

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agro – vétérinaire et Biologiques

Département de Biologie

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Biotechnologies Végétales

EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES CHEZ LAURUS NOBILIS.

Par

MILIANI Asmaa

Devant le jury composé de :

M-S. HAMAI. DI.	Maître de conférences A, USD de Blida	Président
A .BERBER.	Maître de conférences A, USD de Blida	Examineur
S. MEGATLI.	Maître de conférences B, USD de Blida	Examineur
F. SAIDI.	Professeur, USD de Blida	Rapporteur
L. SAADI.	Maître assistante A, USD de Blida	Co-promoteur

Blida, Juin 2012

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail :

A ma très chère mère Fadila

Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers toi.

A la mémoire de mon père Abd El Kader

Le destin ne nous a pas laissé le temps pour jouir ce bonheur ensemble et de t'exprimer l'immense amour que je vous porte.

Puisse Dieu tout puissant vous accorder sa clémence, sa miséricorde et vous accueillir dans son saint paradis....

A toute ma famille

Avec toute mon estime, affection et respect, je vous souhaite santé, bonheur et prospérité.

A Tous mes Amis

Veillez accepter l'expression de mon amour, ma gratitude pour votre amitié, compréhension et encouragements.

Je vous souhaite beaucoup de réussite, de bonheur et prospérité.

A tous ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer.

A Tous Mes enseignants tout au long de mes études.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à Mme SAIDI Fairouz, Professeur à la faculté de Biologie, Université de Blida pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'accordé m'ont permet de réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer également toute ma gratitude à Mme SAADI Leila, Maître de conférences au département de Biologie de l'Université de Blida pour sa disponibilité et ses conseils précieux et leurs soutiens.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr HAMAIDI.M-S, Maître de conférences au département de Biologie de l'Université de Blida d'avoir accepté de présider le jury.

J'exprime mes vifs remerciements à Mr MEGATLI.S, Maître de conférences au département d'Agronomie et Mr BERBER Maître de conférences au département de Vétérinaire pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Mes vifs remerciements vont à tout le personnel du GROUPE SAIDAL d'El-Harrach et en particulier à Mmes Menana, Malika, Thoraya, Fizia, Linda, Tribache, Latifa et Mrs Moussa ,Yahia pour toute l'aide qu'ils m'ont donnée.

Mes sentiments de reconnaissances et mes remerciements vont également a l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Je ne saurais remercier ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour la réalisation de ce travail sans citer les noms en particulier, M Saida, Mme Fadila ,M Habiba ,M Maimoune Habiba et M Zineb.

Je tiens à remercier infiniment Mr Abou chabana Nabil pour son soutien et son aide précieuse, je lui souhaite une longue et brillante carrière de chercheur.

Je ne voudrais pas oublier de remercier mes amis pour les innombrables moments forts que nous avons vécus ensemble, aux étudiants des 3 promotions de biotechnologies végétales.

RESUME

Afin de contribuer à la valorisation de la flore Algérienne, nous avons mené une étude qui consiste à extraire, caractériser et identifier la fraction aromatique et quelques métabolites secondaires de *Laurus nobilis* et sur l'étude de l'effet biologiques et pharmacologiques.

Laurus nobilis .L, est une plante appartenant à la famille des Lauracées. Elle pousse dans la région montagneuse de Blida (Chrèa).

L'extraction de la fraction aromatique (huile essentielle et hydrolat) de feuilles fraîches du *Laurus nobilis* a été accomplie par hydrodistillation. Le rendement en huile essentielle est de 0.6%. la fraction aromatique dissoute dans l'hydrolat (4.2mg/ml) a été récupérée par condensation de l'eau aromatique avec un solvant organique.

L'huile essentielle et l'hydrolat se sont analysés par GC/MS. Selon le profil chromatographique de l'huile essentielle et l'hydrolat, notre étude nous permettra d'aboutir que ces deux extraits sont composés essentiellement par des monoterpènes et des dérivés phénylpropaniques. L'oxyde terpénique (1.8 cineole) apparait comme le composé majoritaire de l'huile essentielle et de l'hydrolat dont la teneur indicative est 20.66% et 14.51% respectivement.

Le screening phytochimique effectuées sur la poudre et l'infusé des feuilles de *Laurus nobilis* ont révélé la présence de polyphénols tels que les flavonols, flavanols, tanins catéchiques, d'alcaloïdes, de saponosides, de mucilage, de stérols et tritèrènes.

Différentes classes de composés ont été identifiées dans l'extrait méthanolique par chromatographie sur couche mince suivi des méthodes colorimétriques : les flavonoïdes, les tanins, les coumarines.

L'étude antimicrobienne de l'huile essentielle a révélé une grande action inhibitrice sur la croissance des souches pathogènes testées. Cependant ; L'extrait méthanolique présente une activité inhibitrice uniquement sur *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 29 mm.

Les tests antimicrobiens menés sur l'infusion (10%) et l'hydrolat se sont révélés négatives ; ces produits n'ont donc aucun effet antimicrobien.

In vitro l'extrait méthanolique a présenté de fortes propriétés de piéger les molécules de radical libre DPPH en comparaison avec l'huile essentielle, l'hydrolat et les antioxydants de références.

L'infusion et l'hydrolat de *Laurus nobilis* ne présente aucune toxicité aigue même après deux semaines d'observation, tandis que l'huile essentielle administré par voie orale est modérément toxique dont la DL50 est de 902.50 mg/kg.

Il est clairement mis en évidence que les différents extraits issus de *Laurus nobilis* contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles auxquelles on attribue un pouvoir anti-inflammatoire, antalgique, diurétique et sédatif.

Mots clés : *Laurus nobilis*.L ; métabolite secondaire ; huile essentielle ; hydrolat ; *Staphylococcus aureus* ; teste antimicrobiens ; antioxydants ; toxicité ; anti-inflammatoire ; antalgique ; diurétique ; sédatif.

ABSTRACT

To contribute to the enhancement of the flora of Algeria, we led a study which consisted of extracting, characterizing and identifying the aromatic fraction and some secondary metabolites of *Laurus nobilis*, also we focus in this study on the biological and pharmacological effect.

Laurus nobilis. L is an aromatic plant belonging to the family of Lauraceae. It grows in the mountainous region of Blida (Chr ea).

The extraction of the aromatic fraction from fresh leaves (essential oil, hydrosol) of *Laurus nobilis* was accomplished by hydrodistillation. The essential oil yield is 0.6 %. The dissolved aromatic fraction in the hydrosol (4.2mg / ml) this was achieved by condensation of the aromatic water with an organic solvent.

The essential oil and the hydrosol were analyzed by GC/MS. According to the chromatographic profile of the essential oil and the hydrosol, our study will allow us to confirm that these two extracts consist essentially of monoterpenes and phenylpropane derivatives. The Terpene oxide (1.8 cineole) appears as the major component of the essential oil and the hydrosol, the indicative content of which is 20.66 % and 14.51 % respectively.

The photochemical screening performed on the powder and infused with leaves of *Laurus nobilis* revealed the presence of polyphenols such as flavonols, flavanols, tannins cat chic , alkaloids, saponins , mucilage, sterols and triterpenes.

Various classes of compounds were identified in the extract methanol by thin layer chromatography followed by colorimetric methods: flavonoids, tannins, coumarins.

The antimicrobial study of essential oil revealed an inhibitive action on the growth of the tested pathogenic strains. However, the extract methanol presents

an inhibitive activity only against *Staphylococcus aureus* with a zone of 29 mm inhibition.

The antimicrobial tests led on the infusion (10%) and hydrosol was negative, these products therefore have no antimicrobial effect.

In vitro, the methanolic extract presented strong properties to trap the molecule of free radical DPPH in comparison with the essential oil, hydrosol and synthetic antioxidant .

The infused and the hydrosol of *Laurus nobilis* presents no toxicity after two weeks of observation, whereas the essential oil taken orally is moderately toxic with LD50 902.50 mg/kg .

It is clearly demonstrated that the various extracts from *Laurus nobilis* contain a variety of phenolic compounds and some essential oils which we attribute as anti-inflammatory, analgesic, diuretic and sedative capacities.

Keywords: *Laurus nobilis*.L; secondary metabolite, essential oil, hydrosol, *Staphylococcus aureus*; antimicrobial test ; antioxidants; toxicity, anti-inflammatory, analgesic, diuretic, sedative .

ملخص

تعتبر نبتة الغار المعروفة بالبرند *nobilis Laurus* من بين النباتات العطرية الأكثر انتشارا في الجزائر ، و لتعزيز استخدام مركباتها في الصناعة الصيدلانية وإنتاج الأدوية الطبيعية، تمحور عملنا حول استخلاص وصف وتحديد المركبات الثانوية الفعالة لهذه النبتة ودراسة تأثيرها البيولوجي والصيدلاني .

تم استخلاص الزيوت العطرية للأوراق بواسطة طريقة التقطير المائي حيث بلغ مردود العملية 0.6% , أما بالنسبة للماء العطري الناتج عن تلك العملية فقد تم تكثيفه بواسطة محلول عضوي من اجل استخراج الزيوت المنحلة فيه والتي قدرت كميتها ب 2.4mg \ml

إن التحاليل الفيزيوكيميائية للزيوت الأساسية فقد جاءت مطابقة للمعايير الدولية المعمول بها في حين أن التحليل الكروماتوغرافي المر فوق بطيف الكتلة سمح لنا بالتعرف على أن 1.8 cineole هو المكون الأساسي لكل من الزيت والماء العطري بنسبة تقدر ب 20.66% و 14.51% على التوالي .

أما الفحص الكيميائي لمسحوق ومنقوع الأوراق مكننا من التعرف على أهم المركبات الثانوية الفعالة للنبتة وهي (ponosidessa ،alcaloïdes ، tanins cetaceuqih·flavanols·flavonols)polyphénols

flavonoïdes, إن التحليل الكروماتوغرافي اللوني للمستخلص الميثانولي للنبتة كشف عن وجود كل من المركبات الثانوية الآتية: (tanins, coumarines)

بينت الدراسة الميكروبيولوجية للجزء العطري عن فعالية هذا الأخير في تثبيط نمو الجراثيم أما بالنسبة للمستخلص الميثانولي للنبتة فقد بين فعاليتها فقط في تثبيط نمو *ollyhpatSuccocs aureus*. إن منقوع النبتة (10 %) والماء العطري لا يظهران أي فعالية ضد الجراثيم المقترحة.

من جهة أخرى أبدى المستخلص الميثانولي فعالية جيدة كمضاد للأكسدة مقارنة بالزيت الأساسي والماء العطري والمؤكسدات الشاهدة.

إن الماء العطري ومنقوع النبتة لا يظران أي صفة سمية حادة حتى بعد أسبوعين من الملاحظة أما بالنسبة للزيت الأساسي فقد بين انه معتدل السمية ب DL 50 تساوي 902.50mg /Kg وذلك بعد أسبوعين من الملاحظة.

لقد تم إثبات أن مختلف المستخلصات الناتجة عن نبتة *Laurus nobilis* أبدت فعالية جيدة لكن بدرجات متفاوتة ضد الالتهاب والآلام وكذلك أثبتت على قدرتها المهدئة والمدرة للبول.

الكلمات المفتاح

nobilis Laurus ، الزيوت الأساسية ، الماء العطر ، المركبات الثانوية ، مضاد الجراثيم مضاد للأكسدة ، مضاد للالتهاب ، مضاد للألم ، مدر للبول ، مهدئ

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	
RESUME	
ABSTRACT	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAU	
INTRODUCTION.....	18
Chapitre 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	20
1.1. Les plantes médicinales	20
1.1.1. Histoire de la phytothérapie.....	20
1.1.2. Définition de la phytothérapie.....	22
1.1.3. Les principes actifs des plantes médicinales.....	22
1.1.4. Récolte, séchage et conservation des plantes médicinales.....	25
1.1.4.1. Récolte.....	25
1.1.4.2. Dessiccation ou séchage.....	25
1.1.4.3. Conservation et stockage.....	26
1.1.5. Divers mode de préparation des plantes.....	26
1.2. L'aromathérapie.....	27
1.2.1. Définition de l'aromathérapie.....	27
1.2.2. Définition des huiles essentielles.....	28
1.2.3. Formation des huiles essentielles.....	28
1.2.4. Rôle des huiles essentielles chez les plantes.....	29
1.2.5. Composition chimique des huiles essentielles.....	29
1.3. Hydrolathérapie.....	30
1.3.1. Définition de l'hydrolathérapie.....	30
1.3.2. Définition de l'hydrolat.....	30

1.3.3. Composition des hydrolats.....	31
1.4. Laurier noble	31
1.4.1. Laurier noble dans l'histoire.....	31
1.4.2. Origine et distribution de la plante.....	31
1.4.3. Description botanique de la plante.....	32
1.4.4. Place dans la systématique.....	33
1.4.5. Synonymes botanique.....	33
1.4.6. Composition chimique.....	34
1.4.7. Utilisation des feuilles de <i>Laurus nobilis</i>	35
1.4.8. Propriétés pharmacologiques et recherches en cours.....	36
1.4.8.1. Effets antioxydants.....	36
1.4.8. 2. Effet anticonvulsive.....	37
1.4.8. 3. Effet cytotoxique.....	38
1.4.8. 4. Effet fumigènes et insecticide.....	38
1.4.8. 5. Effet hypoglycémiant.....	39
1.4.8. 6. Effet gastroprotectif.....	39
1.4.8. 7. Effet mollucidal.....	40
1.4.8. 8. Effet inhibiteur d'absorption d'alcool.....	40
1.4.8. 9. Effet curatif de blessures.....	40
1.4.8. 10. Effet inhibiteur d'enzyme.....	41
1.4.8. 11. Effet inhibiteur de la nitration.....	41
1.4.8. 12. Effet antimicrobien.....	41
Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES.....	44
2.1. Matériels.....	44
2.1.1. Matériel biologique.....	44
2.1.1.1. Matériel végétal.....	44
2.1.1.2 Matériel animal.....	44
2.1.1.3 Matériel bactériologique.....	45
2.2. Méthodes.....	45
2.2.1. Identification botanique de la plante.....	46
2.2.1.1. Aspect macroscopique.....	46
2.2.1.2.Aspect microscopique.....	46
2.2.1.3. Technique histologique pour la localisation des lieux de sécrétion de la plante.....	46

2.2.2. Détermination du taux d'humidité.....	51
2.2.3. Etude des composés volatiles.....	52
2.2.3.1. Cinétique d'extraction.....	52
2.2.3.2.. Extraction par hydrodistillation.....	53
2.2.3.3. Les analyses physico-chimiques, organoleptiques et chromatographiques de l'huile essentielle.....	55
2.2.4. Etude des composés non volatils polaires et non polaires.....	59
2.2.4.1. Extraction au soxhlet.....	60
2.2.4.2. Analyse de la fraction méthanolique par CCM.....	61
2.2.4.3. Etude phytochimique de l'infusé de <i>Laurus nobilis</i>	62
2.2.5. Etude de l'activité antimicrobienne de <i>Laurus nobilis</i>	64
2.2.5.1. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne.....	65
2.2.5.2. Etude quantitative de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle.....	67
2.2.6. Evaluation de l'activité antioxydante.....	69
2.2.7. Etude de la toxicité de <i>Laurus nobilis</i>	70
2.2.8. Activité anti-inflammatoire.....	73
2.2.9. Activité antalgique (Writhing test).....	75
2.2.10. Activité diurétique.....	77
2.2.11. Activité sédative.....	79
2.2.12. Etude statistique.....	80
Chapitre 3: RESULTAT ET DISCUSSION.....	81
3.1. Résultats de l'étude botanique de la plante.....	81
3.1.1. Etude macroscopique.....	81
3.1.1.1. Feuilles.....	81
3.1.1.2. Fleurs.....	84
3.1.1.3. Fruit.....	88
3.1.2. Etude microscopique.....	91
3.1.2.1. Feuille.....	91
3.1.2.2. Pétiole.....	95
3.2. Détermination du taux d'humidité.....	98
3.3. Etude des composés volatils.....	99
3.3.1. Etude de la cinétique d'extraction.....	99
3.3.2. Extraction et rendement en huile essentielle.....	100
3.3.3 Extraction de l'huile essentielle dissoute dans l'hydrolat.....	100

3.3.4. Caractéristiques organoleptiques.....	101
3.3.5. Caractéristiques physico-chimiques.....	101
3.3.6. Analyse chromatographique de la fraction aromatique.....	102
3.3.6.1. Composition chimique de l'huile essentielle.....	102
3.3.6.2. Composition chimique de l'hydrolat.....	106
3.4. Etude des composés non volatiles.....	107
3.4.1. Résultat de l'extraction au soxhlet.....	107
3.4.2. Analyse de la fraction méthanolique par CCM.....	108
3.4.3. Screening phytochimique.....	110
3.5. Etude de l'activité antimicrobienne de <i>Laurus nobilis</i>	111
3.5.1. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne.....	111
3.5.2. Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne.....	123
3.6. Activité antioxydante DPPH.....	133
3.6.1 Activité antioxydante de l'huile essentielle et de l'hydrolat.....	133
3.6.2. Activité antioxydante de l'extrait méthanolique.....	135
3.7. Etude de la toxicité.....	137
3.8. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	138
3.9. Evaluation de l'activité antalgique.....	140
3.10. Evaluation de l'activité diurétique.....	143
3.11. Evaluation de l'activité sédative.....	144
CONCLUSION.....	147

REFERENCES

APPENDICES

GLOSSAIRE

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : les sites sécréteurs.	28
Figure 2.1 : Souris NMRI.	45
Figure 2.2 : Rat WISTAR.	45
Figure 3.1 : Feuille juvénile.	81
Figure 3.2 : Face supérieur d'une feuille juvénile (Loupe G×4.5).	81
Figure 3.3 : Face inférieure d'une feuille juvénile (loupe G× 4.5).	82
Figure 3.4 : Face supérieur d'une feuille adulte.	82
Figure 3.5 : Face inférieure d'une feuille adulte.	82
Figure 3.6 : Face supérieure d'une feuille adulte (Loupe G×4.5).	82
Figure 3.7 : Face supérieure d'une feuille adulte (MP×40).	83
Figure 3.8 : Fleurs sous forme d'ombelles enfermées dans un involucre.	83
Figure 3.9 : Fleurs femelles.	84
Figure 3.10 : Fleurs mâles.	84
Figure 3.11 : Fleurs mâles (loupe G×4.5).	85
Figure 3.12 : Etamine isolé (loupe G×4.5)	85
Figure 3.13 : Glande nectarifère (loupe G×4.5).	86
Figure 3.14 : Fleur femelle (loupe G×4.5).	86
Figure 3.15 : Organe femelle isolé (loupe G×4.5).	87
Figure 3.16 : Staminode (loupe G×4.5).	87
Figure 3.17: Baies verdâtre immatures.	88
Figure 3.18 : Baies noirâtre matures.	89
Figure 3.19 : Les différents constituants de la baie.	
Figure 3.20 : Les différents constituants isolée de la baie	
Figure 3.21 : La graine.	
Figure 3.22 : Coupe transversale dans le limbe de la feuille de <i>Laurus nobilis</i> (MP G×40).	89
Figure 3.23 : Coupe transversale dans une portion du limbe de la feuille de <i>Laurus nobilis</i> (MP G×60).	90
Figure 3.24 : Coupe transversale dans le limbe de la feuille de <i>Laurus nobilis</i> (G×60).	91
	92

Figure 3.25 : Coupe transversale dans le limbe de la feuille de <i>Laurus nobilis</i> (MP G×40).	93
Figure 3.26 : Coupe transversale dans le limbe de la feuille de <i>Laurus nobilis</i> (MP G×60).	93
Figure 3.27 : Coupe transversale dans le limbe de la feuille de <i>Laurus nobilis</i> (MP G×60).	94
Figure 3.28 : Coupe transversale du pétiole de <i>Laurus nobilis</i> (MP G×10).	95
Figure 3.29 : Coupe transversale du pétiole de <i>Laurus nobilis</i> (MP G×60).	95
Figure 3.30 : Coupe transversale du pétiole de <i>Laurus nobilis</i> (MP G×40).	96
Figure 3.31 : Coupe transversale du pétiole de <i>Laurus nobilis</i> (MP G×60).	96
Figure 3.32 : Taux d'humidité par rapport à la masse de la matière végétale fraîche.	97
Figure 3.33 : Cinétique d'extraction des huiles essentielles lors de l'hydrodistillation.	98
Figure 3.34 : Teneur de <i>Laurus nobilis</i> en substances polaires, apolaires et autres.	105
Figure 3.35 : Migration de l'extrait méthanolique.	106
Figure 3.36 : Plaque de CCM après révélation.	107
Figure 3.37 : Les diamètres des zones d'inhibition des souches testées pour l'huile essentielle.	111
Figure 3.38 : Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	112
Figure 3.39 : Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur <i>Escherichia coli</i> .	113
Figure 3.40 : Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur <i>Staphylococcus aureus</i> .	114
Figure 3.41 : Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur <i>Bacillus subtilis</i> .	115
Figure 3.42 : Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	116
Figure 3.43 : Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur <i>Enterococcus faecium</i> .	117
Figure 3.44 : Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur <i>Bordetella bronchiseptica</i> .	117
Figure 3.45 : Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	118
Figure 3.46 : Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur <i>Candida albicans</i> .	119
Figure 3.47 : Résultats de la CMI pour <i>B.subtilis</i> , <i>E.coli</i> , <i>S.aueus</i> avec l'huile essentielle de <i>Laurus nobilis</i> à différents concentrations.	123
Figure 3.48 : Résultats de la CMI pour <i>B. bronchiseptica</i> , <i>K.pneumoniae</i> avec l'huile essentielle de <i>Laurus nobilis</i> à différents concentrations	125
Figure 3.49 : Résultats de la CMI pour <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (s), <i>Candida albicans</i> (c), avec l'huile essentielle de <i>Laurus nobilis</i> à différents concentrations.	127
Figure 3.50 : Résultats de la CMB pour <i>K. pneumoniae</i> .	128
Figure 3.51 : Résultats de la CMB pour <i>B.subtilis</i> .	128

Figure 3.52 : Résultats de la CMB pour E.coli.	128
Figure 3.53 : Résultats de la CMB pour E. faecium.	128
Figure 3.54 : Résultats de la CMB pour S.aureus.	129
Figure 3.55 : Résultats de la CMB pour B. Bronchiseptica.	129
Figure 3.56 : Résultats de la CMB pour S.cereviciae.	129
Figure 3.57 : Résultats de la CMB pour C.albicans.	129
Figure 3.58 : Activité antioxydante (DPPH) de l'HE, HA, Rutine, Tocophérol, Quercétine.	132
Figure 3.59: Activité antioxydante de l'extrait méthanolique et de la quercétine.	132
Figure 3.60 : Pourcentage d'œdème chez les souris NMRI.	136
Figure 3.61 : Pourcentage de réduction d'œdème chez des souris NMRI.	137
Figure 3.62 : Nombre de crampes comptabilisées sur des souris NMRI.	138
Figure 3.63 : Pourcentage de protection contre les crampes abdominales chez les souris NMRI.	138
Figure 3.64 : Effet de différents extraits de Laurus nobilis sur la diurèse chez les rat WISTAR.	140
Figure 3.65 : Excrétion urinaire volumétrique des différents extraits de Laurus nobilis.	140
Figure 3.66: Nombre de déplacements comptabilisés par l'actimètre sur des souris NMRI.	142
Figure 3.67 : Pourcentage de réduction de déplacement par les différents produits Testés.	142

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : les différents types des alcaloïdes.	23
Tableau 1.2 : Systématique de <i>Laurus nobilis</i> .	23
Tableau 1.3 : Dénomination de <i>Laurus nobilis</i> L.	33
Tableau 2.1 : Les souches microbiennes testées.	63
Tableau 3.1 : Propriétés organoleptiques d'huile essentielle et d'hydrolat.	100
Tableau 3.2 : Caractéristiques physico-chimique de l'huile essentielle.	100
Tableau 3.3 : Composition chimique de l'huile essentielle.	103
Tableau 3.4 : Composition chimique de l'hydrolat.	104
Tableau 3.5 : Résultats de la révélation des plaques de CCM par les colorants chimiques.	106
Tableau 3.6 : Le criblage phytochimique de <i>Laurus nobilis</i> .	107
Tableau 3.7 : Les diamètres des zones d'inhibition des souches utilisées.	109
Tableau 3.8 : Résultats de la CMI et de la CMB.	120
Tableau 3.9 : Activité antioxydante (DPPH) pour l'huile essentielle, l'hydrolat, rutine, tocophérol et de la quercérine.	130
Tableau 3.10 : Concentration inhibitrice du tocophérol et de la rétine.	131
Tableau 3.11 : Activité antioxydante de l' l'extrait méthanolique et de la quercitrine.	133
Tableau 3.12 : Concentration inhibitrice du l'extrait méthanolique et du qercétine.	134
Tableau 3.13 : Mortalité des souris.	134

INTRODUCTION

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études.

