



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

**Apport Thérapeutique de l'Essence
Aromatique du Thym dans la
Rectocolite Hémorragique**

Présenté par
ASNAM Samia

Devant le Jury composé de =

Mme ROUAKI F.	Université Blida 1	Présidente
Mme SOUR S.	Université Blida 1	Examinatrice
M. BOKHATAM M.N.	Université Blida 1	Promoteur

Session 2020-2021

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier **ALLAH** le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

En second lieu, je tiens à remercier mon encadrant Dr. Bokhatam M.N (enseignant-chercheur à l'Université Blida), pour l'orientation, la confiance, la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

Je remercie vivement les membres de ce respectueux jury :

Madame Dr. Rouaki F. (Maître de Conférences à l'Université Blida 1) : je suis très honorée que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Madame Dr. Sour S. (Maître de Conférences à l'Université Blida 1) : Vous m'avez honoré d'avoir examiné mon mémoire de fin d'études ; je vous suis très reconnaissantes et je vous adresse mes sincères remerciements et soyez assurée de ma profonde gratitude.

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.

Enfin, je remercie ma famille, pour leurs soutiens, leurs encouragements, leurs sacrifices, eux qui m'ont guidé durant toutes mes années d'études vers le chemin de la réussite

SOMMAIRE

Liste des Abréviations

Résumé

Abstract

Introduction

Chapitre I = DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1.1. Condensé historique

1.1.2. Description botanique

1.1.3. Dénominations internationales

1.1.4. Place dans la systématique

1.1.5. Habitat et répartition géographique

1.1.6. Bienfaits et vertus thérapeutiques de la plante

1.1.6.1 Utilisation alimentaire

1.1.6.2 Bienfaits thérapeutiques

1.1.6.3 Utilisations dans la cosmétique

1.1.7. Précautions d'emploi et effets secondaires

1.2.1. Définition

1.2.2. Anatomie générale du tube digestif

1.2.3. Structure générale de la paroi du tube digestif :

1.2.5. Physiopathologie

1.2.6. Apport des thérapies complémentaires : La Phyto-aromathérapie

Chapitre II = MATERIEL ET METHODES

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel végétal et huile essentielle

2.1.2. Milieux de cultures et agents chimiques

2.2. Méthodes

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

2.2.1.1. Technique de diffusion en milieu solide (Aromatogramme)

2.2.1.2 Méthode en phase vapeur (microatmosphère)

2.2.2. Détermination de propriété anti-inflammatoire de l'huile essentielle *in vivo*

2.2.2.1. Etapes de la technique de coloration « Hématoxyline-Eosine »

2.2.4. Docking moléculaire

Chapitre III: RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Activité antimicrobienne de l'HE *in vitro*

3.1.1. Technique d'Aromatogramme

3.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoires de l'huile essentielle *in vivo*

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 de l'enzyme

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Liste des Abréviations

Ach : Acétylcholine
ATCC : American Type Culture Collection
ATB : Antibiotiques
CI : Colites indéterminées
CMI : Concentration Minimale des inhibitions
COX : Cyclo-oxygénase
DZI : Diamètre de la Zone d'inhibition
EPSP : Etablissement de Proximité de la santé Publique
EPH : Etablissement Public hospitalier
GABA : Acide γ -aminobutyrique
HE : Huile Essentielle
IL : Interleukine
iNOS : Oxyde nitrique synthase
LPS : Lipopolysaccharides
MH : Muller-Hinton
NF- κ B : Nuclear factor-kappa B
NO : Monoxyde d'azote
ORL : Otorhinolaryngologie
PNN : Polynucléaires neutrophiles
SAB : Sabouraud-Chloramphénicol
TNF- α : Tumor necrosis facteur alpha

RESUME

Nous avons entrepris cette étude afin de mieux cerner les propriétés anti-inflammatoires de l'huile à échelle cellulaire. Aussi, le pouvoir antimicrobien de l'huile aromatique a été exploré *in vitro* sur plusieurs souches microbiennes par différentes techniques. Enfin, le volet bio-informatique ne sera pas délaissé puisque nous avons mené une étude des propriétés anti-inflammatoires des molécules caractéristiques via l'inhibition des récepteurs enzymatiques, une enzyme impliquée dans le processus inflammatoire. Le screening antimicrobien de l'huile a montré son efficacité dans l'inhibition de la croissance de toutes les souches microbiennes avec des diamètres de zone d'inhibition. De meilleurs résultats ont été obtenus en microatmosphère où une inhibition quasi-totale (80 mm) a été constatée. L'étude histologique a révélé que les animaux traités d'une façon préventive par l'huile n'ont présenté aucune ulcération. En définitif, l'étude a bel et bien confirmé le bien-fondé de l'utilisation de la fraction aromatique commun comme ingrédient préventif à visée anti-inflammatoire dans un modèle animal. D'autres investigations seront nécessaires pour explorer la toxicité et le mécanisme d'action de cette huile aromatique et de ses composés terpéniques.

Mots-Clés: Huiles essentielles ; Inflammation; Activité anti-inflammatoire ; Docking moléculaire.

ABSTRACT

This research study was carried out in order to better understand the anti-inflammatory properties of EO on a cellular scale via the histological examination. Also, the antimicrobial effect of EO has been done *in vitro* against several microbial strains using different assays. Further, the anti-inflammatory property of several EO compounds was realized *in silico* using the molecular docking method. The antimicrobial screening of EO revealed its effectiveness in inhibiting the growth of all microbial strains tested with inhibition zone diameters. Better results were obtained using disc diffusion assay where almost a total inhibition (80 mm) was detected. The histological study revealed that the animals treated preventively did not present any ulceration, in comparison with the negative control. Ultimately, the study did confirm the validity of the use of this EO as a preventive ingredient for anti-inflammatory purposes in an animal model. Further investigations will be needed to explore the toxicity and mechanism of action of this aromatic oil and its terpene compounds.

Keywords: Essential oils; inflammation; Anti-inflammatory activity; Molecular docking.

INTRODUCTION

S'il existe des thérapeutiques pour soulager les inflammations ou encore des traitements permettant de diminuer l'intensité et la durée des poussées et de prévenir les récurrences, ils ne suffisent pas à traiter ou soulager tous les malades (**Simon, 2013 ; Klotz et al., 2015**).

Et lorsqu'il n'y a plus d'autres options pour une prise en charge, c'est l'ablation pure et simple qui est envisagée. Mais cette opération chirurgicale, qui n'est pas sans conséquences sur la qualité de vie du patient, ne résout le problème que dans la certains cas. Pour les autres, le processus inflammatoire se répand à nouveau qui lui a été directement attaché. En conséquence, médecins comme patients espèrent l'arrivée de nouvelles molécules thérapeutiques efficaces (**Rawsthorne et al., 1999 ; Peyrin-Biroulet et al., 2016**).

Pourtant, de nombreuses pistes et options naturelles se dessinent pour apporter des réponses immédiates en complément ou en lieu et place des traitements pharmacologiques conventionnels.

Les patients atteints d'inflammation sont classés parmi les plus grands consommateurs de thérapies complémentaires et alternatives comme en témoignent de nombreuses études (**Joos et al., 2006 ; Hilsden et al., 2011**).

Actuellement, les thérapies alternatives et complémentaires, à l'instar de la phyto-aromathérapie, deviennent très populaires y compris dans les pays développés (**Gröchenig et al., 2019**).

Parmi ces approches, la prise de mixtures et d'extraits des herbes aromatiques et médicinales semble être une stratégie prometteuse (**Triantafillidis et al., 2016 ; Ganji-Arjenaki & Rafieian-Kopaei, 2019**).

De nombreuses études ont montré, in vivo sur des modèles animaux d'inflammation, les effets protecteurs et bénéfiques de certaines fines herbes et plantes aromatiques et médicinales.

Aussi, le pouvoir antimicrobien de l'huile aromatique a été exploré *in vitro* sur plusieurs souches microbiennes. Enfin, le volet bio-informatique ne sera pas délaissé puisque nous avons mené une étude des propriétés anti-inflammatoires des molécules majoritaires via l'inhibition des récepteurs enzymatiques, une enzyme impliquée dans le processus inflammatoire.

Chapitre I

**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

1.1. Plantes aromatiques et aromathérapie

1.1.1. Aromathérapie

Terme venant de la latin *aroma* (odeur agréable de certain essence naturelles) et du grec *thérapie* (soin, cure), « ce qui signifie : se soigne par les odeurs » (**Couic-Marinier et al., 2014**). L'aromathérapie est un thérapeutique utilisant les essences, les huiles essentielles et les hydrolats aromatiques extrais des parties aromatiques des plantes médicinales (**Faucon, 2017**).

1.1.2. Plantes aromatiques

C'est une plante qui contient des molécules aromatiques volatiles ou odorantes dans un ou plusieurs organes producteurs que sont les feuilles, les fleurs, les fruits, les graines, l'écorce, les racines. Pour être distillée, la plante aromatique doit renfermer une quantité suffisante de molécules aromatiques. Celles-ci sont contenues dans des systèmes sécréteurs :

- Les poils sécréteurs (ex : lavande)
- Les cellules sécrétrices (ex : boldo)
- Les poches schizophrènes (ex : millepertuis)
- Les poches schizolysigènes (ex : oranger)
- Les canaux sécréteurs (ex : carotte)

Les plantes aromatiques capables de synthétiser une essence sont peu nombreuses. Parmi les 800 000 espèces végétales, seules 10 % en sont capables. Parmi les familles aromatiques, les plus représentatives sont :

- Les Abiétacées représentées par les Conifères (sapins, cèdres, pins).
- Les Apiacées dont les fruits sont particulièrement riches en essence (aneth, angélique, coriandre, cumins, anis vert).
- Les Astéracées (20 000 espèces) qui constituent les herbes pour la plupart (tanaïs, mûle, armoise).
- Les Cupressacées (cypripès, genévrier, thuya).
- Les Ericacées (gaulthérie, ledon).
- Les Lamiacées (lavandes, romarins, menthes, marjolaines, sarriettes, mélisses, sauges).
- Les Lauracées (cannelles, lauriers, ravensares, bois de rose, camphriers).
- Les Myrtacées (eucalyptus, giroflier, myrte, niaouli, tea tree, cajepu).
- Les Poacées (citronnelles, palma rosa, vétiver, verveines, lemon-grass).
- Les Rutacées qui forment tous les citrus (citron, pamplemousse, mandarine, oranger bigarade) (**Zahalka, 2014**)

1.1.3. Historique

L'Histoire de l'aromathérapie se confond avec celle de la phytothérapie jusqu'au XX^{ème} siècle. En réalité le terme « aromathérapie », issu du latin « aroma = odeur » et du grec « therapein = soin », fut créé en 1928 par un chercheur lyonnais, Gattefossé René-Maurice. La petite Histoire dit qu'il aurait découvert les propriétés de l'huile essentielle de lavande lors d'une explosion dans son laboratoire de parfumerie qui le brûla gravement (**Baudoux, 2013**).

