



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la  
Recherche Scientifique  
جامعة البليدة 1  
Université Blida 1



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

## Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique  
Option  
Biotechnologie et Pathologies Moléculaires

## Thème

**Activités Pharmacologiques des Plantes à  
Parfum : Etude *in vivo*, *in vitro* et *in silico***

Présenté par

**AIT MOKHTAR Rajaa & TOUAHRI Radia**

Devant le Jury composé de =

Mme MAKHLOUF C.	Maître Assistante	Univ. Blida 1	Présidente
Mme BOKRETA S.	Maître Assistante	Univ. Blida 1	Examinatrice
M BOKHATAM M.N.	Maître de Conférences	Univ. Blida 1	Promoteur
Mme MERZOUGUI H.	Maître Assistante	Lab. Hygiène	Invitée

Session 2020-2021

## **REMERCIEMENTS**

Ce mémoire n'aurait pas pu être ce qu'il est, sans l'aide d'ALLAH source de toute connaissance qui nous a donné la force afin de l'accomplir.

Nous sommes très honorées de la présence dans ce jury. Nous lui adressons également nos remerciements de bien vouloir examiner et juger ce mémoire.

- Madame MAKHLOUF C. (Maître Assistante à l'Université Blida 1): nous sommes très honorées que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.
- Madame BOUKRETA S. (Maître Assistante à l'Université Blida 1): Vous nous avez honoré d'avoir examiné notre mémoire de fin d'études ; nous vous sommes très reconnaissantes et nous vous adressons nos sincères remerciements et soyez assurée de notre profonde gratitude.
- C'est avec un grand plaisir que nous adressons nos sincères remerciements à nos encadreurs pour la la disponibilité et la patience que vous avez manifesté à notre égard, ainsi que pour vos orientations pour mener à bien ce travail.

Nous adressons nos vifs remerciement et reconnaissance à tous le corps enseignant du Département de Biotechnologie et ceux de la Faculté SNV et particulièrement toutes celles et tous ceux qui nous ont enseigné durant notre cursus universitaire.

## DÉDICACES

*On tient à remercier le bon Dieu ٱ le tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail et pour tous ce que il m'a donnée pour que je puisse être la personne que je suis maintenant.*

*Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie que je dédie ce travail A mes très chers parents qui ont toujours été avec moi à mes côtés, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur Je les remercie pour leur éducation, leur sacrifice et leur assistance, merci pour tous, sans vous je ne serais pas là ou je suis, Je le dois, que Dieu vous garde, leur prête bonheur et longue vie et merci d'avoir fait de moi la princesse de votre royaume.*

*A mes chers frères : Youcef ma seconde moitié et Yacine pour vous exprimer toute mon affection et ma tendresse je dis à mon frère Yacine tu es toujours présent dans mon cœur je vous souhaite le meilleure des meilleurs.*

*A celle qui ont coloré ma vie par leurs sourires, par leurs esprits et par leurs bontés, amour, soutien et leurs conseils, à mes deux sœurs : Lydia et Amel que Dieu vous garde pour moi.*

*Ma binôme Radia, je ne peux te remercier autant pour votre précieuse aide et pour votre encouragements, je serais toujours reconnaissante, mille merci pour votre présence et votre travail.*

*A ma chère amie « Ikram » que j'aime merci d'être à mes côtés dans les moments les plus dures inoubliables.*

**Rajaa**

## DÉDICACES

*A mes très chers parents, qui m'ont tant offert sans jamais se lasser, qui m'ont transmis le désir et m'ont toujours accompagné tout au long de mes études avec leur amour, leur soutien, leur compréhension et leurs encouragements, et m'ont permis de devenir ce que je suis, avec tout mon amour et ma reconnaissance.*

*A celle qui ont éclairé ma vie  
Mes chères sœurs, Amel et Nassima pour leur soutien et leur encouragement avec tout mon amour et ma reconnaissance.*

*A mon cher frère Yacine*

*A mes chères cousines, Amira, Imen, Siham, Wissam  
Mon cousin Adel*

*A mes amies que j'ai vécues avec elles des beaux Moments au cours de mon cursus à l'université : Rajaa, Maroua, Nour el houda sérine, Nadia, Asma.*

*A mon binôme Rajaa que je lui remercie énormément pour Sa patience et son aide toute cette période*

# SOMMAIRE

---

**Liste des Figures**

**Liste des Tableaux**

**Liste des Abréviations**

**Résumé**

**Abstract**

**Introduction**

## **Chapitre I = DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

1. Monographie de la plante étudiée :

1.1. Genre

1.2. Etymologie

1.3. Taxonomie

1.4. Aire de repartition

1.5. Huile essentielle

1.5.1. Composition chimique

1.5.2. Toxicité de l'huile essentielle

1.5.3. Domaines d'applications et intérêts en phytothérapie

2. Peau et cicatrisation

2.1. Généralités et structure sur la peau

2.1.1. Epiderme

2.1.2. Derme

2.1.3. Hypoderme

2.1.4. Annexes épidermiques

2.2. Différentes étapes de cicatrisation

## **Chapitre II = MATERIEL ET METHODES**

---

2.1. MATERIEL

2.1.1. Huile essentielle

2.1.2. Souches microbiennes

2.1.3. Milieux de cultures et produits chimiques

2.2. Méthodes

- 2.2.1. Evaluation du pouvoir antibactérien et antifongique *in vitro*
  - 2.2.1.1. Identification des souches microbiennes
  - 2.2.2.3. Identification des bactéries
  - 2.2.2.4. Examen microscopique des souches fongiques
- 2.2.2. Evaluation du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle *in vitro*
  - 2.2.2.1. Méthode des aromagrammes (diffusion en milieu gélosé)
  - 2.2.2.2. Méthode de diffusion en phase vapeur (microatmosphère)
  - 2.2.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

### **Chapitre III: RESULTATS ET DISCUSSION**

---

- 3.1. Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle *in vitro*
  - 3.1.1. Activité antimicrobienne en aromatogramme
  - 3.1.2. Activité antimicrobienne en microatmosphère
  - 3.1.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)
- 3.3. Activité anti-inflammatoire *in silico* par docking moléculaire
  - 3.3.1. Énergie d'interaction et affinité
  - 3.3.2. Interactions ligands-site catalytique

### **CONCLUSION**

### **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## Liste des Abréviations

**ATB** = Antibiotique

**ATCC** = American Type Culture Collection

**CMB** = Concentration Minimal Bactéricide

**CMI** = Concentration Minimal Inhibitrice

**DAB** = Diaminobenzidine

**GN** = Gélose Nutritive

**HE** = Huile essentielle

**HRP** = Horseradish peroxidase

**IL** = Interleukine

**MEC** = Matrice extra-cellulaire

**MH** = Muller-Hinton

**P** = Pénicillin

**PDGF** = Platelet Derived Growth Facteur

**PRL** = Peperaceliline

**SAB** = Sabouraud

**TBS** = Tampon Buffer Substrate

**TGF** = Transforming Growth Factor

**TI** = Ticarciline

**TNF** = Tumor Necrosis Factors

**TRS** = Target Retrieval Solution

**VEGF** = Vascular Endothelial Growth Factor

## Liste des Tableaux

Tableau 1.1. Taxonomie de la plante.

Tableau 2.1. Souches microbiennes utilisées dans le screening antimicrobiens.

Tableau 3.1. Screening antibactérien de l'essence *in vitro*.

Tableau 3.2. Screening antifongique de l'huile essentielle *in vitro*.

Tableau 3.3. Résultats de la détermination des CMI par dilution en milieu gélosé.

Tableau 3.4. Résultats de docking moléculaire des ligands.



# Liste des Figures

Figure 1.1. Partie aérienne.

Figure 1.2. Distribution en bassin méditerranéen.

Figure 1.3. Photos de microscopie optique d'une coupe calice.

Figure 1.4. Photos de microscopie de trichome glandulaire.

Figure 1.5. Exemples de mono- et sesquiterpènes linéaires, mono- ou polycycliques.

Figure 1.6. Représentation schématique de la structure de la peau.

Figure 1.7. Illustration schématique de l'épiderme.

Figure 1.8. Quatre populations cellulaires de l'épiderme.

Figure 2.1. Aspect des différentes colonies microbiennes après repiquage.

Figure 2.2. Observation au microscope des souches après coloration de Gram.

Figure 2.3. Galerie API 20NE.

Figure 2.4. Observation au microscope optique des souches fongiques.

Figure 2.5. Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle en milieu solide.

Figure 2.6. Illustration de la méthode de Microatmosphère.

Figure 2.7. Téléchargement de la protéine.

Figure 2.8. Structure 3D de l'enzyme.

Figure 2.9. Structure 3D de l'enzyme.

Figure 2.10. Elimination des molécules Hetatoms et autres ligands.

Figure 2.12. Docking multiple.

Figure 2.13. Visualisation des différentes interactions.

## RESUME

---

Un travail de recherche a été précédemment entrepris dans le but d'évaluer le pouvoir pharmacologique de l'essence aromatique d'une plante à parfum de la famille des lamiacées. Aussi, le pouvoir antimicrobien de l'HE a été exploré *in vitro* sur différentes souches microbiennes. En outre, l'aspect bio-informatique n'a pas été délaissé puisque nous avons entrepris une étude *in silico* concernant les propriétés pharmacologiques des molécules caractéristiques de l'HE sur l'inhibition de plusieurs récepteurs enzymatiques impliqués dans certaines pathologies inflammatoires. L'étude de l'activité antimicrobienne de l'HE a été accomplie par deux tests complémentaires (aromatogramme et microatmosphère). En définitif, l'étude histopathologique a bel et bien confirmé le bien-fondé de l'utilisation de cette fraction aromatique comme ingrédient actif dans des préparations galéniques. Cette action a été rendue possible aussi par l'effet antimicrobien de l'HE, démontré antérieurement, et qui jouait un rôle majeur dans la prévention des surinfections des plaies.

**Mots-clés :** Huiles essentielles ; Propriétés pharmacologiques, Activités antibactérienne et antifongique ; Amarrage moléculaire.

## ABSTRACT

---

A previous research was done on the evaluation of the biological effect of essential oil (EO). The antimicrobial activity of EO has also been assessed *in vitro* against different microbial strains. In addition, the molecular docking of some major compounds of EO was carried out in order to evaluate its anti-inflammatory property *in silico*. The antimicrobial activity of EO was realized using two complementary assays (disc diffusion and vapor diffusion methods). Finally, the histopathological study has indeed confirmed the health benefit of EO as an active ingredient in topical ointment. This effect was also made possible by the antimicrobial effect of EO, previously demonstrated, and which played a major role in the prevention of secondary wound infections.

**Keywords:** Essential oils; Pharmacological effects; Antibacterial and antifungal activities; Molecular docking.

# INTRODUCTION

---

---

La peau richement vascularisée et innervée, assure différentes fonctions vitales pour l'organisme comme l'élimination d'agents nocifs, l'oxygénation ou la protection des tissus. Lorsqu'une plaie survient, débute instantanément les processus d'inflammation et de cicatrisation. Il faudra alors entre 6 et 12 mois à la peau pour retrouver son aspect. Mais quand une plaie ne se répare pas dans de bonnes conditions, elle peut laisser des traces plus ou moins visibles et inesthétiques. Pour bien cicatriser et éviter de voir apparaître des marques sur l'épiderme, il faut appliquer des gestes simples mais indispensables pendant les trois phases du processus de cicatrisation, à savoir la phase vasculaire, la phase de bourgeonnement et la phase de remodelage. En effet, la cicatrisation d'une plaie se déroule en deux grandes étapes qui sont la formation de la cicatrice puis sa maturation (**George Broughton et al., 2006 ; Senet & Raynaud-Simon, 2007**).

Pour que les lésions de la peau guérissent rapidement et dans les meilleures conditions, il est conseillé de bien nettoyer, désinfecter et protéger la cicatrice. Ces trois étapes sont essentielles car elles permettent d'éliminer les germes qui ont pu pénétrer dans la lésion et de protéger la plaie des corps étrangers. Elles limitent aussi les risques d'infection et favorisent la cicatrisation. Autre astuce pour accélérer ce processus : maintenir la lésion dans un milieu humide, grâce à une crème cicatrisante et un pansement stérile. Cela permet à la plaie de ne pas sécher à l'air libre et empêche aussi la formation d'une croûte (**Kottler, 2017 ; Boucher et al., 2017**).

De ce fait, notre travail vise à valoriser l'essence végétale de cette plante à parfum en aromathérapie. Un travail de recherche a été précédemment entrepris concernant l'évaluation du pouvoir cicatrisant de l'essence aromatique de cette plante à parfum *in vivo*. En outre, l'aspect bio-informatique n'a pas été délaissé puisque nous avons entrepris une étude *in silico* concernant les propriétés pharmacologiques (anti-inflammatoires) des molécules caractéristiques de l'HE sur l'inhibition de plusieurs récepteurs enzymatiques impliqués dans certaines pathologies humaines.

