES = *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*.

L'HE n'a présenté aucune activité antibactérienne détectable contre l'ensemble des souches. Cette absence de zones d'inhibition suggère que les composés volatils de l'HE ne sont pas actifs à distance, ou bien qu'ils ne soient pas libérés dans la phase vapeur pour exercer un effet antimicrobien mesurable. Cela limite fortement son intérêt dans une application par inhalation ou en atmosphère confinée.

La comparaison entre les deux méthodes précédentes révèle des différences notables tant sur le plan de la sensibilité que du mode d'action des HE testées. L'aromatogramme repose sur la diffusion des composés dans un milieu gélosé où l'HE doit traverser l'agar pour atteindre les germes, ce qui peut limiter l'efficacité de certains composants volatils ou hydrophobes. En revanche, la microatmosphère évalue l'effet antibactérien en phase vapeur, où les molécules volatiles diffusent librement dans l'espace clos de la boîte et agissent à distance, sans contact direct. L'HE, déjà peu active en aromatoigramme, est totalement inactive en microatmosphère, ce qui indique une faible libération de composés volatils ou une absence d'effet bactéricide à distance.

Ainsi, la microatmosphère apparaît plus sensible pour évaluer le potentiel des HE riches en composés volatils, tandis que l'aromatogramme reste adapté à l'évaluation d'huiles contenant des substances moins volatiles mais capables de diffuser dans la gélose. L'usage combiné de ces deux méthodes offre donc une vision plus complète du profil antimicrobien global d'une HE, en tenant compte de ses propriétés physico-chimiques, de sa voie d'administration potentielle, et du type de pathogènes ciblés.

Il a été rapporté que certaines HE présentent une activité antibactérienne contre un large spectre de bactéries des infections cutanées, y compris celles des ulcères du pied diabétique. Ces infections sont généralement polymicrobiennes, incluant des souches à Gram positif comme *S. aureus* et à Gram négatif comme *K. pneumoniae*, *Proteus* spp. ou *E. coli*, souvent multirésistantes.

Plusieurs études ont montré que l'HE exerce une inhibition significative de la croissance de ces germes, avec des diamètres pouvant dépasser 30 mm en méthode d'aromatogramme ou microatmosphère (Lu et al., 2018 ; Costa et al., 2019 ; Cui et al., 2019).

Le mécanisme antibactérien de ces HE repose sur leur capacité à perturber l'intégrité de la membrane bactérienne. Grâce à leur nature lipophile, ces composés s'intègrent dans la bicouche phospholipidique, altérant la perméabilité membranaire (Ultee et al., 2002 ; Bouyahya et al., 2017). Ils peuvent aussi inhiber la respiration cellulaire, bloquer les enzymes essentielles à la réplication bactérienne. Ces mécanismes multifactoriels expliquent en partie leur efficacité sur des souches multirésistantes.

3.2. Détermination du pouvoir irritant des préparations dermocosmétiques

3.2.1. Indice d'irritation primaire cutané (test de Draize)

L'indice d'irritation cutanée primaire (IIP) constitue un paramètre fondamental dans l'évaluation de la tolérance dermatologique des produits cosmétiques. Ce test, réalisé selon les recommandations de l'OCDE (2015), permet de déterminer la sévérité des réactions locales induites par l'application topique d'une substance sur la peau.

Dans le cas des préparations formulées à base d'huiles essentielles, l'étude de l'IIP revêt une importance particulière, car ces composés volatils renferment des molécules actives pouvant être à la fois bénéfiques (antimicrobiennes, anti-inflammatoires) et irritantes en fonction de leur concentration et de leur profil chimique.

L'évaluation cutanée de la préparation dermique à base d'HE, selon le test d'irritation primaire chez le lapin, n'a révélé aucun signe d'irritation ni sur les zones scarifiées ni sur les zones intactes. À 60 minutes et 24 heures après retrait du pansement, aucun lapin n'a présenté d'érythème ni de formation d'escarres (score 0/4) ni d'œdème (score 0/4). De même, aux lectures réalisées à 48 et 72 heures, les observations sont restées nulles pour l'érythème, l'escarre et l'œdème.