Ce chimiste continua les recherches et les expériences dans ce domaine puis publia en 1931 un ouvrage « Aromathérapie » dans lequel il décrivait ses expériences et étudiait les relations structures-activités. Il contribua à une étude scientifique des traitements d'aromathérapie et de phytothérapie.

En 1971, il fonda l'association de recherche en phytothérapie et aromathérapie car selon lui : « Unissant les recherches modernes aux enseignements du passé, la phytothérapie et l'aromathérapie n'ont jamais cessé d'être des médecines millénaires et d'avenir » (**Lacoste and Menant, 2010**).

1.2. Huiles essentielles

1.2.1. Quelques définitions

Les HEs sont des mélanges de nombreux composés qui sont des molécules peu complexes comme les terpènes, les phénols, les méthyl-éthers, les oxydes, les esters, les cétones. Elles sont produites par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages. L'extraction de ces huiles peut s'effectuer par expression à froid, ce qui préserve l'intégrité de l'essence mais ne peut s'appliquer qu'aux plantes appartenant à la famille des Rutacées **(Masango, 2005)**.

L'extraction par distillation se fait en exploitant la volatilité des composés aromatiques pour les séparer. Il existe deux formes de distillation : l'hydrodistillation où l'eau et le végétal sont chauffés ensemble dans un ballon et l'hydrodistillation par entraînement à la vapeur d'eau, où la vapeur est d'abord produite dans un ballon puis acheminée dans un second ballon, dans lequel elle va remonter en passant à travers le matériel végétal et en entraînant les composants aromatiques **(El Haib, 2011)**.

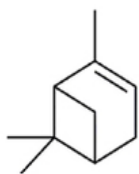
Actuellement, près de 3000 HEs sont décrites, parmi lesquelles environ 300 présentent une importance commerciale dans le cadre d'applications pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires, agronomiques ou dans le domaine de la parfumerie **(Bakkali et al., 2008 ; Tajkarimi et al., 2010)**.

1.2.2. Composition chimique

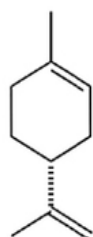
La composition chimique des plantes aromatiques est complexe. Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une HE est variable **(Fig. 1)**, d'une grande diversité de composés (jusqu'à 500 molécules différentes dans l'HE de Rose). A côté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces. De masse moléculaire relativement faible, ce qui leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives.

Terpenes

Monoterpenes



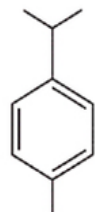
α -Pinene



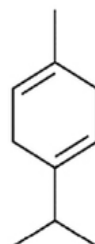
Limonene



Sabinene

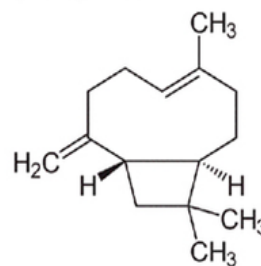


p-Cymene



γ -Terpinene

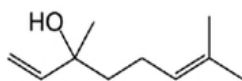
Sesquiterpenes



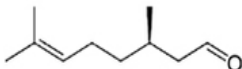
β -Caryophyllene

Terpenoids

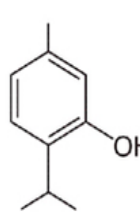
Monoterpenoids



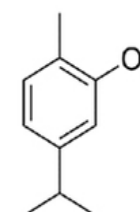
Linalool



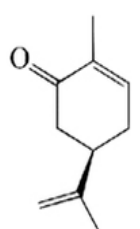
Citronellal



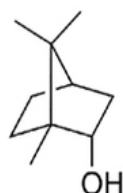
Thymol



Carvacrol

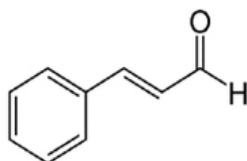


Carvone

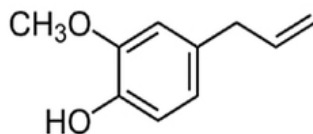


Borneol

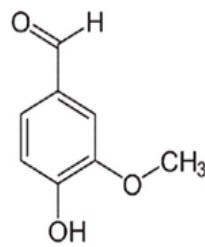
Phenylpropanoids



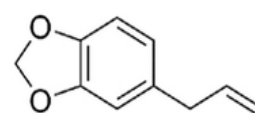
Cinnamaldehyde



Eugenol

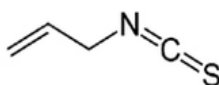


Vanillin

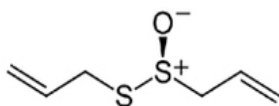


Safrole

Others



Allyl-isothiocyanate



Allicin

Figure 1. Structure chimique de certains composés caractéristiques des huiles essentielles.

La deuxième fraction dite non volatile de la plante, composés organiques non volatils (CONV), est composée essentiellement de coumarines, flavonoïdes, composés acétyléniques ainsi de lactones sesquiterpéniques phénols ou polyphénols jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante (**Kubeczka, 1982**). L'ensemble de ces produits sont accumulés dans des cellules sécrétrices offrant à la plante une odeur caractéristique (**Taleb-Toudert, 2015**).

L'analyse des tendances du marché international indique que les exportations mondiales des huiles essentielles pour les années 1998-2002 ont dépassé un milliard de dollars annuellement. Les Etats-Unis est le plus grand fournisseur des huiles essentielles. Le flux des importations mondiales d'huiles essentielles de 1998 à 2001 est resté stable autour d'une valeur de 1.300 millions de dollars.

Tableau 1. Huiles essentielles les plus demandées sur le marché mondial.

Huiles essentielles	Volume (tonne)	Pays producteurs
Citronnelle	1 800	Chine, Sri Lanka
Citron	9 200	Argentine, Italie, Espagne
Eucalyptus (type citronellal)	1 000	Chine, Brésil, Inde, Vietnam
Feuille de clou de girofle	1 800	Indonésie, Madagascar
Verveine exotique	1 200	Chine
Menthe verte	1 800	USA, Chine
Bois de cèdre (Chine)	1 650	USA, Chine
Lavandin	1 100	France
Patchouli	1 200	Indonésie, Inde

1.2.4. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

Les plantes aromatiques et leurs HEs, peuvent avoir d'intéressantes applications dans différents secteurs:

- En pharmacie

Dans leur grande majorité, les plantes médicinales sont utilisées en nature, en particulier pour la préparation d'infusions et sous la forme de préparations galéniques simples. Elles sont également utilisées pour l'obtention des HEs dont certaines peuvent avoir un intérêt médicamenteux (en particulier dans le domaine des antiseptiques externes) mais qui, majoritairement, sont surtout destinées à l'aromatisation des formes médicamenteuses destinées à la voie orale.

L'effet biologique a souvent été trouvé supérieur à celui de plusieurs fongicides du commerce. De plus, ces huiles sont très efficaces sur les germes résistants aux antibiotiques ; ce qui leur donne une place parmi les moyens thérapeutiques de désinfection (**Valnet, 1984**).

Les perspectives d'application peuvent s'étendre à d'autres domaines comme, par exemple, la stomatologie, le traitement des affections bactériennes et fongiques de la cavité Buccale, les soins dentaires ou simplement pour l'hygiène dentaire sous forme de pâte dentifrice ou de pâte à mâcher (**Wegrzyn and Lamendinh, 2005**).

- Dans les industries agro-alimentaires :

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes utilisés dans l'assaisonnement des aliments a été reconnue depuis longtemps.

C'est pour cela que l'on pense, de plus en plus, à les utiliser dans la conservation des denrées alimentaires, sans pour autant en dénaturer le goût puisque ces aromates entrent dans la composition des préparations alimentaires.

C'est ainsi que l'on trouve le laurier dans certaines conserves et dans le miso qui est un met japonais traditionnel (**Kurita and Koike, 1982**).

1.2.5. Toxicité des huiles essentielles

Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant, allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de *Citrus* contenant des furocoumarines) (Naganuma et al., 1985).

Il est cependant capital d'intégrer la notion de la dualité "Efficacité - Toxicité". En effet, toute substance thérapeutiquement active est potentiellement toxique. Tout dépendra de la dose unitaire, journalière, de la voie d'administration, de l'état du patient.

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées (Pibiri, 2006).

Cependant quelques informations sur certaines toxicités sont décrites par la littérature : En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL_{50} supérieures à 5 g/kg.

1.1.6. Bienfaits et vertus thérapeutiques de la plante

1.1.6.1 Utilisation alimentaire

Utilisé depuis des temps anciens à des fins aromatiques et médicinales. En tant que plante aromatique, il est utilisé aujourd'hui pour parfumer les aliments comme condiment et épice (par exemple du fromage et de la viande), des liqueurs et des mélanges d'herbes.

A été utilisé dans les industries alimentaires et aromatiques comme exhausteur de goût dans une grande variété d'aliments, de boissons et de produits de confiserie en raison de sa grande aromaticité, ainsi que comme conservateur alimentaire pour la conservation de la viande, du poulet et du poisson ; en raison de ses propriétés antimicrobiennes et antioxydants.

1.1.6.2 Bienfaits thérapeutiques

En tant que plante médicinale a été un médicament important dans plusieurs autres maladies. La plante possède la capacité de guérir les aberrations gastro-intestinales, car l'extrait a été administré pour traiter les vers chez les enfants.

Il a été rapporté que l'extrait de plante entière était utilisé contre plusieurs troubles respiratoires dus à l'inflammation des muqueuses des voies respiratoires supérieures, notamment la coqueluche, la bronchite et le catarrhe, l'asthme et la pharyngite. Le thé a été largement utilisé pour traiter la toux et le rhume. Il a été utilisé aussi pour traiter les maux de gorge.

D'autres propriétés attribuées comprennent l'amélioration de la fonction hépatique et agir comme un stimulant de l'appétit. Les pousses de fleurs étaient utilisées pour traiter les infections de la bouche, de la peau, des voies urinaires, les douleurs aux gencives, l'hypertension artérielle, les problèmes cardiaques, la rétention d'eau, la cystite, les rhumatismes et l'arthrite. Considéré comme astringent, carminatif, désinfectant et tonique. Appliqué sur la peau, soulage les morsures et les piqûres, la névralgie, les douleurs rhumatismales.

La plante était principalement utilisée pour le traitement des plaies, car elle possède des propriétés cicatrisantes et antiseptiques. Au Pérou, une infusion de cette plante est utilisée pour améliorer les fonctions cérébrales et circulatoires et pour lutter contre les parasites intestinaux.

1.1.6.3 Utilisations dans la cosmétique

Dans les cosmétiques, l'extrait est utilisé dans les shampooings, les dentifrices, les conditionneurs de cheveux, les savons, les détergents et les crèmes, elle est largement utilisée de nos jours dans les désinfectants pour les mains, les bains de bouche Il a également trouvé son importance dans les problèmes dermatologiques comme l'acné, la peau grasse, la dermatite, les piqûres d'insectes.