Un grand nombre de plante, aromatiques, médicinales, des plantes épices et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture.

Le regain d'intérêt aux plantes médicinales et leurs extraits telles les huiles essentielles, vient essentiellement d'une prise de conscience des malades et de leur désir profond de revenir aux moyens naturels et efficaces [1]. Car les plantes offrent un espoir de guérison dans le domaine des maladies contemporaines, et le besoin d'information sur les nouveaux produits phytothérapeutiques s'accroît [2]. Le malade tend de plus en plus à fuir les substances chimiques et à éviter les dangers qu'elles peuvent induire [1].

Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plus riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. De nombreuses substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles se sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies [3].

Malgré que l'Algérie, renferme une flore très riche en plantes médicinales et aromatique, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents

thérapeutiques de ces plantes. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier *Laurus nobilis* L., des lauracées très fréquemment employées comme condiment dans le pourtour méditerranéen.

Notre travail, s'inscrit dans le cadre de la valorisation du patrimoine naturel Algérienne dont les objectifs principaux peuvent se résumer ainsi:

- ✓ Identification botanique de la plante ;
- ✓ Extraction et caractérisation analytique et chromatographique de l'huile essentielle (HE) et de l'hydrolat (HY) du *Laurus nobilis* ;
- ✓ Etude phytochimique de l'extrait aqueux et de l'extrait méthanolique ;
- ✓ Etude biologique et pharmaco-toxicologique de différents extraits de *Laurus nobilis* (HE, HY, Inf).

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Les plantes médicinales

1.1.1. Histoire de la phytothérapie

Hommes et plantes sont liés depuis des millénaires. Les hommes préhistoriques connaissaient déjà les vertus de certaines plantes sauvages et des herbes qui guérissent. Ils ont probablement mâché les végétaux qu'ils ramassaient autour d'eux, adoptant ceux qui leur étaient bénéfiques. Puis la découverte du feu leur permit de les infuser dans l'eau bouillante [4].

Les découvertes les plus anciennes prouvant l'utilisation des plantes à des fins médicinales datent de 5000 ans. Il s'agit de tablettes d'argile sumériennes contenant des formules végétales [5].

La pharmacopée Chinoise connue depuis plusieurs millénaires et les papyrus des civilisations pharaoniques constituent autant de preuves de l'ancienneté de la phytothérapie.

Deux mille cinq cent ans avant notre ère, en Inde, on se soignait avec des plantes et des épices, selon les principes de la médecine védique. Et, curieusement, les Veda hindous décrivent des plantes et des doctrines médicales très proches de celles que l'on retrouve dans les écrits d'Hippocrate et de Gallien, précurseurs de la médecine occidentale. Comme ces médecins préconisaient des soins à base de plantes, leur culture se répandit dès lors dans les jardins grecs [4].

Au Moyen Age, tant les civilisations occidentales qu'arabes se soignaient par les plantes.

Au XV^e siècle, Paracelse, le célèbre médecin alchimiste, avança « la théorie des signatures » selon laquelle chaque plante porte en elle ou sur elle la signature de la maladie qu'elle guérit. Il suffit de savoir décrypter les signes [5]. La tige de la prêle évoque en miniature nos colonnes vertébrales. Elle est le remède des colonnes vertébrales déminéralisées, déformées. La fleur d'*Euphrasia officinalis* qui ressemble à une pupille oculaire, traitera l'œil défailant, on la surnomme « casse-lunettes » [6].

Si l'histoire de la phytothérapie est riche, à partir du XIX^e siècle, la plante médicinale est abandonnée au profit de la chimie moderne. C'est le début de l'ère du médicament. Au cours de cette période, tous les efforts se sont concentrés sur la recherche de nouvelles molécules synthétiques qui remplacent les principes actifs des plantes. Les molécules synthétiques deviennent de plus en plus complexes et efficaces. Cependant, quelques irréductibles s'accrochent à leur croyance et continuent à croire aux bienfaits de la phytothérapie ce qui permet sa renaissance au cours du XX^e siècle [5].

La phytothérapie à longtemps reposé sur des observations empiriques. Actuellement, elle fait de plus en plus l'objet d'études scientifiques approfondies. Cette médecine permet d'avoir recours à des traitements individualisés. Alors que le médicament chimique est composé d'une molécule, la plante possède une action plus douce mais plus profonde grâce à la synergie de toutes les substances qu'elle contient. Les nombreux principes actifs, bien que présents en faible quantité, agissent de façon harmonieuse et respectent la personne dans sa globalité. Dénué le plus souvent de tout effet secondaire toxique, l'emploi médicinal des plantes apparaît de plus en plus souvent comme une réponse aux problèmes générés par les médicaments chimiques [5].

1.1.2. Définition de la phytothérapie

Étymologiquement, la phytothérapie vient du grec phytos qui veut dire plantes et therapia qui veut dire soins ou traitement.

La phytothérapie est donc l'art de se soigner par les plantes médicinales. Se sont des plantes renfermant un plusieurs principes actifs, s'occupant du terrain ainsi que du symptôme, capable de prévenir, de soulager ou de guérir des maladies [7].

La phytothérapie représente une partie de la thérapeutique médicamenteuse, elle connaît de nos jours une véritable renaissance tant dans le domaine des maladies internes qu'en dermatologie et en cosmétologie (savons, eaux, poudres, déodorants a base de plantes) et enfin en balnéothérapie (bain, compresses) [8].

1.1.3. Les principes actifs des plantes médicinales

Le règne végétal comprend des substances organiques de structure et d'utilisation variées. En effet, les plantes renferment des composants chimiques qui se répartissent en deux grands groupes : les protides, les glucides, les lipides et les acides nucléiques d'une part, les pigments, les tanins, les saponosides, les flavonoïdes, les vitamines, les hormones et les essences végétales dites huiles essentielles d'autre part. Les premiers sont les constituants du métabolisme primaire. Ils existent en permanence au sein de la plante. Les autres proviennent du métabolisme secondaire et ne sont pas toujours présents chez les végétaux [9].

- Alcaloïdes : sont des composés azotés complexes, présentant généralement de puissants effets physiologiques. Ce sont pour la plupart des poisons végétaux très actifs, dotés d'une action spécifique [8]. On connaît aujourd'hui 3000 alcaloïdes différents répartis dans 4000 espèces végétales (Tableau1.1). Les alcaloïdes peuvent protéger les plantes de la consommation par les animaux. Ils constituent également des réserves d'azote [10].

Tableau1.1 : les différents types des alcaloïdes.

Alcaloïde	Origine	Effets
Substances consommables :		
Nicotine	<i>Nicotiana tabacum</i> (tabac) dans les feuilles	Constriction des vaisseaux
Usage thérapeutique :		
Atropine	<i>Atropa belladonna</i> (belladone) dans le fruit	Antimitotique utilisé contre la goutte
Substances entraînant des dépendances :		
Morphine	<i>Papaver somniferum</i> (pavot) dans les fruits immatures	Analgésique, calment

- Hétérosides ou Glucosides: les hétérosides résultent de la combinaison, avec élimination d'eau, de l'hydroxyle réducteur d'un ose avec une substance non glucidique, l'aglycone ou génine.

L'osidification assure l'hydrophilie de molécules peu solubles comme les dérivés phénoliques et terpéniques. Les molécules ainsi solubilisées peuvent entrer dans le métabolisme ou être emmagasinées dans la vacuole. L'isolement dans la vacuole correspond souvent à un processus de détoxification, les composés phénoliques et terpéniques étant toujours plus ou moins nocifs [11].

Selon la composition chimique de la partie aglycone, on distingue plusieurs groupes de glucosides :

- Thioglucosides ;
- Glucosides dérivés de l'acide cyanhydrique ;
- Glucosides anthraquinoniques ;
- Cardioglucosides (glucosides de la digitale) ;
- Glucosides phénoliques [11].

- Saponines : sont très communes dans les plantes médicinales .Du point de vue chimique, elles se caractérisent également par un radical glucidique (glucose, galactose) joint à un radical aglycone .Leur propriété physique principale est de réduire fortement la tension superficielle de l'eau. Toutes les saponines sont fortement moussantes et constituent d'excellents émulsifiants.

Elles ont une autre propriété caractéristique : celle d'hémolyser les globules rouges, (érythrocytes) et de libérer ainsi leur hémoglobine, ce qui explique l'effet toxique de certaines d'entre elles. En l'occurrence, elles sont inconsommables [12].

-Tanins : sont des mélanges complexes de polyphénols.Le principe actif est un phénol qui se combine avec des sucres. On distingue deux catégories :

- Tanins hydrolysables : Ces tanins sont des dimères d'acide gallique condensés sur un dérivé glycosyle, Ils comprennent l'acide gallique et les produits de condensation de son dimère, l'acide hexahydroxydiphénique. Comme leur nom l'indique, ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude [13].

- Tanins catéchiques : qui sont proches des flavonoïdes. Ce sont des flavonoïdes dérivés de la flavane.Ils sont appelés catéchiques parce qu'ils sont toujours accompagnés de catéchols dans les plantes fraîches [7].

Les tanins étaient autrefois utilisés pour le tannage de peaux. Ils ont la propriété de coaguler certaines protéines des muqueuses et des tissus en créant une couche isolante et protectrice qui a pour effet d'apaiser la douleur et de réduire les saignements [12].

- Flavonoïdes : sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux , on les trouve dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes [11].

Les génines des flavonoïdes sont composés de plusieurs phénols $C_6.C_3-C_6$.On les nomme flavones du latin flavus, qui veut dire jaune.Parmi les flavonoïdes on distingue : flavones, flavonols, isoflavones, xanthones [7].

Chez les plantes, les flavonoïdes exercent plusieurs fonctions, notamment la protection contre les champignons et les insectes, ainsi que le contrôle des processus de croissance. Beaucoup de ces substances ont des propriétés proches de celles des œstrogènes. Chez l'homme, la majorité des flavonoïdes inhibent le processus inflammatoire et sont aussi des antioxydants [12].

- Huiles essentielles : Ce sont des substances volatiles et odorantes obtenues par la distillation des plantes aromatiques. L'huile essentielle est présente dans les feuilles, les fleurs et l'écorce de certains végétaux. Dix pour cent seulement parmi les huit cent mille espèces du monde végétal sont capables de synthétiser une essence [14]. Les huiles essentielles ont des propriétés pharmacologiques très différentes les unes des autres en raison de l'hétérogénéité de leur composition chimique [15].

1.1.4. Récolte, séchage et conservation des plantes médicinales

1.1.4.1. Récolte

Les principes actifs dans la plante dépendent de son biotope, de son développement et de son âge. Leur quantité et leur composition changent au cours de la croissance et varient même au cours de la journée. Les plantes médicinales seront donc cueillies lorsque la teneur en matière actives est plus forte [16].

Les plantes destinées à l'extraction des essences doivent être cueillies avant l'aube, lorsque la rosée du matin est encore présente et avant que la chaleur du soleil n'en libère la substance aromatique [17].

1.1.4.2. Dessiccation ou séchage

Le séchage et la conservation des plantes médicinales requièrent autant de soin que la récolte, si on veut que les plantes ne perdent pas leurs qualités médicinales [16].

Généralement, les plantes récoltées doivent être mises à sécher le plus rapidement possible, pour éviter l'échaudage au cours de leur flétrissement. On

évite le plus souvent de procéder au séchage en plein soleil : les rayons solaires causent une déperdition des matières actives, un jaunissement et un brunissement rapide des végétaux, une altération de leur valeur médicinale [8].

1.1.4.3. Conservation et stockage

Une plante médicinale mal conservée perd en partie sa valeur thérapeutique, et il faut éliminer au cours du stockage l'action d'un certain nombre de facteurs parmi les quels : l'air et la lumière (pour éviter les réactions d'oxydation). L'humidité (propice à la détérioration des principes actifs et au développement de moisissures), l'attaque des animaux (insectes, rongeurs et autres parasites) [18].

Les plantes doivent être stockées de préférence sous forme entière non incisée. En effet, la destruction des structures cellulaires, entraînent la lésion des appareils sécréteurs ainsi que l'augmentation de la surface de contact avec l'air. Cette opération favorise la perte des constituants volatils et l'infiltration de l'oxygène dans les cellules entraînant l'apparition des phénomènes oxydatifs généralement néfastes.

Les plantes entières qui renferment des lipides ou des huiles essentielles ne doivent pas être stockées plus de 3 ans après leur récolte, voir plus de 2 ans pour certaines d'entre elles (paprika, piments, aneth) [19].

1.1.5. Divers mode de préparation des plantes

Le choix du type de préparation est fonction du type de constituants de la plante et du respect de la qualité des principes actifs de celle-ci [1].

- Décoction : Elle est utilisée pour les parties aériennes dures de la plante (écorce, bois, graine, fruit). Elle est également utilisée chez les plantes contenant des tanins, de l'acide silicique ou d'autres substances qui ne sont difficilement solubles. Les plantes sont bouillies pendant un temps qui varie de 5 à 30 minutes. La décoction est ensuite filtrée [16].

- Infusion : Elle est préparée avec les parties les plus tendres de la plante (herbes, feuille, fleur). Ce mode est utilisé lorsque les substances risquent d'être détruites par la cuisson ou l'évaporation. On commence par humidifier légèrement la préparation, puis on verse dessus de l'eau bouillante. On laisse infuser les

herbes de 5 à 15 minutes dans un pot en porcelaine ou en verre, muni d'un couvercle préalablement rincé à l'eau chaude. L'infusion sera ensuite filtrée à travers une passoire inoxydable ou une fine mousseline [16].

- Macération : La plante macère de l'eau froide, du vin, de l'alcool ou de l'huile, durant un temps plus ou moins long (selon les cas, de quelques heures à plusieurs jours, parfois plusieurs semaines, selon le type de plante), pour en extraire les principes solubles [20].

- Poudre : elle est constituée de la plante sèche réduite en poudre très fine et dont la préparation se fait en deux temps, une pulvérisation et un tamisage. L'usage des poudres est double :

un usage direct (gélules à ingérer) ;

un usage indirect (teintures, et différents extraits) [21].

1.2. L'aromathérapie

1.2.1. Définition de l'aromathérapie

L'aromathérapie désigne une branche particulière de la médecine par les plantes. Ce terme savant est composé de deux racines grecques : aroma signifiant parfum et thérapie, méthode visant à soigner la maladie, à soulager le malade. L'aromathérapie met en œuvre des essences et des huiles essentielles pures extraites de différentes plantes aromatiques appréciées pour leurs propriétés thérapeutiques [6].

Une plante aromatique se différencie des autres plantes médicinales par ces principes odoriférants et parfumés appelés huiles essentielles [22].

L'aromathérapie est certes une branche de la phytothérapie, puisqu'il s'agit de se soigner par les plantes. Mais en aromathérapie, on utilise seulement la partie volatile de la plante [23].

Il est absolument impossible de comparer un extrait de la plante (phytothérapie) et une huile essentielle (aromathérapie). Certaines parties de la plante, totalement inoffensives en tisane ou en gélule, seraient extrêmement toxiques si elles étaient proposées sous forme d'huile essentielle [23].

1.2.2. Définition des huiles essentielles

La norme AFNOR définit l'huile essentielle comme un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épiderme des Citrus, soit par distillation à sec. L'huile est ensuite séparée de phase aqueuse par des procédés physiques [24].

Selon la pharmacopée Européenne, ce sont des produits de composition généralement assez complexe renferment des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de leur extraction [17].

1.2.3. Formation des huiles essentielles

Les huiles essentielles, produites par les végétaux supérieurs, sont élaborées par des sites sécréteurs botaniques (Figure 1.1) qui se retrouvent sur presque toutes les parties de la plante (tige, feuilles, fleurs ou graine). Elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules où elles se rassemblent sous forme de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles. Ensuite elles sont stockées dans des cavités résultant de la fusion de plusieurs cellules [9].

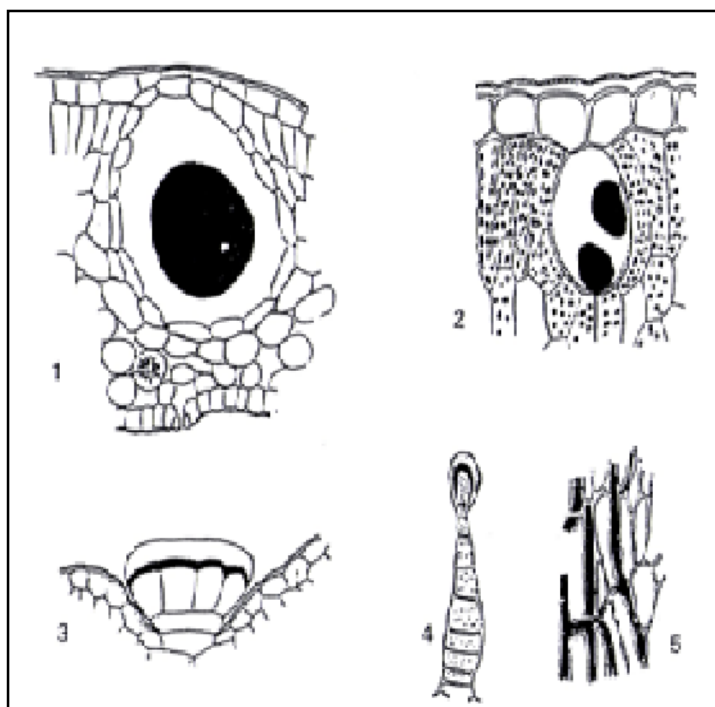


Figure 1.1 : les sites sécréteurs [11]

- 1 : poche sécrétrice dans une feuille d'*Eucalyptus globulus* (Myrtacées) ;
- 2 : cellule isolée sous l'épiderme de la feuille de *Sassafras officinale* (Lauracées) ;
- 3 : poil de menthe poivrée (*Menthapiperita*, Lamiacées) ;
- 4 : poil de patchouli (*Pogostemon*, Lamiacées) ;
- 5 : laticifères dans la racine d'un Salsifis (Astéracées).

1.2.4. Rôle des huiles essentielles chez les plantes

Les huiles essentielles protègent la plante contre les parasites, les insectes ou les herbivores. Elles peuvent aussi favoriser la fécondation en attirant certains insectes [25].

Toutefois, la fonction des huiles essentielles au sein de la plante reste encore un phénomène assez obscur. Les effets d'attraction, de répulsion et de dégagement observés sont dus à la complexité et la variété structurale des substances présentes dans l'essence [9].

1.2.5. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles est généralement très complexe d'un double point de vue, à la fois par le nombre élevé de constituants présents et surtout par la diversité considérable de leurs structures.

En effet, elles comprennent deux classes de composés caractérisés par des origines biogénétiques bien distinctes : le groupe des terpénoïdes et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

Il existe également d'autres corps qui entrent en faible proportion dans la constitution de certaines huiles essentielles (acides organiques, les esters et d'autres composés) [9].

1.3.Hydrolathérapie

1.3.1. Définition de l'hydrolathérapie

L'hydrolathérapie, ou thérapie par les hydrolats, est une branche de l'aromathérapie, elle-même issue de l'ensemble le plus vaste de la phytothérapie. C'est une thérapie holistique, elle met en relation entité : Corps-Esprit [26].

L'hydrolat est donc une forme de thérapie particulièrement douce. Elle ne présente pas de phénomènes d'accoutumance ou d'interactions médicamenteuses. Elle est alors très indiquée pour les personnes sensibles, comme les enfants en bas âges, les femmes enceintes ou les personnes âgées [27] [26].

Les hydrolats peuvent être consommés sous forme de tisanes, en spray oral, par gouttes ou également comme tonique cutané [26].

1.3.2. Définition de l'hydrolat

Le terme hydrolat est issu de l'appellation latine « hydro », qui signifie « eau » et du français « lat » ou « lait » car cette substance présente une apparence laiteuse dans les quelques minutes qui suivent la distillation [26].

Lors du processus d'obtention des huiles essentielles par entraînement à la vapeur, un sous-produit se forme à partir de l'eau ayant servi à l'extraction des molécules odorantes. Ce produit est l'hydrolat. Au cours de la distillation, la vapeur d'eau traverse la matière végétale puis se condense au contact des parois froides d'un réfrigérant [27].L'eau se dissocie alors spontanément de l'huile essentielle du fait de leur non miscibilité tout en conservant une petite portion des composés volatils de l'huile essentielle dont la teneur varie de 1 à 5% [27] [28].

1.3.3. Composition des hydrolats

Les hydrolats contiennent en petite quantité des composés volatils semblables à ceux présents dans l'huile essentielle, néanmoins un certain nombre d'éléments peuvent être absents. Ainsi, la composition des hydrolats s'éloigne donc de celle des huiles [28].

Pour pouvoir effectuer l'analyse de la composition chimique des hydrolats par GC-MS, il est nécessaire de « concentrer » l'hydrolat avant l'injection, en procédant à une extraction liquide-liquide avec un solvant organique tel que le chloroforme [29].

1.4. Laurier noble

1.4.1. Laurier noble dans l'histoire

Le laurier devait, dès la plus haute antiquité, attirer l'attention des médecins grecs qui avaient entouré de ses feuilles les tempes de leur dieu Esculape.

Hippocrate vantait son huile contre le tétanos et ses feuilles en injections pour calmer les douleurs qui suivent l'accouchement. Galien l'utilisait dans les affections du foie [30].

Au Moyen-âge, Nicolas Myrepsus fait de ses baies la base d'un antidote destiné à calmer la toux [31].