**Chapitre I**

**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

# Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

---

## 1. Monographie de la plante étudiée

### 1.1. Genre

Le genre est l'un des plus importants genres de la famille des Lamiacées (Labiées). Ces dernières constituent une large famille de plantes dicotylédones qui comprend environ 7200 espèces et près de 236 genres répartis en 8 sous-familles.

De nombreuses espèces de cette famille sont des plantes aromatiques source d'HE très utiles pour l'aromathérapie, la parfumerie et l'industrie des cosmétiques.

On y rencontre aussi beaucoup d'espèces mellifères et également des espèces cultivées comme plantes condimentaires et ornementales (**Lis-Balchin, 2002 ; Benabdelkader, 2012**).

### 1.2. Etymologie

Le mot dérive du verbe laver. Il est peut être issu de l'italien (action de laver) mais peut remonter au latin *lavare* qui signifie laver et aussi se baigner, les Romains ayant utilisé pour parfumer leurs bains.

Cette étymologie laisse penser que très tôt la a été utilisée pour parfumer le linge fraîchement lavé.

Mais il est également possible que et soient tirés du latin *livere* (qui signifie "pour être livide ou bleuâtre") qui en latin médiéval (**Benabdelkader, 2012**).

Entre les années 1950 et 1990, la sélection variétale s'est principalement axée sur le rendement et la qualité de l'huile essentielle. Elle est empirique et consiste à sélectionner en champ les individus présentant les meilleurs rendements.

### 1.3. Taxonomie

Cependant, toutes les principales formes cultivées et commercialisées résident dans les sections *stoechas* et *spica*. Cette organisation taxonomique a été réalisée sur la base de plus de 40 critères anatomiques mais aussi par une analyse phylogénétique basée sur la comparaison de séquences nucléaires.

**Tableau 1.1. Taxonomie.**

<b>Règne</b>	Plantes
<b>Sous règne</b>	Plantes vasculaires
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotylédones
<b>Sous classe</b>	Dialypétales
<b>Ordre</b>	Lamiales
<b>Famille</b>	Lamiaceae
<b>Sous-famille</b>	Nepetoideae

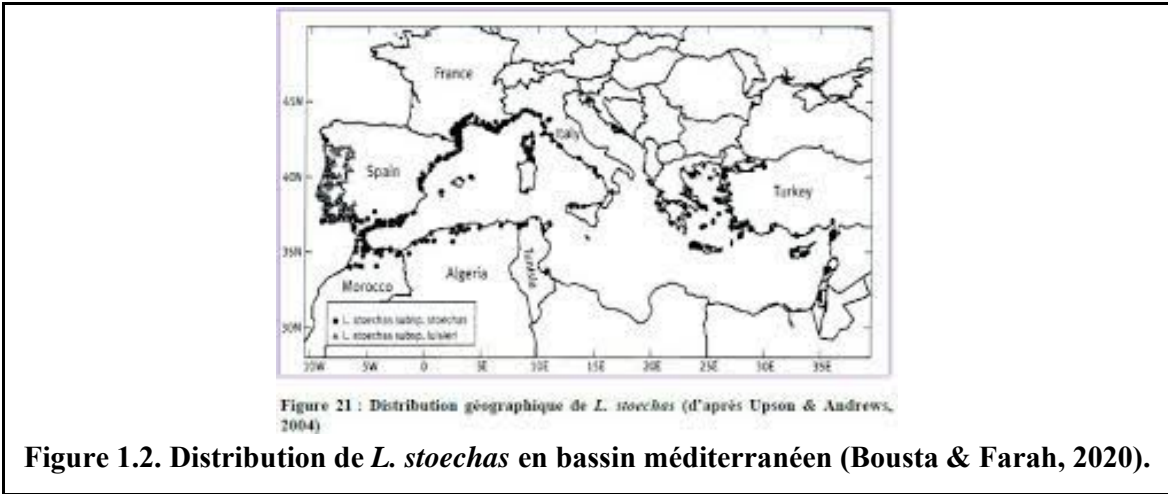






**1.4. Aire de répartition**

Elle est répandue dans tout le bassin méditerranéen (Europe méridionale, l’Afrique du Nord et le Moyen Orient) avec une petite disjonction sur la frontière Lybie-Egypte (**Figure 1.2**). Actuellement, elle a été introduite et cultivée en Bretagne, Nouvelle Zélande et en Australie (Upson et Andrews, 2004)..



## 1.5. Huile essentielle

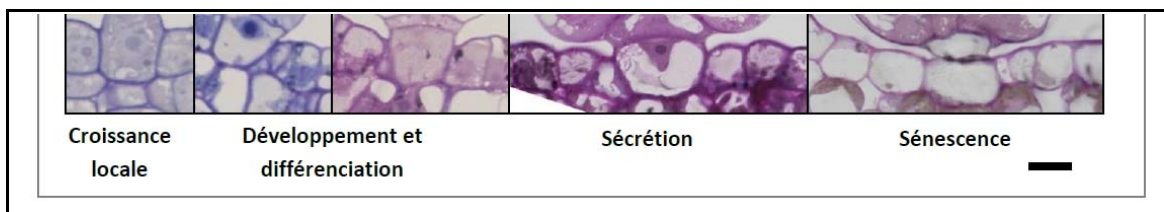
### 1.5.1. Composition chimique

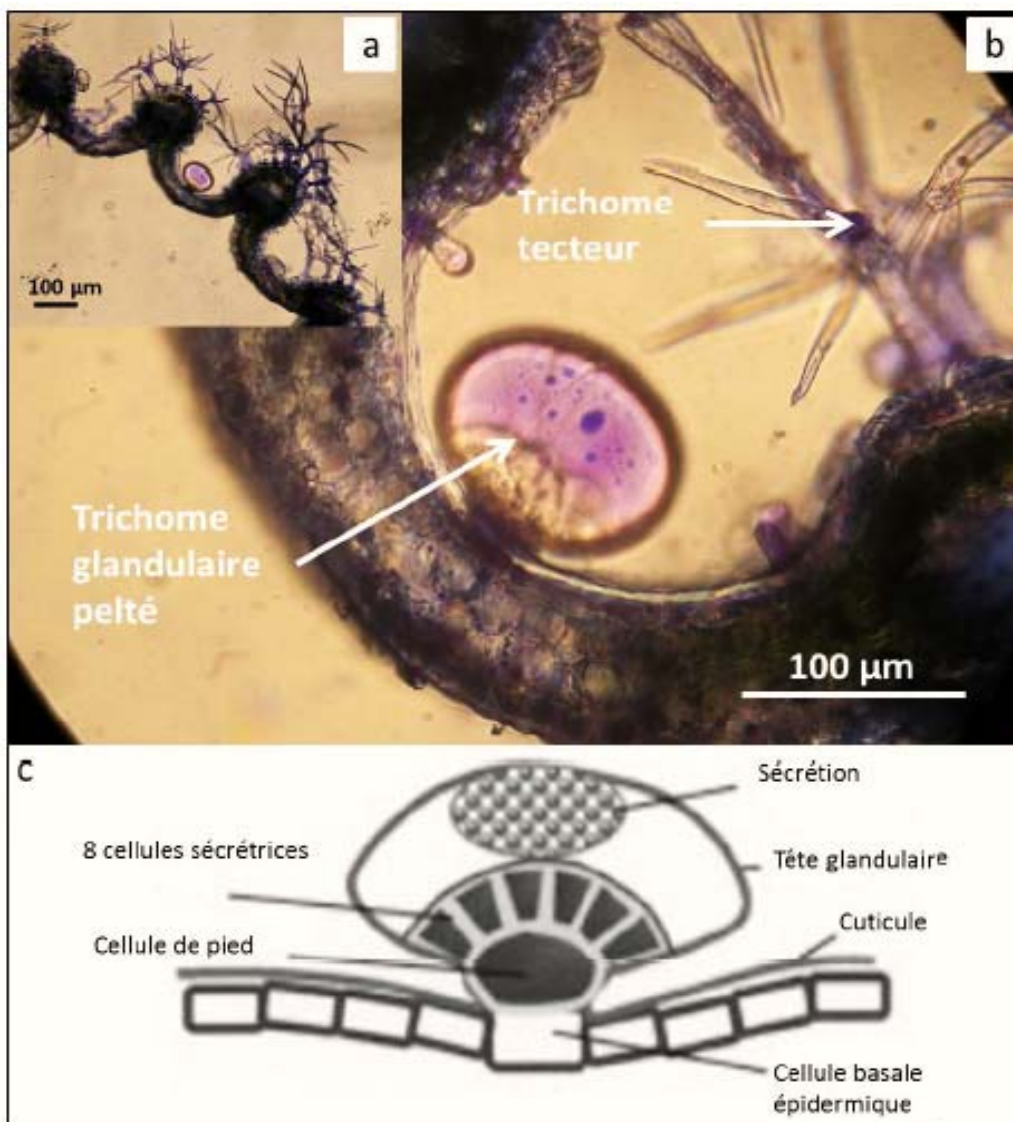
Elles, comme beaucoup de Lamiaceae produisent des grandes quantités de terpènes volatils, principalement des mono- et des sesquiterpènes (Upson et al. 2004; Guitton et al. 2010) (Perrin & Colson, 1986) (Figure 1.3).

Les autres trichomes que l'on trouve en abondance sont les trichomes tecteurs. Ce sont des poils ramifiés qui ne produisent pas de terpènes.

L'HE est extraite des inflorescences. L'HE est ensuite extraite par hydrodistillation des inflorescences dans des alambics. La vapeur d'eau déchire la cuticule des trichomes glandulaires et entraîne les composés volatils (Iriti et al. 2006) (Figure 1.4).

Après refroidissement de cette vapeur d'eau, l'HE, hydrophobe, compose une phase bien distincte de l'eau florale. D'autres processus comme l'extraction par solvant (hexane principalement) existent et permettent l'obtention de la concrète, pâte faite de cires et de composés organiques volatils.





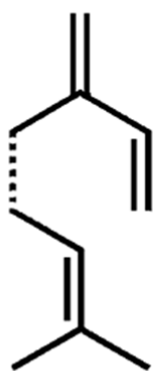
**Figure 1.3.** Photos de microscopie optique d'une coupe calice colorée au réactif Nadi (a et b) et schéma d'un trichome glandulaire pelté (c) (a) Vue d'ensemble de la section de calice. (b) Agrandissement d'un trichome glandulaire et d'un trichome tecteur. La coloration violette est associée à la présence de terpènes sous la cuticule du trichome glandulaire pelté.

Modifié d'après (Guitton et al. 2010). (c) Modifié d'après (Iriti et al. 2006).

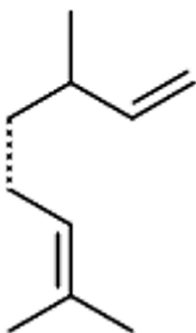
Les études des constituants volatils des espaces ont relevé la présence de plus de 200 constituants chimiques (**Figure 1.5**), beaucoup d'entre eux étant présents sous forme de traces. Elle synthétise plus de 100 terpènes différents. Les travaux sur la composition chimique des HE montrent qu'elles sont plus riches en monoterpènes qu'en sesquiterpènes, et que ces deux groupes de molécules constituent la majeure partie des HE.

Toutes les espèces et les hybrides du genre sont des plantes très aromatiques qui produisent des mélanges complexes d'HE produites et stockées dans des glandes sur la surface des fleurs et des feuilles (**Lis-Balchin, 2002**). Il n'est donc pas surprenant que les connaissances phytochimiques soient axées sur leurs molécules terpéniques.

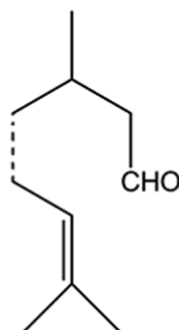
### Acyclic Monoterpenes



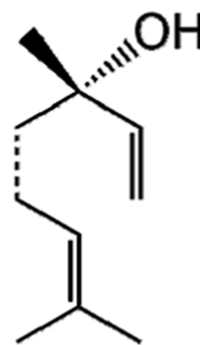
Myrcene



Ocimene



Citronellal

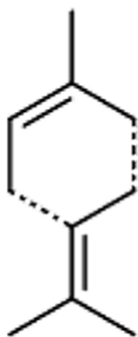


Linalool

Hydrocarbons

Oxygenated

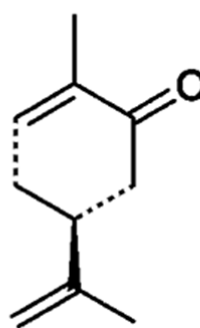
### Monocyclic Monoterpenes



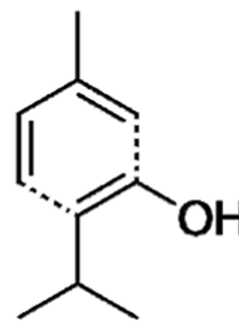
Terpinolene



Phellandrene



Carvone



Thymol

Hydrocarbons

Oxygenated

Figure 1.5. Exemples de mono- et sesquiterpènes linéaires, mono- ou polycycliques illustrant la diversité des terpènes volatils.