Le score total combiné des six lectures (zones scarifiées et non scarifiées) est de 0, conduisant à un indice d'irritation primaire (IIP = 0/8) classant la formulation comme non irritante.

L'absence de réaction inflammatoire ou irritative s'explique par le rôle protecteur de la formulation cosmétique, qui permet d'encapsuler ou disperser les composés actifs dans une base hydrophile ou huileuse, réduisant leur impact direct sur l'épiderme. Les excipients agissent comme agents adoucissants, filmogènes ou hydratants, capables de limiter la pénétration agressive des composés lipophiles, tout en assurant une libération progressive de l'actif.

Dans plusieurs études, les préparations enrichies en huiles essentielles bien diluées ont montré un faible indice d'irritation, confirmant leur bonne tolérance cutanée (Wojtunik-Kulesza, 2022 ; Soni et al., 2023). Cependant, certains composants, tels que le cinéole, l'eugénol ou le citral, peuvent induire une réaction inflammatoire lorsqu'ils sont présents à des concentrations élevées. L'IIP constitue donc un outil pour ajuster les doses afin de concilier efficacité et innocuité dermatologique.

3.2.2. Détermination du pouvoir irritant des préparations dermiques

Le test HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane) est une méthode alternative in ovo, largement utilisée pour évaluer le potentiel irritant des substances chimiques et des formulations dermiques. Basée sur l'utilisation de la membrane chorioallantoïdienne de l'œuf de poule fécondé, cette approche permet d'observer directement les réactions vasculaires induites par un produit appliqué sur une membrane richement vascularisée. Dans le cadre des préparations dermiques à base d'huiles essentielles, ce test représente un outil précieux pour évaluer la sécurité d'emploi tout en respectant les principes de réduction de l'expérimentation animale.

L'évaluation de l'effet irritant des préparations dermiques à base d'HE, par la méthode HET-CAM, a permis de déterminer la tolérance oculaire potentielle des produits testés.

Le sérum physiologique, utilisé comme témoin négatif, n'a provoqué aucune réaction vasculaire (score final = 0), confirmant l'absence d'effet irritant. À l'inverse, la base caustique, utilisé comme témoin positif, a induit une hémorragie marquée, une coagulation sévère et une hyperémie notable, avec un score total élevé, traduisant un fort pouvoir irritant.

En comparaison, les préparations à base d'HE ont obtenu un score final faible, ce qui confirme l'absence totale d'effet irritant sur la membrane CAM. Ces résultats indiquent que les préparations testées présentent une bonne innocuité en conditions simulant un contact muqueux, la classant dans la catégorie des produits non irritants.

Dans le domaine des cosmétiques, le HET-CAM s'est imposé comme une méthode alternative aux tests d'irritation chez l'animal, notamment après les interdictions progressives de l'expérimentation animale en Europe. Il permet de détecter précocement des formulations susceptibles d'entraîner des réactions inflammatoires locales, ce qui est crucial pour garantir la sécurité des produits (Pimentel et al., 2023).