En 1872, le docteur Doria tenta à rendre au laurier un peu de son antique prestige en publiant les succès qu'il avait obtenus chez des sujets atteints de fièvres intermittentes [30].

1.4.2. Origine et distribution de la plante

Originaire de l'Asie Mineure, mais, on le rencontre aujourd'hui dans l'ensemble des pays méditerranéennes, dans l'Ex-yougoslavie ainsi qu'en Inde [32].

Laurus nobilis pousse dans les forêts ombragées et humides à proximité des côtes, fréquemment planté comme arbre ornemental et aromatique [33].

Il est commun dans les ravins et les forêts humides Tell Algérois et elles du Constantinois [34].

Il est aussi cultivé pour la production commerciale, en Turquie, Algérie, France, Grèce, au Maroc, en Amérique centrale et aux Etats –Unis Méridionaux [35] [36].

1.4.3. Description botanique de la plante

Laurus nobilis L., membre de la famille des Lauracées qui renferme 32 genres et environ 2000-2500 espèces [35]. *Laurus*, nom latin d'origine celte qui veut dire toujours vert allusion au feuillage persistant de la plante [37].

Laurus nobilis, arbuste ou arbre aromatique de 2 à 10 m de haut à tige droite. Les tiges des Lauracées ont un péricycle scléreux hétérogène (fibres et cellules scléreuses) et des cellules à essence [38].

Ses feuilles sont alternes, coriaces, persistantes, longues de 16 cm sur 8 cm large, atténuées en court pétiole, penninerviées, entières et aux bordures ondulées [39].

Les feuilles, elliptiques, lancéolées, dégagent une forte odeur aromatique si on les froisse. C'est la conséquence de l'existence de grosses cellules sécrétrices éparses dans la mésophylle des limbes [40].

Les fleurs sont petites et dioïques (fleurs males et femelles sur des pieds séparés). Elles apparaissent en mars–avril, jaune verdâtre ou vert blanchâtre. Elles sont odorantes et groupées à l'aisselle des feuilles en petits bouquets en forme d'ombelles axillaires pédonculées et involuquées [32] [39] [40].

Le fruit est une baie globuleuse, d'un noir profond à maturité, atteignant 2 cm de long, sa pulpe est verte, grasse et parfumée [32].

Les baies contiennent 25% d'huile grasse et jusqu'à 3% d'huile volatile composée de cinéol, géraniol et linalol [41].

1.4.4. Place dans la systématique

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure synthétisée dans le tableau 1.2 [42].

Tableau 1.2 : Systématique de *Laurus nobilis*

Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Laurales
Famille	<i>Lauracées</i>
Genre	<i>Laurus</i>
Espèce	<i>Laurus nobilis</i>

1.4.5. Synonymes botanique

Du fait qu'il soit très répandu dans le monde, le *Laurus nobilis* L, présente divers appellations selon les pays (tableau1.3).On ne confondra pas ce laurier noble avec d'autre espèces ligneuses fâcheusement appelées lauriers notamment : le laurier Cerise (*Prunus laurocerasus*), le laurier Tin, le laurier rose (*Nerumoleander*), le laurier des Alpes (*Rhododendron ferrugineum*) et le laurier de Saint Antoine [31] [40].

Tableau1.3 : Dénomination de *Laurus nobilis* L.

La nomination	<i>Laurus nobilis</i>
Nom commun Français	Laurier d'Apollon, laurier commun, laurier noble, laurier sauce, laurier franc, laurier à jambon [42].
Nom vernaculaire arabe et targui	Rend, erend, habb'ra'r (le fruit), tasselt [39].
Nom celtique	Blaur signifie toujours vert [39].
Nom allemand	Lorbeer, lorbeerbaum, gewürzlorbeer [32].
Nom anglais	Bay,sweet bay,bay laurel ,true laurel [32].

1.4.6. Composition chimique

De nombreuses études ont été réalisées pour la détermination de la composition chimique des feuilles de *Laurus nobilis*. Elles ont montré leur richesse en substances actives. Par distillation les feuilles fournissent environ 10 à 30 ml /kg (1- 3 %) d'huile essentielle [43].

Cette huile essentielle est complexe et riche de 270 composants actuellement connus, couvrant une grande gamme de molécules aromatiques qui sont :

- Les oxydes monoterpéniques (36%) sous la forme de cineole, puissamment actifs sur la fonction respiratoire [31].
- Les monoterpénols (18%) en majorité linalol. Ceux sont des antibiotiques et immunostimulants.
- Les monoterpènes (23%) surtout pinènes et sabinènes, ce sont des puissants toniques généraux mais également antalgiques et légèrement immunostimulants.
- Les esters (15 à 20%) et les phénols méthyl-éthers (4%), permettent une action antispasmodique majeure.
- Les sesquiterpènes (5%), ce sont des composés à 15 carbones, doués d'activités anti-inflammatoire et antivirale.
- Les lactones sesquiterpéniques (costénolide et artémorine) anciennement dénommés principes amers, substances hautement réactives, elles sont responsables des vertus digestives des plantes qui les synthétisent. Ces lactones sesquiterpéniques comprennent un groupe réactif, en l'occurrence : α -méthylène- γ -butyrolactone. Ce groupe joue un rôle important dans le pouvoir allergisant [31].

Les feuilles de *Laurus nobilis* contiennent aussi des flavonoïdes polaires (dérivées glycosylées de quercétine, kaempferol et de catéchine) et apolaires (quatre dérivés acylés de kaempferol) [44] [45], des alcaloïdes isoquinoléiques (réticuline, aporphinoïdes) [43].

En plus GÓMEZ-CORONADO et *al.*, ont montré la richesse de ses feuilles en α - tocophérol. Ainsi, 100 g de feuilles fraîches de *Laurus nobilis* contiennent 132.2 mg de vitamine E [46].

1.4.7. Utilisation des feuilles de *Laurus nobilis*

Les feuilles de *Laurus nobilis* sont parmi les assaisonnements les plus connus dans tous les pays. Elles sont généralement utilisées comme épice valable en culinaires (en potages, ragoûts et sauce) et aromatisant en industrie alimentaire. Cette plante a aussi des applications importantes en médecine traditionnelle et représente récemment un sujet de recherche scientifique intéressant [47]. Le laurier est principalement utilisé, par voie orale, dans le traitement symptomatique des troubles de l'appareil digestif supérieur tels que le ballonnement épigastrique, lenteur de la digestion, éructations et flatulence [32].

A l'extérieur, l'huile essentielle est utilisée dans les bains antirhumatismaux ainsi qu'en frictions pour les foulures, abcès, ulcères, gale, pelade, pédiculose, psoriasis et mycoses. Il est utilisé aussi contre la chute des cheveux [32] [48].

En outre, l'huile essentielle est utilisée par l'industrie cosmétique, et en parfumerie [36] [39].

L'extrait aqueux est utilisé dans la médecine traditionnelle turque comme anti hémorroïdal, antirhumatismal, diurétiques et pour le traitement du mal d'estomac. Il peut être utilisé aussi comme antidote lors des morsures de serpent [45].

Dans la médecine traditionnelle iranienne, les feuilles de cette plante ont été utilisées pour traiter l'épilepsie et la maladie de Parkinson [49].

En Maroc, les feuilles sont prises oralement pour traiter le désordre du foie et pour l'hygiène dentaire [50].

La concrète de laurier et le beurre de laurier étaient utilisés dans la médecine vétérinaire ancienne en frictions contre les douleurs diverses dont la fourbure, la goutte des volailles. Elles servaient aussi à préserver l'animal des mouches et des poux. De nos jours, l'huile de *Laurus nobilis* entre dans la composition du végébon vétérinaire pour les affections de la peau et de la mamelle [51].

Bien que les feuilles de laurier noble soient principalement extraites pour produire les huiles essentielles qui sont utilisées en pharmacie et en cosmétique,

la pyrolyse des résidus d'extraction de laurier ont une grande importance comme source d'énergie renouvelable [52].

La matière végétale de laurier noble épuisée après la distillation pourrait être considérée comme alimentation fibreuse ayant de bonnes valeurs énergétiques et de digestibilité pour les ruminants [53].

L'hydrolat de laurier noble combat les germes et la douleur, pour tous les problèmes de bouche (aphtes et douleurs dentaires). On l'utilise aussi pour purifier la peau.

L'hydrolat est aussi recommandé pour aider les individus améliorer la communication avec les autres et avec soi-même [54].

1.4.8. Propriétés pharmacologiques et recherches en cours

1.4.8.1. Effets antioxydants

Il existe de nos jours un intérêt croissant vis-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement, cancers, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire [55].

Dans l'organisme, les métabolites de l'oxygène sont formée de façon permanente au cours de la vie par des réactions biochimiques physiologiques, mais aussi par un grand nombre de facteurs externe comme par exemple les ultraviolets (UV), la pollution, la fumée du tabac, les herbicides, les pesticides et beaucoup d'autres substances [56].

L'activité antioxydante des extraits méthanolique (bruts et dégraissés) des feuilles, d'écorces et des fruits de *Laurus nobilis* ont été étudiés au niveau de la peroxydation de lipide (LP) dans les liposomes, induite par le système Fe^{+2} /ascorbate et mesuré spectrophotométriquement à 533 nm .Les résultats ont montré que tous les extraits de recherche possédaient une activité antioxydante .L'extrait dégraissé des feuilles montre une inhibition plus élevée du LP que

l'extrait brut et le maximum de son activité (68.4%) a été atteint avec une plus petite quantité (2.0mg) [47].

FERREIRA et *al.*, ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits (huile essentielle, extrait éthanolique et décoction) de dix espèces de plantes médicinales dont *Laurus nobilis*, cette espèce a montré des valeurs élevées pour l'activité antioxydante pour chacun des trois extraits et elle est plus haute pour les extraits polaires. Dans le laurier noble, l'isoquercitrin et les glycosides flavonol peuvent expliquer l'activité exhibée [57].

Dans une autre étude, DEMO et *al.*, ont démontré la présence des tocophérols (vitamine E), principalement le γ - tocophérol, dans les feuilles de *Laurus nobilis* obtenue dans la fraction apolaire par extraction hexane. Dans cette étude on rapporte que le contenu tocophérol est strictement corrélé avec l'activité antioxydante de l'extrait hexane des feuilles [58]

1.4.8.2. Effet anticonvulsif

Avec l'émergence de plusieurs psychotropes peuvent induire une dépendance, les huiles essentielles présentent une sérieuse alternative contre les pathologies psychiques.

Les psychotropes ou substances psycho-actives sont des produits qui agissent sur le psychisme d'un individu en modifiant son fonctionnement mental. C'est la classe des médicaments la plus utilisée dans le monde. Ils peuvent entraîner des changements dans les perceptions, l'humeur, la conscience, le comportement et diverses fonctions psychologiques [59].

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* a été évaluée pour l'activité anticonvulsif contre des crises expérimentales, l'huile a protégé des souris contre des convulsions toniques, induites par électrochoc maximal et particulièrement par pentylène-tétrazol. Aux doses anticonvulsives, l'huile essentielle a produit la sédation et relâchement du cœur. Les composants responsables de cet effet peuvent être le cinéol, eugénol et le méthyle eugénol mais d'autres études sont exigées avant que toutes conclusions puissent être tirées [60].

1.4.8.3. Effet cytotoxique

Les extraits *n*-hexane ,éthanol et aqueux des feuilles de *Laurus nobilis* ont été testés pour leurs propriétés cytotoxiques en utilisant l'essai biologique de crevette de saumure (*Artemia salina*) .Seul l'extrait *n*-hexane exhibe une activité cytotoxique contre la crevette de saumure même si on l'avérait moins active que l'umbelliferone et la colchicine .Dans le criblage phytochimique tous les extraits ont donné des résultats positifs pour les sesquiterpènes ,les extraits éthanol et aqueux pour les alcaloïdes mais seulement l'extrait *n*-hexane était positif pour les flavonoïdes et la vitamine E .En conclusion ,les glycosides flavonol pourraient être des principes actifs responsables de l'activité cytotoxique observée [45] .

D'autres études ont réalisé l'isolement et l'identification des composés des feuilles et des fruits de *Laurus nobilis* supposés être cytotoxique .Ils ont isolés six lactones sesquiterpéniques connue et un nouveau sesquiterpène le lauroxepine, ces substances actives se sont avérées fortement cytotoxiques contre la lignée cellulaire ovarienne cancéreuse A2780 [35].

Une étude a montré que l'extrait méthanolique de *Laurus nobilis* présente une activité inhibitrice contre NF-KB (nuclear factor-kappa B) dont l'activation de NF-KB a été impliqué dans le cancer et dans beaucoup de maladies inflammatoires chroniques humaines, telles que l'asthme, l'arthrite, et la maladie inflammatoire d'entrailles [61].

Les lactones sesquiterpéniques reynosin et santamarine isolée de feuille de laurier noble présente une activité cytotoxique contre la lignée de cellule humaine GLC4 de carcinome de poumon et la lignée cellulaire colorectale COLO320 de cancer (IC50 124 millimètres) [62].

1.4.8.4. Effet fumigènes et insecticide

Récemment, il ya un intérêt croissant pour l'utilisation probable des extraits de plantes comme solution de rechange aux insecticides synthétiques.

Treize huiles essentielles dont ceux de *Laurus nobilis* ont été examinées sous leurs formes de vapeur contre une espèce d'insectes attaquant les produits

stockés, *Acanthoscelides obtectus* (bruche du haricot). Les résultats ont indiqués que l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* a une action répulsive, réduit la fécondité, diminue la couvaison d'œufs, augmente la mortalité larvaire de nouveau né et influence défavorablement l'apparition de progéniture [63].

Une étude similaire a été réalisée par ERLER et *a.*, où l'huile essentielle extraite à partir du feuillage frais de *Laurus nobilis* a été examinée pour son activité répulsive contre les femelles adultes d'une espèce de moustique (*Culex pipiens*), cette huile a montré un degré de répulsion intéressant contre ces parasites vecteurs de plusieurs maladies comme la malaria, fièvre jaune, dengue, encéphalite [64].

De même, l'activité fumigène de certains composés qui se produisent naturellement dans les huiles essentielles des plantes aromatiques dont cinéol, eugénol et linalol, composés principales de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*, a été évalué contre espèces d'insectes parasites des produits entreposés (*Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica* et *Tribolium castaneum*). L'activité insecticide a changé avec l'espèce d'insecte, le composé et le temps d'exposition. Les résultats ont prouvé que ces composés peuvent convenir comme fumigène en raison de leur volatilité élevée, efficacité et leur sureté [65].

1.4.8.5. Effet hypoglycémiant

L'activité hypoglycémiant des extraits de feuille de laurier a été également rapporté [63]. Les feuilles de laurier noble ont renforcé l'action de l'insuline dans le métabolisme de glucose [66]. L'administration des doses de 200 et 600 mg/kg de l'extrait éthanolique des feuilles de *Laurus nobilis* a produit une diminution significative des niveaux de glucose sanguin chez des lapins diabétiques [67].

1.4.8.6. Effet gastroprotectif

Une étude a été réalisée par GÜRBÜZ et *al.*, où cinq plantes aromatiques dont *Laurus nobilis*, sont employées traditionnellement en Turquie pour traiter le mal d'estomac. Ils ont été choisis pour déterminer leur pouvoir anti-ulcérigène. Une décoction et un extrait méthanol ont été préparés à partir des fruits de laurier pour déterminer leurs effets sur un modèle d'ulcère gastrique induit par l'éthanol chez

des rats .Les expériences pharmacologiques et les techniques histopathologiques ont clairement montré que ces extraits donnés oralement ont significativement protégé l'estomac contre ce modèle d'ulcère .Cette étude doit être continue pour l'isolement des constituants actifs et pour révéler leur mode d'action [68] .

1.4.8.7. Effet mollucidal

L'effet mollucidal des extraits aqueux des feuilles et des fleurs de *Laurus nobilis* a été testé sur le stade de blastula et sur l'escargot adulte (*Biomphalaria glabrata*) .Les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux des feuilles a présenté une toxicité sur les embryons à une concentration de 125 ppm. L'extrait de fleur a semblé être plus efficace (35 ppm). Des malformations céphaliques et des coquilles ont été trouvées dans les embryons traités avec des extraits de la feuille (50 ppm) et de la fleur (25 ppm).La valeur LD90 sur les escargots adultes a été estimée comme 340 ppm pour l'extrait de fleur et 1900 ppm pour l'extrait de feuille [69].

1.4.8.8. Effet inhibiteur d'absorption d'alcool

L'extrait méthanolique des feuilles de *Laurus nobilis* a efficacement empêché l'élévation du taux d'éthanol dans le sang chez un rat chargé d'éthanol .Sept sesquiterpènes actifs ont été isolés en tant qu'inhibiteur d'absorption d'alcool[68].

La partie active dans ces sesquiterpènes s'est avéré la partie α -méthylène γ -butyrolactone qui était essentielle pour montrer la suppression de l'absorption d'éthanol. En outre, le retard de vidange gastrique a été présumé impliquer partiellement dans leur effet inhibiteur [70] [71].Ces sesquiterpènes ont non seulement un effet préventif efficace pour la toxicité aigue d'alcool mais peuvent également aider des patients à éviter l'abus d'alcool [70].

1.4.8.9. Effet curatif de blessures

L'effet curatif de blessures de l'huile de feuille de *Laurus nobilis* a été examiné par KHALIL et al.,.Une blessure en pleine épaisseur a été faite dans le secteur dorsal des souris *Mus musculus* .Les blessures ont été traitées quatre fois avec la préparation d'huile avec 12 h d'intervalle pendant deux jours successifs. Après 16

jours, les blessures ont été visuellement observées, photographiquement documenté et le secteur de blessure a été mesuré. Après le 16^{ème} jour, les animaux ont été sacrifiés et l'histologie du secteur de blessure est examinée. L'huile de *Laurus nobilis* a montrée une bonne activité curative de blessures [72].

1.4.8.10. Effet inhibiteur d'enzyme

FERREIRA et al., ont étudié l'effet de l'huile essentielle, l'extrait éthanolique et la décoction des feuilles de *Laurus nobilis* sur l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine donnant la choline et l'acétyle. La fraction éthanolique a montré une valeur élevée d'inhibition d'AChE de 64% (1mg/ml), donc la plante *Laurus nobilis* peut aider à traité ou soulager des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer, puisque les drogues approuvées pour la thérapie de cette maladie agissent en contrecarrant le déficit d'acétylcholine [73].

1.4.8.11. Effet inhibiteur de la nitration

L'huile essentielle obtenue à partir des feuilles de *Laurus nobilis* a montré une inhibition presque complète de la formation du 3-nitrotyrosine (91% à 300 µg/ML) dont la nitration de tyrosine en 3- nitrotyrosine est généralement considérée comme un biomarqueur de phénomènes inflammatoires [74].

1.4.8.12. Effet antimicrobien

Avec l'émergence de microorganismes pathogènes résistants aux antibiotiques, les huiles essentielles antimicrobiennes présentent une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques contre les pathologies infectieuses [75].

Plusieurs études ont montré que les huiles essentielles sont capables de s'attaquer aux microbes les plus puissants, comme le staphylocoque, le bacille de Koch (tuberculose) ou le bacille typhique (typhoïde) [76].

La composition de ces huiles essentielles et, en particulier, la nature de leurs composés majoritaires sont responsable de cette activité antimicrobienne [77]. En

effet, il est admis que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles se classe dans l'ordre décroissant selon la nature de leurs composés majoritaires : phénols > alcools > aldéhydes > cétones > oxydes > hydrocarbures > esters [77] [78] [79].

Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à son « totum », c'est-à-dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires [80].

L'efficacité des huiles essentielles ne s'affaiblit pas au fur et à mesure de leur utilisation, et il n'y a pas besoin de multiplier les doses pour guérir. L'extrême variété de leurs composants empêche les microbes d'organiser leur résistance [24].

A la manière des agents chimiques, on distingue deux sortes d'effets des huiles essentielles sur les microorganismes : une activité létale (bactéricide) et une inhibition de la croissance [77].

Des huiles essentielles de plusieurs plantes ont été évaluées pour leur potentiel sur la croissance du mycète aflatoxinogénique (*Aspergillus parasiticus* CFR 223) et sur la production d'aflatoxine. L'huile des feuilles de laurier noble a stimulée in vitro la croissance des mycéliums du mycète mais a réduit la concentration de son aflatoxine de 55.21% [81].

Deux glycosides de kaempferol [kaempferol-3-O- α -L-(2'',4''-di-E-p-coumaroyl)-rhamnoside et kaempferol 3-O- α -L-(2'' -E-p-coumaroyl-4''- Z-p-coumaroyl)-rhamnoside] isolées de *Laurus nobilis* ont montré une forte activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline et enterocoque résistant à la vancomycine. Ces deux glycosides ont aussi réduit les concentrations minimale inhibitrice de quelques fluoroquinolones tels que le norfloxacine et le ciprofloxacine sur *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) [82].

L'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* extraites par une technique du dioxyde de carbone supercritique représente un potentiel agent antifongique

qui pourrait être employé en tant que fongicide naturelle pour la protection des pêches et des kiwis stockés contre le *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* [83].

L'extrait méthanolique –dichloromethane des feuilles de *Laurus nobilis* montre une activité antibactérienne contre *Paenibacillus larvae* agent causale de la loque américaine avec une concentration minimale inhibitrice de 16-32 µg/ml [84].

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériels

2.1.1. Matériel biologique

2.1.1.1. Matériel végétal

Notre étude a porté sur une plante aromatique *Laurus nobilis*, communément appelée laurier noble.

Les feuilles de *Laurus nobilis* L. ont été récoltées au mois de février 2010 dans la région montagneuse de Blida (Ben Ali). Les plantes poussent sur le versant Nord-Ouest à une altitude d'environ 750m, ils poussent sous bois en situation ombragée, ils ne bénéficient d'aucun traitement. Une partie des feuilles fraîches est destinée pour l'extraction des composés aromatiques (HE et HY). L'autre partie est séchée à l'ombre et à l'abri de l'humidité.

Les échantillons séchés sont broyés dans un broyeur électrique (Universel M20) puis mis dans des bocaux hermétiques et conservés à température ambiante.

Le broyage de la plante permet d'augmenter la surface de contact solvant-échantillon, une meilleure infiltration du solvant au sein du matériel végétal ce qui a pour conséquence une augmentation de l'extraction (solide-liquide).

2.1.1.2 Matériel animal

- Souris NMRI : L'animal utilisé est la souris NMRI (Naval Medical Research Institute, Bethesda, Maryland, USA). La souris blanche est la race albinos de la Souris domestique *Mus musculus*. Elle provient de l'animalerie du

CRD-SAIDAL d'EL Harrach. Nous avons utilisé 130 souris, d'un poids de 20 g chacune.

- Rat Wistar : Ce sont des rats d'élevage qui sont très utilisés par les laboratoires. Leur facilité d'élevage permet de les faire reproduire en grand nombre. Les rats utilisés proviennent de l'animalerie du CRD-SAIDAL d'EL Harrach. Nous avons utilisé 48 rats, d'un poids égal à 250 g chacun.