1.1.7. Précautions d'emploi et effets secondaires

Une dermatite de contact aéroportée au travail causée par la poussière et d'autres symptômes allergiques, telles que la congestion nasale, la toux sèche et la faiblesse générale, et des symptômes respiratoires ont été signalés dans les agriculteurs polonais.

Dans de grandes doses, il paralyse les organes d'extrémité des nerfs sensoriels et des centres nerveux de la moelle épinière et de la moelle.

Dans des doses toxiques, il produit une sensation de chaleur dans l'épigastrium, qui sonne dans les oreilles, la surdité, la transpiration abondante, une urine accrue de couleur verdâtre foncé, une détresse respiratoire, une prosternation extrême, un coma et la mort.

1.1.8.1. Production et composition

Selon la norme AFNOR NF'T 75-006, « l'huile essentielle désigne le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe, soit par distillation « sèche ». Elle est ensuite séparée de sa phase aqueuse par des procédés physiques » (AFNOR, 2000).

L'industrie utilise principalement des feuilles et des fleurs. Par rapport aux tiges, les feuilles et les fleurs ont des concentrations plus élevées en métabolites bioactifs ; pour la production d'huile volatile, principalement par distillation à la vapeur.

L'huile essentielle est responsable de l'arôme épicé typique est de couleur pâle, jaune ou rouge, avec une odeur riche, douce, herbacée et aromatique et un goût persistant, corse et épicé. Le composé prédominant parmi les composants de l'huile essentielle a été identifié qui donne la saveur distincte.

Elle se compose principalement d'une myriade de composés chimiques classés en composés phénoliques, terpénoïdes, flavonoïdes, stéroïdes, alcaloïdes, tanins et saponines. La plupart d'entre eux sont des composés volatils.

De plus, son huile également une bonne source de certaines vitamines. Ils sont principalement riches en vitamine A et en vitamine C. La vitamine A est nécessaire au maintien de la santé des muqueuses et de la peau ainsi qu'à une bonne vision. La vitamine C offre une résistance contre les infections microbiennes et combat les radicaux libres pro-inflammatoires nocifs.

En outre, son huile considérés comme d'excellentes sources de certains minéraux importants, qui sont essentiels pour une santé optimale, par ex. le potassium, étant un composant important des cellules et des fluides corporels, contrôle la fréquence cardiaque et la pression artérielle, le manganèse est un cofacteur de l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase et le fer est impliqué dans la formation des globules rouges.

1.1.8.2. Notion de chémotype

Sur la base du rapport de chaque constituant, plusieurs chémotypes ont été décrits Le profil phytochimique, ne varie pas seulement en fonction du génotype mais également en fonction de facteurs abiotiques tels que l'emplacement, l'altitude, les pratiques culturales, le moment de la récolte, les méthodes de séchage et les conditions de stockage.

Cette notion de chémotype est devenue essentielle et fondamentale en aromathérapie car les indications thérapeutiques qui découlent de ces divers éléments chimiques peuvent être très différentes.

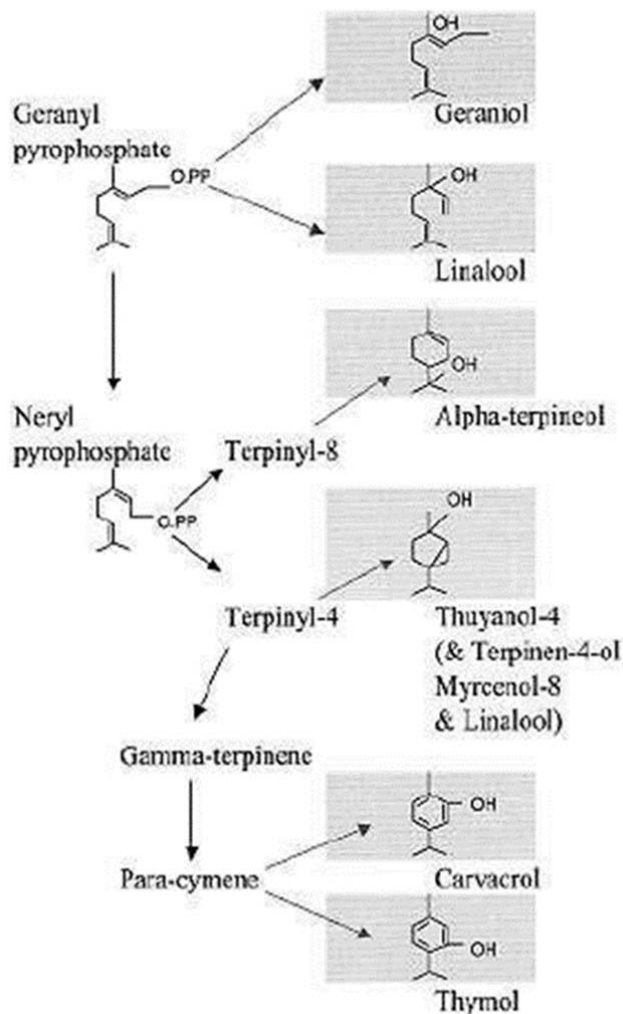


Figure 1.2. La chaîne biosynthétique prévue pour la production de monoterpènes.

1.1.8.3. Bienfaits thérapeutiques de l'huile essentielle

En aromathérapie, les huiles sont utilisées pour traiter les troubles cutanés ainsi que les douleurs corporelles, les douleurs rhumatismales et la sciatique. Cette propriété de réduire la douleur est principalement, qui possède le plus grand potentiel anti-inflammatoire parmi tous les constituants rapportés.

Récemment, une étude a évalué le potentiel de l'huile essentielle et de ses composants individuels pour réduire les déficits cholinergiques liés aux troubles neurodégénératifs et psychiatriques. L'étude a révélé que l'huile augmente la neurotransmission en modulant les niveaux synaptiques de l'acétylcholine (ACh) et l'activité du récepteur nicotinique de l'acétylcholine, orchestrée.

Les composés de l'huile essentielle ont montré des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, antibactériennes et antifongiques ; elle est utilisée comme désinfectant et antiseptique, probablement en raison de son contenu phénolique ; et pour parfumer les savons, faire des parfums et comme agent aromatisant pour de nombreux types de produits alimentaires et peut également être utilisée dans le traitement du pied d'athlète (Tinea pedis).

1.1.8.4. Contre-indications de l'huile essentielle

Les huiles essentielles riches en phénols et en aldéhydes « aromatiques », telles que les espèces de ce genre peuvent entraîner des irritations, voir des brûlures sur la peau et plus encore sur les muqueuses.

La présence de cétones monoterpéniques (comme la menthone, la carvone, la verbénone, le camphre) et de certains oxydes terpéniques (1,8 cinéole, alpha-pinène, bêta-pinène, alphaterpinène) dans les huiles peuvent entraîner une altération du système nerveux. Le risque augmente principalement lors d'une utilisation prolongée ou à forte dose de ces huiles essentielles. Le risque varie également selon la voie d'administration employée (la voie interne présentant plus de risque).

Chaque année, le nombre d'intoxication aux huiles essentielles (particulièrement chez les enfants) augmente de façon régulière, et ce depuis les années 2000. Dans les Hauts de France, 73% des personnes concernées par un empoisonnement étaient des enfants de moins de 15 ans, dont 60% avaient entre 1 et 4 ans.

Étudié séparément, s'avère toxique pour la cellule hépatique (hépatocyte) alors que l'huile dans son intégralité à faible dose présente des propriétés hépato-protectrices. Certaines molécules aromatiques agissent sur le système cardiovasculaire.

Selon la même étude, la quantité de ces composés que l'on peut retrouver dans un unique flacon de divers bains de bouche, serait capable de provoquer une arythmie voire même un arrêt cardiaque.

1.2.2. Anatomie générale du tube digestif

Sur le plan anatomique, le tube digestif proprement dit comporte successivement l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) puis le gros intestin (cæcum, appendice, côlon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde) puis le rectum. En fonction des localisations, on peut constater des particularités histologiques propres à chaque étage du tube digestif (**Kinani, 2014**).

1.2.3. Structure générale de la paroi du tube digestif :

Le tube digestif est constitué de 4 tuniques concentriques qui sont à partir de la lumière : la muqueuse, la musculaire-muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse puis une tunique conjonctive externe (Figure 1) (**Kinani, 2014**). Cette structure en 4 couches est retrouvée tout le long du côlon, excepté du canal anal et d'une partie du rectum (**Alhilali, 2017**).

a) La muqueuse

Elle comprend 2 parties : l'épithélium et le chorion.

L'épithélium correspond à l'ensemble des cellules recouvrant la surface externe et les cavités internes de l'organisme. Dans le cas du côlon, l'épithélium joue le rôle d'interface entre le côlon, les tissus sous-jacents et la lumière intestinale. Les cellules de cet épithélium sont à renouvellement rapide, on a une seule couche de cellules hautes portant des cils. Sa fonction est l'absorption et la sécrétion de mucus, d'enzymes et autres substances. Les cils ont pour rôle de propulser ce mucus.

L'épithélium s'invagine dans la muqueuse en cryptes de Lieberkûhn. Ce sont des glandes de forme tubulaire appartenant à la muqueuse de l'intestin grêle et du côlon. Ces cellules secrètent un mucus, une glaire qui permet de maintenir la muqueuse lubrifiée afin que les selles continuent à glisser en direction du rectum.

Le chorion est un tissu riche qui contient les vaisseaux sanguins et lymphatiques. C'est un tissu conjonctif, où on retrouve des lymphocytes (surtout T) et des polynucléaires éosinophiles (plus rares). Ce chorion est lui-même limité par une assise musculaire : la muscularis mucosae est constituée d'une mince couche de tissu musculaire lisse.

Lors des poussées de RCH, c'est cette muqueuse qui est la plus touchée. En effet, la muqueuse devient érythémateuse, les cellules à mucus se raréfient et l'architecture des cryptes de Lieberkuhn est anormale. Dans les formes les plus graves, la muqueuse peut même se détacher du reste de la paroi, laissant à nu la muscularis mucosae (ALHILALI, 2017).

c) La sous-muqueuse

Est constituée de tissu conjonctif et contient le plexus nerveux de Meissner (ou « plexus sous-muqueux de Meissner ») ainsi que des vaisseaux sanguins et lymphatiques pour la muqueuse (Kinani, 2014).

Limitée en haut par la muscularis mucosae et en bas par la musculuse, elle est constituée de tissu conjonctif et contient le plexus nerveux de Meissner, les vaisseaux sanguins et lymphatiques pour la muqueuse. Dans la RCH, la sous-muqueuse est relativement épargnée (contrairement à la muqueuse et à la muscularis mucosae).

Cependant, dans les formes graves, elle peut être altérée ou mise à nue (Alhilali, 2017).

d) La musculuse

Limitée en haut par la sous-muqueuse et en bas par l'adventice, elle a une disposition en deux couches musculaires : circulaire et longitudinale. Entre ces deux couches se trouve le plexus nerveux d'Auerbach. Elle n'est pas touchée lors d'une RCH (Alhilali, 2017).

e) La tunique externe

Selon la localisation, elle peut être considérée comme une séreuse ou une adventice.