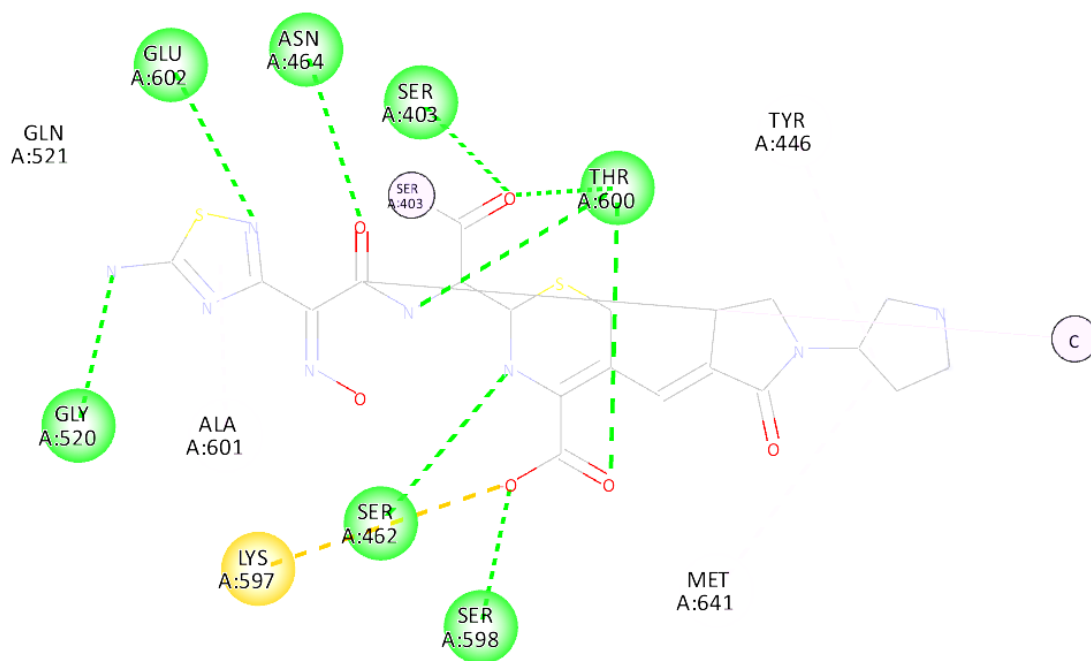
3.3. Pouvoir antibactérien *in silico* par docking moléculaire

Le docking moléculaire constitue un outil incontournable pour l'étude du potentiel antibactérien de nouvelles molécules. Il permet de prédire l'affinité de liaison entre un ligand (molécule candidate) et une cible biologique, généralement une protéine bactérienne essentielle à la survie ou à la virulence du micro-organisme. Grâce à des algorithmes de calcul basés sur la reconnaissance structurale et l'évaluation des énergies d'interaction, cette approche *in silico* fournit des informations précieuses avant toute validation expérimentale.

Les scores du docking moléculaire indiquent l'affinité de liaison entre chaque ligand et la protéine cible. Plus la valeur est négative, plus l'interaction ligand–protéine est stable, ce qui traduit une meilleure affinité. Les scores obtenus (tableau 3.3) pour les composés terpéniques se situent entre –7.010 et –7.428 kcal/mol, tandis que l'amoxicilline présente un score légèrement plus favorable à –7.630 kcal/mol. Ces valeurs négatives indiquent une interaction favorable entre les ligands et le site actif de la PBP (figure 3.1). Même si l'amoxicilline conserve le meilleur score, les monoterpènes phénoliques (carvacrol et thymol) présentent des affinités proches (respectivement –7.428 et –7.352 kcal/mole), suggérant une capacité compétitive de liaison au site catalytique de l'enzyme bactérienne. Ces résultats *in silico* suggèrent que certains composés terpéniques pourraient exercer une activité antibactérienne efficace en interférant avec la synthèse de la paroi bactérienne, tout comme les β -lactamines. Reste à confirmer ces résultats à travers des études expérimentales *in vitro* et *in vivo*.