### 1.5.2. Toxicité de l'huile essentielle

Elle a une faible toxicité et des HE non diluées peuvent être utilisées pour traiter les brûlures et avoir des effets bénéfiques sur la cicatrisation. Cependant des cas de dermatite allergique après contact direct avec la peau ont été rapportés (**Lis-Balchin, 2002**).

### 1.5.3. Domaines d'applications et intérêts en phytothérapie

En parfumerie, son HE est aujourd'hui délaissée en raison de son odeur fortement camphrée et de la concurrence importante des autres qui se prêtent mieux à la culture intensive et dont l'odeur est plus agréable. La forte teneur en camphre généralement observée limite ses applications en cosmétologie (**Monge, 2013**). En cosmétique elle était à l'honneur chez les Romains et reprend aujourd'hui du galon, portée par l'engouement retrouvé pour les produits nature (**Festy et Dupin, 2012**). Son HE est largement employée dans l'industrie du parfum savons, eaux de Cologne, lotions pour la peau, vernis, démaquillants (**Schauenberg et Paris, 2010**).

1. Favorise la détente des nerfs et des muscles
2. Anti-douleurs et anti-inflammatoire
3. Régulatrice du sébum
4. Cicatrisante et régénératrice cutanée
5. Antiseptique et antibactérienne
6. Facilite la digestion la circulation du sang et l'élimination (urines et sueur)
7. Antimite (vêtements)



## 2. Peau et cicatrisation

### 2.1. Généralités et structure sur la peau

Indispensable à la vie, la peau (du latin *pellis*), enveloppe protectrice du corps, est une barrière physique protégeant l'ensemble des organes et tissus des agressions extérieures (**Eckert, 1989**).

Elle demeure un lieu privilégié de contact et d'échanges avec le milieu extérieur. La peau est considérée comme l'organe le plus étendu mais également le plus volumineux du corps humain avec une surface proche des 2 m<sup>2</sup> (**Mosteller, 1987**).

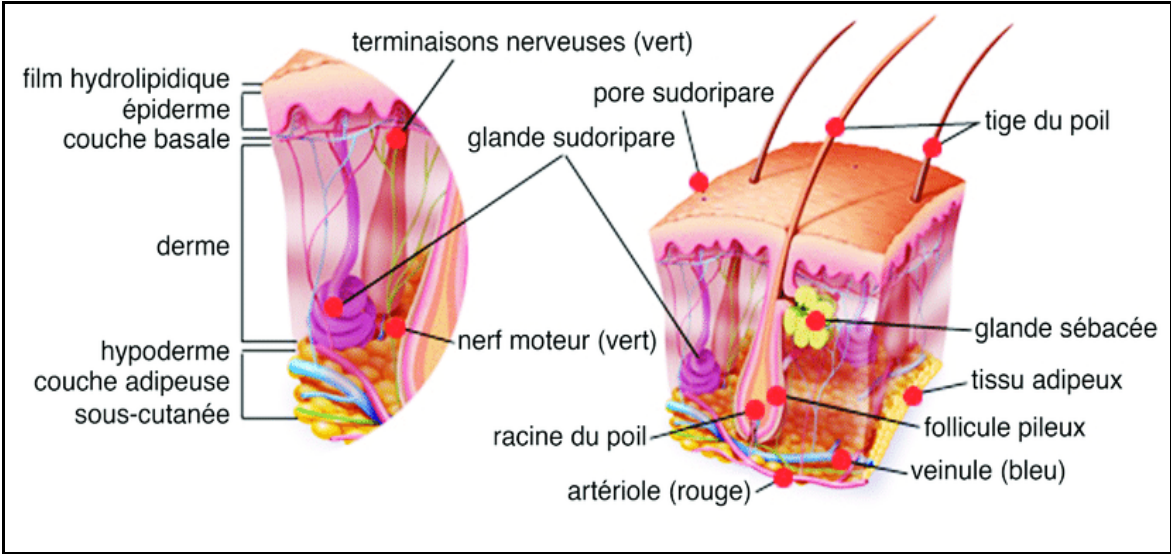
Elle se compose approximativement de 70% d'eau, 27% de protéines, 2% de lipides et près de 1% d'oligo-éléments (**Woodard et White, 1986**). Les kératinocytes constituent 95% de l'épiderme, et la couche basale est la source de tous les kératinocytes. Ce sont ces kératinocytes de la couche basale qui sont principalement responsables de la réponse de l'épiderme lors de la cicatrisation des plaies.

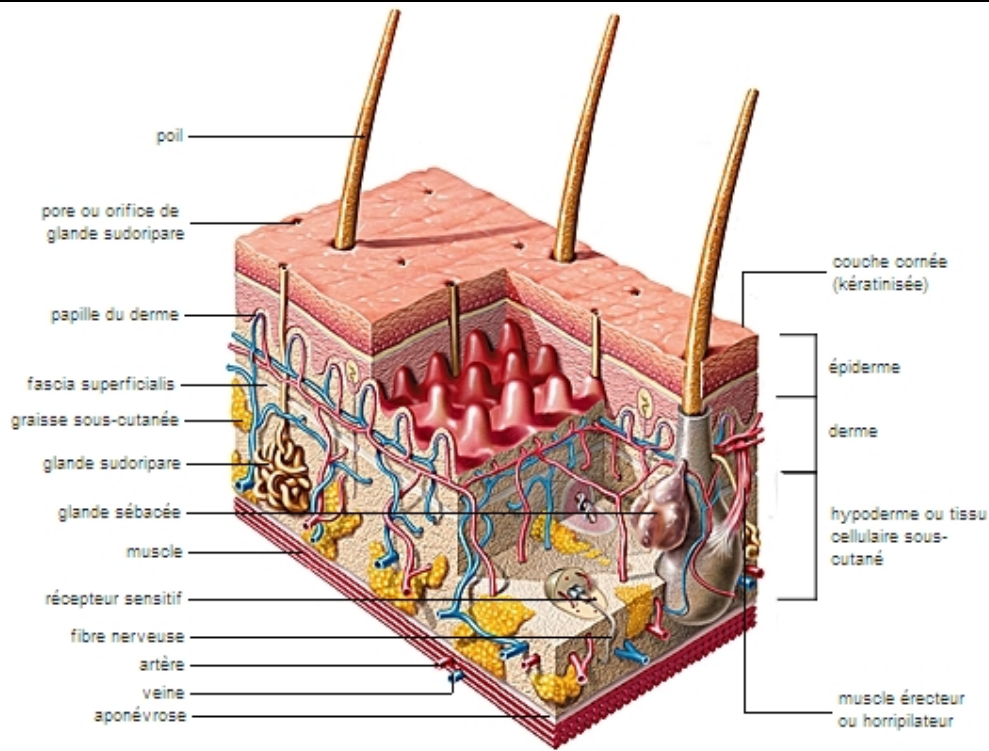
Trois couches superposées définissent la peau (**Figure 1.6**) :

- L'épiderme = tissu épithélial de revêtement, stratifié et kératinisé.
- Le derme = tissu conjonctif dense de soutien.
- L'hypoderme = tissu conjonctif, de réserve, le plus profond.

Au sein de ces différentes structures sont présentes des annexes représentées par les phanères (cheveux, poils, ongles), les glandes sébacées et les glandes sudoripares.







## Anatomie de la peau

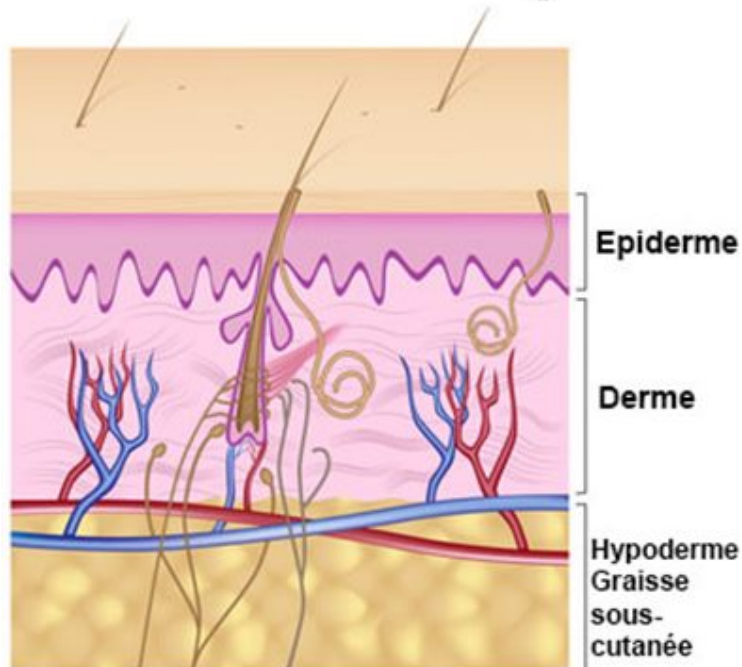
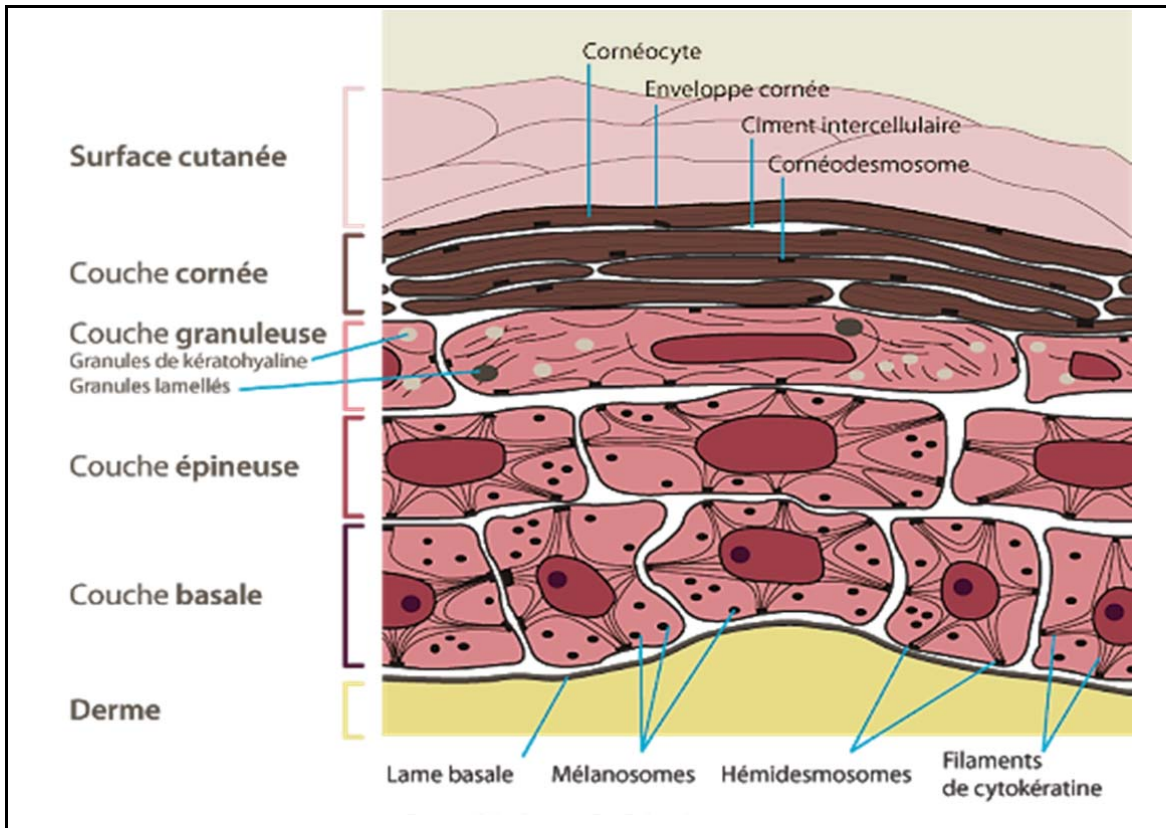


Figure 1.6. Représentation schématique de la structure de la peau en trois dimensions (Domingues, 2014).

### 2.1.1. Epiderme

L'épiderme un tissu épithélium pluristratifié, kératinisé, constitué de plusieurs assises cellulaires, dépourvu de vaisseaux sanguins et lymphatiques mais renfermant de nombreuses terminaisons nerveuses sensibles. Cet épiderme est, lui-même, constitué de quatre couches, de la profondeur à la superficie : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (Prost-Squarcioni et Le Roux-Villet, 2008).