Aux extrémités du tube digestif la tunique externe est constituée par tissu conjonctif lâche qui la rend solidaire aux organes voisins ; on lui donne le nom d'adventice. Entre ces deux extrémités, la tunique externe comporte un tissu conjonctif tapissé sur son versant externe par un épithélium simple (mésothélium), constituant ainsi le feuillet viscéral de la séreuse péritonéale. On parle de séreuse (Kinani, 2014).

1.2.5. Physiopathologie

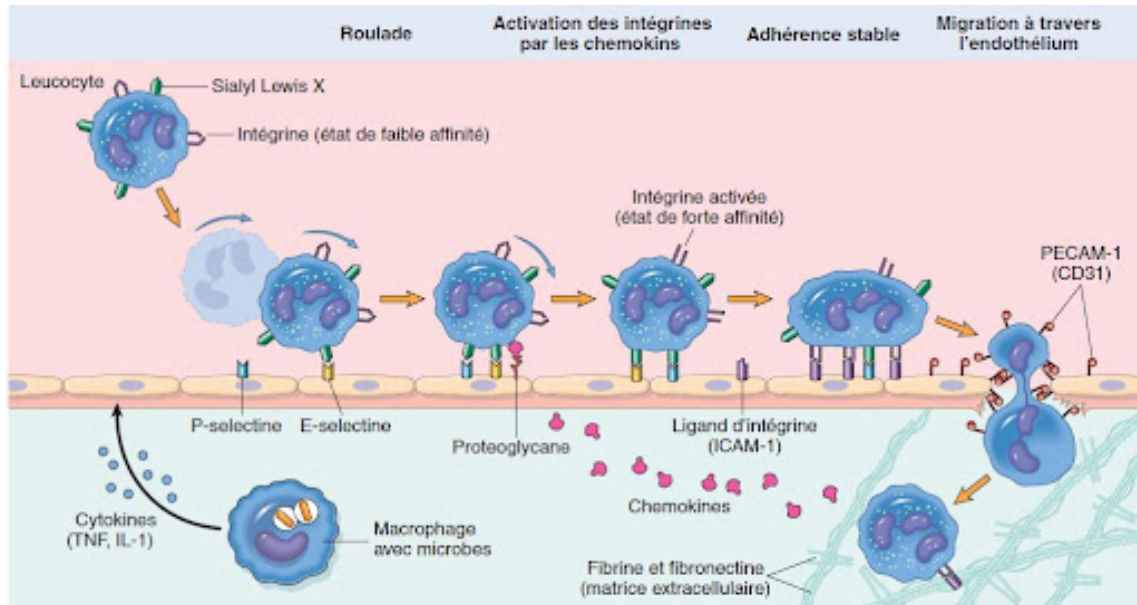
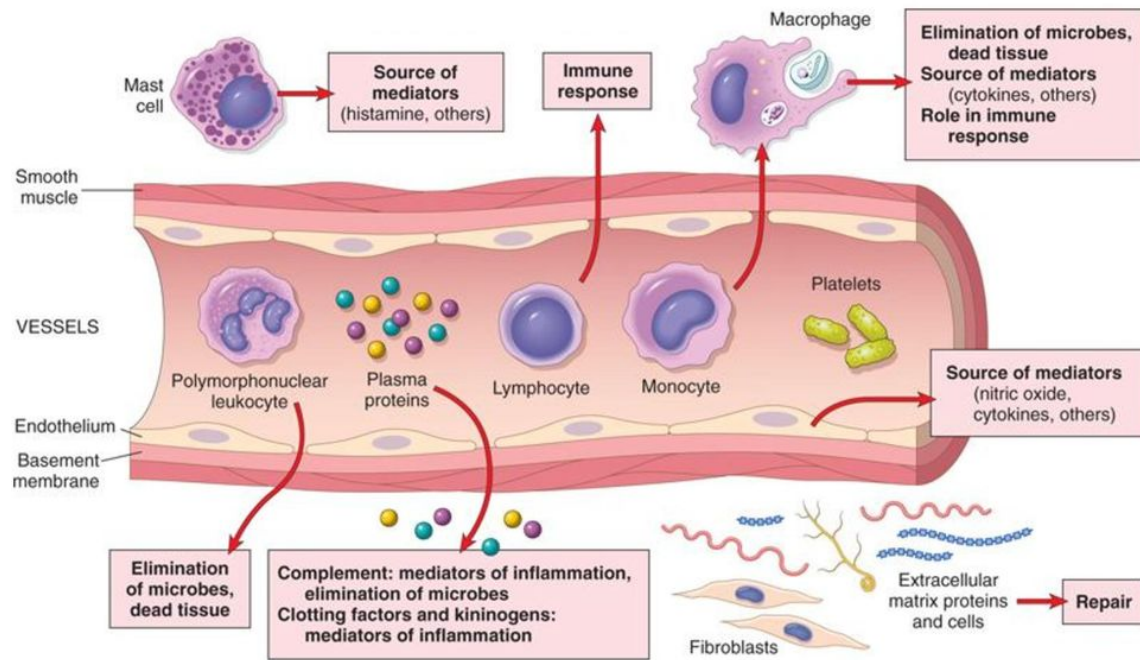


Figure. Etapes de la réaction inflammatoire.

La physiopathologie reste encore mal connue, repose sur l'inflammation chronique de la muqueuse intestinale évoluant par poussées inflammatoires de durées variables (phase symptomatique) entrecoupées par des phases de rémission (phase asymptomatique).

L'activité du système immunitaire intestinal est excessive au cours de ces maladies. Actuellement, on pense qu'il y aurait une augmentation de la perméabilité intestinale, permettant l'invasion de la muqueuse par des agents exogènes, contenus dans la lumière intestinale. Les cellules immunocompétentes sont ainsi stimulées au contact des agents exogènes, contenus dans la lumière intestinale, et induisent la fabrication accrue de cytokines pro-inflammatoires. (Alhilali, 2017)

Les composants des réponses inflammatoires



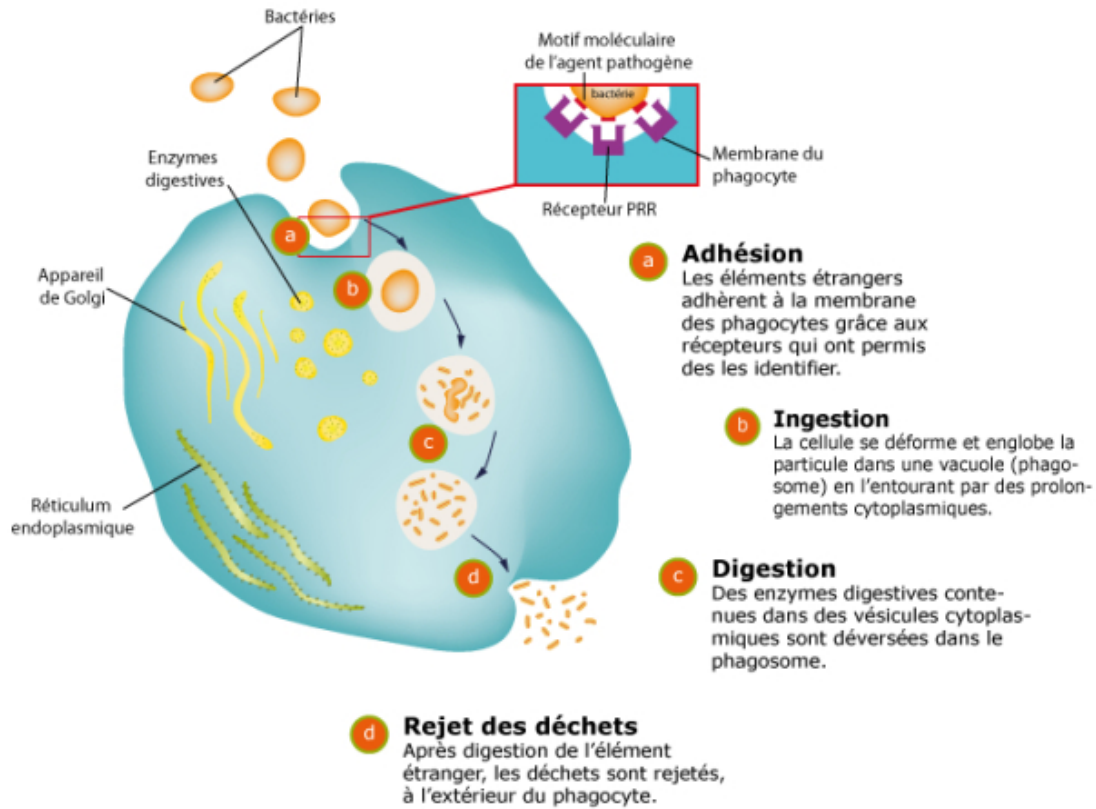


Figure. La réaction inflammatoire.

Figure. Composants des réponses inflammatoires.

Les lymphocytes de la muqueuse, essentiellement les lymphocytes T, produisent des cytokines en excès (IL2 et IFN γ) et les macrophages synthétisent en quantité accrue des médiateurs pro-inflammatoires (IL1, IL6, TNF α , prostaglandines, leucotriènes, facteurs d'activation plaquettaire), les cellules immunitaires innées (cellules dendritiques) contrôlent l'activité d'un ou plusieurs types de cellules T différenciées et agressives, qui sécrètent de très nombreuses cytokines spécifiques. Ces médiateurs de l'inflammation seraient à l'origine des dommages tissulaires observés au niveau de la muqueuse digestive et de la pérennisation de la réaction inflammatoire (Alhilali, 2017)

A l'état sain, la fonction de barrière immune est maintenue par la couche de mucus et les cellules épithéliales formant des jonctions serrées. Les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques, présentent l'antigène aux lymphocytes T et B dans les ganglions lymphatiques. L'activité coordonnée des cellules immunitaires innées et adaptatives maintient l'homéostasie de la muqueuse intestinale à l'équilibre.

Parmi les cellules inflammatoires, on retrouve les cellules TH9 qui entraînent l'apoptose des entérocytes et empêchent la guérison des muqueuses. L'IL-13 produite par les cellules NK contribue également aux lésions épithéliales. Les lésions et les dommages de la muqueuse sont associés à la dysbiose, ce qui contribue probablement à la cascade inflammatoire.

Chapitre II

MATERIEL & METHODES

Chapitre 2 : MATERIEL & METHODES

2. Matériel et méthodes

Les principaux objectifs de notre travail se résumaient à étudier, *in vitro*, le pouvoir antimicrobien de l'HE sur plusieurs souches (ATCC) en utilisant plusieurs méthodes microbiologiques, et à évaluer le pouvoir anti-inflammatoire *in vivo*.

Aussi, une étude *in silico* a été faite à travers l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires des composés terpéniques sur l'inhibition d'une enzyme impliquée dans le processus inflammatoire.