Figure 2.1 : Souris NMRI
(Originale)



Figure 2.2 : Rat WISTAR
(Originale)

2.1.1.3. Matériel bactériologique

Les souches utilisées sont au nombre de neuf (9). Elles proviennent du laboratoire de microbiologie du CRD- SAIDAL d'El Harrach et sont : *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsielle pneumonia*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2. Méthodes

✓ Lieux d'expérimentation

Nos expérimentations ont été réalisées sur une durée d'une année, de février 2010 à février 2011. Elles ont été effectuées au niveau :

- Laboratoire de la post-graduation « Biotechnologie Végétale » du département de biologie de l'université Saad Dahlab de Blida.
- Laboratoires de substances naturelles, microbiologie et de pharmacotoxicologie du CRD-SAIDAL d' El Harrach.
- Laboratoire d'analyse physico-chimique du biotique de groupe SIDAL.

- Laboratoire d'histologie de l'hôpital PARNE du Bâche Djarah.
- Laboratoire de chimie organique de l'université Houari Boumediene de Bab El Zouar et du groupe Moubydal.

2.2.1. Identification botanique de la plante

Pour l'identification nous avons procédé comme suit :

2.2.1.1. Aspect macroscopique : La plante récoltée a été identifiée au niveau des laboratoires de biologie végétale du département et de botanique du département d'agronomie (Université Saad Dahlab de Blida).

2.2.1.2. Aspect microscopique

Observation à la loupe :

- ✓ La fleur : le nombre de pétales, de sépales et d'étamines a été comptabilisé.
- ✓ La forme des feuilles et celle des baies ont été observées.

2.2.1.3. Technique histologique pour la localisation des lieux de sécrétion de la plante

L'étude histologique est effectuée par l'observation en microscope photonique.

Des coupes histologiques de la feuille et du pétiole ont été réalisées au niveau du laboratoire d'histologie de l'hôpital PARNE du Bâche Djarah. L'étude histologique est basée sur la réalisation des coupes au microtome des organes végétaux inclus dans la paraffine. Elle nécessite 3 étapes fondamentales :

- Fixation des organes ;
- Inclusion des organes dans la paraffine ;
- Coloration des coupes.

- Fixation des organes

Le but de la fixation histologique est d'immobiliser les structures, de les conserver et de permettre la confection des préparations permanentes.

Le rôle d'un liquide fixateur est de maintenir la pièce prélevée dans un état aussi proche que possible de la morphologie in vivo et de permettre l'observation au microscope [85].

Pour la fixation, nous avons utilisé le mélange formol alcool, acide acétique (FAA : 8v/1v/1v).

Un passage sous vide dans le dessiccateur (appendice C) pendant une heure est important et obligatoire. Il est nécessaire car il permet une meilleure pénétration du fixateur dans les tissus, tout en éliminant l'eau des cellules (organes), et éviter ainsi une désorganisation des structures.

Le temps de fixation est de 24h à 48 h selon la taille et la consistance des organes à fixer.

Après fixation, les organes sont trempés dans l'éthanol 70°. Cette opération assure une bonne conservation des organes pendant plusieurs mois (la dilution de l'alcool est préparée selon le tableau de Gay-Lussac (appendice E).

- Inclusion des organes dans la paraffine

Cette étape nécessite une déshydratation progressive des pièces à l'éthanol, puis une imprégnation par le toluène, avant l'inclusion des organes dans la paraffine fondue (appendice C).

- ✓ Déshydratation

C'est le traitement par l'éthanol de concentration progressivement croissante, utilisée pour amorcer l'extraction de l'eau ou autres produits [85].

La déshydratation consiste à mettre les organes dans des bains d'éthanol durant d'une heure. Elle est réalisée comme suit :

- Ethanol 95° pendant 1 heure ;
- Ethanol 95° pendant 1 heure ;
- Ethanol 100° pendant 1 heure ;
- Ethanol 100° pendant 1 heure ;
- Ethanol 100° pendant 1 heure ou 1 nuit.

✓ Imprégnation

Cette étape permet d'éliminer toute trace d'éthanol, et cela pour une meilleure pénétration de la paraffine dans les tissus. L'imprégnation par le toluène (hydrocarbure benzénique) est recommandée pour la rapidité de sa pénétration. Celle-ci se traduit par un éclaircissement des pièces [85].

L'imprégnation se déroule en plongeant les fragments d'organes dans :

- Toluène + alcool (1V /1V) pendant 30 mn ;
- Toluène pur pendant 1 heure ;
- Toluène pur pendant 1 heure ;
- Toluène pur pendant 1 heure ;
- Toluène + paraffine fondue (1V /1V) pendant 30 mn de 58 °C à 60°C ;
- Paraffine pendant 1 heure de 58 °C à 60°C ;
- Paraffine pendant 1 heure de 58 °C à 60 °C ;
- Paraffine pendant 1 nuit ou plus de 58 °C à 60 °C.

✓ Inclusion à la paraffine

Introduite en technique histologique par KLEBS, l'inclusion représente le moyen le plus utilisé parmi les procédés d'inclusion . Les caractères physiques (la plasticité, et la viscosité), de la paraffine conditionnent la qualité des inclusions et des coupes [85].

L'inclusion se fait à la paraffine pure qui est coulée à chaud 65 °C (température de fusion de la paraffine) dans des moules.

Le moule est constitué de deux accessoires : un support métallique avec un diamètre variable selon la taille de l'échantillon à couper et des cassettes en plastique permettant l'inclusion de l'organe dans la paraffine.

Ce système de cassettes consiste à remplir les moules métalliques de paraffine neuve fondue, dans laquelle on dépose délicatement l'échantillon. Ensuite on installe les cassettes identifiées sur les moules de manière à ce que cette paraffine pénètre dans les perforations des cassettes. Le durcissement se fait à l'air libre et à température ambiante, ou dans le réfrigérateur pendant 10 mn.

On obtient des blocs où les fragments sont parfaitement inclus. Le passage à l'étape suivante nécessite une heure d'attente au minimum.

- Confection des coupes et coloration

Les organes inclus dans la paraffine sont débités en coupes séries d'une épaisseur de 7 à 10 μm à l'aide d'un microtome manuel (LEICA RM 2125 RT).

Les rubans de coupes réalisées sont placés sur des lames propres passées préalablement dans de l'éthanol 95°C puis séchées à l'aide d'un papier hygiénique. Les lames sont ensuite numérotées avec un diamant puis étalées par une eau gélatineuse (0.1g de gélatine en poudre dans 100 ml d'eau distillée).

Les préparations ainsi réalisées sont installées sur une plaque chauffante réglée à 40°C afin d'étaler les coupes en évitant leur plissement (appendice C).

- ✓ Déparaffinage

Le déparaffinage est une étape qui précède la coloration. Il consiste à éliminer la paraffine des tissus pour faciliter la pénétration des colorants.

Cette étape est assurée par trois bains successifs dans le toluène :

- Un bain de toluène pur pendant 15 mn sur plaque chauffante ;
- Un bain de toluène pur pendant 10 mn sur plaque chauffante ;
- Un bain de toluène pur pendant 10 mn sur plaque chauffante.

✓ Réhydratation

La réhydratation a pour but de préparer les coupes à l'action du colorant. Elle consiste à faire passer les coupes dans :

- Trois bains successifs d'alcool absolu pendant 10 mn ;
- Un bain d'alcool pure/formol (4V /1V) pendant 5 mn.

Les coupes sont ensuite rincées à l'eau courante.

✓ Coloration

Nous avons utilisé la double coloration carmino-vert selon le protocole suivant :

- Vert de méthyle (10 mn) : les coupes sont uniformément colorées en vert ;
- L'alcool 90°C: les coupes qui y sont disposées subissent une régression de coloration ;
- L'eau distillée : simple passage des coupes ;
- Carmin aluné (10 à 15 mn) : colore les parois squelettiques des cellules végétales demeurées cellulosiques en rose alors que le vert de méthyle teinte les parois lignifiées, cutinisées et subérifiées en vert, ou bleu vert ou en violet suivant le degré de modification de la paroi colorée ;
- L'eau distillée pour un dernier lavage, afin d'éliminer l'excès de coloration ;
- Déshydratation (par séchage rapide sur une plaque chauffante) et montage des lamelles avec le baume de Canada [86].

2.2.2. Détermination du taux d'humidité

✓ Principe

Le taux d'humidité est la quantité d'eau en millilitre contenue dans une quantité connue de matériel végétal. Elle est déterminée à l'aide de l'appareil DEAN et STARK (appendice C).

✓ Mode opératoire

20 g de matériel végétal sont introduits dans un ballon volumétrique de 500 ml relié par un tube de raccordement à un réfrigèrent à reflux et à un tube collecteur gradué, et qui est rempli au 2/3 de son volume par du toluène (C₇ H₈). Sous l'effet du chauffage le solvant ainsi que l'eau dans le végétal s'évaporent, dans le réfrigérant les vapeurs se condensent en gouttelettes qui s'accumulent dans le tube gradué (eau en bas et solvant en haut), l'opération dure jusqu'au moment où le niveau d'eau dans le tube gradué devient constant et le solvant devient limpide correspondant à 24 heures.

Après refroidissement, le volume d'eau est lu et le taux d'humidité est calculé comme suit :

$$TH = V \cdot 100 \cdot 0,998 / M$$

TH : Taux d'humidité.

V : Volume d'eau lu dans le tube gradué.

M : Masse végétale fraîche utilisée.

0,998 : Densité de l'eau.

2.2.3. Etude des composés volatiles

2.2.3.1. Cinétique d'extraction

La cinétique se définit comme étant l'évolution du rendement en fonction du temps (appendice C).

✓ Appareillage

L'extraction est une hydrodistillation, constitué de quatre parties principales : le chauffe ballon, le ballon volumétrique, le réfrigérant et le récipient en verre.

✓ Mode opératoire

La matière végétale 100 g de (feuille fraîche) est introduite dans un ballon volumétrique de 2 litres. Celui-ci est rempli d'eau jusqu'aux 2/3 de son volume soit 1.33 L.

Le ballon est mis dans une chauffe ballon. Les vapeurs qui se dégagent sont chargées d'huiles essentielles et passent dans le réfrigérant où la température avoisine les 18 °C à 19 °C. Ainsi, la vapeur se condense en gouttelettes qui seront récupérées dans des Erlen-meyer à cols rodés en fonction du temps pendant 4 heures.

Le distillat obtenu est un mélange d'huile essentielle et d'eau de condensation. Pour séparer les deux phases nous procédons à une extraction liquide /liquide à l'aide d'un solvant. Dans une ampoule à décanter, nous mettons le distillat et nous ajoutons de l'éther diéthylique.

Nous obtenons deux phases distinctes non miscibles. Dans l'ampoule on observe deux phases distinctes : L'une des phases étant aqueuse et plus dense, occupe la partie inférieure tandis que l'autre, moins dense est organique, occupe la partie supérieure. Cette dernière est constituée d'huile essentielle dissoute dans de l'éther diéthylique. Dans le cas où la séparation n'est pas claire, nous ajoutons, à l'aide d'une spatule, une petite quantité de NaCl.

L'huile essentielle ainsi récupérée est filtrée sur un papier filtre contenant du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) pour l'élimination des molécules d'eau susceptibles d'être encore contenues dans cette phase. Cette dernière est récupérée dans des tubes à essai préalablement pesés pour avoir le poids des tubes vides (P_{tv}). Après l'évaporation totale du solvant, les tubes sont à nouveau pesés pour avoir le poids des tubes pleins (P_{tp}). La différence entre (P_{tv}) et (P_{tp}) nous donnera le poids de l'huile essentielle, pour le calcul du rendement.

Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R \ \% = M_{HE} \cdot 100 / M_S \quad \text{avec } M_S = M_V (1-H)$$

R %: rendement en pourcentage

M_{HE} : masse de l'huile essentielle

M_S : masse du végétal

M_V : masse du végétal utilisé dans l'hydrodistillation

2.2.3.2. Extraction par hydrodistillation

Afin d'étudier les activités biologiques, pharmacologiques et les caractéristiques physico-chimiques, il est nécessaire de récupérer une grande quantité d'HE.

Dans notre cas, nous avons pu obtenir des huiles essentielles en utilisant un extracteur semi industriel, dont le mode d'extraction est expliqué ci –dessous :

✓ Appareillage

L'extraction est un hydrodistillateur, utilisant un extracteur pilote « Alambic semi industriel ». Il est constitué de quatre parties : l'alambic contenant le végétal, l'alambic contenant le réfrigérant, la corbeille, et l'essencier (appendice C).

✓ Mode opératoire

Pour obtenir l'huile essentielle, les feuilles fraîches sont assemblées dans la corbeille qui est remise dans l'alambic.

Grâce à un système de chauffage électrique, la vapeur d'eau traverse la matière végétale. Cette vapeur chargée d'huile essentielle, migre vers le réfrigérant. Elle passe alors dans un alambic où circule l'eau froide en continu grâce à un système de circuit fermé, la température avoisine 12 °C à 13 °C. Ainsi, les vapeurs chargées d'huile essentielle, se condensent en liquide.

Après une heure d'extraction, la vapeur condensée obtenue conduit à deux phases :

- Une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'eau par simple décantation. La quantité d'HE obtenue est pesée pour le calcul du rendement.

L'huile essentielle est conservée au frais, dans un flacon en verre teinté, hermétiquement clos.

- Une phase aqueuse (eau aromatique ou hydrolat) qui contient une quantité non négligeable d'essence sous forme solubilisée. La récupération de cette huile est réalisée par extraction liquide-liquide avec un solvant organique (éther diéthylique). L'utilisation d'un rotavapeur permet d'éliminer l'éther et d'obtenir l'HE dissoute dans l'hydrolat.

✓ Détermination du rendement à l'échelle pilote

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction et la masse végétale traitée.

$$R_p\% = M_{HE} / M_V$$

M_{HE} : Masse de l'huile essentielle récupérée avec l'extracteur pilote.

M_V : Masse de la matière végétale traitée par l'extracteur pilote.

R_p : Rendement à l'échelle pilote.

2.2.3.3. Les analyses physico-chimiques, organoleptiques et chromatographiques de l'huile essentielle

Ces analyses nous permettent d'évaluer les propriétés organoleptiques et physicochimiques de l'HE. Elles sont effectuées selon les normes d'AFNOR [24].

- Propriété organoleptiques de l'huile essentielle et de l'hydrolat

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) de l'huile essentielle et de l'eau aromatique ont été notées.

- Mesure des indices chimiques

- ✓ Indice acide

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1 g d'huile essentielle.

Mode opératoire

Peser 2 g d'huile essentielle, ajouter 5 ml d'éthanol 95°, plus quelques gouttes de phénolphtaléine. Titrer avec du KOH alcoolique à 0.1mol/l jusqu'au virage rose de la solution. Noter le volume du KOH (appendice C).

L'indice d'acide (IA) est donné par la formule suivante :

$$IA = V \cdot C \cdot 56,11 / M$$

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

C : concentration en (mol/l) de KOH.

M : masse en (g) de la prise d'essai.

✓ Indice d'ester

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1 g d'huile essentielle.

Mode opératoire

Introduire 1 g d'huile essentielle dans un ballon en verre d'une capacité de 100 ml puis à l'aide d'une burette ajouter 25 ml de solution de KOH alcoolique (0,5mol/l) ainsi que des fragments de pierre ponce ou de porcelaine.

Adapter le réfrigérant à reflux au ballon et le placer dans un bain Marie, maintenir le ballon durant 30 minutes à partir de l'ébullition.

Laisser refroidir, démonter le tube du réfrigérant ajouter 20 ml d'eau distillée puis quelques gouttes de phénolphtaléines.

Titrer l'excès de KOH avec une solution d'HCL (0,5mol/l), nous notons le volume d'HCL qui correspond au V_1 .

Cette manipulation est menée en parallèle avec un essai blanc, en utilisant les mêmes réactifs et dans les mêmes conditions opératoires. Nous notons le volume d'HCl qui correspond au V_0 (appendice C).

L'indice d'ester (IE) est calculé par l'équation suivante :

$$IE = (28,05/M) (V_0 - V_1) - IA$$

M : masse en (g) de l'huile essentielle utilisé.

V_0 : volume en (ml) de HCl utilisé pour l'essai blanc.

V_1 : volume en (ml) de HCl utilisé pour la détermination de l'indice d'ester.

- ✓ Mesure de la miscibilité à l'éthanol

Adition graduelle à une prise d'essai de l'huile essentielle, à la température de 20 °C ,d'une solution d'éthanol de titre alcoométrique convenable.

Ajouter, à l'aide de la burette, un mélange hydroéthanolique de titre alcoométrique déterminé, préalablement amené à une température de 20 °C ± 0.2 ° C, par fraction de 0.1ml, jusqu'à miscibilité complète, en agitant énergiquement après chaque addition. Lorsque le mélange est parfaitement limpide, noter le volume du mélange hydroéthanolique utilisé [24].

- Mesures des grandeurs physiques

- ✓ Densité relative à 20 ° C (d^{20})

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'une huile essentielle à 20° C, à la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20° C:

Mode opératoire

Peser à 0,001 g près un pycnomètre d'une capacité de 5 ml muni de son bouchon,.

Remplir le pycnomètre d'eau distillée, le plonger dans le bain thermostatique et attendre 30 min. Boucher le pycnomètre et essuyer l'extérieur avec un chiffon sec, le peser avec son bouchon à 0.001 g près.

Vider le pycnomètre et le nettoyer.

Effectuer la même opération pour l'HE.

La densité relative de l'huile essentielle (d^{20}) est donnée par la formule suivante :

$$d^{20} = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)$$

m_0 : masse de pycnomètre vide (g).

m_1 : masse du pycnomètre rempli d'eau (g).

m_2 : masse du pycnomètre rempli d'HE (g).

✓ Indice de réfraction

C'est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle qui est maintenue à une température constante.

Mode opératoire

Régler le réfractomètre en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée qui est de 1.333 à une température de 20 °C. Après ouverture du prisme secondaire, nous disposons 2 gouttes d'HE sur la partie centrale du prisme principal. Ensuite, nous fermons délicatement le prisme secondaire. La lecture de la mesure s'effectue à une température stable.

L'indice de réfraction IR, à la température de référence t, est donné par l'équation suivante :

$$IR = n_t' + 0,00004 (t' - t)$$

n_t' : valeur de la lecture obtenue à la température t'

t' : température à laquelle la mesure est effectuée

t : température de référence (20°C).

✓ Pouvoir rotatoire

La mesure d'angle de rotation a été faite par un polarimètre automatique de type SCHMIDT HAENSCH, il suffit d'insérer le tube d'observation (rempli d'un échantillon liquide) dans la cavité pour échantillon et d'appuyer sur le bouton START.

Les valeurs des mesures sont affichées de façon digitale en gros caractères et faciles à lire sur un écran couleur (appendice C).

- Analyses chromatographique de la fraction aromatique (HE et HY)

Les analyses chromatographiques des HE et HY ont été effectuées par CG-MS. Le type d'appareil utilisé est Hewlett Packard 6890 N couplé avec un spectromètre de masse 5973N.

Une quantité de 1µl d'HE ou d'HY diluée dans le dichlorométhane est prélevée et injectée dans l'appareillage pour déclencher les procédures d'analyse.

La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70 eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30 m × 0.25 mm). La température de la colonne est programmée de 50 °C à 250 °C à raison de 4 °C mn⁻¹. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1 ml/ mn. L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST 98 et piloté par un logiciel « HP ChemStation ». Ceci permettra l'identification des constituants aromatiques de l'HE et de l'HY.

2.2.4. Etude des composés non volatils polaires et apolaires

Les composés non volatils de la plante ont été extraits à l'aide du soxhlet (appendice C).

Principe

Le ballon est chauffé, les vapeurs du solvant passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant.

Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon provoquant alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites. Le solvant contenu dans le ballon s'enrichit donc progressivement en composés solubles.

Le cycle peut se répéter indéfiniment, jusqu'à épuisement complet du solide, d'où l'efficacité remarquable de cette technique par rapport à la simple macération.

2.2.4.1. Extraction au soxhlet

20 g de matière végétale, soigneusement lavée et séchée, sont introduites dans la cartouche en papier filtre qui est placée dans le soxhlet.

250 ml d'éther de pétrole sont introduits dans un ballon à col rodé à fond plat et placé dans un bain Marie porté à ébullition.

Après une douzaine de siphonages, nous récupérons le ballon contenant le solvant enrichi en substances solubles (fraction lipidique), et la matière végétale contenue dans la cartouche de papier filtre que l'on nommera marc. Ce dernier sera séché à l'air libre.

Le marc récupéré et séché est réintroduit dans une seconde cartouche et soumis à une seconde extraction au soxhlet en utilisant du méthanol afin de récupérer les substances polaires solubles dans les alcools ou autres solvants polaires.

Après une douzaine de siphonages, nous récupérons le marc et le ballon contenant le solvant ainsi que la fraction polaire de la plante (sucres, flavonoïdes, tanins, divers glycosides)

Les résidus secs des deux extractions, à l'éther de pétrole et au méthanol, sont obtenus par évaporation du solvant grâce à un évaporateur rotatif.

Les ballons contenant les résidus secs sont pesés avant et après extraction afin de déterminer la teneur respective de chacune des deux résidus secs.

2.2.4.2. Analyse de la fraction méthanolique par CCM

Le résidu méthanolique est soumis à une chromatographie sur couche mince, sur des plaques de gel de silice, dans le but de faire une caractérisation des composés.

Principe

Elle possède comme principaux avantages, la simplicité, la rapidité, et le coût modeste non négligeable.

La solution de substances à séparer est déposée sur un matériau solide, insoluble. La phase stationnaire est entraînée par une phase mobile liquide, l'éluant. La rétention des différentes substances dépend d'une part de leur nature, de leur taille, de leur structure et de leur polarité et d'autre part, de la polarité de la phase mobile et de l'activité de la phase stationnaire [87].

Condition opératoires

- Phase stationnaire : plaque de gel de silice standard : 20 cm/ 20 cm.
- Phase mobile : eau distillée/ acide acétique/butanol (5v, 1v, 4v)[88].

Des spots de 10 µl sont déposés à 1 cm du bord inférieur de la plaque.

La plaque est plongée dans une cuve en verre contenant la phase mobile, préalablement préparée. La migration se fait par capillarité. Lorsque le solvant atteint les deux tiers de la plaque, la migration est arrêtée.

Les plaques sont ensuite séchées quelques minutes à l'étuve puis vaporisées par les révélateurs adéquats :

Dans notre étude nous avons utilisé :

- Le FeCl_3 1% pour la révélation des tanins et des acides phénols ;
- Le AlCl_3 1% pour la révélation des flavonoïdes ;
- La potasse alcoolique 1% pour la révélation des coumarines.
-

2.2.4.3. Etude phytochimique de l'infusé de *Laurus nobilis*

C'est une technique qui permet de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physico-chimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques.

✓ Dosage des alcaloïdes

Le réactif de Dragendorff est composé de : Iodure de potassium (KI) 60 g, nitrate de bismuth (BiNO_3) 0,85 g, acide acétique glacial (CH_3COOH) 15 ml, Chlorure de mercure (Hg_2Cl_2) 13,55 g, ammoniacque (NH_4OH) 20ml et dichlorométhane (CH_2Cl_2) 100 ml.