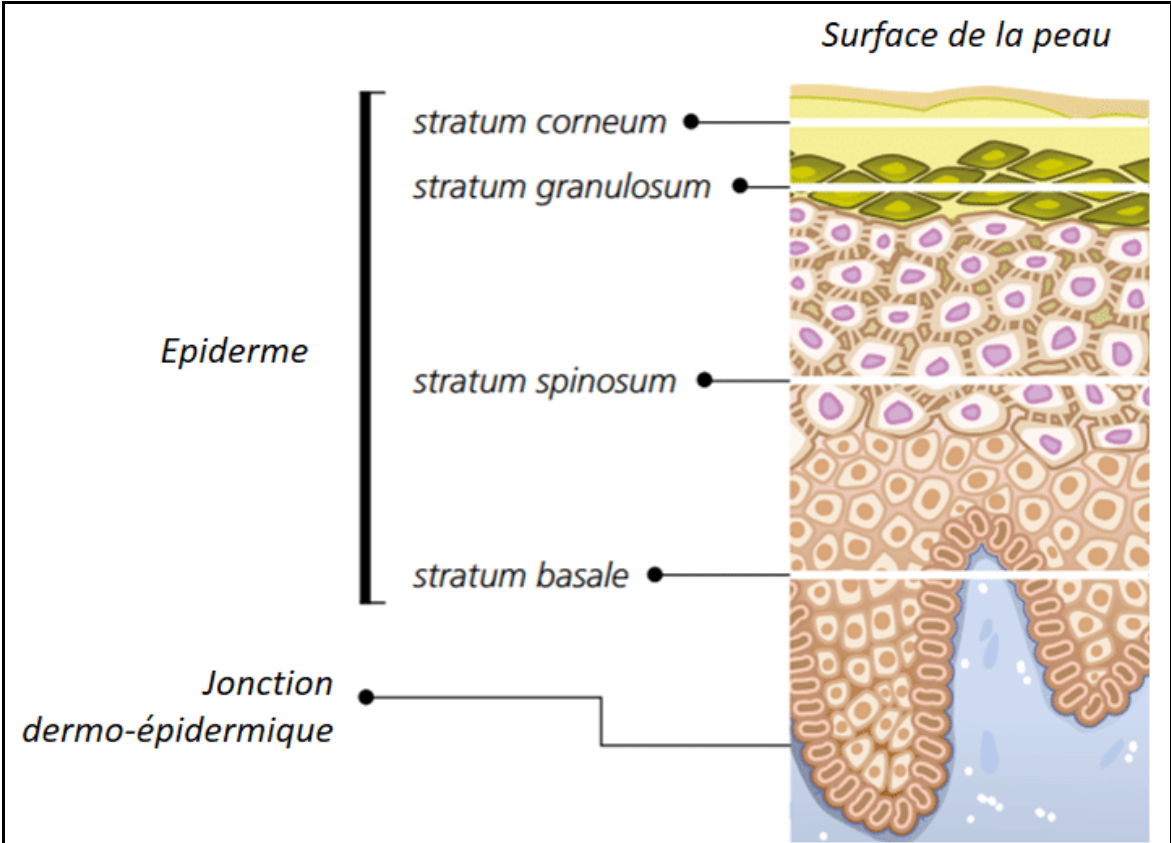


Figure 1.7. Illustration schématique de l'épiderme.

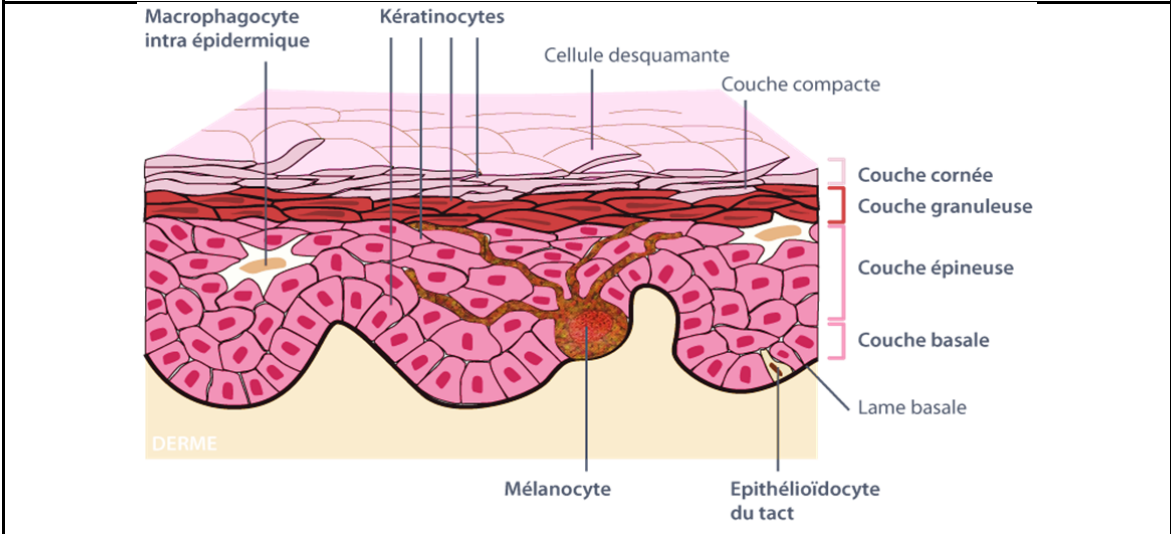


Figure 1.8. Quatre populations cellulaires de l'épiderme.

### **2.1.2. Derme**

Le derme est fortement vascularisé, et contribue à la thermorégulation de l'organisme (**Sanyal et Maji, 2001**). C'est un tissu conjonctif fibro-élastique de soutien, conférant à la peau ses propriétés biomécaniques de résistance, de souplesse et d'élasticité (**Prost-Squarcioni et al., 2008**). Le derme est principalement composé de fibres de collagène, mais également de protéoglycanes et de glycoprotéines de structure qui interviennent dans les interactions cellule-matrice (**Krieg et Aumailley, 2011**).

### **2.1.3. Hypoderme**

Continuant le derme vers la profondeur, l'hypoderme est un tissu conjonctif lâche richement vascularisé qui, selon les conditions de nutrition et les régions de la peau, contient plus ou moins de tissu adipeux. Les adipocytes sont rassemblés en lobules et en lobes graisseux séparés par des travées conjonctivo-vasculaires et nerveuses (**Galatoire et al., 2007**).

### **2.1.4. Annexes épidermiques**

- Les glandes sudoripares/sudorales sont réparties sur toute la surface de la peau. Ces glandes sont à l'origine de la sécrétion de la sueur, mécanisme indispensable à la thermorégulation de l'organisme (**Sato et al ; 1989**). Deux types de glandes sudoripares sont identifiables : les eccrines et les apocrines. Les eccrines sont principalement localisées dans le derme. Elles sont à l'origine de la sécrétion à la surface de l'épiderme de la sueur (**Hould, 1982**). Les glandes apocrines sont situées dans l'hypoderme uniquement dans des zones précises comme les aisselles, les paupières, le pubis et les parties génitales.
- Les glandes sébacées, sont localisées au niveau du derme moyen, où elles sont accolées aux follicules pileux pour former les follicules pilo-sébacés (**Downing et al., 1987**).

## **2.2. Différentes étapes de cicatrisation**

La cicatrisation est définie comme un ensemble de phénomènes physiologiques naturels aboutissant à la réparation de la structure cutanée de tissu lésée. Elle met en jeu une cascade complexe de réaction et d'interaction entre les cellules et les médiateurs (**Oummad, 2013**). La cicatrisation d'une plaie se déroule en trois phases principales se chevauchent entre elles ainsi que chaque une est caractérisée par des activités cellulaires spécifiques (**Singer et Clark, 1999**), réaction et d'interaction entre les cellules et les médiateurs (**Oummad, 2013**).

### **2.2.1. Phase inflammatoire (0 à 3 jours)**

C'est la première étape de cicatrisation, elle vise à limiter les perturbations physiologiques provoquées par les lésions et empêche la propagation des bactéries, Elle est divisée en deux étapes (**Oummad, 2013**), à savoir une étape vasculaire qui correspond à une hémorragie plus ou moins intense au sein de la plaie s'accompagne de rupture des vaisseaux et permet l'extravasation des éléments contenus dans le sang. La phase de détersion ne s'arrête que lorsque tous les débris nécrotiques, et tout le matériel (excès de fibrine, bactéries...) pouvant entravé la cicatrisation sont éliminés.

### **2.2.2. Phase de réparation**

- La formation d'un tissu de granulation : Les macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes migrent dans la plaie. Au cours de cette phase, les macrophages jouent un rôle clé, elles libèrent des médiateurs comme TNF- $\alpha$  et l'IL-1 qui activent la néo-angiogenèse et l'activité fibroblastique (**Witte et Barbul, 1997**). La multiplication et la migration des fibroblastes suite à ces stimulations aboutissent à la synthèse d'une nouvelle matrice.
- Le tissu de granulation est constitué de ces fibroblastes, de nouveaux vaisseaux bourgeonnants, et de collagène immature (collagène III). Sous l'influence du facteur de croissance endothélial de croissance endothéliale vasculaire (VEGF), l'angiogenèse débute lorsque les vaisseaux commencent à bourgeonner à partir des vaisseaux sanguins entourant la plaie.
- Certains fibroblastes commencent également à se différencier dans cette phase en en myofibroblastes qui ont une fonction contractile pour rapprocher les bords béants de la plaie (**Robson, 2003**).

### **2.2.3. Phase maturation**

- Phase de remodelage : La MEC va progressivement être remodelée dans les deux mois qui suivent la fermeture de la plaie. La maturation se poursuit parfois pendant deux ans avec une diminution progressive du tissu de granulation, l'élaboration d'une structure collagénique plus dense et l'organisation du réseau vasculaire.

Le collagène de type III, présent majoritairement dans le tissu de granulation, est progressivement remplacé par celui de type I, composant principal du derme à partir du 21<sup>ème</sup> jour, la contraction de la plaie est terminée. Cependant, si le contenu en collagène est maximal à ce moment, la résistance de la cicatrice ne correspond qu'à 80% de celle d'une peau normale. Ces zones cicatricielles sont cependant moins résistantes et moins élastiques qu'une peau normale. Ceci s'explique par un déficit relatif en élastine et par la relative désorganisation de la nouvelle MEC (Dealey & Cameron, 2008).

La cicatrice présente un aspect lisse et mat avec une pigmentation souvent plus claire due à une absence de mélanine (**Cherif, 2016 ; El zayat et al., 2018**).

**Chapitre II**

**MATERIEL &**

**METHODES**



## Chapitre 2 : MATERIEL & METHODES

---

### 2.1. MATERIEL

#### 2.1.1. Huile essentielle

L'HE a été conservée dans des flacons stériles teintés à 4 °C et à l'abri de l'air et de la lumière, pendant toute la durée de notre travail, pour éviter d'éventuels phénomènes d'oxydation, d'altération chimique ou de contamination microbienne.

#### 2.1.2. Souches microbiennes

Le screening antimicrobien a été réalisé sur 4 souches ATCC (American Type Culture Collection). Concernant le screening antifongique, nous avons utilisé 1 champignon et 1 levure (**Tableau 2.1**).

Ces bactéries et champignons ont été conservés et maintenus en vie, par des repiquages continus, sur des milieux de culture adéquats.

**Tableau 2.1. Souches microbiennes utilisées dans le screening antimicrobiens *in vitro*.**

Souches microbiennes	Origine	Famille
<b>Bactéries à Gram –</b>		
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Enterobacteriaceae
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25812	Pseudomonadaceae
<b>Bactéries à Gram +</b>		
<i>Staphylococcus</i>	ATCC 25923	Pseudomonadaceae
<i>Bacillus</i>	ATCC 6633	Bacillaceae

#### 2.1.3. Milieux de cultures et produits chimiques

Suivant les méthodes employées, nous avons utilisé des milieux de culture solides, en l'occurrence la Gélose Nutritive (GN) ou Muller-Hinton (MH) pour les bactéries et la gélose Sabouraud-Chloramphénicol (SAB) pour les champignons.

Aussi, le solvant Tween 80 a été utilisé pour la dispersion de l'HE dans un milieu gélosé. Ce solvant est pur chimiquement et provient de Sigma-Aldrich (Allemagne).