2.1. Matériel

2.1.2. Souches microbiennes

Quatre souches bactérienne et deux fongique ont été utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne toutes les souches sont de référence (ATCC). Les souches microbiennes ont été conservées et maintenues en vie, par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance pendant 24 heures à 37 °C.

2.1.2. Milieux de cultures et agents chimiques

Nous avons utilisé des milieux de culture solides, Muller-Hinton (MHA) pour les bactéries et la gélose Sabouraud-Chloramphénicol (SAB) pour les champignons, ces milieux de culture proviennent de la société idéal-Labo, sise à Beni Merad (Blida). Et afin de mener une étude comparative du pouvoir antibactérien de l'essence avec des produits de références, des disques d'Antibiotiques (ATB) ont été utilisés comme témoins positifs.

2.2. Méthodes

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

La recherche de l'activité antibactérienne et antifongique basée sur l'inhibition de la croissance des micro-organismes soumis en contact avec l'HE. Deux méthodes qualitatives (aromatogramme et microatmosphère) et une technique quantitative (détermination des concentrations minimales inhibitrices) ont été effectuées.

2.2.3.1. Technique de diffusion en milieu solide (Aromatogramme)

Cette technique a été décrites par plusieurs auteurs (**Zaika, 1989 ; Tyagi et al., 2013**). C'est la méthode que nous avons adoptée pour évaluer, dans une première étape, le pouvoir antimicrobien de l'essence.

Elle est basée sur une technique utilisée en bactériologie, l'antibiogramme. Cette méthode, inspirée de celle des antibiogrammes, a été généralisée aux HE issues de l'hydrodistillation de la plante. La seule différence réside dans le remplacement des antibiotiques (ATB) par des extraits aromatiques.

L'essence diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'essence aromatique suffisante qui inhibe leur croissance.

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance bactérienne se traduit par un halo translucide autour du disque et dont le Diamètre de la Zone d'Inhibition (DZI) est mesuré et exprimé en millimètres (mm). Plus le DZI est grand, plus la souche est sensible à l'HE. Ainsi, la souche microbienne sera classée comme étant sensible, intermédiaire ou résistante vis-à-vis de l'HE.

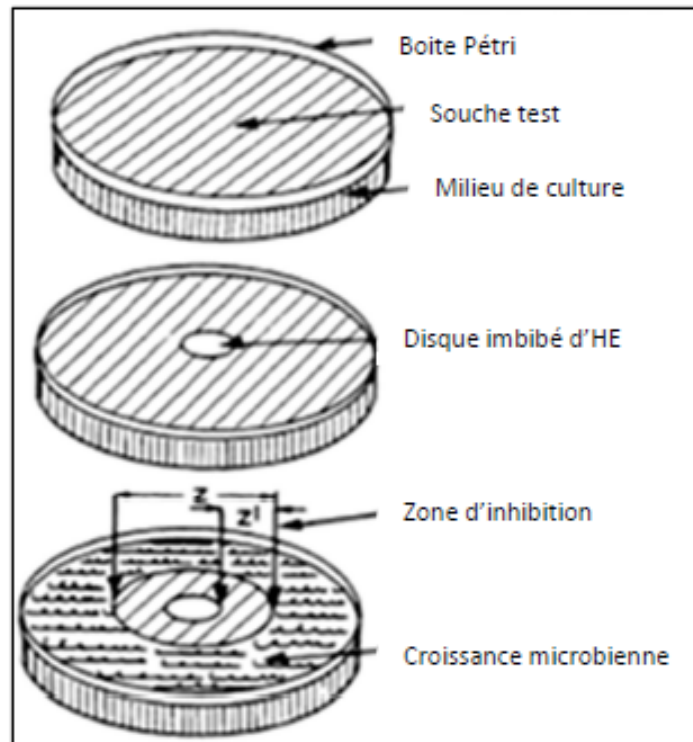


Figure 2.1. Illustration de l'aromatogramme (Zaika, 1989).

2.2.1.2 Méthode en phase vapeur (microatmosphère)

Nous avons utilisé cette méthode dans le but d'apprécier les propriétés bactéricides de la phase volatile de l'HE. Cette méthode (**Figure 2.2**).

Cette technique permet mettre en évidence la diffusion des composants volatils des HE à l'intérieur d'une boîte Pétri. Donc le disque est déposé au centre du couvercle de la boîte Petri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélose. De la même manière que l'aromatogramme, nous avons appliqué 3 quantités croissantes au disque.

Le diamètre du disque diffère selon la quantité d'HE à imprégner afin d'obtenir un bon étalement et, par conséquent, une meilleure évaporation de l'HE. La préparation de l'inoculum, l'ensemencement, l'incubation et la lecture des résultats ont été menés de la même manière que la première méthode (Aromatogramme).

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance de micro-organismes se traduit par une zone translucide sur la gélose, de contour plus ou moins nette et à tendance circulaire.

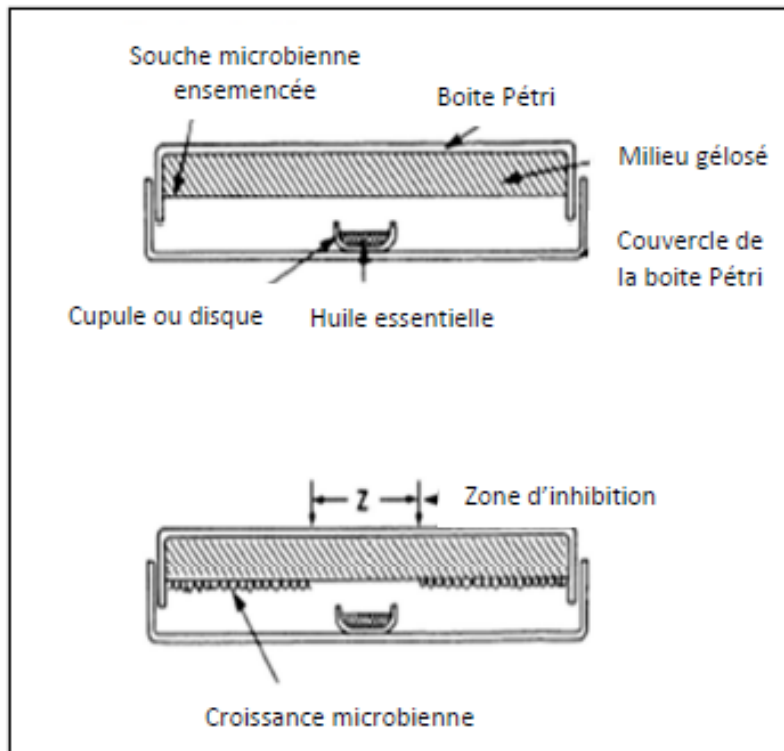


Figure 2.2. Illustration de la méthode de Microatmosphère (Zaika, 1989).

2.2.1.3. Technique de dilution en milieu gélosé (macrodilution)

La technique de dilution en milieu solide est recommandée par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000) pour évaluer la sensibilité des bactéries micro-aérophiles aux agents antibactériens. Elle consiste à ensemencer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en HE dispersée de façon homogène et stable dans le milieu de culture.

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte.

Les boîtes Pétri seront incubées à 37 °C pendant 24h pour les bactéries et à 25 °C pendant 48h pour les levures.

La lecture des résultats se fait visuellement en observant s'il y a l'apparition d'une éventuelle colonie microbienne, en comparaison avec une boîte témoin (exempte d'HE).

A noter que les CMI ont été déterminées uniquement pour les souches ayant manifesté une certaine sensibilité à l'action inhibitrice de l'HE par les méthodes préliminaires.

2.2.4. Détermination de propriété anti-inflammatoire de l'huile essentielle *in vivo*

Afin de confirmer l'activité anti-inflammatoire au niveau cellulaire, des coupes ont été réalisées sur les pièces coupées précédemment. La coloration effectuée était celle d'Hématoxyline-Eosine (H-E.) selon la procédure de **Martoja et Martoja-Pierson (1967)**. Les coupes sont réalisées avec un microtome (Leica RM 212SRTS) permettant d'obtenir des sections de 3 à 5 µm d'épaisseur.

2.2.4.1. Etapes de la technique de coloration « Hématoxyline-Eosine »

— Fixation :

La fixation a pour but le durcissement des pièces et la conservation des structures tissulaires du prélèvement dans un état aussi proche que possible du vivant pour l'analyse morphologique et immunofluorescence. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion dans un grand volume de liquide fixateur (formol à 10%).

— Déshydratation et Eclaircissement :

La déshydratation a pour but de faire sortir l'eau contenue dans les tissus pour éviter sa répulsion vis-à-vis la paraffine pendant l'inclusion. On utilise généralement un automate muni (Leica) de plusieurs bacs contenant par ordre :

Tableau 2.2. Les différents bacs de déshydratation et éclaircissement

Réactifs	Temps (h)	Température (°C)
Formol	2	< 40
Ethanol 50%	2	45
Ethanol 50%	1	45
Ethanol 60%	1	45
Ethanol 70%	1	45
Ethanol 90%	1	45
Ethanol 98%	1	45
Xylène 50%	1	45
Xylène 60%	1	45
Paraffine 50%	2	60
Paraffine 60%	2	60

- Inclusion dans la paraffine nécessite au préalable la déshydratation des pièces histologiques (bains successifs d'éthanol de degrés croissants, jusqu'à l'absolu).
- Elimination complète des traces d'éthanol et l'imprégnation par le xylène.
- Elimination de xylène et le remplacement par la paraffine. Les pièces sont placées successivement dans deux bains chacun, d'une durée de 2 heures à 60 °C.

Mode opératoire :

- On met les pièces du colon dans des cassettes qui se placent en vrac dans le panier. Chaque cassette porte toutes les indications utiles de Chaque pièce. On met le panier dans l'automate d'infiltration qui va effectuer automatiquement toutes les opérations de traitement des prélèvements tissulaires : fixation, déshydratation, et éclaircissement des spécimens dans les solvants pour finir par l'inclusion dans la paraffine.
- Le panier est transporté d'un poste à l'autre, le déplacement s'effectue dans le sens des aiguilles d'une montre. Un mouvement de va et vient est imprimé au panier immergé. Ce mouvement a pour but de faciliter et d'accélérer l'infiltration.
- Avant de quitter un poste, le panier est maintenu pendant 60 secondes au-dessus du récipient pour laisser au produit le temps de s'égoutter (on réduit ainsi au minimum le risque de contamination de solvants.).
- Enlever le panier et prendre les cassettes pour l'enrobage.





Figure 2.3. Automate de déshydratation

— Inclusion :

L'inclusion consiste à enfermer l'organe dans une cassette en plastique qui la pénètre intimement. On obtient alors un bloc de consistance homogène que l'on coupera au microtome. Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes histologiques fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Il existe différentes qualités de paraffine qui se différencient par leur point de fusion. La durée de l'inclusion dépend de la taille de la pièce, et elle se fera dans des moules permettant les confections de blocs qui se montent ensuite sur le microtome.