0.5 g de poudre sont pesés puis mélangés à 5 ml d'une solution (H_2SO_4) 10%. Le mélange obtenu est mis sous agitation et macération pendant 3 heures. Ce mélange est ensuite filtré et le volume complété avec de l'eau distillée à 5 ml. 1 ml de filtrat obtenu est placé dans un tube auquel nous ajoutons 5 gouttes du réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité rouge orangé indique la présence des alcaloïdes [89].

✓ Dosages des polyphénols

Une infusion aqueuse (5%) est réalisée (0,5 g du poudre pour 10 ml d'eau distillée) pendant 30 minutes. Le mélange est ensuite filtré et le volume ajusté à 10 ml avec l'eau distillée.

✓ Flavonoïdes

A 1 ml de l'infusion obtenue ci-dessus nous ajoutons 1 ml d'alcool-chlorhydrique, 1ml d'alcool isoamylique puis quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration:

- Rose orangé indique la présence de flavones;
- Rose violacé indique la présence de flavanones;
- Rouge indique la présence de flavonols et flavanols [89].

✓ Tanins

A 1 ml de l'infusion (5 %) est ajouté 200 µl de FeCl₃ (1%). En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu - noir.

La différenciation entre les tanins galliques et catéchiques se fait par le réactif de Stiasny (méthanal-acide chlorhydrique concentré 2 : 1 v/ v).

- Tanins catéchiques

A 1 ml de l'infusion obtenue ci-dessus, nous ajoutons 0,5 ml de réactif de Stiasny. Le mélange obtenu est chauffé au bain-Marie à 90 °C pendant 15 minutes. L'apparition d'un précipité montre la présence des tanins catéchiques.

- Tanins galliques

Pour révéler les tanins galliques, nous avons filtré le mélange précédemment chauffé et prélevé 0,5 ml du filtrat. Le filtrat est ensuite saturé avec de l'acétate de sodium, à ce mélange il est ajouté 100 µl d'une solution de FeCl₃ à 1 % .

Le développement d'une teinte bleu-noire indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny [89].

✓ Anthocyanines (leucoanthocyanes)

A 1 ml de l'infusion (5 %) est ajouté 1 ml d'alcool-chlorhydrique, 1ml d'alcool isoamylique puis le mélange est chauffé à reflux au bain-Marie pendant 20 minutes. l'apparition d'une coloration:

- Rouge-cerise violacé indique la présence de leucoanthocyane;
- Brun-rouge indique la présence des catéchols.

✓ Dosage des saponosides

0,5 g de poudre sont mélangés à 10 ml d'eau distillée puis portés à ébullition pendant 5 minutes. Le mélange est ensuite refroidi et agité vigoureusement pendant 2 minutes. La formation d'une mousse plus ou moins importante indique la présence de saponosides.

2.2.5. Etude de l'activité antimicrobienne de *Laurus nobilis*

- Souches microbiennes étudiées

Des souches microbiennes référencées ATCC (American Type Culture Collection) ont été utilisées (Tableau 2.1). Les souches microbiennes ont été choisies pour leurs fréquences élevées dans les contaminations humaine et animal

Tableau 2.1 : Les souches microbiennes testées.

Souches de référence	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 9372
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 4157
<i>Entérocooccus faecuim</i>	ATCC 6569
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	ATCC 4617
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352
<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433
<i>Saccharomycs cerevisiae</i>	ATCC 2601

- Milieux de cultures et produits actifs

Deux milieux de culture ont été utilisés :

- Muller –Hinton pour les bactéries ;
- Sabouraud pour les champignons.

Lors de nos essais, nous avons testé aussi bien l'activité antimicrobienne de l'HE, HY, extrait méthanolique (1%) que l'infusion (10%) de *Laurus nobilis*.

2.2.5.1. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne

Aromatogramme

- Principe

La technique consiste à utiliser des disques de papier absorbants stériles (9 mm de diamètre) imprégnés des différents produits à tester. Les disques sont déposés à la surface de la gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. La diffusion des produits testés à partir du disque placé en surface sur la gélose détermine un gradient de concentration. Les micro-organismes croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration du produit testé suffisante pour inhiber leur croissance. Après incubation autour des disques, nous observons une zone circulaire claire indemne de colonies, c'est la zone d'inhibition.

Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante [90].

Cette méthode est tirée du principe du titrage des antibiotiques « Pharmacopée Européenne 2002 », et son application pour les huiles essentielles a été validée par le département de microbiologie du C.R.D Sidal. Elle a été aussi utilisée par certains auteurs (DEANS et RITCHIE ; ZAIKA PATTNAIK et *al.* ; SIVROPOULOU et *al.* ; SMITH-PALMER et *al.* ; LISBALCHIN et *al.* ; BURT et REINDERS ; OKOGUN et *al.* ; FALEIRO et *al.*) [91][92][93][94][95][96][97] [98][99].

- Protocole expérimental

- ✓ Préparation de l'inoculum

Les suspensions bactériennes ont été effectuées en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées et identiques d'une culture jeune de 18 h pour les bactéries et 48 h pour les levures, les mettre ensuite dans 9 ml d'eau physiologique stérile, puis agiter au vortex pendant quelques secondes.

La lecture de la densité optique est effectuée en utilisant un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm. La DO doit être comprise entre 0.22 et 0.32 pour les bactéries sauf pour *Staphylococcus aureus* qui doit être comprise entre 0.3 et 0.4. La DO optimale pour les levures doit être comprise entre 2 et 3. Ces différentes DO correspondent à une concentration optimale de 10^7 à 10^8 germes/ml.

✓ Préparation des milieux de culture

Verser aseptiquement les milieux gélosés déjà liquéfiée dans un bain Marie (Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures) sur des boites de Pétri à raison de 15 ml par boîte.

Laisser solidifier sur la paillasse.

✓ Préparation de la deuxième couche du milieu

Pour chacune des souches remplir des flacons stériles avec 50 ml de Muller-Hinton pour les bactéries, et avec 50 ml de Sabouraud pour les levures. Nous avons réalisé 3 répétitions pour chaque concentration ;

Ensemencer les milieux de culture avec 200 μ l de chaque suspension et ;

Transvaser rapidement 4 ml de chaque milieu inoculé en deuxième couche sur la surface des boîtes contenant déjà la première couche de gélose ;

Etaler rapidement la seconde en faisant pivoter la boîte sur elle même pour avoir une surface uniforme.

Enfin laisser solidifier sur la paillasse.

✓ Dépôt des disques

Les disques en cellulose stérile, imbibées d'une quantité de produit à tester, sont déposés sur la surface de la gélose, puis laisser diffuser sur la paillasse pendant 30 minutes. L'incubation s'effectue à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25 °C pendant 48h pour les levures.

✓ Lecture

La mesure du diamètre des zones claires autour des disques (zone d'inhibition) se fait à l'aide d'un pied à coulisse.

2.2.5.2. Etude quantitative de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle

Cette étude nous permettra de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), les concentrations minimales bactéricides (CMB) et les concentrations minimales fongicides (CMF) des souches testées.

• Détermination des CMI

Principe

Cette méthode a comme principe d'effectuer des dilutions de l'huile essentielle dans le milieu gélose solide MH pour les bactéries et SAB pour les levures, puis inoculer ce milieu avec les souches testées. Ces différentes dilutions nous permettent de définir la plus faible concentration qui inhibera la croissance microbienne.

Protocole expérimental

✓ Préparation de l'inoculum

A partir de jeunes cultures, nous réalisons des suspensions de 10^8 germes/ml pour chaque souche testée.

Réaliser une série de dilution allant de 10^{-1} à 10^{-6} .

✓ Préparation de la gamme de dilution de l'huile essentielle

Les différentes étapes sont les suivantes :

Liquéfaction de 200 ml du milieu à 95°C dans un bain Marie et lui additionner 1 ml de Tween80 ;

Préparation d'une dilution de 2% de l'HE à tester en diluant 1 ml de l'huile essentielle obtenue dans 50 ml du milieu ;

Bien homogénéiser le 1^{er} flacon puis verser 25 ml de son contenu dans un autre flacon, ajuster à 50 ml de milieu pour avoir la dilution 1%. Cette opération est poursuivie jusqu'à obtention de la dilution 0.03% ;

A partir de chaque dilution ainsi obtenue, nous versons 20 ml dans chaque boîte de Pétri ;

Laisser solidifier sur la paillasse ;

Partager les boîtes en deux parties :

- ✓ Ensemencer une partie par spotage à l'aide d'une micro-seringue avec 3 µl de chaque suspension microbienne de la dilution 10^{-4} .
- ✓ Pour la détermination des CMB et CMF, nous déposons les disques cellulosesques imbibés avec 3 µl des suspensions microbiennes de la dilution 10^{-4} .

Laisser les boîtes de Pétri, 30 minutes pour la diffusion, sur la paillasse;

Incuber à 37 °C pendant 24 h pour les bactéries et à 25 °C pendant 48 h pour les levures ;

- ✓ Lecture

On parlera de CMI la ou aucune croissance visible n'est constatée au niveau des spots tout en sachant que la présence d'une ou deux colonies n'est pas prise en considération.

- Détermination des CMB/CMF

Après repérage des disques ou aucune croissance n'est présente lors de la détermination des CMI, l'expérimentation se poursuit en vue de la détermination des CMB et CMF.

Elle consiste à déterminer la plus faible concentration de l'HE où aucune subcroissance microbienne n'est visible qu'après subculture dans un milieu indemne de l'HE à 37 °C pendant 24h pour les bactéries et 25 °C pendant 48h pour les levures.

✓ Protocole expérimental

Liquéfier les milieux MH pour les bactéries et SAB pour les levures dans un bain Marie à 95 °C;

Couler les boîtes de Pétri ;

Laisser solidifier sur la paillece;

Avec une pince stérile, nous prélevons aseptiquement les disques correspondant aux concentrations de l'HE où aucune croissance n'est observée pour chaque souche lors de la détermination des CMI ;

On replace les disques dans des boîtes de Pétri déjà préparées ;

Incuber à 37 °C pendant 24h pour les bactéries et à 25 °C pendant 48h pour les levures ;

✓ Lecture

On effectue une lecture à l'œil nu, la CMB et CMF sera la où aucune subcroissance d'une souche donnée n'est constatée après subculture.

2.2.6. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante a été évaluée in vitro par la méthode de piégeage du radical DPPH. Le pouvoir antioxydant des produits testés a été comparé à un ou plusieurs antioxydants de synthèse (Quercétine et Rutine) et un antioxydant naturel : le tocophérol.

- Mesure de l'activité antiradicalaire (DPPH)

Principe

La capacité de céder des hydrogènes par les huiles essentielles ou par certains composés purs, est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution éthanolique contenant le radical libre DPPH (1,1 –Diphenyl-2-picrylhydrazyl).

Mode opératoire

Le test utilisant le DPPH a été réalisé en suivant la méthode décrite par BURITS et BUCAR , où 25 µl de chacune des dilutions des produits testés sont mélangés dans la cellule placée dans la cuvette du spectrophotomètre avec 975 µl d'une solution éthanolique de DPPH. Après une période d'incubation de 30 minutes, à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue à 517nm. Les expériences sont réalisées en 3 répétitions. Le pourcentage de l'activité (A%) est donné par la formule suivante :

$$A\% = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{éch}}) / A_{\text{blanc}}] \cdot 100$$

Où :

A_{blanc} : Absorbance du témoin (DPPH) au temps zéro avant addition de l'échantillon à tester ;

$A_{\text{éch}}$: Absorbance de l'échantillon testé.

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures \pm écart - type. Le paramètre IC_{50} (concentration équivalente à 50 % de DPPH perdu) est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50 % de l'activité de DPPH (couleur). Ces IC_{50} sont déterminés graphiquement pour les deux testes séparés. L'abscisse représente la concentration de l'extrait et l'ordonnée l'activité anioxydante en pourcentage. La valeur de chaque IC_{50} exprime la concentration de l'extrait exigée pour réduire 50 % de DPPH en solution.

2.2.7. Etude de la toxicité de *Laurus nobilis*

La toxicité de *Laurus nobilis* a été testée conformément au protocole standardisé par le laboratoire de pharmacotoxicologie du C.R.D.-SAIDAL.

Principe

Il consiste en l'administration de dose du produit à analyser à plusieurs lots d'animaux répartis d'une manière homogène. Les animaux de chaque lot reçoivent la même dose du produit. Les observations des effets toxiques du

produit sur les animaux ainsi que le nombre de mortalité, sont récupérés tous les jours durant les 14 jours qui suivent l'administration.

Les animaux qui meurent pendant l'essai sont autopsiés (appendice C).

Un essai limite peut être effectué en administrant une dose au moins égale à 2000 mg /Kg de poids corporel à un lot de 05 mâles et 05 femelles, aucune anomalie ni mortalité ne doit survenir dans les 14 jours qui suivent l'administration.

Mode opératoire

- Mettre les animaux à jeun la veille du test ;
- Le lendemain, administré aux animaux de différents lots une dose unique du produit à tester par voie orale comme suit :

Pour l'huile essentielle :

- ✓ Lot N° 01 : composé de dix souris (5 mâles et 5 femelles de 20 g) à qui nous avons administré par voie orale 0.5 ml d'HE à 2 g/Kg.
- ✓ Lot N° 02 : composé de dix souris (5 mâles et 5 femelles de 20 g) à qui nous avons administré par voie orale 0.5 ml d'HE à 1g/Kg.
- ✓ Lot N° 03: composé de dix souris (5 mâles et 5 femelles de 20 g) à qui nous avons administré par voie orale 0.5 ml d'HE à 0.5 g/Kg.
- ✓ Lot N° 04: composé de dix souris (5 mâles et 5 femelles de 20 g) à qui nous avons administré par voie orale 0.5 ml d'HE à 0.25 g/Kg.
- ✓ Lot N° 05 : composé de dix souris (5 mâles et 5 femelles de 20 g) à qui nous avons administré par voie orale 0.5 ml d'HE à 0.125 g/Kg.
- ✓ Lot N° 06 : composé de dix souris (5 mâles et 5 femelles de 20 g) à qui nous avons administré par voie orale 0.5 ml d'HE à 0.0625 g/Kg.

Pour l'hydrolat :

- ✓ Lot N° 01 : composé de dix souris (5 mâles et 5 femelles de 20 g) à qui nous avons administré par voie orale 0.5 ml d'HY à 2 g/Kg.
- ✓ Lot N° 02 composé de dix souris (5 mâles et 5 femelles de 20 g) à qui nous avons administré par voie orale 0.5 ml d'HY à 5 g/Kg.

Pour l'infusion :

- Lot N° 01 : composé de dix souris (5 mâles et 5 femelles de 20 g) à qui nous avons administré par voie orale 0.5 ml d'infusion à 2 g/Kg.
- Lot N° 02 composé de dix souris (5 mâles et 5 femelles de 20 g) à qui nous avons administré par voie orale 0.5 ml d'infusion à 5 g/Kg.

- Priver de nourriture les animaux pendant 3 à 4 heures après l'administration du produit ;

- Observer les animaux de façon systématique, une attention particulière sera apportée aux différents comportements tels que : tremblements, convulsion, salivation, diarrhées, léthargie, sommeil et coma ;

- Les souris ont été mises sous surveillance pendant 14 jours.

✓ DL50

La dose létale 50 (DL50) définie comme l'estimation statistique d'une dose unique de produit supposée tuer 50% des animaux en expérimentation [100]. Elle est généralement exprimée en milligrammes ou en grammes par kilogramme de poids corporel [101].

Pour une substance administrée par voie orale on considère que :

- Si la DL50 est $\leq 5 \text{ mg.kg}^{-1}$, le produit est extrêmement toxique ;
- si la DL50 est comprise entre 5 et 50 mg.kg^{-1} , le produit est très toxique ;
- si la DL50 est comprise entre 50 et 500 mg.kg^{-1} , le produit est toxique ;
- si la DL50 est comprise entre 0.5 et 5 g.kg^{-1} , le produit est peu toxique ;
- si la DL50 est $\geq 5 \text{ g.kg}^{-1}$, le produit n'est pas toxique ou l'est très peu

[100].

✓ Détermination de la DL₅₀

$$DL_{50} = DL_{100} - \frac{\sum a b}{n}$$

n : Nombre moyen d'animaux par lot.

b : moyen des morts de deux doses successives.

a : différence entre deux doses successives .

2.2.8. Activité anti-inflammatoire

La technique utilisée est de l'œdème plantaire à la carragénine selon Levy.

Principe

L'injection de la carragénine (Mucopolysaccharide sulfaté extrait d'une algue) sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche de la souris provoque une réaction inflammatoire qui peut être réduite par un anti-inflammatoire.

Cette étude permet de comparer la réduction de l'œdème plantaire après administration du produit anti-inflammatoire à tester et du produit de référence correspondant.

Mode opératoire

Constituer 9 lots de 5 souris chacun :

- Un lot témoin, (T)
- Un lot essai 1, (HE0)
- Un lot essai 2, (HE1 : 625 mg/kg)
- Un lot essai 3, (HE2 : 1000 mg/kg)
- Un lot essai 4, (HY1 :2 g/kg)
- Un lot essai 5, (HY2 :5 g/kg)
- Un lot essai 6, (Inf1 :2 g/kg))
- Un lot essai 7, (Inf2 : 5 g/kg)
- Un lot référence (Ibuprofène), (Réf : 200 mg/kg).

- Mettre les souris à jeun la veille du test ;

- à T= 0

Administrer aux cinq lots les suspensions suivantes, par voie intra-gastrique :

- Lot (T) : chaque souris reçoit 0.5 ml d'eau distillé ;
- Lot (E₁) : chaque souris reçoit 0.5 ml d'HE0 ;
- Lot (E₂) : chaque souris reçoit 0.5 ml d'HE1 ;

- Lot (E₃) : chaque souris reçoit 0.5 ml d'HE2 ;
- Lot (E₄) : chaque souris reçoit 0.5 ml d'HY1 ;
- Lot (E₅) : chaque souris reçoit 0.5 ml d'HY2 ;
- Lot (E₆) : chaque souris reçoit 0.5 ml d'Inf1 ;
- Lot (E₇) : chaque souris reçoit 0.5 ml d'Inf2 ;
- Un lot (Réf) : chaque souris reçoit 0.5 ml de Réf.

- à T= 30 minutes :

Tous les animaux reçoivent une injection de 0.025 ml de carragénine au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche.

- à T= 4h30 minutes :

Toutes les souris sont sacrifiées après une inhalation prolongée par l'éther.

Les pattes postérieures gauches et droites sont coupées à la hauteur de l'articulation tarso-crurale, et sont pesées sur une balance analytique, avec une précision au millième de gramme près du poids (appendice C).

- ✓ Calcul du pourcentage d'augmentation de l'œdème

Il permet de mettre en évidence la formation de l'œdème, il est défini par :

$$\% \text{ œdème} = (P_1 - P_0) / P_0 \cdot 100$$

P₀ : poids de la patte postérieure droite ;

P₁ : poids de la patte postérieure gauche.

- ✓ Calcul du pourcentage d'inhibition

Il permet la mise en évidence de l'activité anti-inflammatoire :

$$\% \text{ réduction} = (X \text{ témoin} - X \text{ essai}) / X \text{ témoin} \cdot 100$$

X témoin : moyenne de l'œdème pour le témoin ;

X essai : moyenne de l'œdème pour l'essai.

2.2.9. Activité antalgique (Writhing test)

Principe

L'injection de l'acide acétique par voie intra péritonéale chez la souris provoque une réaction douloureuse (appendice C).

Cette douleur se manifeste par des mouvements de torsion de l'abdomen, avec étirement des pattes postérieures (crampes). Elle peut être réduite par un produit antalgique.

Cette étude permet de comparer la réduction du nombre de crampes après administration du produit antalgique et du produit de référence correspondant.

Mode opératoire

On constituer huit lots de 5 souris chacun :

- Lot témoin, (T)
- Lot essai 1, (HE1 : 625 mg/kg)
- Lot essai 2, (HE2 : 1000 mg/kg)
- Lot essai 3, (HY1 : 2 g/kg)
- Lot essai 4, (HY2 : 5 g/kg)
- Lot essai 5, (Inf1 : 2 g/kg))
- Lot essai 6, (Inf2 : 5 g/kg)
- Lot référence (Ibuprofène), (Réf : 200 mg/kg)

La veille du test les souris sont soumises à un jeun ;

Les souris sont numérotées, au niveau de la queue par des traits horizontaux. Chaque trait représente un nombre ;

Au temps T_0

Aux huit lots on administré les solutions suivantes, par voie orale :

- Lot (T) : chaque souris reçoit 0.5 ml d'eau distillée ;
- Lot (E₁) : chaque souris reçoit 0.5 ml d'HE1 ;
- Lot (E₂) : chaque souris reçoit 0.5 ml d'HE2 ;
- Lot (E₃) : chaque souris reçoit 0.5 ml d'HY1 ;

- Lot (E₄) : chaque souris reçoit 0.5 ml d'HY2 ;
- Lot (E₅) : chaque souris reçoit 0.5 ml d'Inf1 ;
- Lot (E₆) : chaque souris reçoit 0.5 ml d'Inf2 ;
- Un lot (Réf) : chaque souris reçoit 0.5 ml de Réf.

Au temps T₀ + 30 minutes

On injecte à toutes les souris, 0.2 ml d'une solution d'acide acétique à 1% par voie intra péritonéale sous un volume de 0.2 ml par souris.

Au temps T₀ + 35 minutes

On fait le comptage de crampes par observation directe des souris séparées chacune dans une cage. La durée de l'observation est de 10 minutes.

✓ Calcul du pourcentage de protection

- Les moyennes arithmétiques des crampes (X) sont calculées pour chaque lot;

- Le pourcentage de réduction des crampes (% de protection) chez les souris traitées en comparaison aux témoins est calculé, par la formule suivante :

$$\% \text{ de protection} = \frac{(X \text{ du lot témoin} - X \text{ du lot essai})}{X \text{ du lot témoin}} \times 100$$

2.2.10. Activité diurétique

Principe

Le principe de l'étude consiste à mesurer l'excrétion urinaire chez les rats soumis à une surcharge saline.

Mode opératoire

Constituer 9 lots de 5 rats chacun

- Lot témoin, (T)
- Lot essai 1, (HE1 : 625 mg/kg)
- Lot essai 2, (HE2 : 1000 mg/kg)
- Lot essai 3, (HY1 : 2 g/kg)
- Lot essai 4, (HY2 : 5 g/kg)
- Lot essai 5, (Inf1 : 2 g/kg)
- Lot essai 6, (Inf2 : 5 g/kg)
- Lot essai 7, (Inf3 : 10 g/kg)
- Lot référence Furosémide, (Réf : 20 mg/kg)

Les rats sont numérotés, au niveau de la queue par des traits horizontaux. Chaque trait représente un nombre.