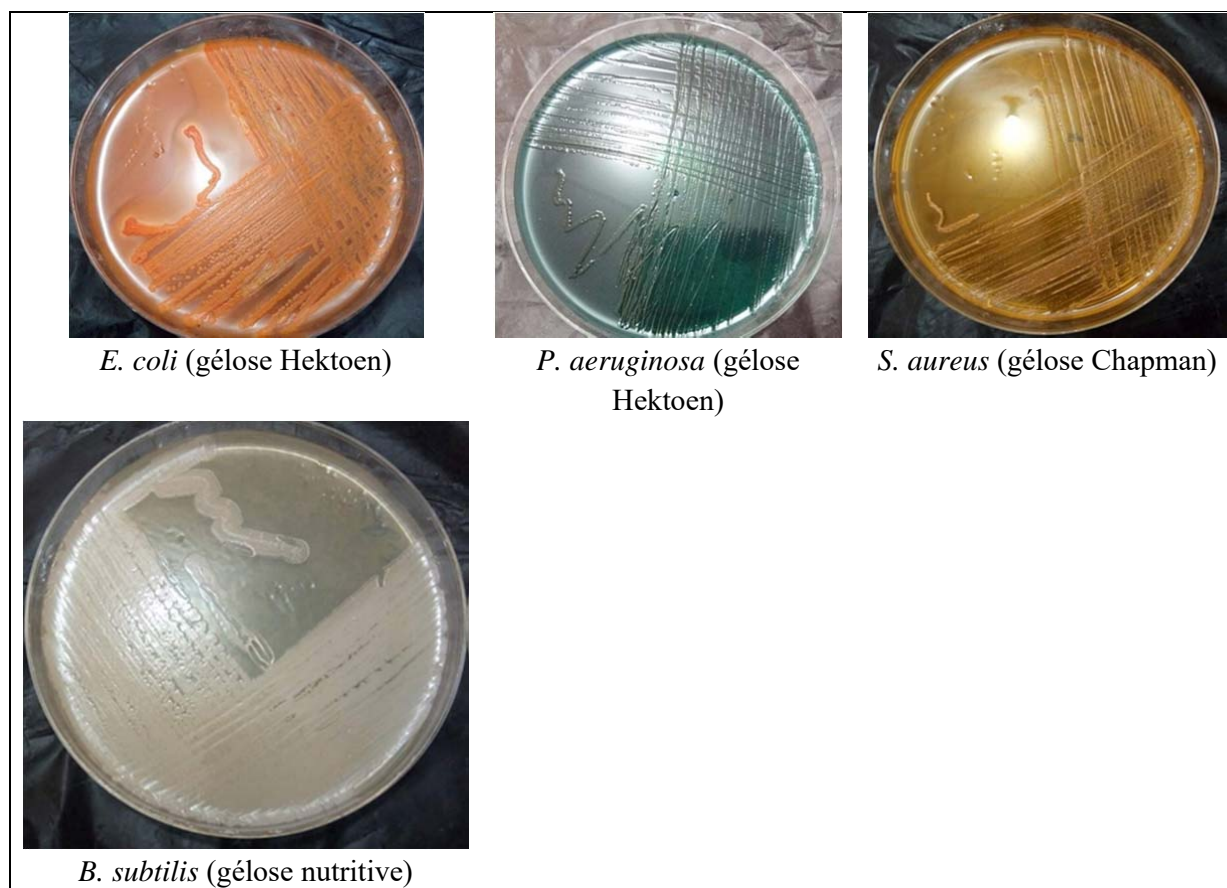
## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Evaluation du pouvoir antibactérien et antifongique *in vitro*

#### 2.2.1.1. Identification des souches microbiennes

Avant de mener le screening antimicrobien de l'HE, nous avons réalisé un repiquage des 4 souches bactériennes ATCC sur leur milieu adéquat (**Figure 2.1**) comme suit :

- *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* : les colonies prélevées sont isolées sur gélose Hektoen.
- *Staphylococcus aureus* : les colonies prélevées sont isolées sur gélose Chapman.



**Figure 2.1. Aspect des différentes colonies microbiennes après repiquage.  
(Photo Originale, 2021)**

### 2.2.2.3. Identification des bactéries

Les cultures positives ont fait l'objet d'une identification microbiologique en utilisant les tests biochimiques classiques et la galerie API 20<sup>E</sup> qui est précédée par l'étape de la coloration de Gram. L'identification des bactéries se fait suivant une clé dichotomique qui va des caractères les plus vastes aux plus pointus pour aboutir à une espèce bactérienne donnée.

— **Aspect macroscopique des colonies** : Après incubation, le premier critère d'identification sur lequel on se base est celle de l'aspect macroscopique des colonies vu à l'œil nu, que ça soit taille, forme du relief (bombée, semi bombée, plate), couleur, aspect (collant, filamenteux), odeur, transparence (opaque, translucide), allure des contours (régulier, dentelés), pigmentation, et aspect de la surface (lisse ou rugueuse) (**Guiraud, 2003**).

### — Coloration de Gram

#### Principe

La coloration de Gram est une technique qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne. Elle permet de colorer les bactéries et de distinguer leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram +) ou la fuchsine (Gram -). Cette opération se déroule en 7 étapes :

#### Mise en œuvre pratique

- Réaliser un frottis sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne, agiter la suspension afin de l'homogénéiser et d'éviter d'avoir un culot au fond du tube.
- Étaler une goutte de la suspension bactérienne sur une lame propre.
- Procéder à la fixation du frottis en faisant passer la lame trois fois dans la flamme du bec bunsen.
- Plonger la lame pendant une minute dans le violet de gentiane, puis rincée à l'eau déminéralisée.
- Étaler le lugol et laisser agir une minute puis rincer à l'eau. Cette étape a pour but de stabiliser la coloration violette.
- Verser goutte à goutte de l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la coloration (15 à 30 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer avec de l'eau.
- Réaliser une contre coloration avec de la fuchsine : laisser agir 30 secondes à 1 minute, laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame.

- Enfin, observer à l'objectif à immersion ( $\times 100$ ) après dépôt d'une goutte de l'huile de cèdre (Cavallo, 2007).

**Observation microscopique :** Les bactéries à Gram + apparaissent en violet foncé, tandis que les bactéries à Gram - sont colorées en rose (Figure 2.2).

### — Recherche de l'oxydase

#### Principe

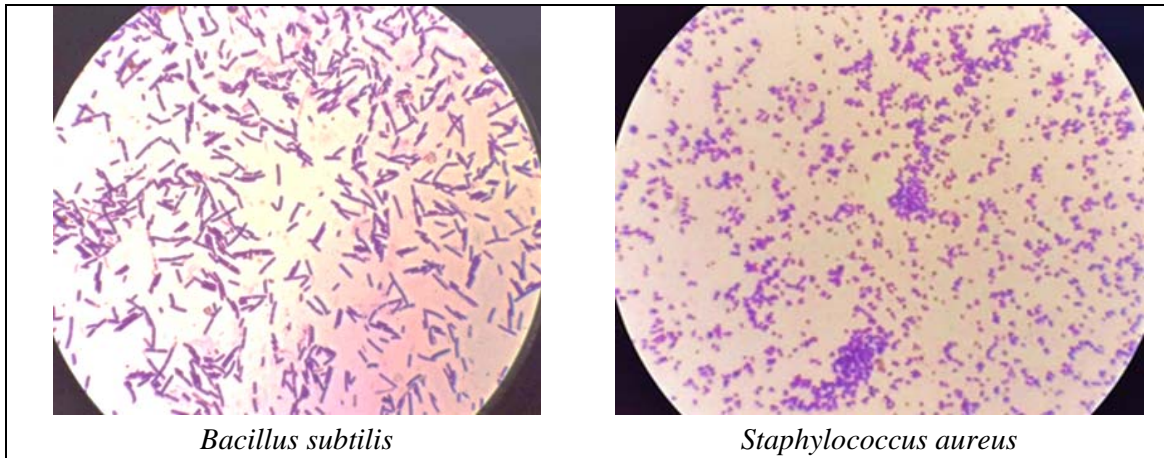
Elle permet d'orienter l'identification des bacilles à Gram -.

#### Mise en œuvre

Un carré de papier buvard imbibé de substrat est posé sur une lame de verre ; puis des fragments de colonies sont fixés sur la lame de verre avec une pipette pasteur boutonnée.

#### Lecture

Si le papier présente une tache violette : le substrat a été oxydé, la bactérie possède une oxydase. Si le papier reste incolore : il n'y a pas eu de réaction, la bactérie ne possède pas l'enzyme.







**Figure 2.3. Galerie API 20NE (Photo Originale, 2021).**

#### **2.2.2.4. Examen microscopique des souches fongiques (Etat frais)**

##### **Principe**

Cet examen nous permet d'apprécier la forme, la mobilité, le mode de regroupement, et l'abondance des bactéries.

##### **Méthodologie**

##### **Lecture**

A l'issue de cet examen microscopique, nous pouvons observer la forme, le mode de regroupement et la mobilité des souches (**Figure 2.4**).

#### **2.2.2. Evaluation du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle *in vitro***

La recherche de l'activité antibactérienne et antifongique consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes soumis à l'HE. Pour cela, 2 méthodes qualitatives (aromatogramme et microatmosphère) et 1 quantitative (CMI) ont été examinées.

##### **2.2.2.1. Méthode des aromatogrammes (diffusion en milieu gélosé)**

L'étude du pouvoir antibactérien et antifongique par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme.

##### **Préparation de l'inoculum**

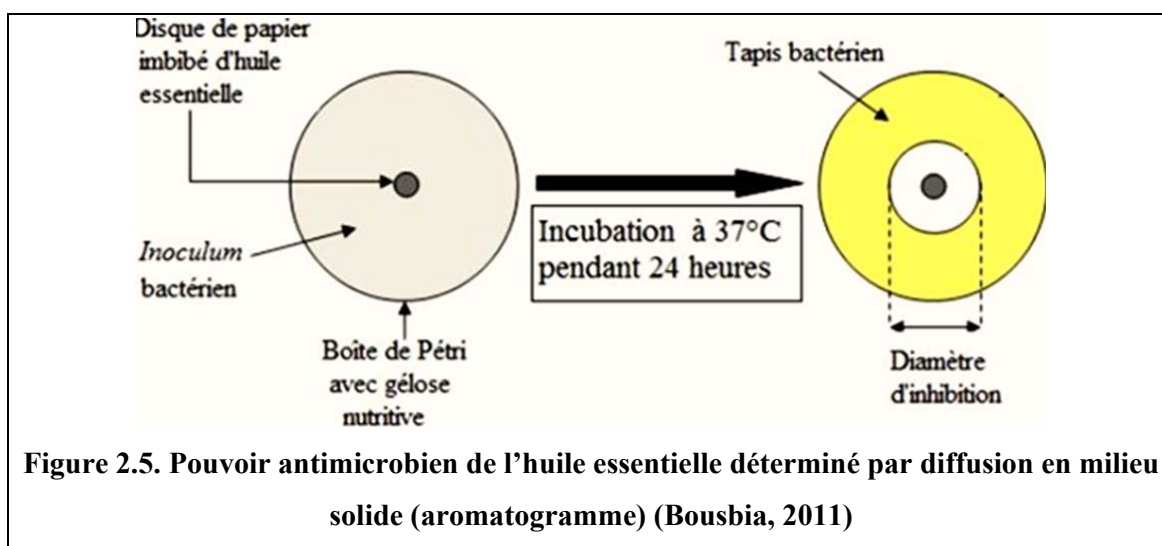
A partir d'une culture jeune de 24 heures sur GN, une suspension bactérienne a été préparée par le prélèvement de 2 à 3 colonies bactériennes à l'aide d'une pipette pasteur. Ces colonies ont été mises dans un tube de solution physiologique stérile avec agitation de façon à obtenir une densité optique de 0,5 à 570 nm.

### Application des disques, incubation et lecture des résultats

Dans notre étude, nous avons testé l'activité antimicrobienne de l'HE en imprégnant les disques par 3 quantités croissantes d'HE par disque, séparément. Ceci a été fait dans le but d'apprécier l'action inhibitrice "dose-dépendante".

Chaque boîte Pétri est ensuite fermée et incubée dans l'étuve à température adéquate (37 °C/24h pour les bactéries et 25 °C pendant 3 ou 5 jours pour les levures et les moisissures, respectivement). L'essence diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration.

Aussi et pour chaque souche microbienne, des contrôles positifs ont été réalisés en appliquant, dans les mêmes conditions citées précédemment, des disques d'ATB qui vont servir comme référence pour pouvoir comparer leur pouvoir antibactérien avec notre échantillon d'HE. A cet effet, plusieurs disques d'ATB ont été utilisés et choisis selon leur disponibilité.



### 2.2.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Elle consiste à ensemercer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en HE dispersée de façon homogène et stable dans le milieu de culture. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la CMI, qui correspond à la plus faible concentration en HE capable d'inhiber la croissance fongique.



La CMI se définit comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu. Le résultat sera exprimé en % (v/v).

#### **2.2.4. Docking moléculaire**

Principe : le Docking moléculaire (ancrage, amarrage ou arrimage moléculaire en français) *in silico* vise à prédire la structure et l'ensemble des mécanismes et interactions intervenant lors de la formation d'un complexe moléculaire « ligand-protéine » ou « protéine-protéine », à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales *in vitro* et *in vivo*. Le Docking moléculaire permet soit de découvrir de nouvelles molécules (par assemblage de deux ou plusieurs molécules), soit de comprendre la nature d'un complexe de molécules obtenu par cristallographie (**Beautrait, 2008**).