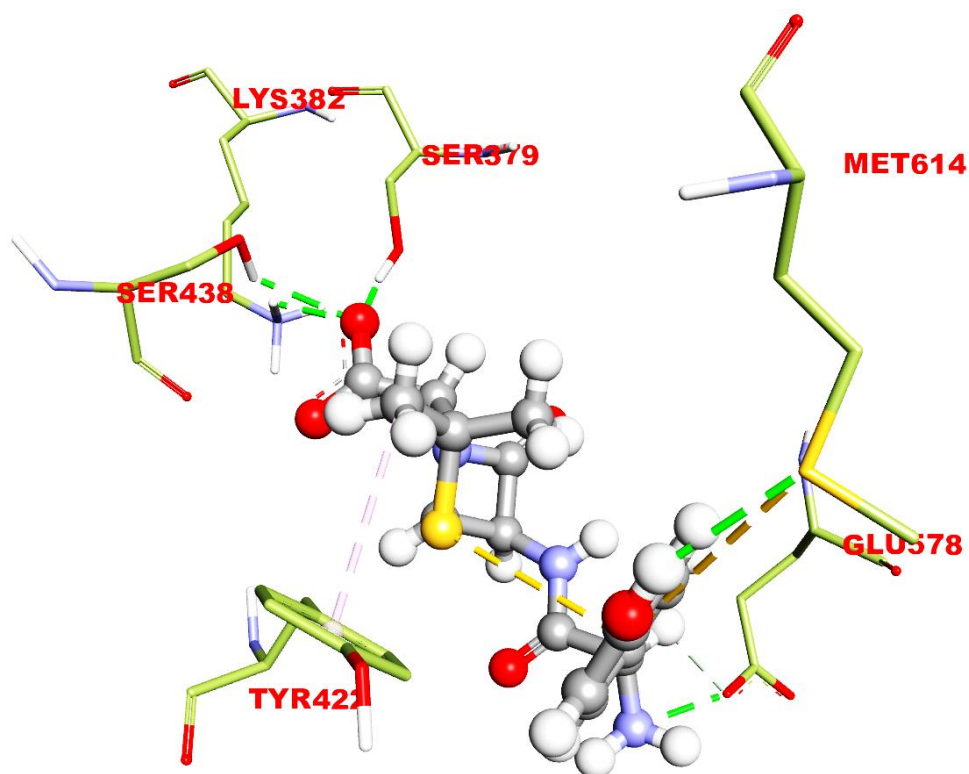
Tableau 3.3. Résultats du docking moléculaire sur la protéine de liaison aux pénicillines.

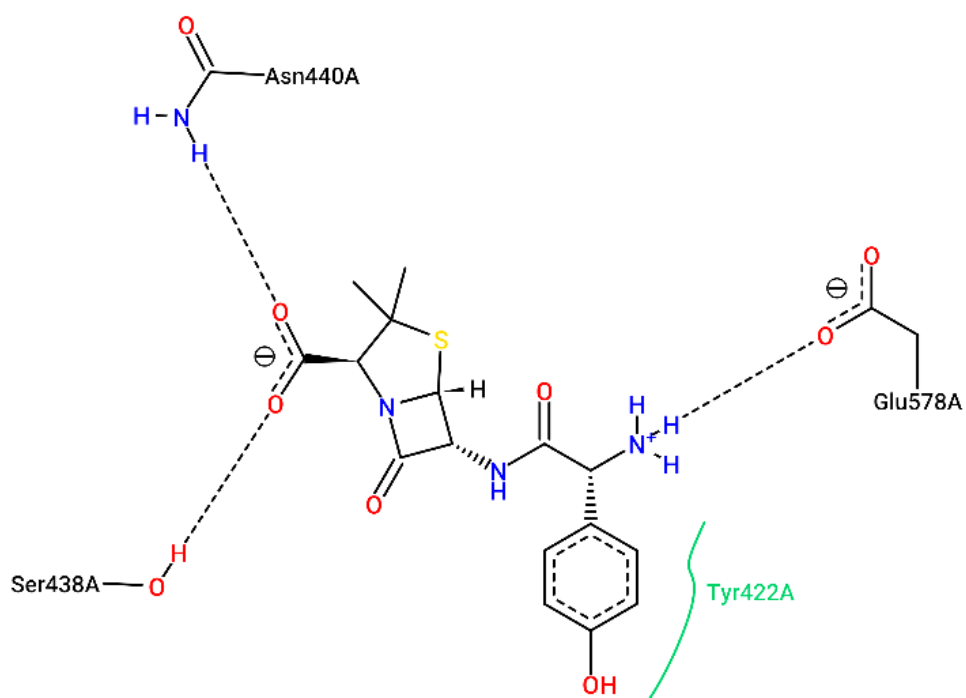
Ligand	Classe	Score d'affinité (kcal/mole)
Amoxicilline	Antibiotique (bêta-lactamine)	-7.4
Carvacrol	Phénol monoterpénique	-7.3
Thymol	Phénol monoterpénique	-7.2
Géranial	Aldéhyde monoterpénique	-7.10
Néral	Aldéhyde monoterpénique	-7.01