Les rats de l'expérimentation sont privés de nourriture et de boisson 18 heures avant le test ;

Administrer aux 9 lots les solutions suivantes ;

- Lot témoin (T) : chaque rat reçoit 50 ml/Kg de solution physiologique par voie orale ;
- Lot essai 1 (HE1) : chaque rat reçoit 50 ml/Kg d'HE à une dose de 625 mg/kg par voie orale ;
- Lot essai 2 (HE2) : chaque rat reçoit 50 ml/Kg d'HE à une dose de 1000 mg/kg par voie orale ;
- Lot essai 3 (HY1) : chaque rat reçoit 50 ml/Kg d'HY à une dose de 2 g/kg par voie orale ;

- Lot essai 4 (HY2) : chaque rat reçoit 50 ml/Kg d'HY à une dose de 5 g/kg par voie orale ;
- Lot essai 5 (Inf1) : chaque rat reçoit 50 ml/Kg d'infusé à une dose de 2 g/kg par voie orale ;
- Lot essai 6 (Inf2) : chaque rat reçoit 50 ml/Kg d'infusé à une dose de 5 g/kg par voie orale ;
- Lot essai 7(Inf3) : chaque rat reçoit 50 ml/Kg d'infusé à une dose de 10 g/kg par voie orale ;
- Lot essai référence (Réf) : chaque rat reçoit 50 ml/Kg de Furosémide à une dose de 20 mg/kg par voie orale.

Placer chaque rat dans une cage à métabolisme (appendice C).

Mesurer la quantité d'urine excrétée après l'administration du produit pendant 6 heures.

✓ Excrétion urinaire volumétrique

L'excrétion urinaire volumétrique (EUV) est donnée par la formule suivante :

$$\text{EUV} = [\text{Volume recueilli (ml)} \cdot 100] / \text{Volume administré (ml)}.$$

2.2.11. Activité sédatrice

Principe

Consiste à étudier la mobilité spontanée chez la souris préalablement traitée par un psychotrope, par l'actimètre en armoire de BOISSIER & SIMON. L'actimètre permet de mesurer la mobilité des souris. Il s'agit d'une armoire métallique de six éléments appelés actinométriques. Ces derniers forment une boîte en plexiglas qui est traversée par des rayons lumineux perpendiculaires.

Mode opératoire

Constituer 8 lots d'animaux de 6 souris :

- Lot témoin, (T) ;
- Lot essai 1, (HE1 : 625mg/kg) ;
- Lot essai 2, (HE2 : 1000mg/kg) ;
- Lot essai 3, (HY1 : 2 g/kg) ;
- Lot essai 4, (HY2 : 5 g/kg) ;
- Lot essai 5, (Inf1 : 2 g/kg) ;
- Lot essai 6, (Inf2 : 5 g/kg) ;
- Lot référence (Imipramine), (Réf : 50 mg/kg).

Mettre les souris sont soumis à un jeun la veille du test ;

Administrer aux souris des différents lots les solutions suivantes :

- Lot témoin (T) : chaque souris reçoit 0.5 ml de l'eau distillée par voie orale ;
- Lot essai 1 (HE1) : chaque rat reçoit 0.5 ml/Kg d'HE à une dose de 625 mg/kg par voie orale ;
- Lot essai 2 (HE2) : chaque rat reçoit 0.5 ml/Kg d'HE à une dose de 1000 mg/kg par voie orale ;
- Lot essai 3 (HY1) : chaque rat reçoit 0.5 ml/Kg d'HY à une dose de 2 g/kg par voie orale ;
- Lot essai 4 (HY2) : chaque rat reçoit 0.5 ml/Kg d'HY à une dose de 5 g/kg par voie orale ;

- Lot essai 5 (Inf1) : chaque rat reçoit 0.5 ml/Kg d'infusé à une dose de 2 g/kg par voie orale ;
- Lot essai 6 (Inf2) : chaque rat reçoit 0.5 ml/Kg d'infusé à une dose de 5 g/kg par voie orale ;
- Lot essai référence (Réf) : chaque rat reçoit 0.5 ml/Kg de Imipramine à une dose de 50 mg/kg par voie orale.

Après 30 minutes :

Brancher l'appareil, les 12 sources lumineuses doivent s'allumer ;

Placer une souris dans chaque cage à plexiglas pendant 30 minutes ;

Le passage de la souris devant le faisceau lumineux provoque l'enregistrement d'unité dans le totaliseur correspondant ;

Les lectures se font après 30 minutes (appendice C).

- ✓ Le pourcentage de réduction (PR) des déplacements :

$$PR = \frac{X(\text{Témoin}) - X(\text{Essai})}{X(\text{Témoin})} \times 100$$

X : moyenne du nombre de déplacements des souris

2.2.12. Etude statistique

Pour mieux valoriser nos résultats, nous avons procédé à l'analyse de la variance ANOVA. Cette méthode statistique permet de comparer les moyennes de plusieurs échantillons supposés indépendants à l'aide du logiciel SPSS 19. L'analyse de la variance est suivie par le teste NEWMAN et KEULS qui permet de distinguer les groupes homogènes en comparant les probabilités de la manière suivante :

- Si $p > 0.05$: résultat non significatif.
- Si $p < 0.05$: résultat significatif.

CHAPITRE3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Résultats de l'étude botanique de la plante

3.1.1. Etude macroscopique

L'identification de la plante s'est effectuée au niveau des laboratoires de biologie végétale (département de biologie) et de botanique (département d'agronomie) de l'université Saad Dahlab de Blida.

3.1.1.1. Feuilles

Elles sont alternes, allongées à lancéolées. Les feuilles juvéniles sont poilues (Figures 3.1 ; 3.2 ; 3.3). Les feuilles adultes ont environ 10 cm de long et 5 cm de large. Elles se terminent en 2 pointes et sont courtement pétiolées. Leur limbe est coriace, glabre, entier, légèrement ondulé et épaissi sur les bords. Il est recourbé vers l'intérieur. La couleur du limbe est vert foncé. La face supérieure est luisante alors que la face inférieure est vert pâle. Le limbe est parcouru de nervures pennées et saillantes (Figures 3.4 ; 3.5 ; 3.6 ; 3.7).

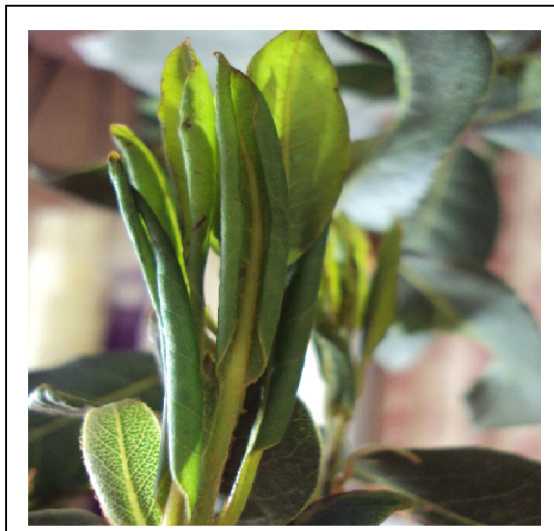


Figure 3.1 : Feuille juvénile (Originale)

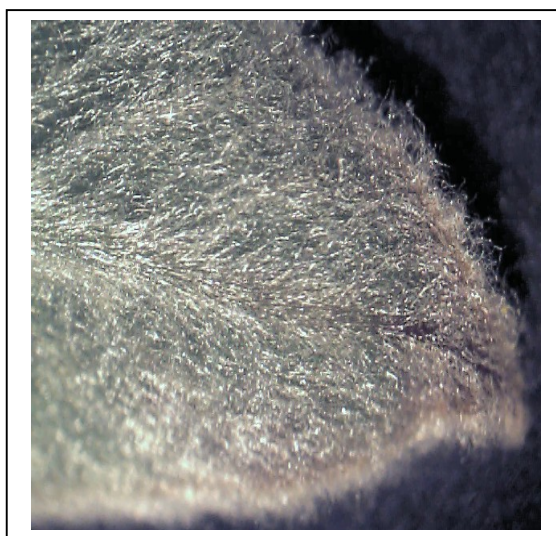


Figure 3.2 : Face supérieure d'une
feuille juvénile (Loupe G×4.5)
(Originale)

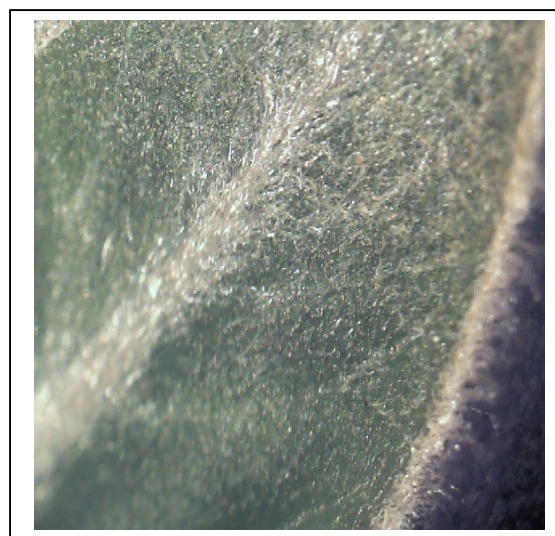


Figure 3.3 : Face inférieure d'une
feuille juvénile (Loupe G×4.5)
(Originale)



Figure 3.4: Face supérieure d'une feuille adulte (Originale)



Figure 3.5: Face inférieure d'une feuille adulte (Originale)

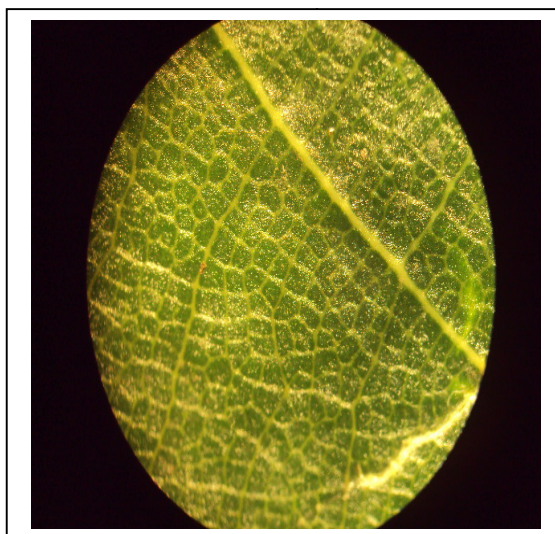


Figure 3.6 : Face supérieure d'une feuille adulte (Loupe G×4.5) (Originale)

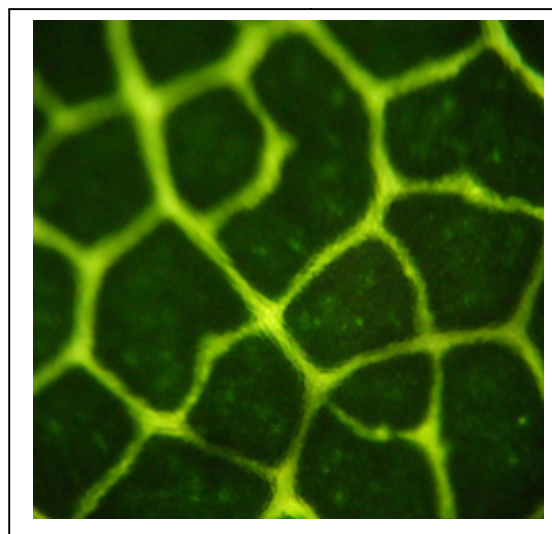


Figure 3.7 : Face supérieure d'une feuille adulte (MP×40) (Originale)

3.1.1.2. Fleurs

Elles sont groupées à l'aisselle des feuilles en petits bouquets en forme d'ombelles axillaires. Elles sont enfermées dans un involucre formé de bractées caduques qui présentent 4 dents (Figure.3.8).

Les fleurs mâles jaunâtres possèdent généralement 8 à 12 étamines. Ces dernières portent en leur centre une glande nectarifère dépourvue de pied. Les anthères s'ouvrent en 2 pores munis chacun d'un clapet droit (Figures 3.10 ; 3.11 ; 3.12 ; 3.13).

Les fleurs femelles vert blanchâtres, portent 4 staminodes (étamines stériles), un ovaire courtement pétiolé, divisé en 3 loges et un stigmate court et émoussé (Figures 3.9; 3.14 ; 3.15 ; 3.16).

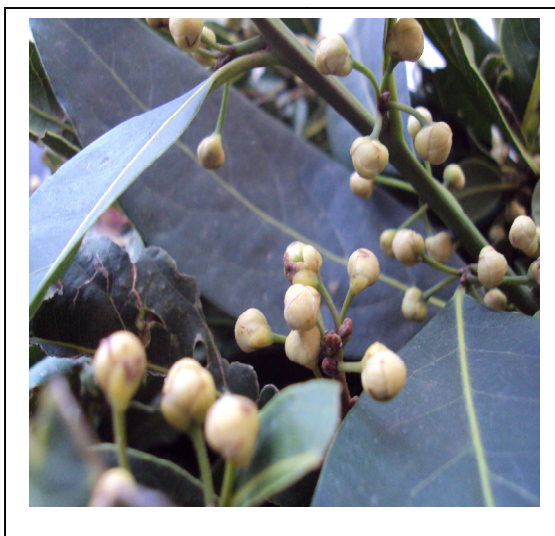


Figure 3.8 : Fleurs sous forme d'ombelle enfermées dans un involucre (Originale)



Figure 3.9 : Fleurs femelles (Originale)



Figure 3.10 : Fleurs mâles (Originale)

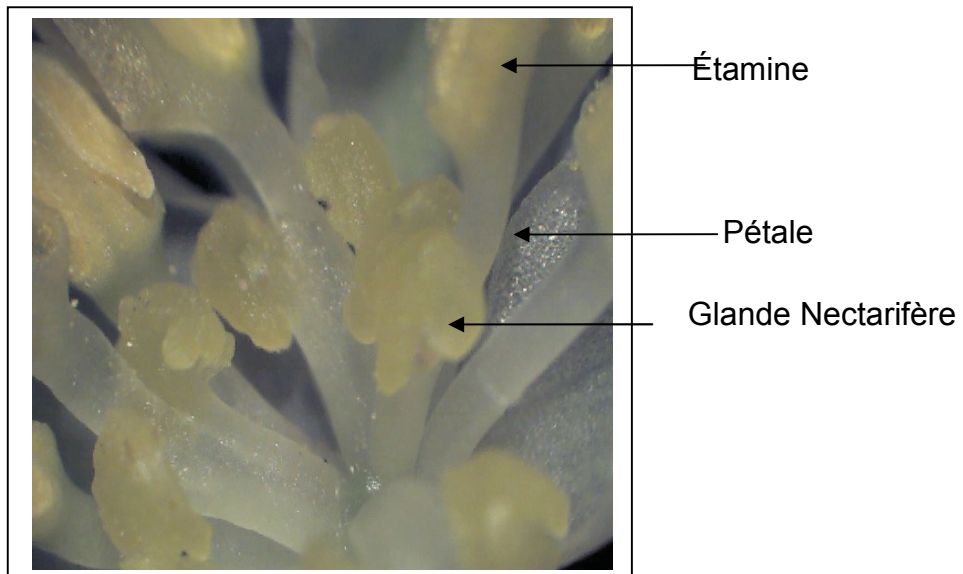


Figure 3.11 : Fleurs mâles (loupe G×4.5) (Originale)

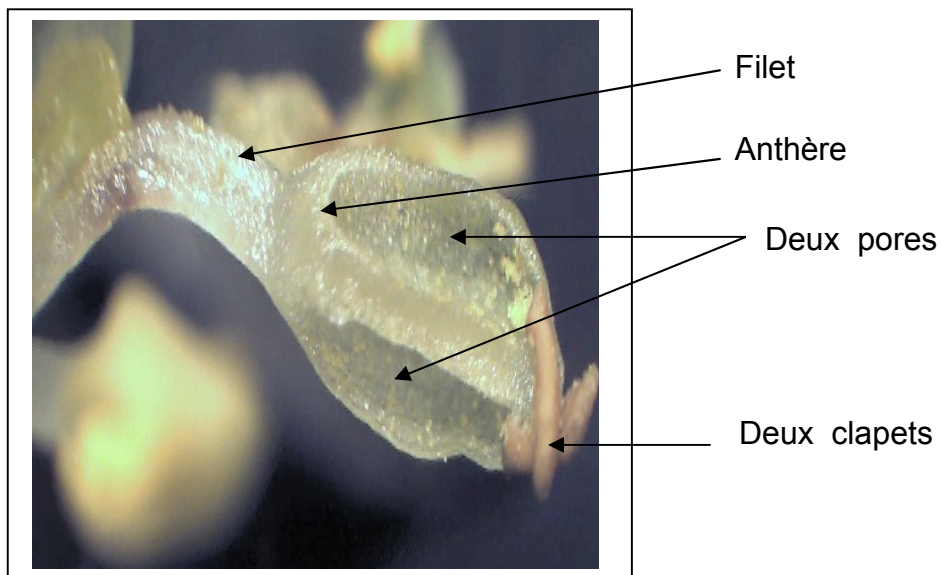


Figure 3.12 : Étamine isolé (loupe G×4.5) (Originale)

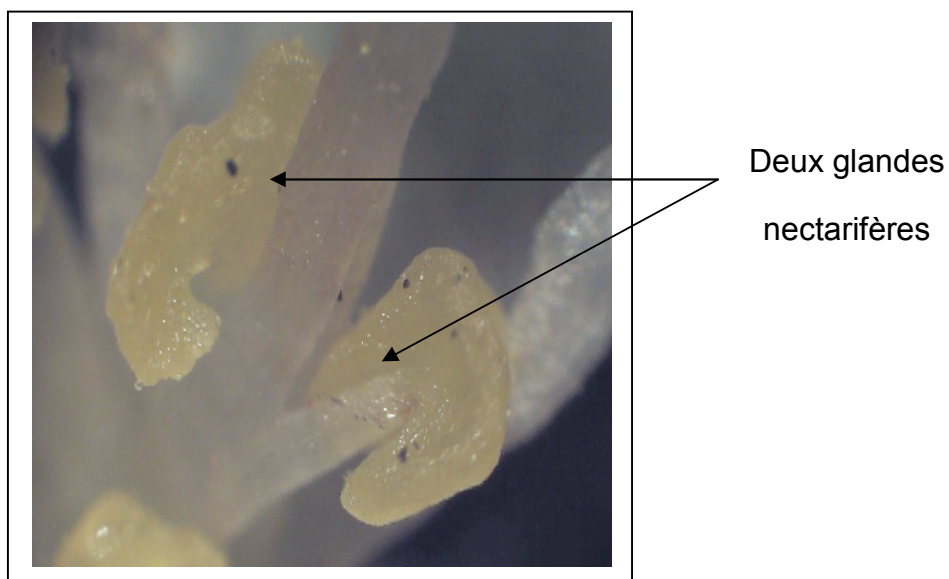


Figure 3.13 : Glande nectarifère (loupe G×4.5) (Originale)

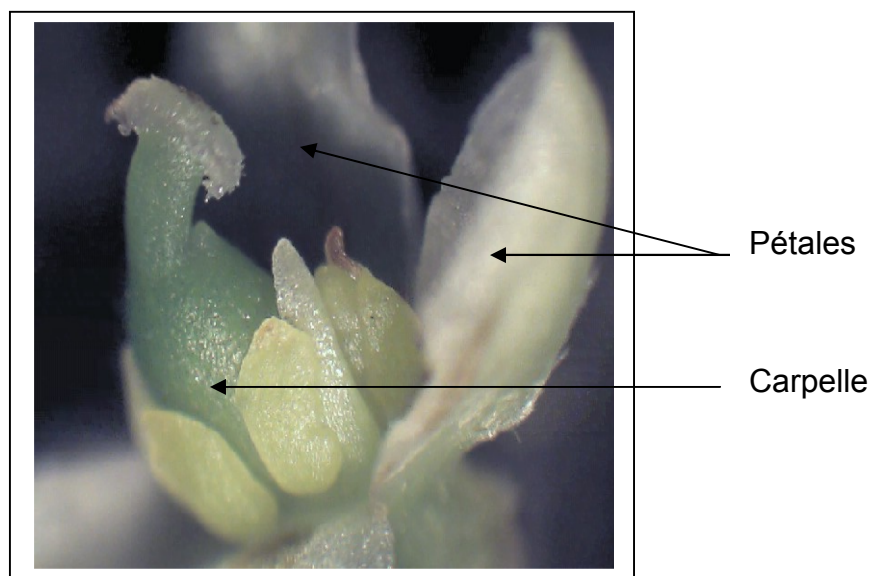


Figure 3.14 : Fleur femelle (loupe G×4.5) (Originale)

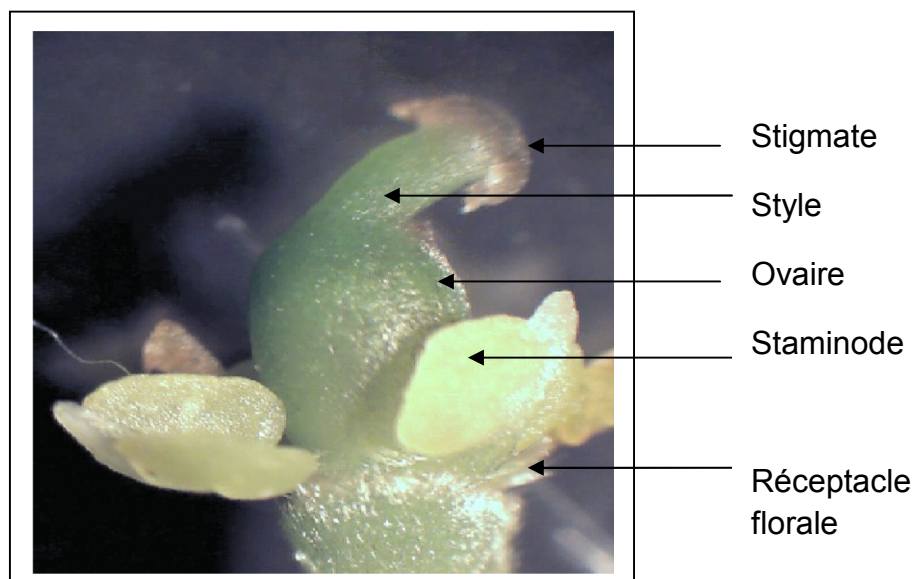


Figure 3.15 : Organe femelle isolé (loupe G×4.5) (Original)

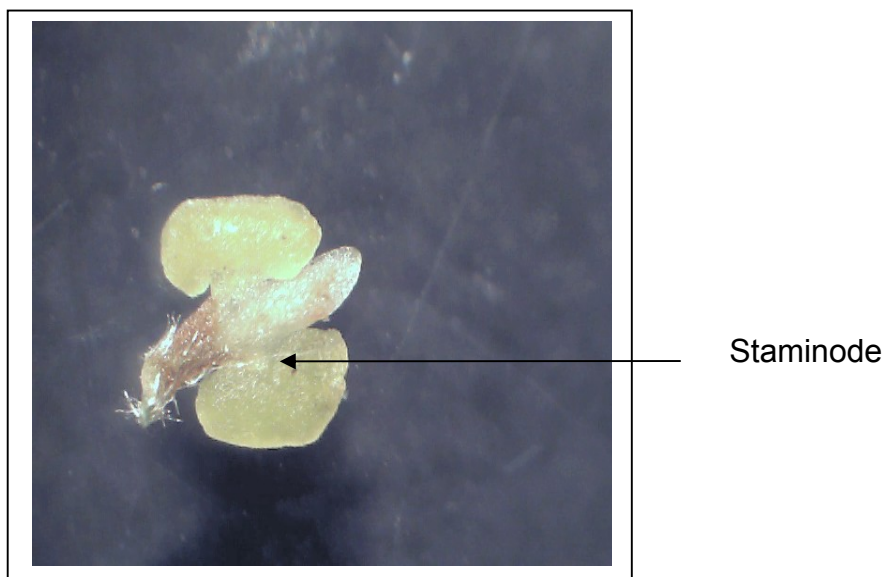


Figure 3.16 : Staminode (loupe G×4.5) (Originale)

3.1.1.3. Fruit

C'est une baie ovoïde de la grosseur d'une cerise, de 2 cm de long sur 1 cm de large. A maturité la couleur du fruit devient noirâtre. Il renferme une graine libre, dont la pulpe verte est grasse et parfumée (Figures 3.17 ; 3.18 ; 3.19 ; 3.20 ; 3.21).