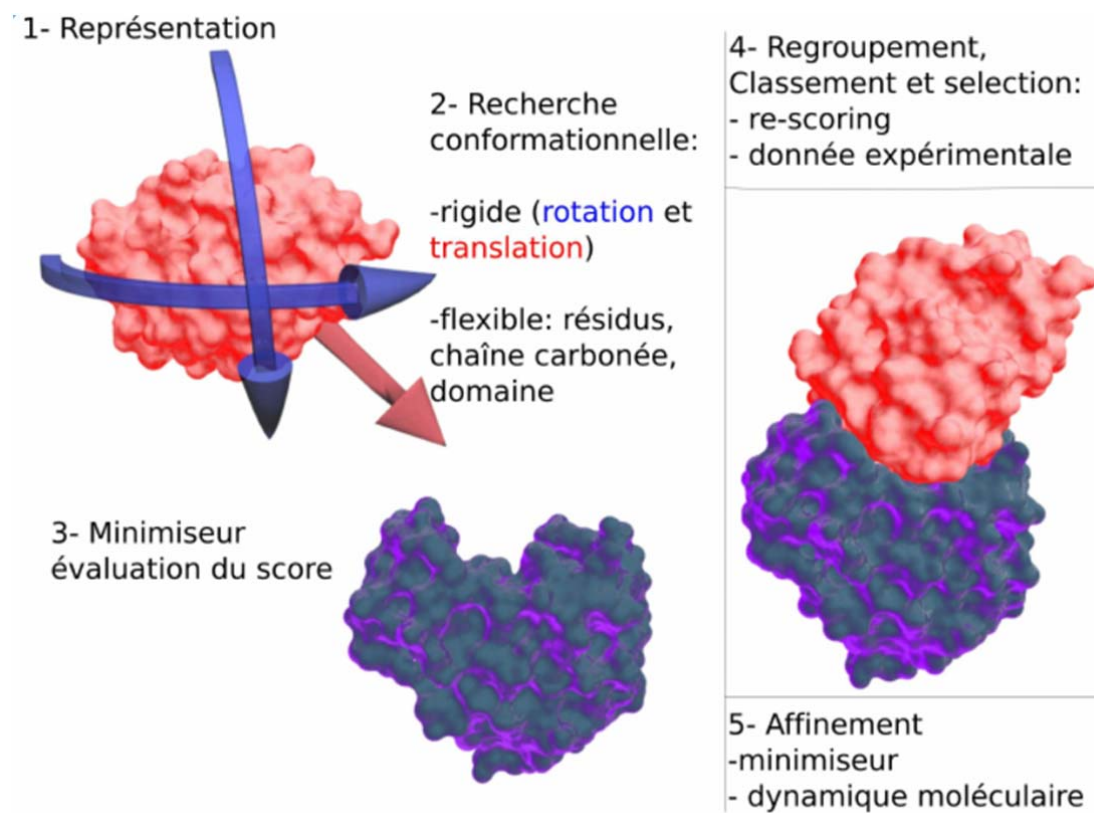
La meilleure position est celle qui est la plus basse en énergie, donc correspond au complexe ligand/protéine le plus stable. La seconde approche, ajustement de fragments, est basée sur la complémentarité des formes. Dans cette méthode, le ligand est décomposé en plusieurs fragments puis reconstruit dans le site actif, en essayant de faire correspondre les géométries et les fonctions chimiques. Cette méthode est beaucoup plus rapide que la simulation de trajectoire et permet généralement le criblage rapide de vastes bibliothèques de molécules. La méthode par simulation de trajectoire est plus lente mais prend mieux en compte la flexibilité du ligand et permet l'exploration de régions plus vastes.

#### **Préparation de la protéine**

Téléchargement des enzymes à partir de la base de données Protein Data Bank (**Figure 2.7**).

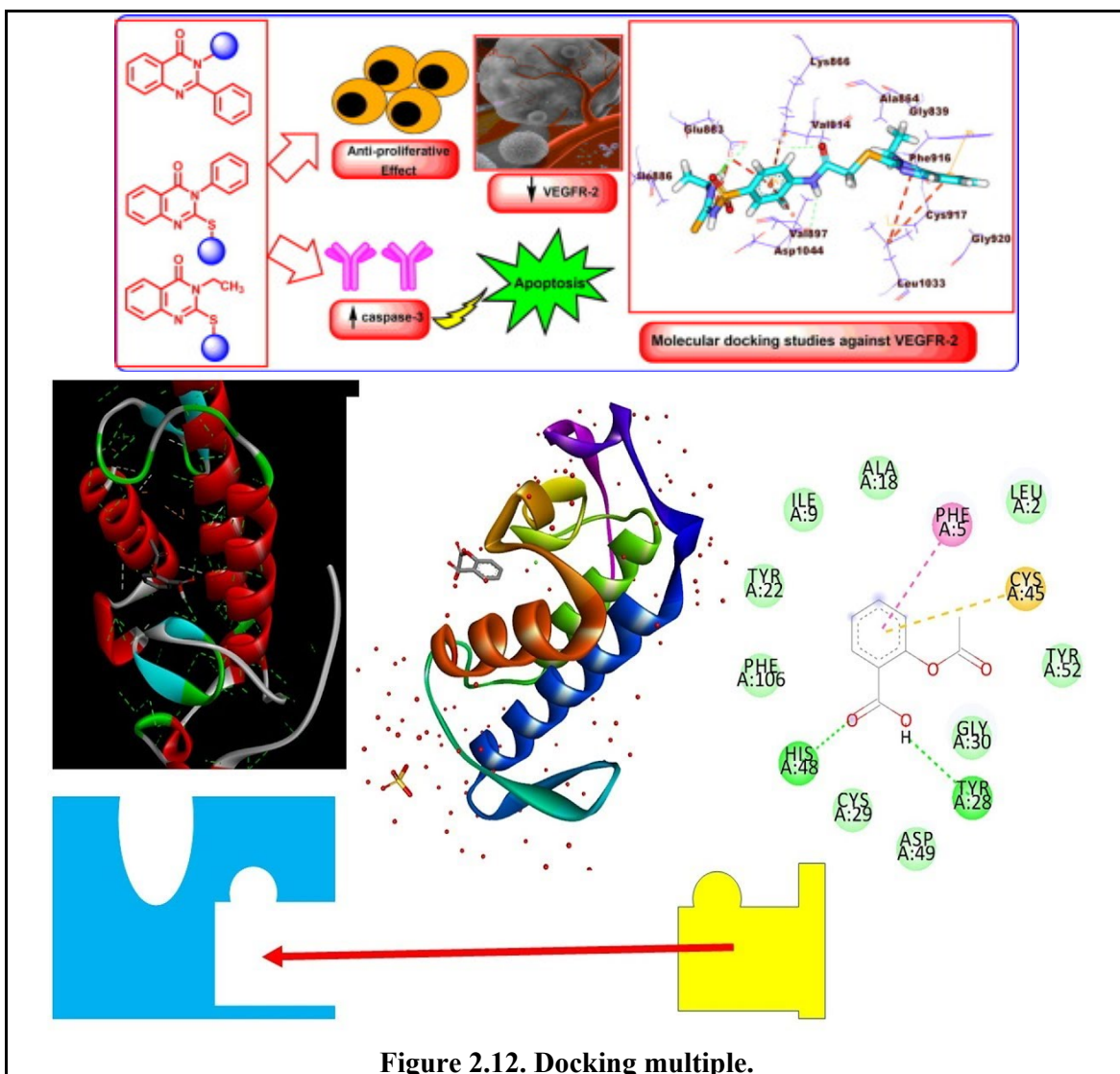
- $\alpha$ -Glucosidase (ID 3WY1) : La structure tridimensionnelle (structure 3D) de l'enzyme essentiellement déterminées par diffraction en rayon X avec une résolution 2,15 Å. Ce récepteur de Poids total : 123,08 kDa , protéine avec résidus : 1070, et 9281 atomes.(figure)



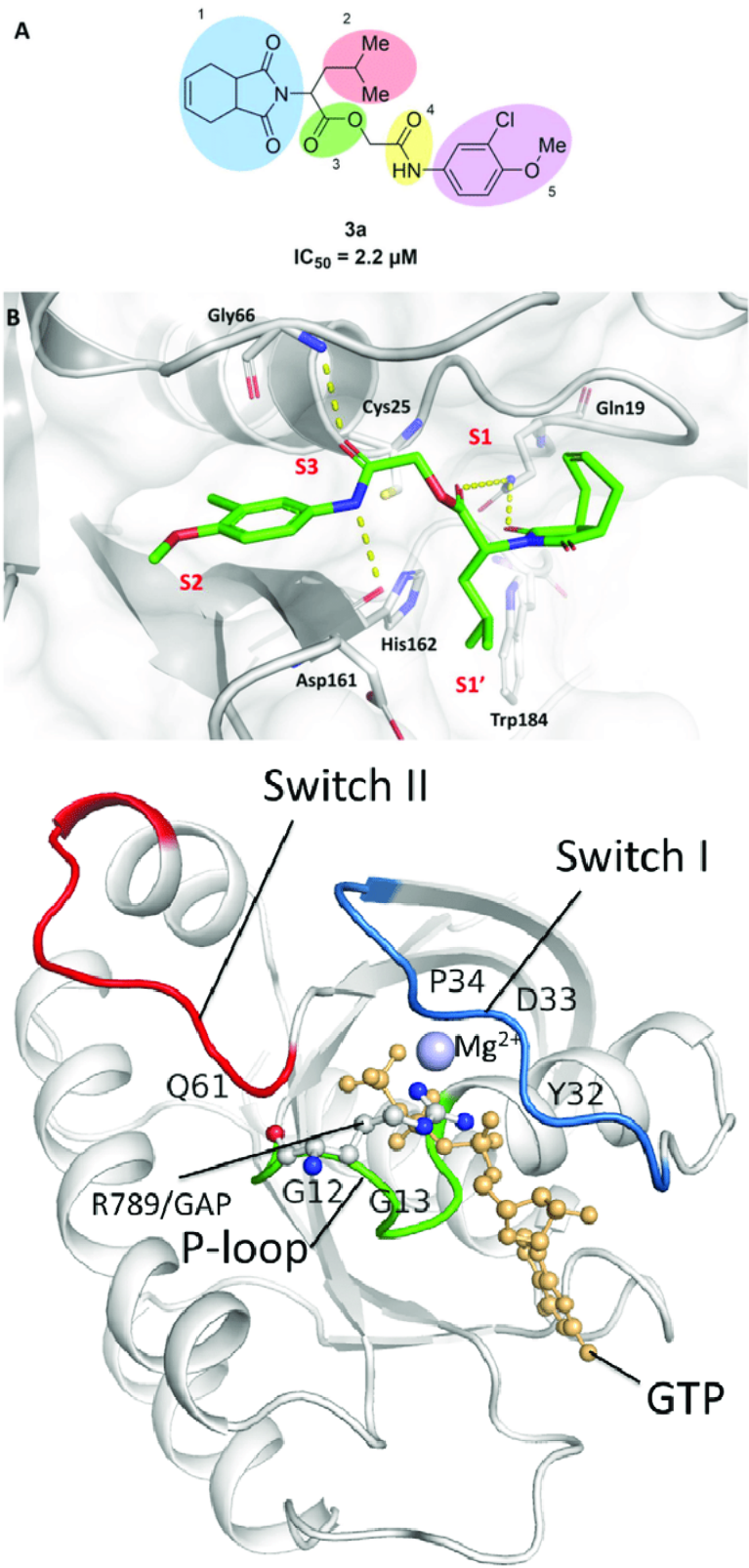


**Préparation du Ligand :** Les ligands (inhibiteurs) sont téléchargés à partir de la base de données PubChem en format 2D ou 3D (**Figure 2.11**). Une Minimisation de l'énergie sera faite, suivie par une conversion en Ligand.

Le docking multiple sera réalisé avec les composés majoritaires et caractéristiques de l'HE comme ligands et les enzymes comme macromolécule (**Figure 2.12**). Le logiciel va donner un Score d'affinité et l'énergie pour chaque ligand.



La visualisation du complexe et des différentes interactions (diagramme 2D) entre les ligands et les sites catalytiques sera faite (**Figure 2.13**).



**Figure 2.13. Visualisation des différentes interactions.**

**Chapitre III**

**RESULTATS  
& DISCUSSION**

## Chapitre 3 = RESULTATS & DISCUSSION

---

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

#### 3.1.1. Activité antimicrobienne en aromatoigramme

L'activité antimicrobienne de l'HE a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, *in vitro*, sur plusieurs souches microbiennes ATCC. Les résultats de cette étude antimicrobienne sont rapportés dans le **Tableau 3.1**. A noter que le diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans le calcul de la zone d'inhibition.