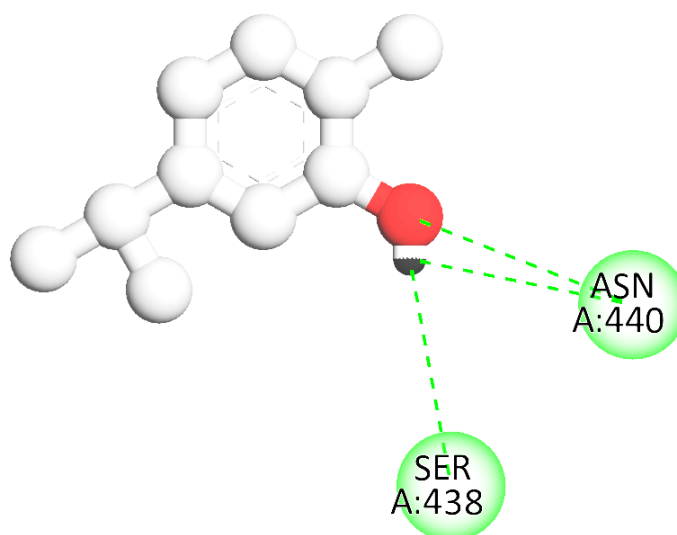
Interactions

	Salt Bridge		Alkyl
	Conventional Hydrogen Bond		Pi-Alkyl
	Pi-Donor Hydrogen Bond		Covalent bond





Amoxicilline



Interactions

Conventional Hydrogen Bond

Carvacrol

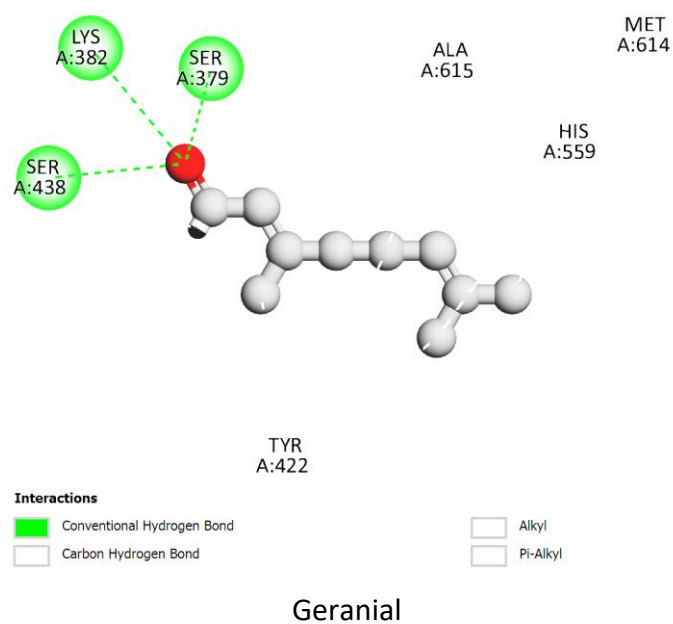
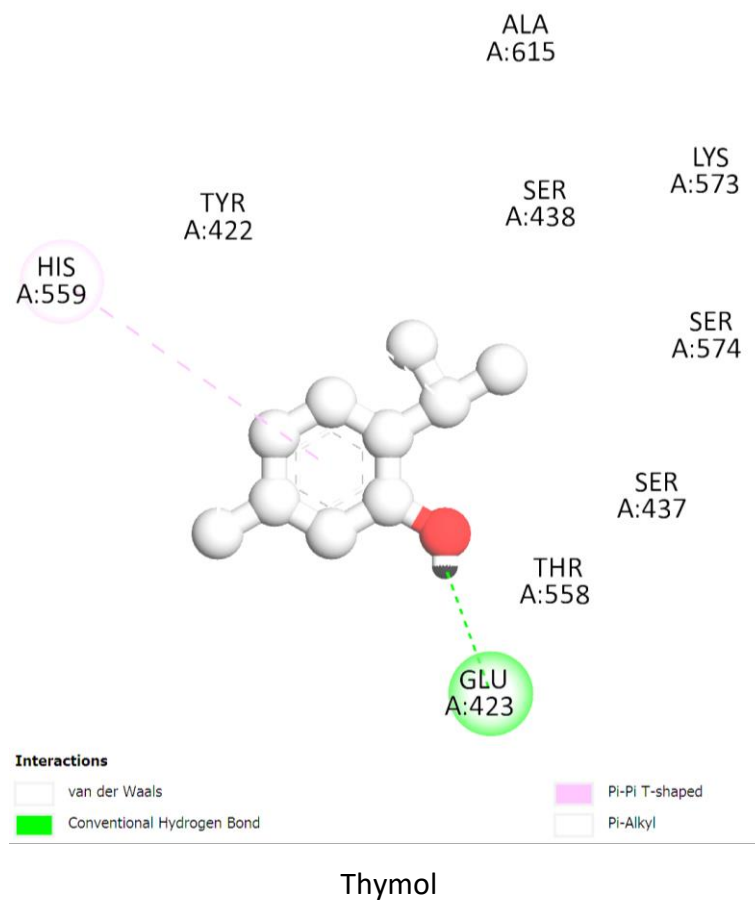