Figure 2.4. Station d'enrobage

Mode opératoire :

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

- console thermique, console d'enrobage et console réfrigérante (SLEE MPS/W MPS/P MPS/C).
- Placer les moules en Acier inoxydable dans le bac de préchauffage.
- Retirer les cassettes de la paraffine liquide à l'aide des pinces préchauffées et les placer sur la plate-forme chaude de travail.
- Après avoir rempli le moule de paraffine, le placer sur la plate-forme chaude, positionner le tissu au centre et au fond du moule.
- Déplacer le moule de la « région chaude » à la « région froide ». Le refroidissement de la base du moule fait que le tissu est maintenu exactement dans la position choisie.
- La cassette d'enrobage est alors enlevée de la plate-forme de travail chauffée, puis placée au-dessus du moule : la température de la cassette et la paraffine liquide permettent une soudure immédiate. La cassette et le moule sont alors de nouveau placés sous le système de distribution, la paraffine est ajoutée jusqu'à ce que la cassette soit à moitié remplie. Placer la cassette et le moule ainsi remplis sur la grande plaque réfrigérée pour refroidissement définitif.
- Après quelques minutes de refroidissement, les blocs ainsi réalisés, avec précision, peuvent donc être stockés dans le tiroir réfrigéré en attendant d'être coupés.

— Réalisation des coupes au microtome :

Les coupes du bloc de paraffine sont réalisées avec un microtome (Leica) permettant d'obtenir des sections de 3 à 5 μm d'épaisseur.

Les rubans obtenus sont étalés sur les lames et mises à sécher 1h à 60 °C. Les indications de l'organe sont préalablement gravées sur la lame correspondante à l'aide d'un diamant.

a



b



Figure 2.5. (a) microtome (b) étalement du ruban sur la lame.

— Coloration :

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

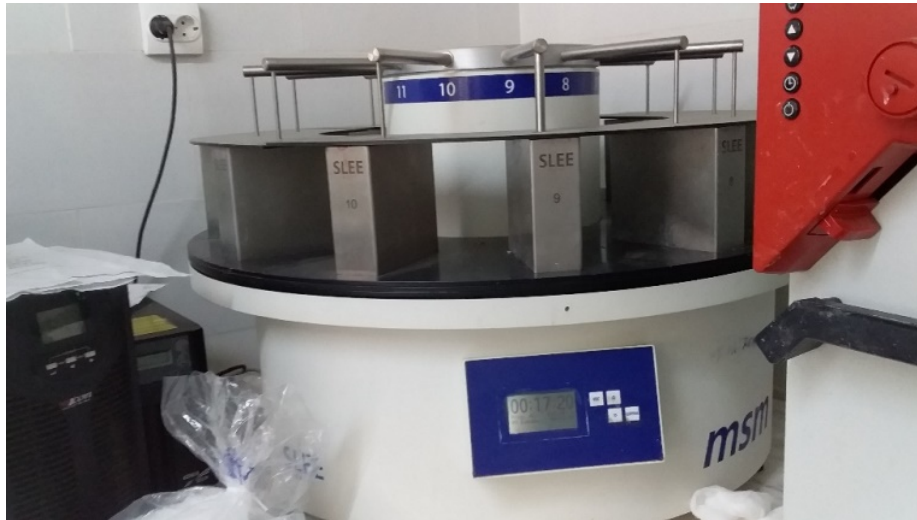


Figure 2.6. Automate de coloration.

— Montage et observation

Le montage est l'opération qui consiste à fixer, à l'aide d'une substance appropriée (Eukit) au colorant utilisé une lamelle de verre sur l'échantillon histologique, cette étape a comme but de protéger les coupes contre la dégradation chimique des colorants qui s'oxydent facilement à l'air libre.

a



b



Figure 2.7 : (a) station du montage (b) microscope photonique.

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 (Beutraït, 2008).

Le principe général est, considérant une cible de géométrie donnée, d'essayer de placer le ligand en interaction avec la protéine de la façon la plus favorable possible.

Lors du docking, la protéine cible est généralement figée alors qu'une certaine flexibilité est attribuée au ligand (angle de torsion). Il existe de nombreux logiciels de docking, qu'on peut répartir en deux catégories selon la méthode utilisée : la simulation de trajectoire et l'ajustement de fragments.

Préparation de la protéine

Téléchargement des enzymes à partir de la base de données Protein Data Bank (**Figure 2.8**).

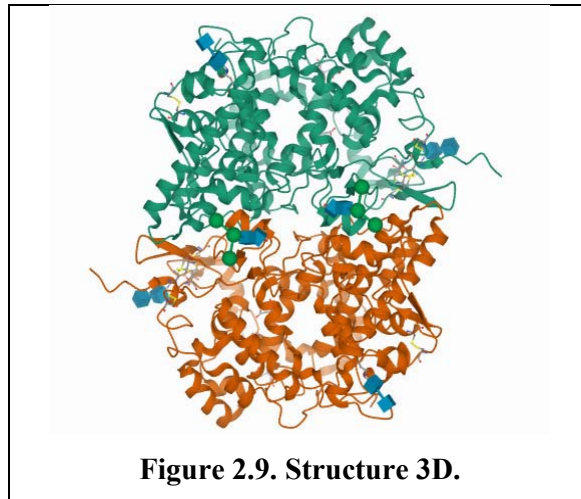
- α -Glucosidase (ID 3WY1) : La structure tridimensionnelle (structure 3D) de L'enzyme essentiellement déterminées par diffraction en rayon X avec une résolution 2,15 Å. Ce récepteur de Poids total : 123,08 kDa , protéine avec résidus : 1070, et 9281 atomes.(figure)



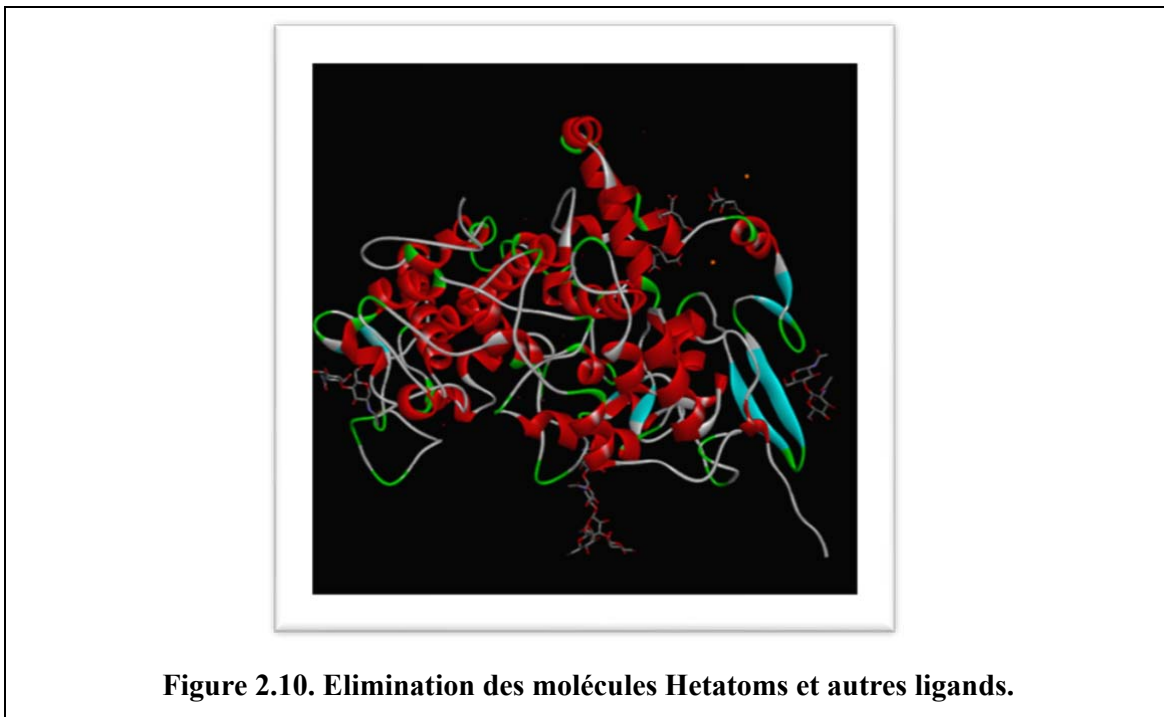
The image shows a screenshot of the RCSB Protein Data Bank (PDB) website. The search bar contains the query 'cox-1'. The search results page displays a list of structures, with the first one highlighted: 6Y3C, Human COX-1 Crystal Structure. The structure is shown as a 3D ribbon model. The page also includes a search query builder, a list of refinements, and a table of metadata for the selected structure.

Property	Value
Released	2020-02-26
Method	X-RAY DIFFRACTION 3.361 Å
Organisms	Homo sapiens

Figure 2.8. Téléchargement de la protéine.



- Simplification des deux chaînes et élimination des molécules H₂O et Hetatms (**Figure 2.10**).
- Elimination des inhibiteurs de l'enzyme.



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.

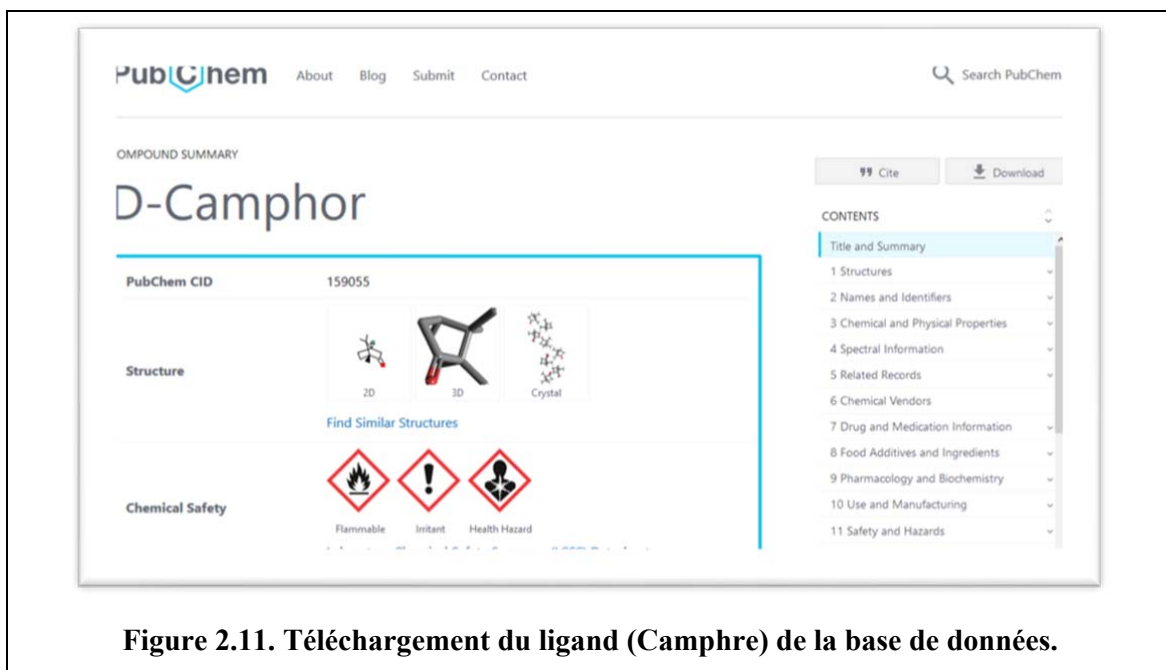


Figure 2.11. Téléchargement du ligand (Camphre) de la base de données.