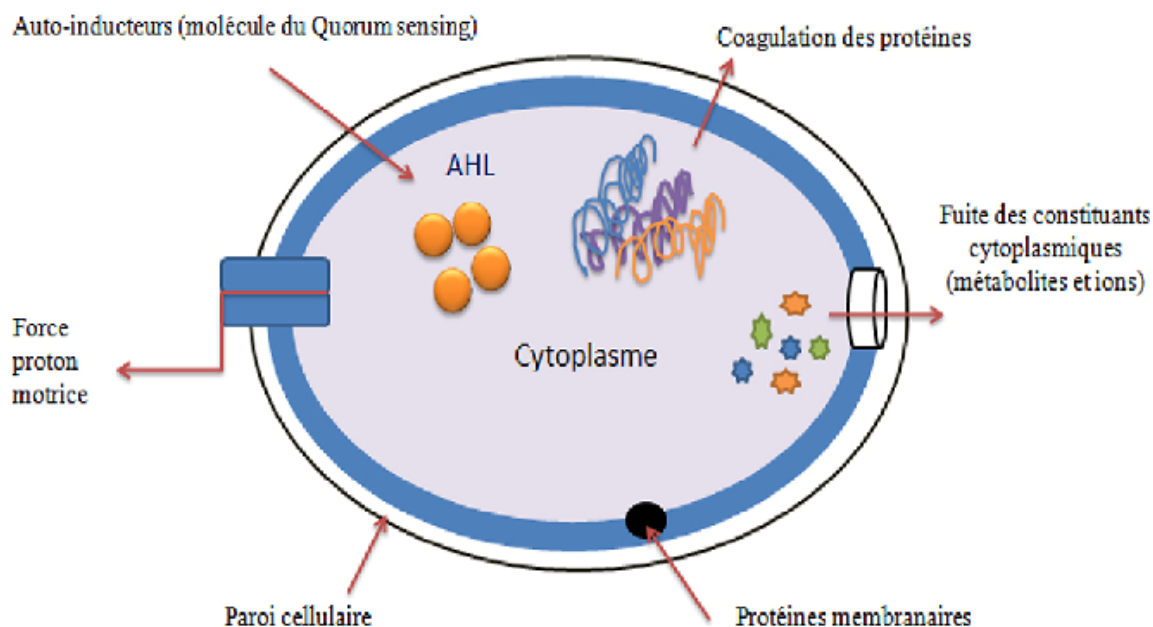
**Tableau 3.1. Screening antibactérien de l'essence *in vitro*.**

Souches	Aromatoigramme			Microatmosphère			Antibiogramme
	Quantité HE (µL/disque)						Antibiotiques (ATB)
	10	20	30	20	40	60	
<b>Bactéries Gram +</b>							
<i>S. aureus</i>		-	-	-	-	-	nd
<i>B. subtilis</i>		-	-	-	-	-	
<b>Bactéries à Gram -</b>							
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	nd

(-) Aucune zone d'inhibition ; HE : Huile essentielle.

Il apparaît clairement que les bactéries à Gram + sont les plus sensibles comparativement aux Gram -. En fait, les Gram - possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi. Cependant, aucune conclusion hâtive ne peut être dégagée car le nombre des souches testées est insignifiant. Aussi, *P. aeruginosa* demeure le germe le plus sensible à l'action inhibitrice de l'HE et ce à toutes les doses testées.

Le mécanisme d'action des extraits aromatiques sur les souches fongiques n'a pas été totalement élucidé. Cependant, certaines études soulignent que cette action antifongique de ces substances terpéniques est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci, entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (Cox et al., 2000).



Dans l'une des larges études dans ce champ, **Deans et Ritchie (1987)** ont analysé cinquante HE à 4 concentrations contre une série de 25 genres de bactéries. Ils ont révélé qu'elle est largement efficace contre différentes souches, particulièrement contre l'indicateur fécal *Enterococcus faecalis*.

En effet, l'HE a révélé une action sur le *Bacillus stearothermophilus*, un important germe impliqué dans la détérioration des aliments capable de résister aux températures élevées. Ces travaux indiquent, que les extraits possèdent un large spectre bactéricide contrairement aux extraits d'oignons. De plus, les extraits aromatiques ont une activité prononcée contre les membres du genre *Salmonella*.

Il faut cependant considérer ces données avec prudence car ce sont des résultats obtenus en laboratoire et l'application en conditions réelles soulèvent de nombreuses interrogations. De plus, l'étude de **Pibiri (2006)** montre que l'efficacité microbicide est limitée dans le temps.

Les dispositifs d'évaporation sont également susceptibles d'entraîner la formation de composés potentiellement toxiques pour l'Homme. Il est donc nécessaire d'obtenir plus de données sur ces différents aspects toxicologiques.

### 3.1.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La détermination des CMI a été accomplie uniquement pour les germes microbiens ayant montré une grande sensibilité vis-à-vis de l'action antimicrobienne de l'HE. Les germes résistants n'ont pas été inclus dans notre recherche.

**Tableau 3.3. Résultats de la détermination des CMI par dilution en milieu gélosé.**

	Concentration huile essentielle (%)					
Souches microbiennes						
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. brasiliensis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-

(-) Absence de croissance microbienne ; (+) Présence de croissance.

Le fort potentiel inhibiteurs des HE est dû principalement à ces molécules terpéniques oxygénées qui sont présents avec une grande concentration ; ainsi, des recherches sur les effets des terpénoides sur la membrane bactérienne isolée suggèrent que cette activité est due à des propriétés lipophiles des terpènes et à la puissance de leurs groupements fonctionnels (**Dorman & Deans, 2000**)

### 3.3. Activité anti-inflammatoire *in silico* par docking moléculaire

#### 3.3.1. Énergie d'interaction et affinité

Les énergies d'interaction et d'affinité entre les enzymes et les différents ligands utilisés sont calculées au cours du docking moléculaire. Elles sont regroupées dans les **Tableaux 3.4** et **3.5**.

**Tableau 3.4. Résultats de docking moléculaire des ligands avec l'enzyme.**

ID	Énergie d'interaction
150449	4229.22
84422	1228.96
6444290	983.60
11218441	5314.50

**Tableau 3.5. Résultats de docking moléculaire des ligands l'enzyme.**

ID	Énergie d'interaction
150339	1426.22
82233	11285.96
867554334	1207.94
6423490	1037.94
11218351	4213.04

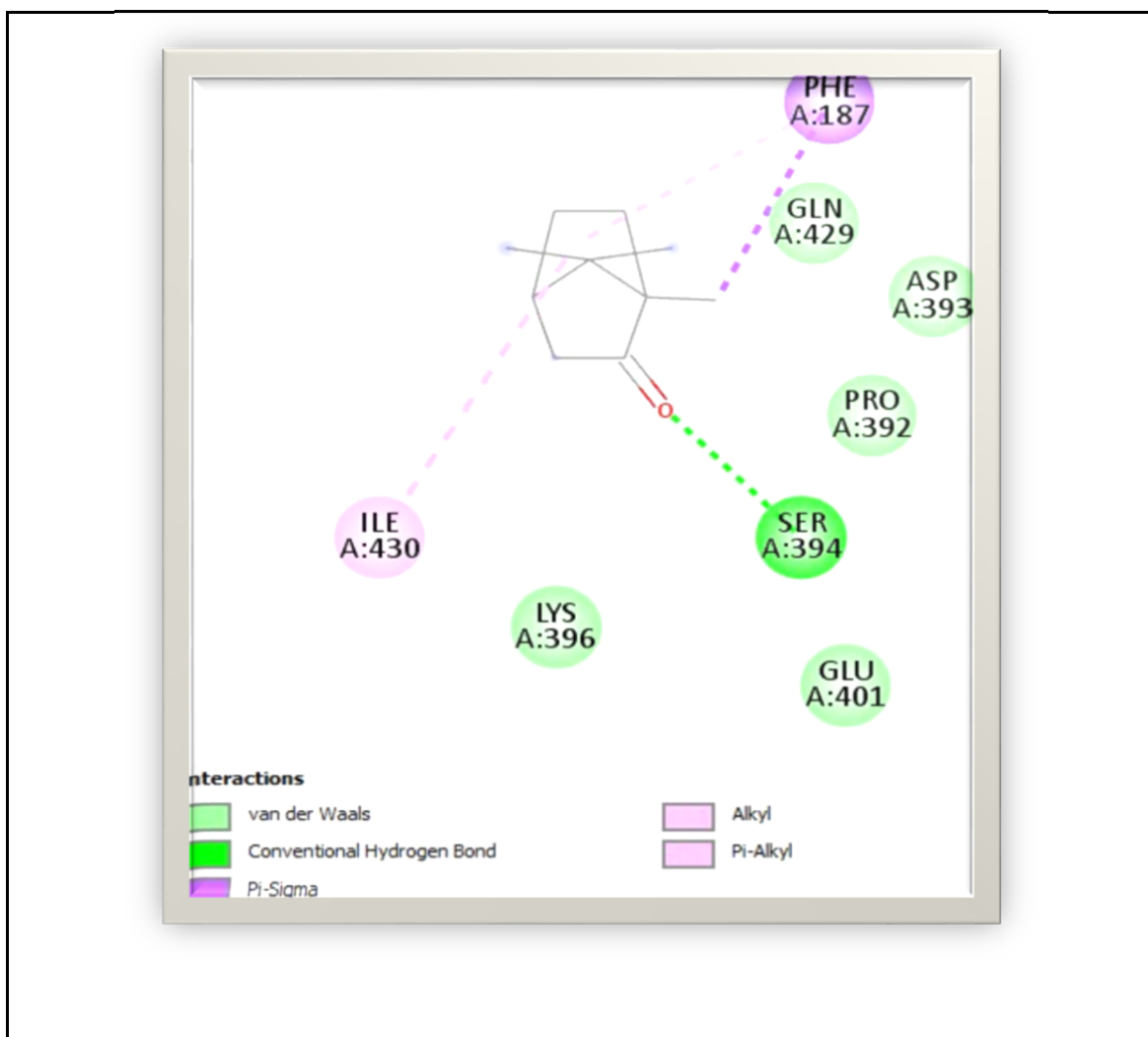
L'expérience liée à l'inflammation aigue est décrit comme une réponse biphasique car il a une phase initiale dans le 2 premières heures, qui est liée à la libération d'histamine et de sérotonine et une autre phase qui comprend la production de prostaglandines qui est le produit de la catalysation de la transformation de l'acide arachidonique. L'amarrage moléculaire est une méthode de calcul actuellement largement utilisée dans le processus de découverte de médicaments (**Chandak et al., 2014**). L'avantage de l'amarrage est d'identifier le mode de l'interaction des molécules étudiées au site de l'enzyme ou récepteur par le biais d'interactions clés spécifiques et de prédire l'affinité de liaison entre les complexes de liaison aux protéines, dans ce cas, les constituants chimiques de L'HE.

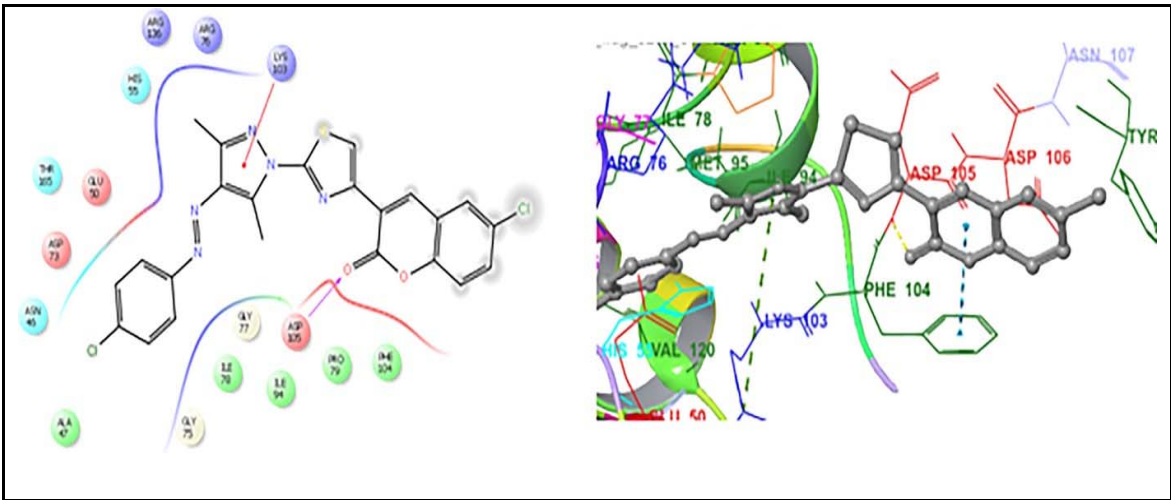
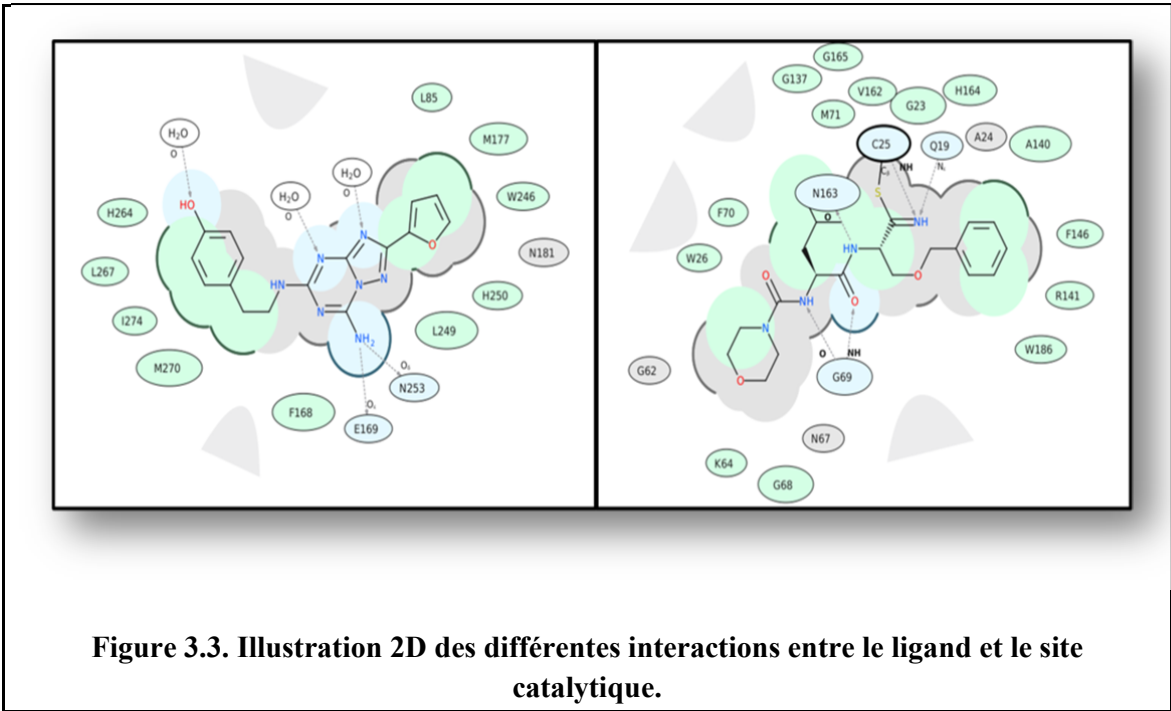