Figure 3.1. Interactions ligands-acides aminés du site actif de la protéine de liaison aux pénicillines.

CONCLUSION

Les plaies chroniques, souvent difficiles à cicatriser en raison de l'hyperglycémie, de la neuropathie périphérique et des infections polymicrobiennes, représentent un défi majeur en pratique clinique. L'application topique de huiles végétales, dans des formulations dermiques, vise à désinfecter la plaie, réduire l'inflammation et favoriser la régénération tissulaire.

Pour mieux cerner les bienfaits des huiles dans l'arsenal thérapeutique des infections du pied diabétique, nous avons conduit cette étude qui visait un triple objectif. En premier, nous avons évalué l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur des bactéries isolées, *in vitro*, par la technique d'aromatogramme et de microatmosphère.

L'huile essentielle a présenté une activité antibactérienne très faible, limitée uniquement à *Staphylococcus aureus*, avec des diamètres de zone d'inhibition faibles. Cette activité a été confirmée aussi en microatmosphère où la vapeur de l'essence ont montré un faible pouvoir inhibiteur.

Par la suite, des préparations dermiques ont été formulées à base des huiles aromatiques et ce afin d'évaluer leur pouvoir irritant sur modèle animal.

Les huiles essentielles représentent une alternative prometteuse et naturelle dans la prise en charge des ulcères du pied diabétique, en raison de leurs propriétés antibactériennes. Leur intégration dans des produits topiques pourrait renforcer l'efficacité des soins locaux tout en réduisant la dépendance aux antibiotiques classiques.

Toutefois, pour permettre leur intégration en pratique clinique, il est impératif de valider scientifiquement leur efficacité, leur innocuité, leur stabilité physico-chimique, et leur mode d'action moléculaire.

Il serait intéressant d'optimiser les formulations galéniques pour améliorer la pénétration cutanée, la biodisponibilité locale et la durée d'action des huiles. Une autre piste de recherche à explorer consiste à évaluer l'effet combiné entre différentes huiles (synergie) ou entre huile-antibiotiques.