Figure 3.17 : Baies verdâtre immatures (Originale)



Figure 3.18 : Baies noirâtre matures (Originale)

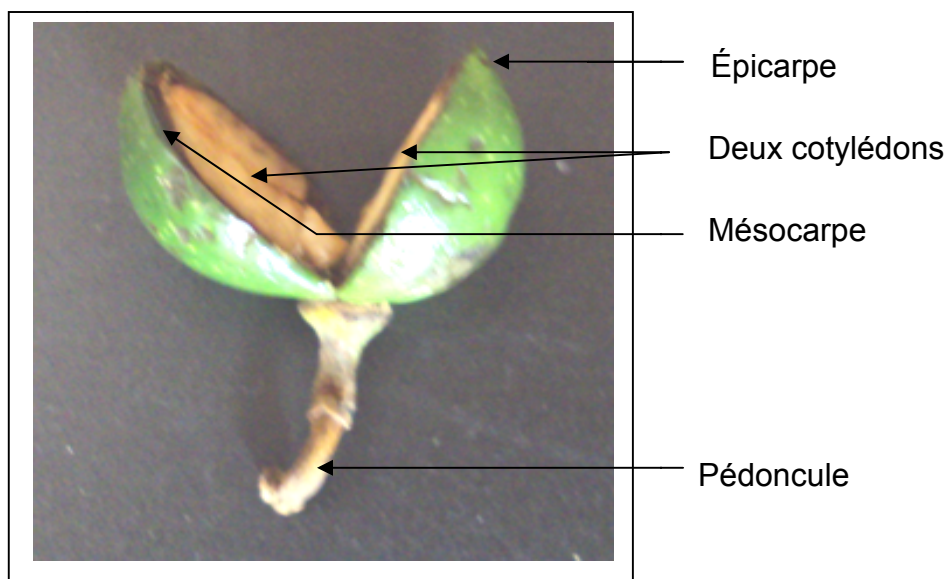


Figure 3.19 : Les différents constituants de la baie
(Originale)



Figure 3.20 : Les différents constituants isolée de la baie (Originale)



Figure 3.21: La graine (Originale)

3.1.2. Etude microscopique

Afin de localiser les structures sécrétrices, nous avons effectué des coupes transversales au niveau du limbe des feuilles et des pétioles.

3.1.2.1. Feuille

La feuille est enveloppée par deux épidermes : inférieur et supérieur. Les faces des cellules épidermiques tournées vers l'extérieur, sont recouvertes d'une cuticule striée (Figures 3.22). Ces épidermes protègent des tissus : deux parenchymes chlorophylliens.

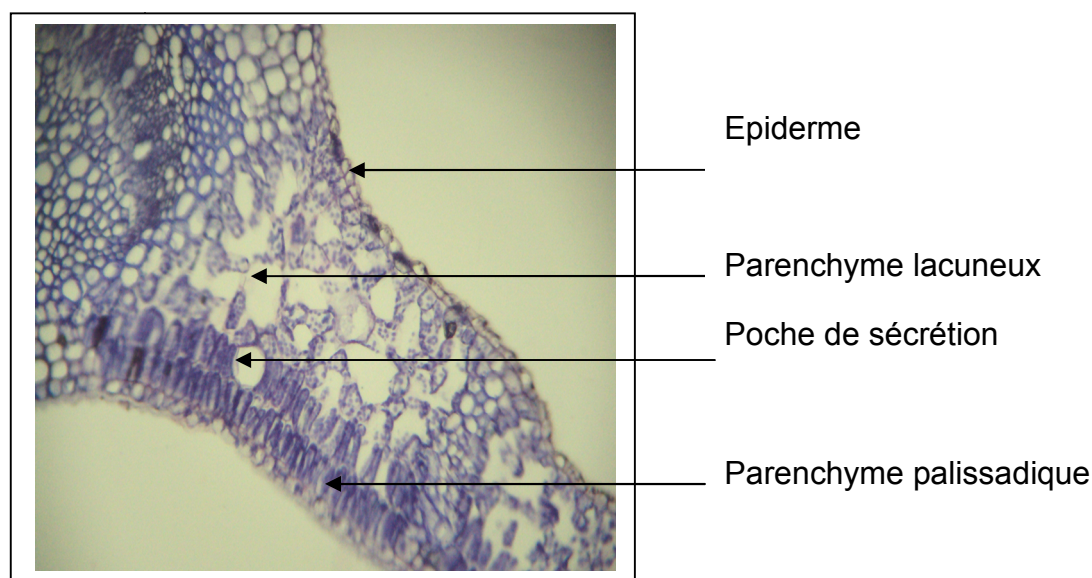


Figure 3.22 : Coupe transversale dans le limbe de la feuille de *Laurus nobilis* (MP G×40) (Originale)

Les tissus chlorophylliens compris entre les deux couches épidermiques sont les parenchymes : palissadique et lacuneux. Ces derniers constituent le mésophylle.

Le tissu chlorophyllien supérieur est constitué de deux couches de cellules formant le parenchyme palissadique. Les cellules palissadiques sont riches en chloroplastes. Elles sont allongées. Leur axe principal est perpendiculaire à la

surface foliaire. En dessous se trouve le parenchyme lacuneux appelé aussi spongieux, ainsi nommé à cause de la présence de nombreux méats aériens entre les cellules. Les cellules sont courtes et arrondie (Figure 3.22).

L'étude microscopique au niveau du limbe, a mis aussi en évidence la présence de grosses poches éparses dans le parenchyme palissadique. Ces poches sont entourées de cellules sécrétrices, de forme ovoïde (Figures 3.23).

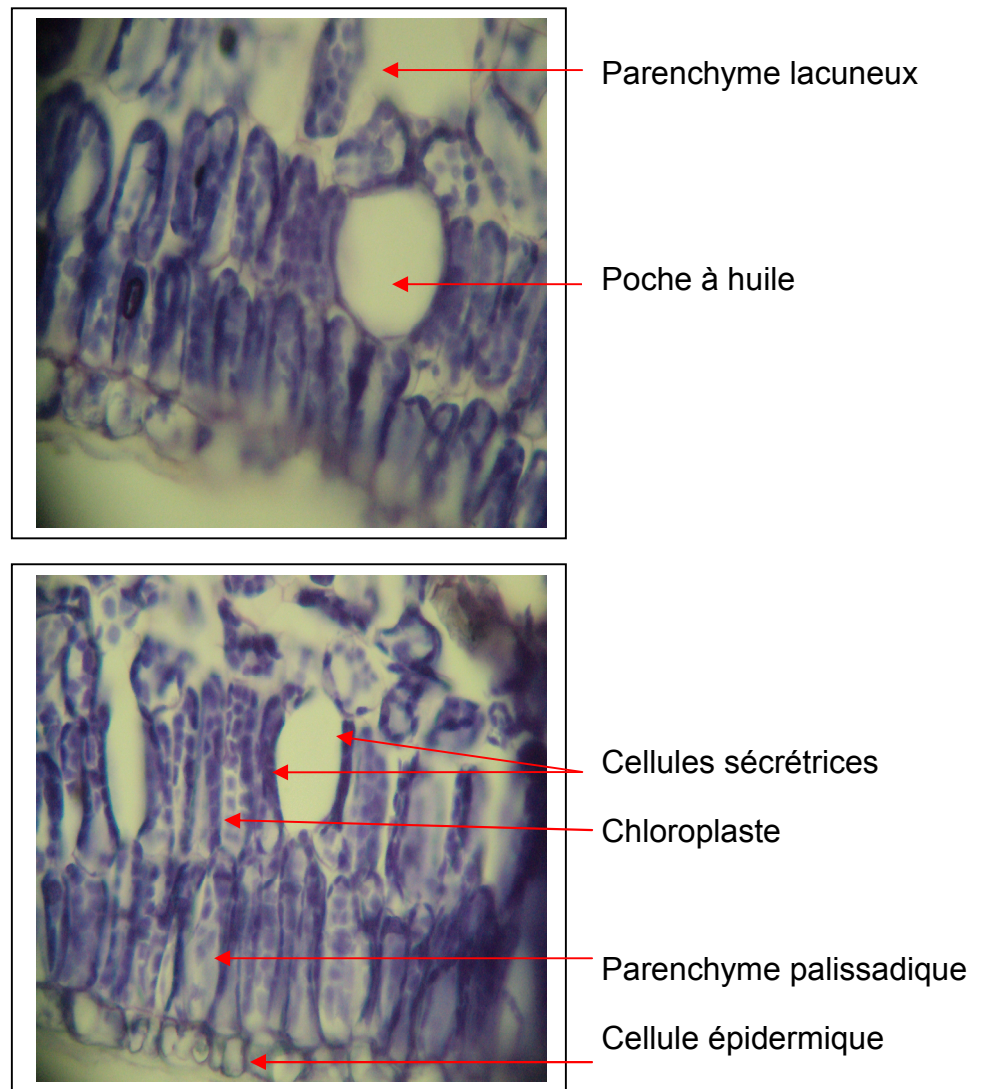


Figure 3.23 : Coupe transversale dans une portion du limbe de la feuille de de *Laurus nobilis* (MP G×60) (Originale)

Les tissus de soutien sont représentés par le collenchyme annulaire (Figure 3.24).

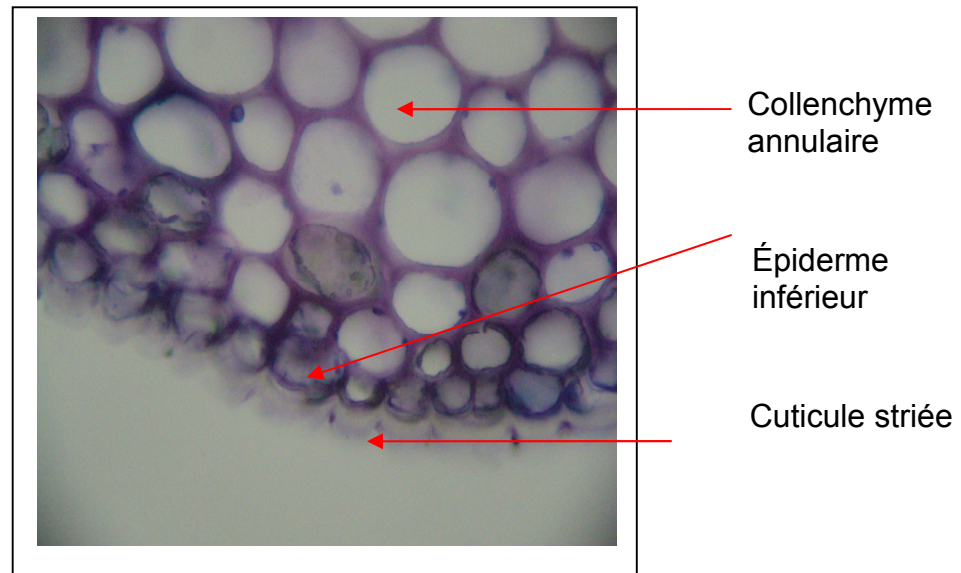


Figure 3.24: Coupe transversale dans le limbe de la feuille de *Laurus nobilis* (MP G×60) (Originale)

Dans les feuilles les tissus conducteurs sont représentés par les nervures. La feuille montre une nervure principale et des nervures secondaires. Ses tissus conducteurs sont composés de xylème primaire et de phloème primaire. Cette nervure est protégée sur les deux faces par un tissu de soutien cellulosique vivant, le collenchyme. Entre les deux types tissus conducteurs, on observe quelques divisions cellulaires qui annoncent la mise en place d'un cambium. Ce cambium donnera naissance aux tissus conducteurs secondaires (bois et liber) (Figures 3.25 ; 3.26 ; 3.27).

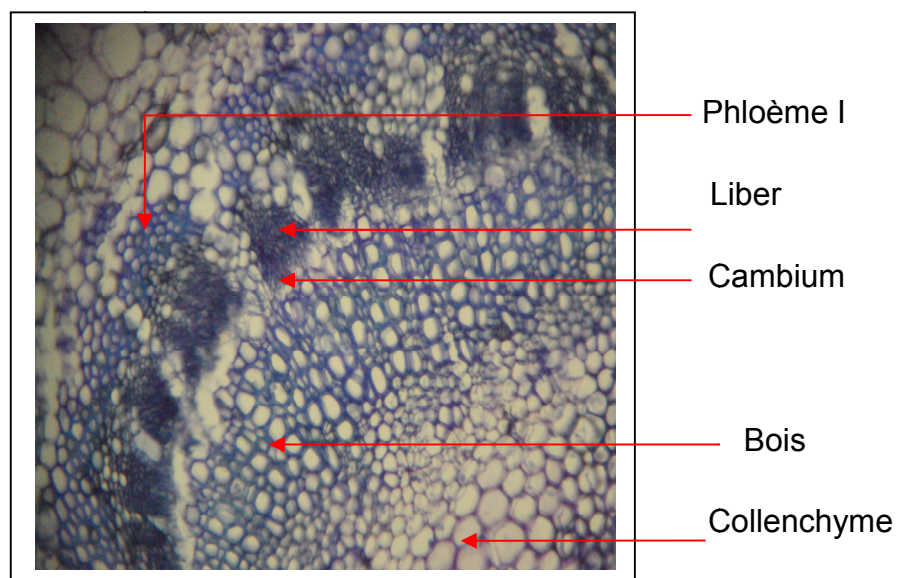


Figure 3.25: Coupe transversale dans le limbe de la feuille de *Laurus nobilis* (MP G×40) (Originale)

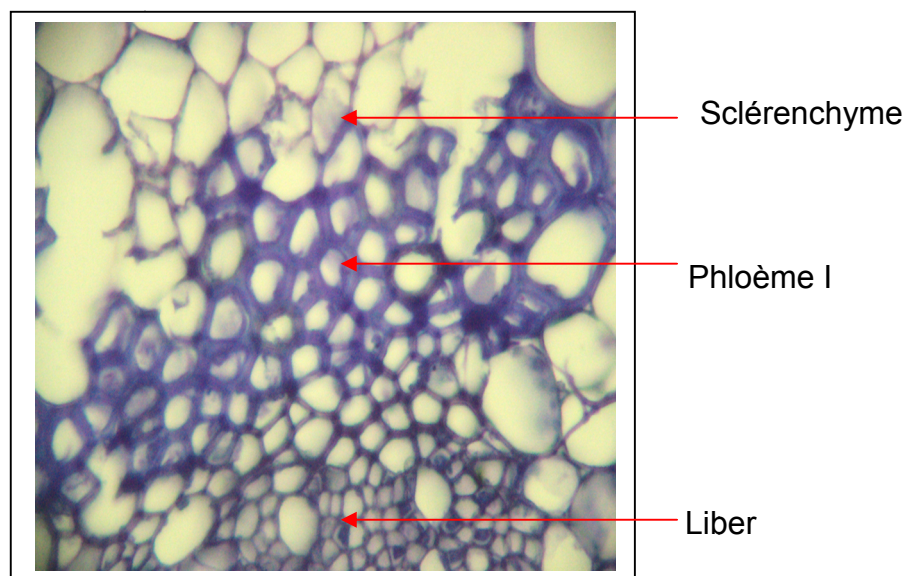


Figure 3.26: Coupe transversale dans le limbe de la feuille de *Laurus nobilis* (MP G×60) (Originale)

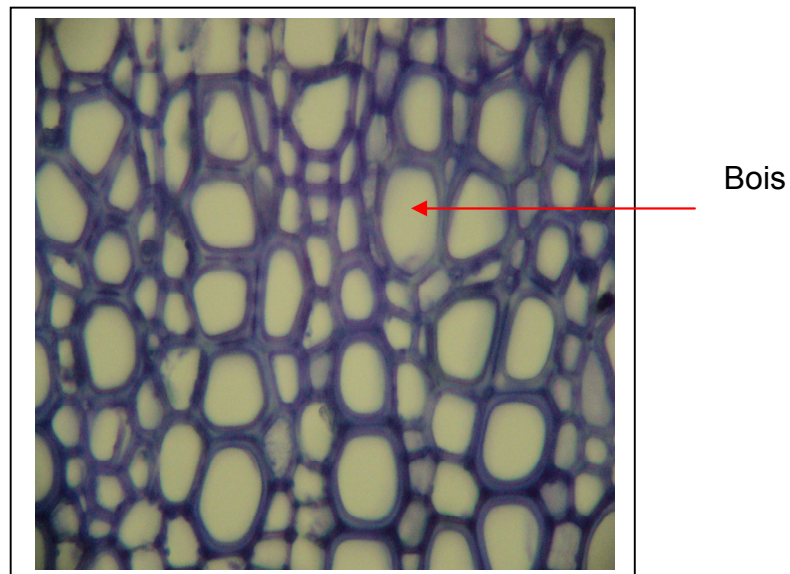


Figure 3.27 : Coupe transversale dans le limbe de la feuille de *Laurus nobilis* (MP G×60) (Originale)

3.1.2.2. Pétiole

La structure anatomique du pétiole est marquée par l'existence d'un plan de symétrie [Figure 3.28]. Dans le parenchyme cortical, nous observons des poches sécrétrices entourées de cellules sécrétrices [Figure 3.29].

Les faisceaux conducteurs libéro-ligneux y sont ordinairement disposés en un arc de cercle dont la concavité est tournée vers la face supérieur de la feuille [Figure 3.30 ; 3.31].

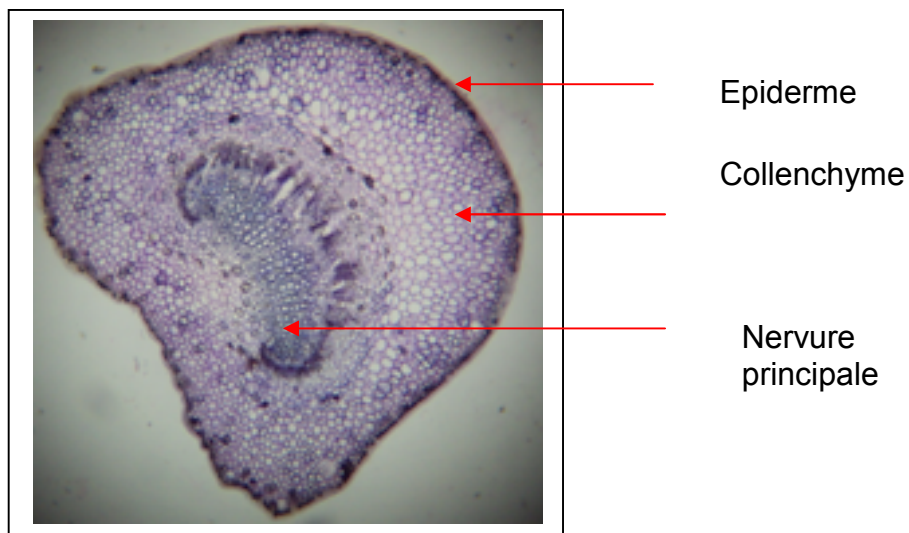


Figure 3.28 : Coupe transversale du pétiole de *Laurus nobilis* (MP G×10)
(Originale)

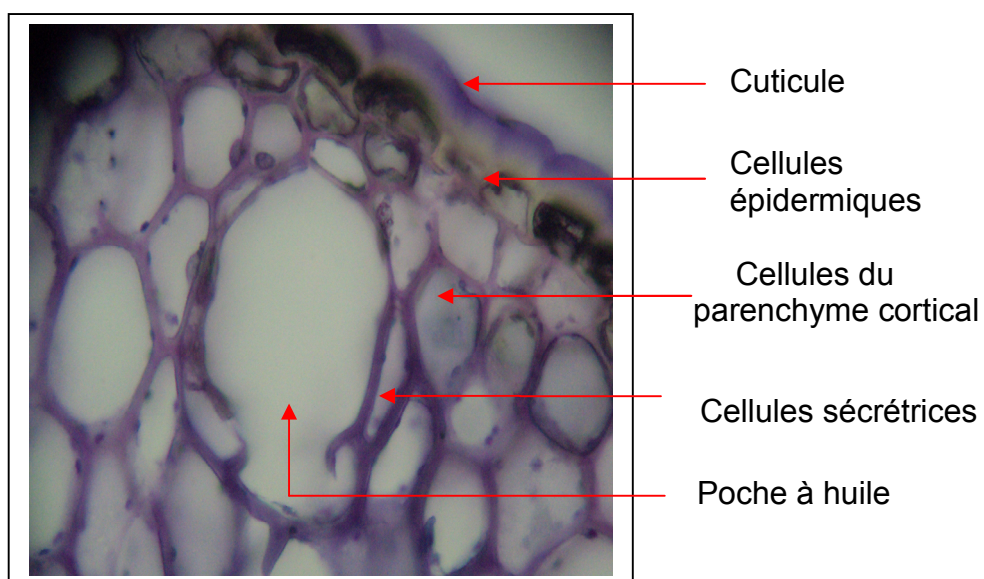


Figure 3.29 : Coupe transversale du pétiole de *Laurus nobilis* (MP G×60)
(Originale)

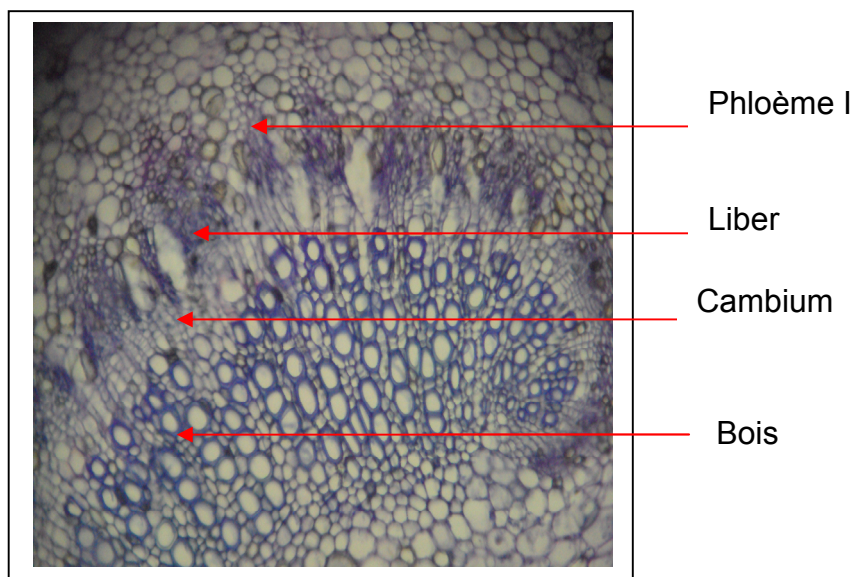


Figure 3.30 : Coupe transversale du pétiole de *Laurus nobilis* (MP G×40)
(Originale)

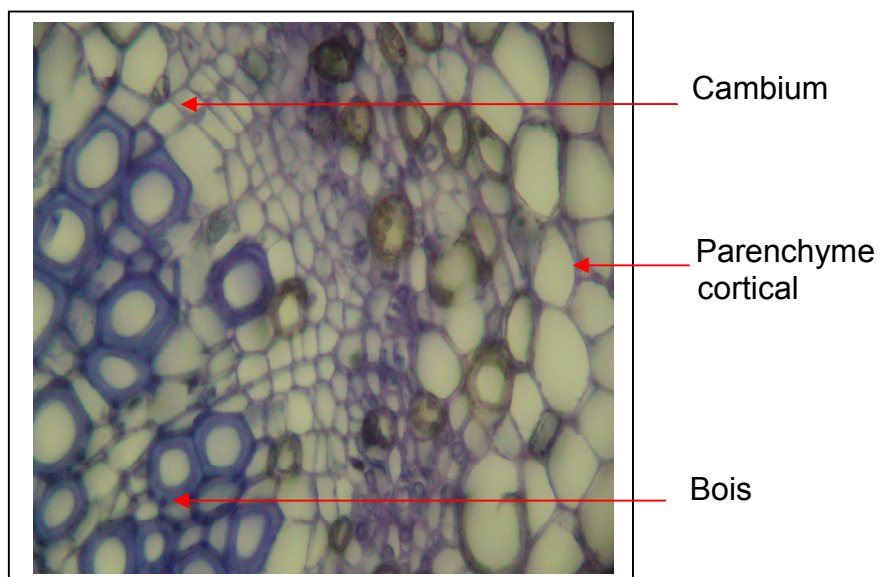


Figure 3.31: Coupe transversale du pétiole de *Laurus nobilis* (MP G×60)
(Originale)

3.2. Détermination du taux d'humidité

Nous constatons que le taux d'humidité de la plante est de 50.4%. Ainsi, approximativement la moitié du poids de la plante fraîche est constitué par l'eau.