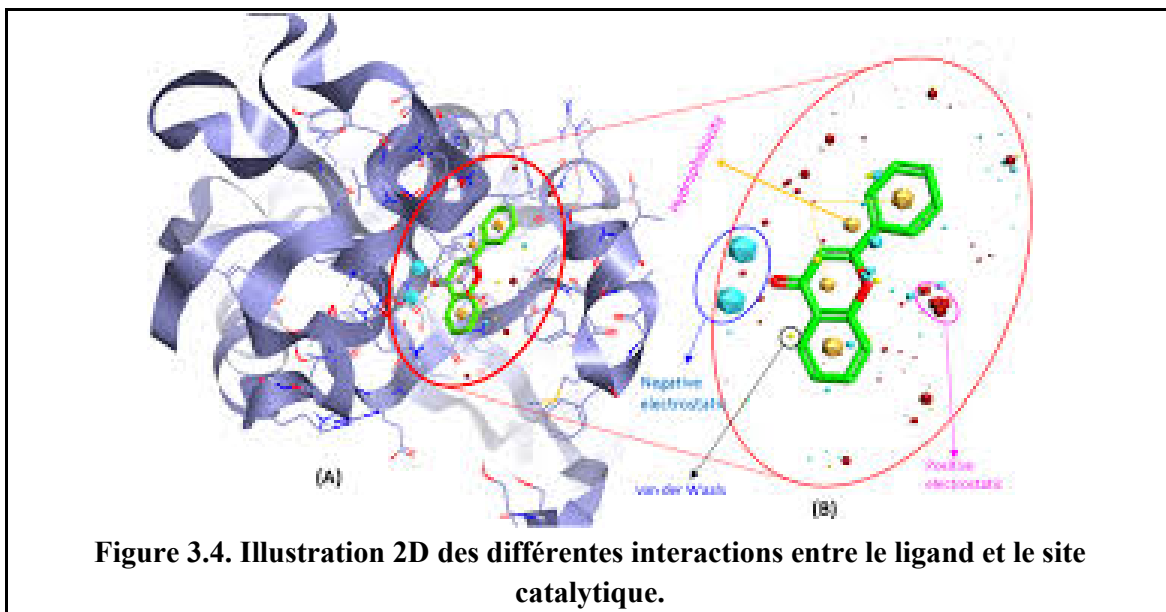
La valeur RMSD indique la précision de l'amarrage postures calculées par l'algorithme d'amarrage par rapport aux poses déterminées expérimentalement d'un composé lié à une cible biologique. Un RMSD en moins supérieur à 2 Å est considéré comme réussi (c'est-à-dire comme ayant justifié validité) (Cole et al., 2005). Le RMSD est de 3.361 Å

### 3.3.2. Interactions ligands-site catalytique de l'enzyme

Les résultats de la minimisation de l'énergie. D'après les résultats obtenus, les ligands possèdent la plus petite valeur des énergies, en comparaison avec les autres complexes, avec une affinité de liaison entre les complexes de liaison aux protéines.







# CONCLUSION

---

A l'heure actuelle, l'huile possède un atout considérable grâce à la découverte progressive de ces potentielles applications dans les soins de santé et en phyto-aromathérapie, ainsi que ses utilisations dans d'autres secteurs d'intérêt économique. Ses nombreuses propriétés font qu'elle connaît une demande de plus en plus croissante sur les marchés internationaux. En aromathérapie scientifique, il s'agit de mettre en valeur les propriétés pharmacologiques des huiles essentielles en s'appuyant sur leur composition chimique.

En définitif, l'étude a bel et bien confirmé le bien-fondé de l'utilisation de cette fraction aromatique comme ingrédient actif dans des préparations galéniques chez les animaux de laboratoire.

Cette action a été rendue possible aussi par l'effet antimicrobien de l'HE, démontré antérieurement, et qui jouait probablement un rôle majeur dans la prévention des surinfections.

De même, il serait intéressant d'apprécier l'action antimicrobienne de cette huile aromatique, en comparaison avec les composés terpéniques isolés, afin de dégager des conclusions sur les possibles antimicrobiens ou encore une potentielle synergie-antagonisme entre les différents constituants, majoritaire et minoritaire.

La cytotoxicité de cette huile ainsi que ces composés caractéristiques devra également être explorée sur cultures cellulaires, avant d'être évaluée *in vivo*.

Après ces nombreux tests, les molécules bioactives de l'essence pourront servir de base au développement de nouvelles préparations parapharmaceutiques.

La recherche devrait continuer à progresser pour trouver ou synthétiser de nouvelles sources prometteuses de cicatrisants efficaces et dénués d'effets indésirables, ou encore effectuer des investigations détaillées, sur l'optimisation des techniques d'isolement, sur des études biochimiques vers la sûreté des sources nouvellement découvertes, et la disponibilité biologique des composés actifs.

## Références Bibliographiques

---

1. Adorjan, B., & Buchbauer, G. (2010). Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(6), 407-426.
2. Al-Bayati, F. A. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of ethnopharmacology*, 116(3), 403-406.
3. Amorati, R., Foti, M. C., & Valgimigli, L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(46), 10835-10847.
4. Arnold, F., & West, D. C. (1991). Angiogenesis in wound healing. *Pharmacology & therapeutics*, 52(3), 407-422.
5. Baba Aissa F (1991): Les plantes me'dicinales en Alge'rie. Alger-Alge'rie, Algeria, Coe'dition Bouche'ne' et Ad. Diwan
6. Baccaglioni, L. (2013). There is limited evidence that topical lavender oil is effective for palliative treatment of recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Evidence Based Dental Practice*, 13(2), 47-49.
7. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
8. Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (2009). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC press.
9. Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006.
10. Besombes, C. (2008). Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermo-mécanique d'herbes aromatiques: applications généralisées (Doctoral dissertation, Université de La Rochelle).
11. Boucher, F., Château, J., Ferry, T., Laurent, F., Chidiac, C., & Valour, F. (2017). Diagnostic de l'infection d'une plaie chronique et principes de traitement. *Revue Francophone de Cicatrisation*, 1(2), 15-22.
12. Bousbia, N. (2011). Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de Doctorat, Spécialité Chimie, L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (France) & Ecole Nationale Supérieure Agronomique (Algérie).

13. Branchet, M. C., Boisnic, S., Frances, C., Lesty, C., & Robert, L. (1991). Morphometric analysis of dermal collagen fibers in normal human skin as a function of age. *Archives of gerontology and geriatrics*, 13(1), 1-14.
14. Brown, L. F., Yeo, K., Berse, B., Yeo, T. K., Senger, D. R., Dvorak, H. F., & Van De Water, L. (1992). Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *The Journal of experimental medicine*, 176(5), 1375-1379.
15. Canillac, N., & Mourey, A. (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*, 18(3), 261-268.
16. Carbonelle B., Denis F., Marmonier A., Hinton G., 1987. *Bactériologie médicale : Technique usuelle*, Ed : SINEP)
17. Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58.
18. Cox, R., Hyde, M., Gatehouse, S., Noble, W., Dillon, H., Bentler, R., & Hallberg, L. (2000). Optimal outcome measures, research priorities, and international cooperation. *Ear Hear*, 21(4 Suppl), 106S-115S.
19. Deans, S. G., & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International journal of food microbiology*, 5(2), 165-180.
20. Detmar, M. (1996). Molecular regulation of angiogenesis in the skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 106(2), 207-208.
21. Djilani, A., & Dicko, A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils. *Nutrition, well-being and health*, 7, 155-179.
22. Domingues, M. (2014). Rôle de ICAT (inhibitor of  $\beta$ -catenin and TCF4) dans le développement normal et pathologique des melanocytes. Thèse de Doctorat, Spécialité Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Paris Descartes, France.
23. Downing, D.T., Stewart, M.E., Wertz, P.W., Colton, S.W., Abraham, W., and Strauss, J.S. (1987). Skin lipids: an update. *J Invest Dermatol* 88, 2s-6s.
24. Eckert, R. L. (1989). Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiological reviews*, 69(4), 1316-1346.
25. Elzayat, E. M., Auda, S. H., Alanazi, F. K., & Al-Agamy, M. H. (2018). Evaluation of wound healing activity of henna, pomegranate and myrrh herbal ointment blend. *Saudi pharmaceutical journal*, 26(5), 733-738.

26. Franz, C., & Novak, J. (2020). Sources of essential oils. In *Handbook of essential oils* (pp. 41-83). CRC Press.
27. Goren-Inbar, N., Sharon, G., Melamed, Y., & Kislev, M. (2002). Nuts, nut cracking, and pitted stones at Gesher Benot Ya 'aqov, Israel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 2455-2460.
28. Guiraud, J. P. (2003). *Microbiologie alimentaire; Application à l'étude des principaux groupes microbiens*. Edition Dunod, Paris, France.
29. Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314-321.
30. Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 86(6), 985-990.
31. Jullien J – DGAL. Juillet, 2016 : Guide de reconnaissance Plantes hôtes potentielles de *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex* en France, Surveillance biologique du territoire (SBT) dans le domaine végétal, Symptôme d'une infection de *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex* sur *Polygala myrtifolia* – 1ère édition.
32. Kalembe, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.
33. Kottler, D. (2017). Plaies chroniques et facteurs de risque infectieux liés à l'hôte. *Revue Francophone de Cicatrisation*, 1(2), 13-14.
34. Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., & Sandri, M. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism*, 6(6), 458-471.
35. Martin, R. (1997). Regional unemployment disparities and their dynamics. *Regional studies*, 31(3), 237-252.
36. Martoja, R., Martoja-Pierson, M., & Grassé, P. P. (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale* (Vol. 345). Masson, Paris, France.
37. Mosteller, F. (1987). Implications of measures of quality of life for policy development. *Journal of chronic diseases*, 40(6), 645-650.
38. Moulin, Y. (2001). Comprendre le processus de cicatrisation. *Infirm Que*, 9(1), 37-40.
39. Murbach Teles Andrade, B. F., Nunes Barbosa, L., da Silva Probst, I., & Fernandes Júnior, A. (2014). Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 26(1), 34-40.



40. Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & Feo, V. D. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), 86.
41. Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.
42. Ono I., Tateshita T., Inoue M. Effects of a collagen matrix containing basic fibroblast growth factor on wound contraction. Wiley & Sons, Inc. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)*, 48: 1999, 621–630.
43. Orlando, B. J., & Malkowski, M. G. (2016). Crystal structure of rofecoxib bound to human cyclooxygenase-2. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 72(10), 772-776.
44. Oummad, A. (2013). Cicatrisation et plaie cutanée chez l'enfant (Doctoral dissertation).
45. Quezel, P., & Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (No. 581.965 Q8).
46. Randrianarivelo, R., Sarter, S., Odoux, E., Brat, P., Lebrun, M., Romestand, B., ... & Danthu, P. (2009). Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chemistry*, 114(2), 680-684.
47. Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial crops and products*, 62, 250-264.
48. Sanyal, D. C., & Maji, N. K. (2001). Thermoregulation through skin under variable atmospheric and physiological conditions. *Journal of theoretical biology*, 208(4), 451-456.
49. Sato, T., Nishio, T., & Hirai, M. (1989). Plant regeneration from isolated microspore cultures of Chinese cabbage (*Brassica campestris* spp. *pekinensis*). *Plant Cell Reports*, 8(8), 486-488.
50. Schauenberg, P., Paris, F. (2010). Guide des plantes médicinales : Analyse, description et utilisation de 400 plantes, Ed. Delachaux et Niestlé, p.396
51. Strodbeck, F. (2001). Physiology of wound healing. *Newborn and infant nursing reviews*, 1(1), 43-52.
52. Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90(3), 333-340.
53. Tsala, D. E., Amadou, D., & Habtemariam, S. (2013). Natural wound healing and bioactive natural products. *Phytopharmacology*, 4(3), 532-60.

54. Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 12(1), 40-53.
55. Witte, M. B., & Barbul, A. (1997). General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America*, 77(3), 509-528.