Références Bibliographiques

1. Al-Mayahi, M., Cian, A., Kressmann, B., De Kalbermatten, B., Rohner, P., Egloff, M., & Uçkay, I. (2016). Associations of diabetes mellitus with orthopaedic infections. *Infectious Diseases*, 48(1), 70–73.
2. Amarir, M. (2014). Gestion du pied diabétique en milieu traumatologique orthopédique, analyse et autocritique. Thèse de doctorat en médecine, Université Mohammed V, Rabat, Maroc.
3. Andjić, M., Božin, B., Draginić, N., Kočović, A., Jeremić, J. N., Tomović, M., & Bradić, J. V. (2021). Formulation and evaluation of *Helichrysum italicum* essential oil-based topical formulations for wound healing in diabetic rats. *Pharmaceuticals*, 14(8), 813.
4. Andjić, M., Draginić, N., Kočović, A., Jeremić, J., Vučićević, K., Jeremić, N., & Bradić, J. (2022). Immortelle essential oil-based ointment improves wound healing in a diabetic rat model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, 112941.
5. Aragón Sánchez, J. (2008). Outcomes of surgical treatment of diabetic foot osteomyelitis: A series of 185 patients with histopathological confirmation of bone involvement. *Diabetologia*, 51(11), 1962–1970.
6. Aragón Sánchez, J. (2010). Treatment of diabetic foot osteomyelitis: A surgical critique. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 9(1), 37–59.
7. Aubert-Viard, F. (2014). Conception et évaluation d'un pansement multicouche antibactérien pour le traitement des plaies chroniques. Thèse de doctorat en sciences physico-chimiques et technologies pharmaceutiques, Université de Lille 2, France.
8. Boukhris, J., Benyas, Y., Boussaidane, M., Mekkaoui, J., Chafry, B., Benchebba, D., Bouabid, S., & Boussouga, M. (2018). Infection du pied diabétique : Du diagnostic à la prise en charge. *E. Masson*, 75, 9–15.
9. Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., & Dakka, N. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 16(S1), 173–183.
10. Chen, W., Lu, Y., Gao, M., Wu, J., Wang, A., & Shi, R. (2011). Anti-angiogenesis effect of essential oil from *Curcuma zedoaria* in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(1), 220–226.
11. Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58.
12. Costa, M. F., Durço, A. O., Rabelo, T. K., Barreto, R., & Guimarães, A. G. (2019). Effects of Carvacrol, Thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: A systematic review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(2), 141–155.

13. Cui, H., Zhang, C., Li, C., & Lin, L. (2019). Antibacterial mechanism of oregano essential oil. *Industrial Crops and Products*, 139, 111498.
14. Cwajda-Białasik, J., Mościcka, P., & Szewczyk, M. T. (2022). Antiseptics and antimicrobials for the treatment and management of chronic wounds: a systematic review of clinical trials. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 39(1), 141-151.
15. Darbellay, P., Uçkay, I., Dominguez, D., Mugnai, D., Filtri, L., Lew, D., & Assal, M. (2011). Traitement du pied diabétique infecté : une approche multidisciplinaire par excellence. *Revue Médicale Suisse*, (292), 894.
16. Delarras, C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou contrôle sanitaire*. Paris : Lavoisier.
17. Denis, F., Ploy, M.-C., Martin, C., Bingen, E., & Quentin, R. (2007). *Bactériologie médicale : Techniques usuelles*. Paris : E. Masson.
18. Donnenberg, M. S. (2015). Enterobacteriaceae. In *Infection Diseases and Their Etiologic Agents* (pp. 2503–2516).
19. Fauchère, J. L., & Avril, J. L. (2002). *Bactériologie générale et médicale*.
20. Grosdidier, A., Zoete, V., & Michielin, O. (2011). SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Research*, 39(Web Server issue), W270–W277.
21. Ha Van, G. (2008). Neuropathie diabétique. In *Le pied diabétique* (pp. 19–29). Elsevier.
22. Hartemann-Heurtier, A., & Senneville, E. (2008). Diabetic foot osteomyelitis. *Diabetes & Metabolism*, 34(2), 87–95.
23. Jacqueminet, S., Ha Van, G., Lejeune, M., & Hartemann-Heurtier, A. (2002). Prise en charge du pied diabétique infecté. *La Lettre de l'infectiologue*, 17(8), 263–270.
24. Kastit, C. H. (2018). *Diagnostic clinique et microbiologique d'une plaie infectée*. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Mohamed V de Rabat, Maroc.
25. Lee, J., Mashayamombe, M., Walsh, T. P., Kuang, B. K., Pena, G. N., Vreugde, S., & Kidd, S. P. (2023). The bacteriology of diabetic foot ulcers and infections and incidence of *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants. *Journal of Medical Microbiology*, 72(6), 001716.
26. Lenvinson, W. (2014). *Review of Medical Microbiology and Immunology* (13e éd.). McGraw-Hill Education.
27. Limeres, J., Diz Dios, P., & Scully, C. (2017). Systemic bacteria transmissible by kissing. In *Saliva Protection and Transmissible Diseases*.
28. Lipsky, B. A. (2008). New developments in diagnosing and treating diabetic foot infections. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 24(S1), S66–S71.

29. Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R., & Nerin, C. (2005). Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(17), 6939-6946.
30. Lu, M., Dai, T., Murray, C. K., & Wu, M. X. (2018). Bactericidal property of oregano oil against multidrug-resistant clinical isolates. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2329.
31. Luepke, N. P. (1985). Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology*, 23(2), 287–291.
32. Malgrange, D. (2008). Physiopathologie du pied diabétique. *La Revue de Médecine Interne*, 29(2), 231-237
33. Martin, A., Maladry, D., & Philippe, H.-J. (2017). Diagnostic et traitement des dermohypodermes bactériennes nécrosantes. *E. Masson*, 1, 23–26.
34. Martini, J., & Senneville, E. (2018). Le pied diabétique. *Journées Nationales du DES d'Endocrinologie-Diabète et Maladies Métaboliques*, Paris.
35. Miraj, S. S., Kurian, S. J., Rodrigues, G. S., Saravu, K., Rao, M., Raychaudhuri, S. P., & Bagchi, D. (2023). Phytotherapy in diabetic foot ulcers: a promising strategy for effective wound healing. *Journal of the American Nutrition Association*, 42(3), 295-310.
36. OCDE. (2015). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques n° 404 : Irritation/corrosion cutanée. Organisation de Coopération et de Développement Économiques.
37. Pimentel, E. F., Portes, D. B., & Endringer, D. C. (2023). HET-CAM method as an alternative model to ocular irritation test for natural product. *InterSciencePlace*, 18(3).
38. Richard, J.-L., & Lavigne, J.-P. (2007). Prise en charge du pied diabétique infecté. *E. Masson*, 222–230.
39. Senneville, E. (2008). Infection et pied diabétique. *E. Masson*, 29, 243–248.
40. Société Française de Microbiologie (SFM). (2015). REMIC : Référentiel en microbiologie médicale (5e éd., Tome 1), 295.
41. Soni, V., Bharti, D., Bharadwaj, M., Soni, V., Saxena, R., & Arora, C. (2023). Toxicity of essential oils. *Essential Oils: Sources, Production and Applications*, 253.
42. Steiling, W., Bracher, M., Courtellemont, P., & De Silva, O. (1999). The HET–CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicology in vitro*, 13(2), 375-384.
43. Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. J. A. E. M. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561–1568.
44. Van Damme, H., & Limet, R. (2005). Le pied diabétique. *Med Liège*, 60, 516–525.

45. Van, G. H. (2011). Le pied diabétique. Paris : Elsevier Masson.
46. Vézina, J., & SPC. (2006). Le soin des plaies : Principes de base. Université du Québec.
47. Wojtunik-Kulesza, K. A. (2022). Toxicity of selected monoterpenes and essential oils rich in these compounds. *Molecules*, 27(5), 1716.
48. Zanella, M. C., Kressmann, B., Wuarin, L., Coulin, B., Maitre, S., Suva, D., & Uçkay, I. (2016). Microbiologie et traitement antibiotique du pied diabétique infecté. *Revue Médicale Suisse*, 12(514), 732–737.

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

Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et la Vie
Département de Biotechnologie
et Agro-Ecologie



Laboratoire des Sciences Animales & Recherche en Biobanking
Laboratoire de Biotechnologie de Productions Végétales

Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du Diplôme de
Master Académique en Biotechnologies
Biotechnologies et pathologies moléculaires

THEME

**Étude des propriétés pharmaco-toxicologiques des essences aromatiques
*in vitro, in vivo et in silico.***

Présenté par

DIB Fadila Aya & GUERMACHE Chahrazed

Date de Soutenance = 07/2025

Devant le jury composé de :

Mme MAKHLOUF C.	MCA	Présidente	Univ. Blida 1
Mme ROUAKI K.	MCA	Examinatrice	Univ. Blida 1
M. BOKHATAM M.	Pr	Promoteur	Univ. Blida 1
Mme. AFER M.	MAA	Co-Promotrice	EHS ElKettar