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

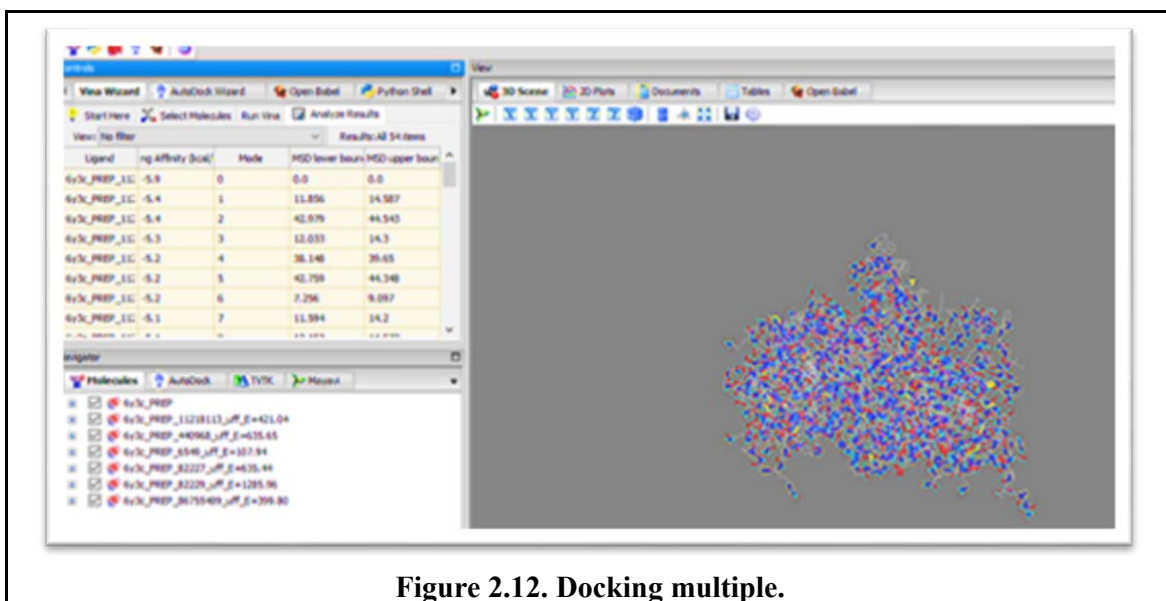


Figure 2.12. Docking multiple.

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

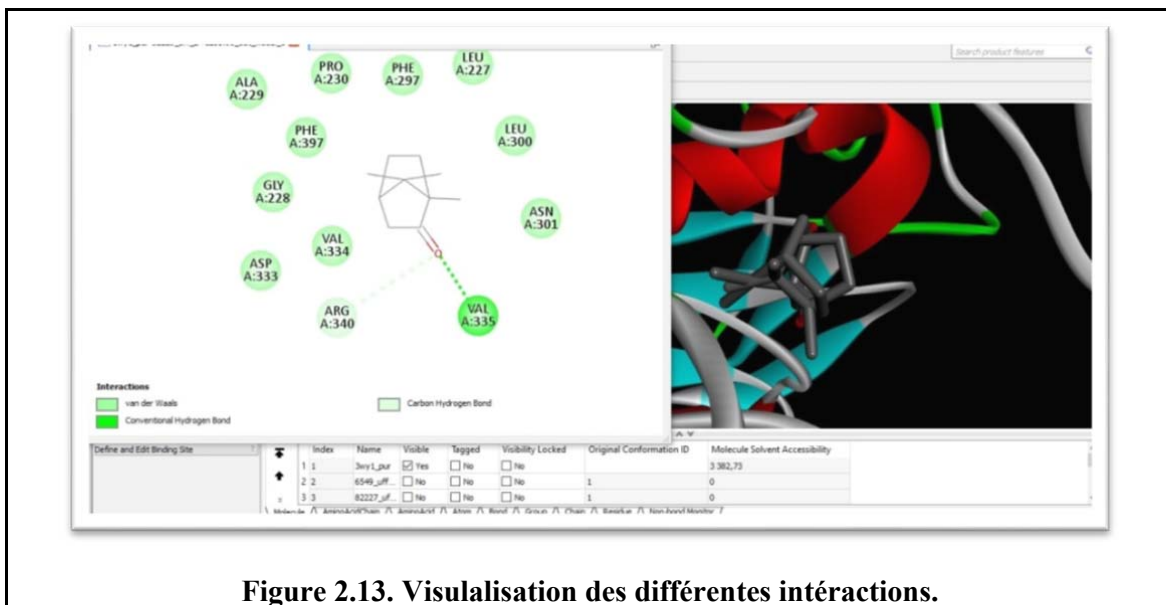


Figure 2.13. Visualisation des différentes interactions.

Chapitre III

RESULTATS & DISCUSSION

Chapitre 3 = RESULTATS & DISCUSSION

3.1. Activité antimicrobienne de l'HE

L'activité antimicrobienne de l'HE a été réalisée, *in vitro*, par 3 méthodes différentes (aromatogramme, micro atmosphère et détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé), a été réalisée sur des souches microbiennes, de référence. L'estimation de l'activité antibactérienne des HE est basée sur une échelle de mesure mise en place par **Meena et Sethi (1994) et Ela et al. (1996)**. Ces derniers ont classé le pouvoir antibactérien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne, en 04 classes :

1. Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 28 mm ;
2. Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone varie entre 16 et 28 mm ;
3. Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone varie entre 10 et 16 mm ;
4. Non inhibitrice lorsque le diamètre d'inhibition est inférieur à 10 mm.

3.1.1. Technique d'Aromatogramme

Concernant les résultats obtenus *in vitro* en aromatogramme, il apparaît que toutes les micro-organismes sont sensibles à l'action inhibitrice de la phase liquide de l'HE.

Selon l'échelle de mesure mise en place par **Meena et Sethi (1994) et Ela et al. (1996)**, il apparaît que l'HE est fortement inhibitrice avec DZI varient dans les trois doses de l'HE. L'HE est modérément inhibitrice contre *S. aureus* où les DZI varient pour toutes les quantités de l'HE alors qu'elle légèrement inhibitrice sur les trois souches bactériennes ; *E. coli*, et *P. aeruginosa* dont les DZI varient qui ont manifesté une sensibilité faible, en comparaison avec les autres espèces.

Concernant les témoins positifs (disques ATB), les DZI varient selon les espèces. L'activité bactériostatique apparaît inférieure à celle de l'ATB.

L'HE a une très forte action inhibitrice sur *B. subtilis* et *S. aureus* qui sont des bactéries à Gram + semble très sensible que les bactéries à Gram négative. En fait ces dernières possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne (Nikaido, 1996 ; Tepe, 2005 ; Gille, 2010).

En fait, les Gram- possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne. Chez les bactéries à Gram+, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polysidiques (acides lipoteichoïques et acides teichoïques).

Toujours en aromagramme et concernant les souches fongiques, de meilleurs résultats ont été obtenus et une sensibilité élevée a été révéler de l'activité antifongique de l'HE. *C. albicans* et *P. aeruginosa* sont plus sensibles avec DZI, ces résultats sont très prometteurs pour une éventuelle utilisation des essences en aromathérapie anti-infectieuse.

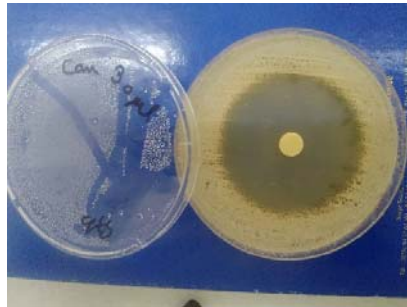
De nombreux articles ont confirmé l'e et antifongique des HE et/ou des extraits de différentes variétés du genre riches en alcools monoterpéniques et/ou en phénols volatils.

L'HE seul ou dans une formulation contenant du du terpinéol était fortement actif contre diverses espèces de champignons et souches de Candida.

Cette étude a conclu que l'HE et ses principaux composants peuvent être une nouvelle bio-ressource pour commercialiser diverses espèces pour des produits antimicrobiens spécifiques afin de gérer les maladies pathogènes humaines.



E. coli (30 µl)



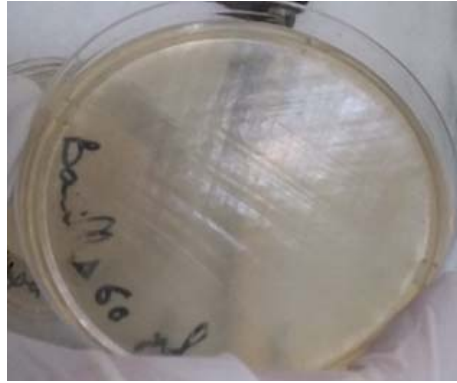
C. albicans (30 µl)

Figure 3.1. Diamètre des zones d'inhibition (Aromatogramme) sur les espèces microbiennes.

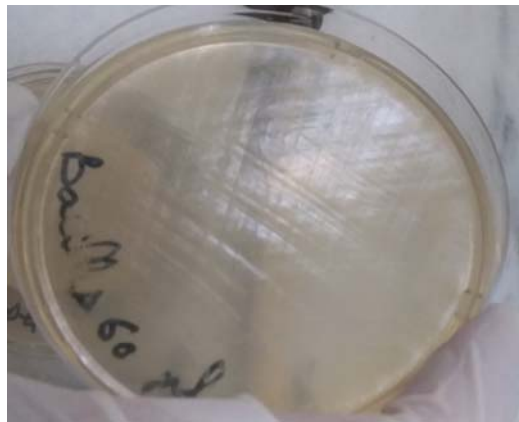
3.1.2. Technique de Microatmosphère

En comparaison entre les deux phases liquide et vapeur il apparaît clairement que cette dernière a une action importante par rapport au première pour toutes les espèces. A la lecture de la littérature scientifique, il apparaît que la microatmosphère est très peu documentée.

En effet, rares sont les articles qui traitent de cette méthode. Les études réalisées par **Tyagi et Malik. (2011 ; 2013)** ont mis en exergue la supériorité de l'action inhibitrice de la phase vapeur par rapport à la phase liquide. Ceci a été confirmé notamment sur les Gram+ et les souches fongiques.



B. subtilis (60µl)



B. subtilis (60µl)



C. albicans (60µl)

3.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoires de l'huile essentielle *in vivo*

Afin de confirmer l'évaluation macroscopique, à échelle cellulaire, nous avons réalisé des coupes histopathologiques au niveau du colon par la technique de coloration Hématoxyline-Eosine. Les observations, réalisées par microscopie photonique, sont illustrées dans la figure

Pour le témoin sain, pas d'inflammation une paroi colique bien différenciée ; faite d'une muqueuse tapissée d'un épithélium cylindrique au noyau régulier surmontant une lamina propia contenant des glandes (cryptes) régulièrement espacées, faite de cellules caliciformes à pole apical ouvert.

Des études antérieures ont montré que la surproduction de médiateurs inflammatoires à partir des macrophages, tels que les cytokines pro-inflammatoires et les métabolites réactifs de l'oxygène (par exemple, NO), est principalement impliquée dans la réaction en cascade de l'inflammation et les dommages ultérieurs.

Les macrophages sécrètent le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β , qui sont considérés comme des médiateurs inflammatoires cruciaux. Dans la muqueuse des patients atteints, leurs taux sont nettement augmentés.

Les résultats ont démontré inhibait la production de médiateurs pro-inflammatoires dans le côlon des souris atteintes, ainsi que dans les macrophages stimulés par le LPS.

Des études antérieures ont montré que le stress oxydatif maintenait la réponse inflammatoire active dans la muqueuse.

Les résultats montrent que a supprimé de manière significative le stress oxydatif induit par le DSS. Les LPS sont reconnus par les macrophages muqueux. Ensuite, les macrophages ont une capacité élevée à produire du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β , provoquant l'activation de NF- κ B.

Par conséquent, il est supposé que l'effet anti-inflammatoire était dû à la suppression de la voie NF- κ B, régulant l'expression de nombreux facteurs inflammatoires.

Réguler les transcriptions d'un grand nombre de gènes cibles, comme les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6 et IL-1 β).

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

3.3.1. Énergie d'interaction et affinité

Pour identifier les interactions entre les composés et les cibles thérapeutiques, il a fallu identifier les acides aminés qui constituent le site catalytique des enzymes.

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'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.

3.3.2. Interactions ligands-site catalytique de l'enzyme

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.

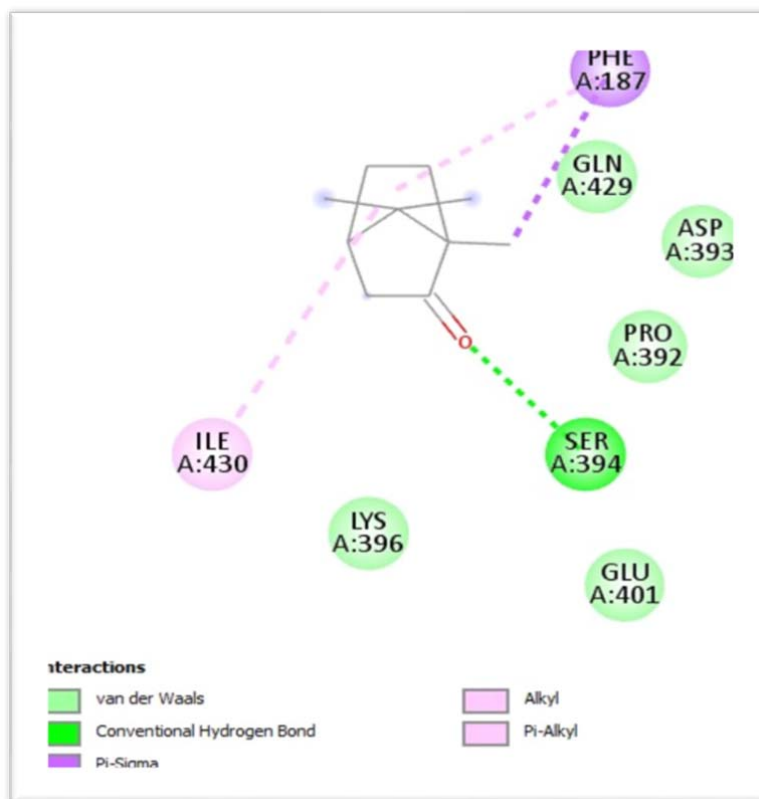


Figure 3.7. Illustration 2D des différentes interactions entre le Ligand et le site catalytique.

CONCLUSION

Les patients atteints sont parmi les plus grands consommateurs de thérapies complémentaires et alternatives. C'est dans la pharmacopée traditionnelle, principalement la phyto-aromathérapie, que réside peut-être une solution à cette problématique.

Plusieurs travaux scientifiques et essais cliniques ont montré les effets protecteurs des fines herbes et certaines plantes aromatiques et médicinales, ainsi que le bien-fondé de leur utilisation, en complément des traitements conventionnels.

Cette étude a été réalisée afin de mieux cerner les propriétés anti-inflammatoires de l'huile essentielle sur le développement d'une inflammation chez les souris.

De même, le pouvoir antimicrobien de l'huile aromatique a été exploré *in vitro* sur plusieurs souches microbiennes par différentes techniques. Le screening antimicrobien de l'huile a montré son efficacité dans l'inhibition de la croissance de toutes les souches microbiennes.

De meilleurs résultats ont été obtenus en microatmosphère où une inhibition quasi-totale a été constatée avec les souches fongiques.

Le volet bio-informatique ne sera pas délaissé puisque nous avons mené une étude des propriétés anti-inflammatoires des molécules caractéristiques via l'inhibition des récepteurs enzymatiques, une enzyme impliquée dans le processus inflammatoire.

Comme perspectives, une étude suivie par une exploration des voies de signalisation impliquées pourraient permettre de mieux comprendre le mécanisme d'action protecteur de cette essence aromatique. De plus, il serait intéressant d'évaluer aussi l'effet d'une consommation quotidienne d'huile sur d'autres marqueurs de l'inflammation (activité myéloperoxydase, cytokines) et du stress oxydant (peroxydation lipidique, glutathion, défenses antioxydantes enzymatiques).

En outre, les cellules immunitaires peuvent être identifiées dans le sang ainsi que dans les structures lymphoïdes secondaires par cytométrie en flux. D'autres investigations seront nécessaires pour explorer la toxicité et le mécanisme d'action de cette huile aromatique et de ses composés terpéniques.

Références Bibliographiques

1. AFNOR (Association Française de Normalisation), 2000. Recueil des normes française “ huiles essentielles”. Monographies relatives aux huiles essentielles. AFNOR, Paris.
2. Ali, B., Al-Wabel, N. A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S. A., & Anwar, F. (2015). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(8), 601-611.
3. Andrade, L. N., Dos Reis Barreto de Oliveira, R., & De Sousa, D. P. (2014). A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. *Molecules*, 19(2), 1459-1480.
4. Aydin, Y., Kutlay, O., Ari, S., Duman, S., Uzuner, K., & Aydin, S. (2007). Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta Medica*, 73(13), 1365-1371.
5. Baudoux D, Zhiri A. 2009. Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies, Edition Inspir Development.
6. Caverzan J., L. Mussi, B. Sufi, et al., A new phytocosmetic preparation stimulates adipogenesis and controls skin aging process: in vitro studies and topical effects in a double-blind placebo-controlled clinical, *J. Cosmet.*
7. chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie*, 51, 993 – 995.
8. Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils’ chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines*, 3(4), 25.
9. Farrell K.T, 1998, *Spices*, condiment and seasonings. 2 ème édition, Springer Science & Business Media, 414p
10. Farzaei, M. H., Bahramsoltani, R., Abdolghaffari, A. H., Sodagari, H. R., Esfahani, S. A., & Rezaei, N. (2016). A mechanistic review on plant-derived natural compounds as dietary supplements for prevention of inflammatory. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 10(6), 745-758.
11. Gilles, M., Zhao, J., An, M., & Agboola, S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. *Food Chemistry*, 119(2), 731- 737.

12. Gogoi, R., Sarma, N., Loying, R., Pandey, S. K., Begum, T., & Lal, M. (2021). A Comparative Analysis of Bark and Leaf Essential Oil and their Chemical Composition, Antioxidant, Anti-inflammatory, Antimicrobial Activities and Genotoxicity of North East Indian *Cinnamomum zeylanicum* Blume. *The Natural Products Journal*, 11(1), 74-84.
13. Horváth, G., & Ács, K. (2015). Essential oils in the treatment of respiratory tract diseases highlighting their role in bacterial infections and their anti-inflammatory action: a review. *Flavour and Fragrance Journal*, 30(5), 331-341.
14. Laird K., Phillips C., “Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?,” *Letters in Applied Microbiology*, vol. 54, no. 3, pp. 169-174, 2012.
15. Lorenzo-Leal, A. C., Palou, E., López-Malo, A., & Bach, H. (2019). Antimicrobial, cytotoxic, and anti-inflammatory activities of *Pimenta dioica* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *BioMed research international*, 2019.
16. Magyar, J., Szentandrassy, N., Bányász, T., Fülöp, L., Varró, A., & Nánási, P. P. (2004). Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *European Journal of Pharmacology*, 487(1-3), 29-36.
17. Martoja, R., Martoja-Pierson, M., & Grassé, P. P. (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale* (Vol. 345). Masson, Paris, France.
18. Meena M.R. et Sethi V., (1994). Antimicrobial activity of the essential oils from spices.
19. Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.
20. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). *Methods for dilution susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. In: *Approved standard M7-A5*. Fourth Edition. Villanova, Pa: NCCLS; 2000;
21. Nikaido H. (1996). Outer membrane. In: F. C. Neidhardt, (Ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology* (Vol. 1, pp. 29–47). Washington, DC: ASM Press
22. Pibiri M. C., Goel A., N., Roulet C. A., “Indoor air purification and ventilation systems sanitation with essential oils,” *International Journal of Aromatherapy*, vol. 16, no. 3, pp. 149-153, 2006.
23. Pibiri, M. C. (2005). *Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles*. Thèse de Doctorat en Sciences, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse (No. oai: infoscience. epfl. ch: thesis-3311).

24. Poirot, T. (2016). Bon usage des huiles essentielles, effets indésirables et toxicologie. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine, France.
25. 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.
26. Tsai, M. L., Lin, C. C., Lin, W. C., & Yang, C. H. (2011). Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1108312632-1108312632.
27. Tyagi, A. K., & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126(1), 228-235.
28. Tyagi, A. K., Gottardi, D., Malik, A., & Guerzoni, M. E. (2013). Anti-yeast activity of mentha oil and vapours through in vitro and in vivo (real fruit juices) assays. *Food chemistry*, 134(15), 1-4.
29. Vázquez-Fresno, R., Rosana, A. R. R., Sajed, T., Onookome-Okome, T., Wishart, N. A., & Wishart, D. S. (2019). Herbs and Spices- Biomarkers of Intake Based on Human Intervention Studies – A Systematic Review. *Genes & Nutrition*, 14(1).
30. Xiang, H., Zhang, L., Yang, Z., Chen, F., Zheng, X., & Liu, X. (2017). Chemical compositions, antioxidative, antimicrobial, anti-inflammatory and antitumor activities of *Curcuma aromatica* Salisb. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 108, 6-16.
31. Zaika, L. L. (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9(2), 97-118.