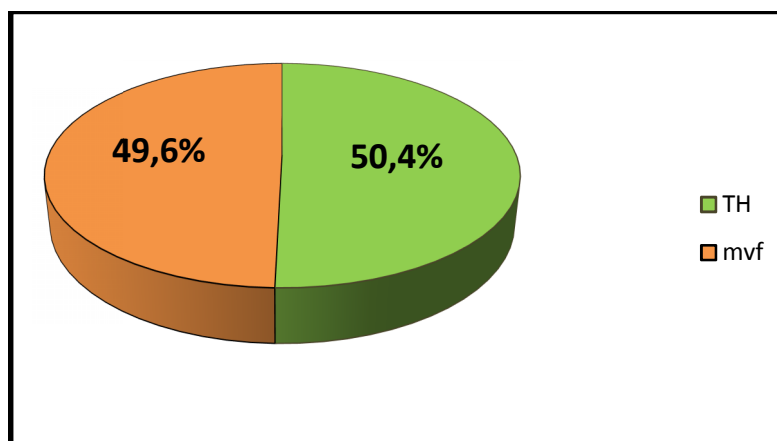


Figure 3.32 : Taux d'humidité par apport a la masse de la matière végétale fraîche.

Les végétaux à l'état frais sont riches en eau. Cette dernière représente plus de 70% de la masse des parties non lignifiées de la plante. Cependant le contenu en eau des plantes est dans un état de mouvement continu qui dépend de l'activité métabolique, du statut hydrique de l'air et du sol environnant ainsi que de certains facteurs [102].

3.3. Etude des composés volatils

3.3.1. Etude de la cinétique d'extraction

Cette étude nous a permis de suivre la cinétique d'extraction et l'évolution du rendement en HE.

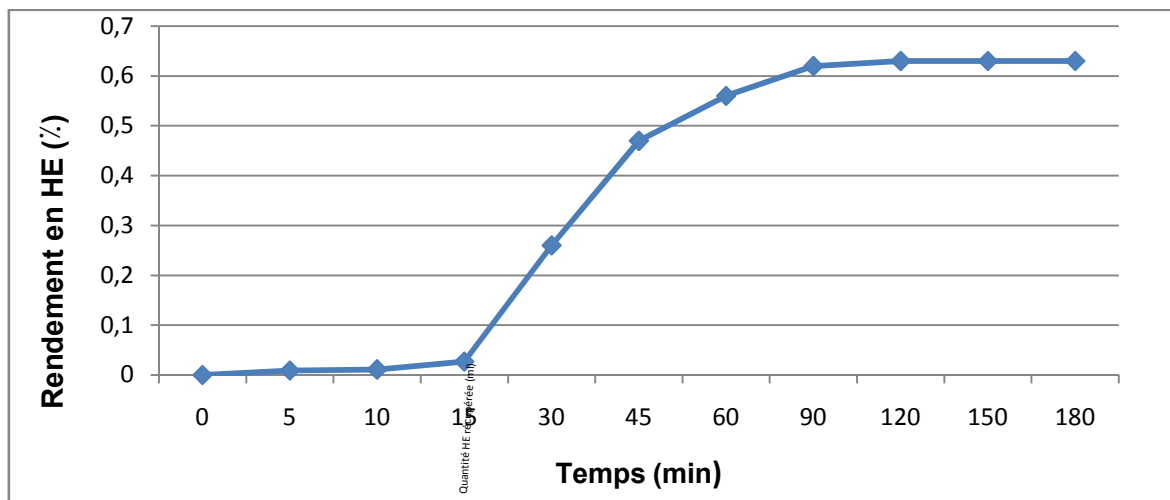


Figure 3.33 : Cinétique d'extraction des HE lors de l'hydrodistillation

Les résultats montrent trois phases (Figure 3.33):

Nous observons un palier dont le rendement est nul [0-15 min], cela peut être expliqué par la résistance de l'eau qui existe dans les cellules de la plante fraîche et qui fait condenser la vapeur d'eau en empêchant l'entraînement facile des huiles essentielles.

La seconde correspond à une augmentation rapide du rendement allant de 0.03% jusqu'au 0.62% et qui peut être expliqué par la propagation de la chaleur qui stimule les sites sécréteurs endogènes.

Au cours de la troisième phase, la courbe tend vers un second palier. Ce dernier correspond au rendement maximum possible à atteindre (0.63%).

On remarque qu'une durée d'extraction de 90 minutes permet de récupérer la majorité de l'huile essentielle. Notons qu'il convient de limiter au maximum la durée de cette opération, afin d'éviter les dégradations thermiques.

Le temps de l'hydrodistillation est relativement assez long (deux heures). Il s'explique par la localisation endogène des sites sécréteurs.

Lorsque les HE sont localisés dans les tissus sous-cutanés, elles doivent d'abord diffuser à travers l'épaisseur du tissu végétal avant d'entrer en contact avec l'eau. Elles seront alors lentement évaporées en comparaison avec les structures localisées superficiellement [103][104].

3.3.2. Extraction et rendement en huile essentielle

L'hydrodistillation des feuilles fraîches de *Laurus nobilis* a été réalisée avec l'extracteur pilote. Le rendement en HE est de 0.62%.

Ce rendement en HE est relativement comparable à ceux obtenus sur la même plante originaire d'Egypte (0.68%), mais il reste inférieur à celui observé chez la plante originaire de Turquie (0.86%). Ces fluctuations de rendements peuvent s'expliquer par la différence des lieux et des saisons de récolte du matériel végétal utilisé [105].

3.3.3 Extraction de l'huile essentielle dissoute dans l'hydrolat (HY)

A partir d'un litre d'eau aromatique (hydrolat), nous avons récupéré une quantité de 4.2 g, ce qui correspond à une concentration de 4.2 mg/ml par rapport au volume de départ.

Ce rendement est nettement supérieur à celui observé par PAOLINO et *al.*, sur l'hydrolat du laurier qui est de 1.14 g/l [106].

3.3.4. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques d'HE et d'HY sont résumées dans le tableau 3.1 .

Tableau 3.1: Propriétés organoleptiques d'huile essentielle et d'hydrolat.

	HE	HY
Aspect	liquide mobile limpide	Liquide limpide
Couleur	jaune très pâle à jaune	incolore à jaune pâle
Odeur	puissante, aromatique, épicées, camphrée avec un fond d'eucalyptus	Fraîche, aromatique moins prononcée,

Les paramètres organoleptiques d'HE et d'HY de *Laurus nobilis* n'ont pas fait l'objet de normalisation par AFNOR.

3.3.5. Caractéristiques physico-chimiques

Les caractères physico-chimiques de l'HE ont été déterminés selon des méthodes normalisées. Les résultats de ces mesures sont regroupés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Caractéristiques physico-chimique de l'huile essentielle

Indices	Résultats
Densité à 20 C°	0.910
Indice de réfraction	1.469
Pouvoir rotatoire	-18.53°
Indice d'acide	0.94
Indice d'ester	42.53
Miscibilité à l'EtOH à 80°	1v

Ce tableau montre que les valeurs de la densité (0,910), l'indice de réfraction (1,469), le pouvoir rotatoire (-18.53°), l'indice d'acide (0.94), l'indice d'ester (42.53) et la miscibilité à l'éthanol sont en accord avec les valeurs signalées par PAOLINI *et al.* , [106].

L'indice d'acide (0.94), inférieur à deux, est un caractère d'une bonne conservation de l'huile. En effet, une huile fraîche ne contient que très peu d'acides libres. Il est à souligner que c'est durant le stockage que l'huile peut subir des dégradations telle l'hydrolyse des esters [24].

Le pouvoir rotatoire de l'huile essentielle est lévogyre (-18.53). Ainsi, elle dévie à gauche la lumière polarisée qui la traverse.

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'HE. Il sera primordial de déterminer le profil chromatographique de l'HE.

3.3.6. Analyse chromatographique de la fraction aromatique

3.3.6.1. Composition chimique de l'huile essentielle

La composition de l'huile essentielle (tableau 3.3 et Figure 3.34) montre que les différents composants sont énumérés selon leur ordre d'éluion sur la colonne chromatographique.

Nous observons une grande diversité des constituants chimiques appartenant à différentes familles de composés chimiques.

Le profil chromatographique des analyses qualitatives et quantitatives de l'huile essentielle (appendice D) nous ont permis de mettre en évidence que les composés majoritaire sont le 1.8 cineol et linalool avec un pourcentage respectivement de 20.66% et 15.56%.

La teneur en 1,8 cinéol de l'huile essentielle est inférieure à celle observée dans l'huile essentielle de plantes originaires d'Egypte (54.9%), de Turquie (28%) et d'Italie (45%) [106].

A la lumière des résultats obtenus (tableau 3.3) nous pouvons déduire que l'huile essentielle de *Laurus nobilis* est constituée essentiellement de groupes chimiques suivants (appendice D) :

- Monoterpènes : sabinène, gamma-terpinène, alpha-terpinène ;
- Monoterpénols : alpha-terpinéol, linalol , L-4-terpineol; 2-Cyclohexen-1-ol, 1-méthyl-4-(1-méthylethyl)-trans-;
- Oxydes terpéniques : 1,8-cinéole, cis-linalolxide;
- Phénols : eugénol;
- Phénols méthyl éthers: methyl eugenol;
- Phénylpropanoïdes : élémicine;
- Esters : Diisooctyl phthalate, acetate d'exo 2 Hydroxycineol.

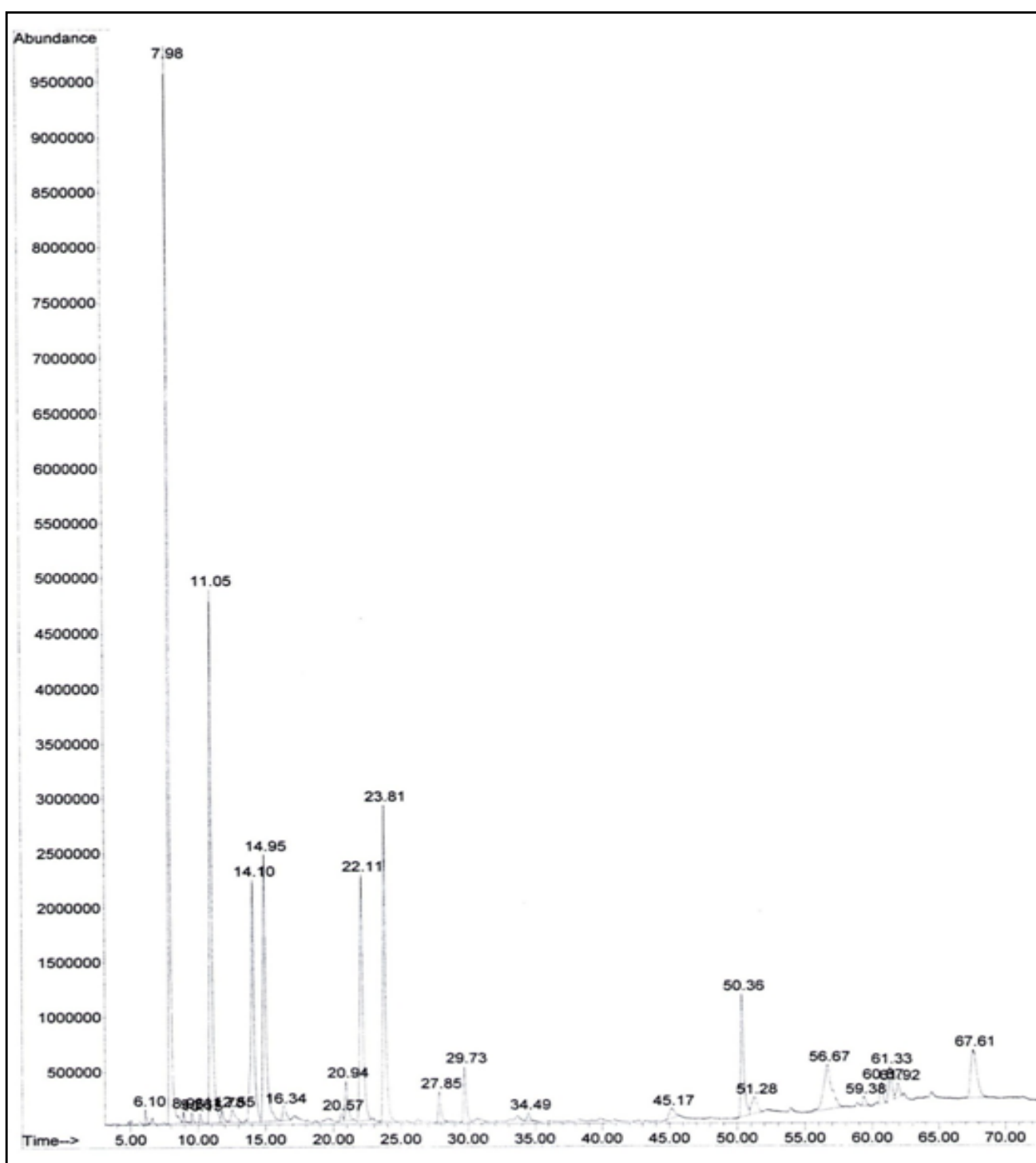


Figure3.34 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* (Originale)

Tableau 3.3: Composition chimique de l'huile essentielle

Temps de rétention (mn)	Composés	%
6.11	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene,4-methyl-1-(1-methylethyl)-[Sabinène]	0.246
7.98	2-Oxabicyclo[2.2.2]Octane,1,3,3-Trimethyl [1.8cineol ou Eukalyptol]	20.658
8.94	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-[γ- terpnène]	0.196
10.15	[Cis-linalolxide]	0.198
11.05	1,6 octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-[linalol]	15.563
12.55	2-Cyclohexen-1-ol,1-methyl-4-(1-methylethyl)-trans-	0.682
14.10	3-Cyclohexen-1-ol,4-methyl-1-(1-methylethyl)-(R)-[L-4-terpineol]	9.382
14.95	3-Cyclohexene-1-methanol,alpha.,alpha.4-trimethyl-[α -terpineol]	9.875
20.57	exo-2-Hydroxycineole acetate	0.253
22.11	Eugenol	9.478
23.81	Benzene,1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)-[Methyl eugenol]	9.871
29.73	Benzene,1,2,3-trimetoxy-5-(2-propenyl)[Elemicine]	1.808
60.67	1,2-Benzenedicarboxylic acid ,diisooctyl ester[Diisooctyl phthalate]	0.867

3.3.6.2. Composition chimique de l'hydrolat

Pour pouvoir quantifier les composants chimiques d'HY par GC-MS, il a été nécessaire de le concentrer en procédant à une extraction avec l'éther éthylique. La composition chimique de l'HY est consignée dans le tableau 3.4 et la Figure 3.35.

Tableau 3.4 : Composition chimique de l'hydrolat

Temps de rétention (mn)	Composés	%
6.77	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene,4-methyl-1-(1-methylethyl) [Sabinène]	4.359
8.76	2-Oxabicyclo[2.2.2]Octane,1,3,3-Trimethyl [1.8cineole]	14.506
11.13	1,6 octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- [Linalol]	8.234
17.88	Phenol,2-Methyl-5-(1-Methylethyl)	0.453
17.89	Thymol	0.652
19.34	Terpinylacetate	6.791
21.11	Benzene,1,2-Dimetoxy-4-(2-Propenyl)- [Methyleugenol]	2.014

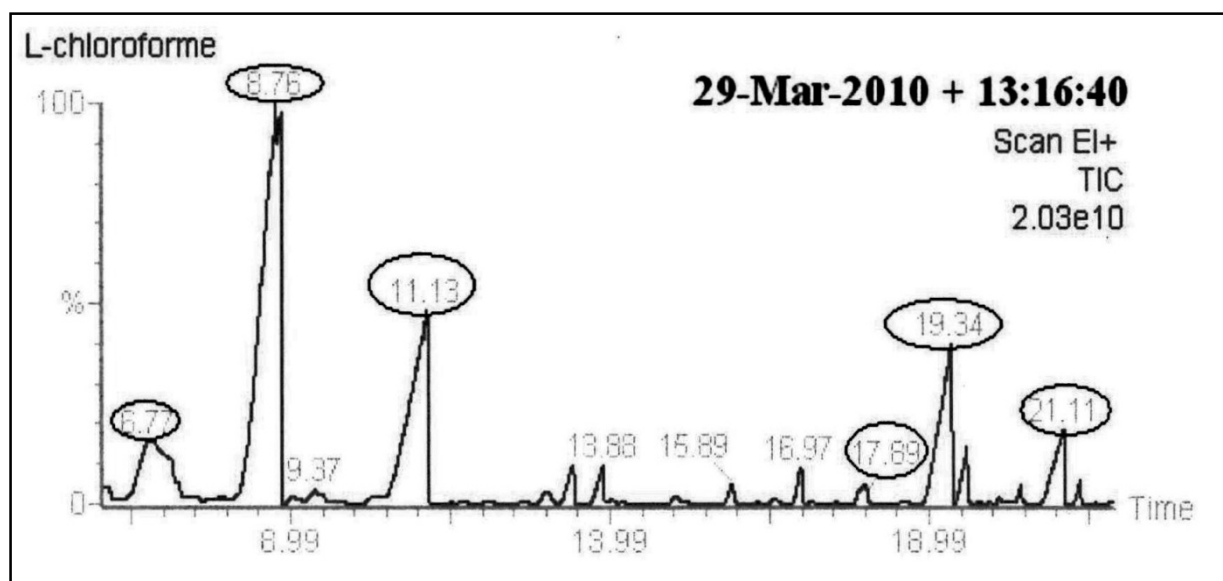


Figure 3.35 : Profil chromatographique de l'hydrolat de *Laurus nobilis* (Originale)

A la lecture des résultats comparatifs des compositions chimiques de l'HE et de l'HY, il en ressort que ces deux extraits présentent des composants en commun mais dans des proportions différentes : sabinène (4.36%) , 1.8 cineol (14.51%) , linalool (8.23%) et methyl eugenol (2.01%).

La fraction volatile de l'hydrolat a été caractérisée par la présence de 1.8 cineol comme composant majoritaire (appendice D).

Cependant, quelques composés ont été rapportés seulement dans l'hydrolat tel que les thymol (0.65%), Phenol,2-Methyl-5-(1-Methylethyl) (0.45%) et terpinylacetate (6.79%).

3.4. Etude des composés non volatiles

3.4.1. Résultat de l'extraction au soxhlet

La teneur en substances non volatiles miscibles dans les solvants apolaires est de 16.9% pour la plante entière. Concernant les substances non volatiles miscibles dans les solvants polaires, la teneur est de 45.15 % pour la plante entière.

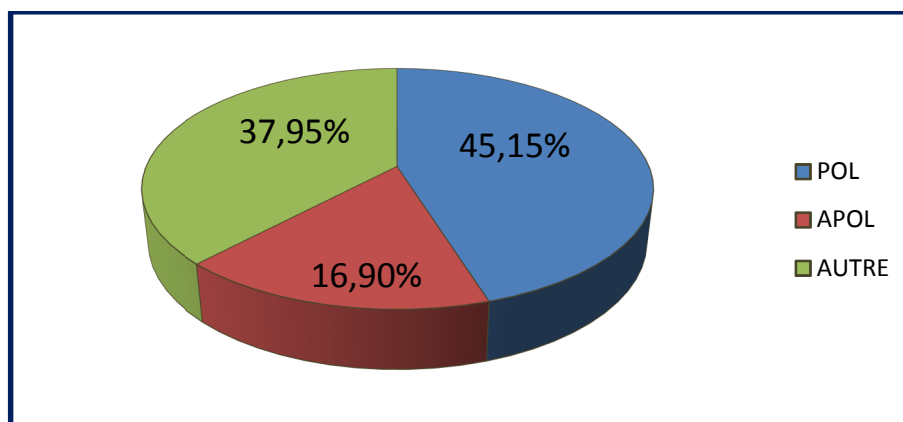


Figure 3.36: Teneur de *Laurus nobilis* en substances polaires, apolaires et autres

3.4.2. Analyse de la fraction méthanolique par CCM

La CCM nous a permis de contrôler la qualité de l'extrait méthanolique, même si elle n'est pas suffisante pour identifier un constituant précis, elle nous a permis d'obtenir des renseignements utiles sur les éléments constitutifs des extraits obtenus.

Après la révélation de l'extrait méthanolique par des méthodes colorimétriques, nous avons obtenu les résultats suivants (tableau 3.5 et figures 3.35 ; 3.36)

Tableau 3.5 : Résultats de la révélation des plaques de CCM par les colorants chimiques

N° puits	Révélateur	Résultats	Groupes chimiques
A	FeCl ₃	Tache noir brunâtres	Tanins et acides phénoliques
B	AlCl ₃	Vertes	Flavonoïdes
C	Potasse alcoolique	Verts jaunes	coumarines

Le tableau 3.5 montre la présence aussi bien des tanins, des acides phénols, des flavonoïdes que des coumarines.

OLFA OUCHIKH et *al.*, ont pu identifier des flavonoïdes et des proanthocyanidines (tanin condensé) dans les feuilles de *Laurus nobilis* originaire de Tunisie [107].

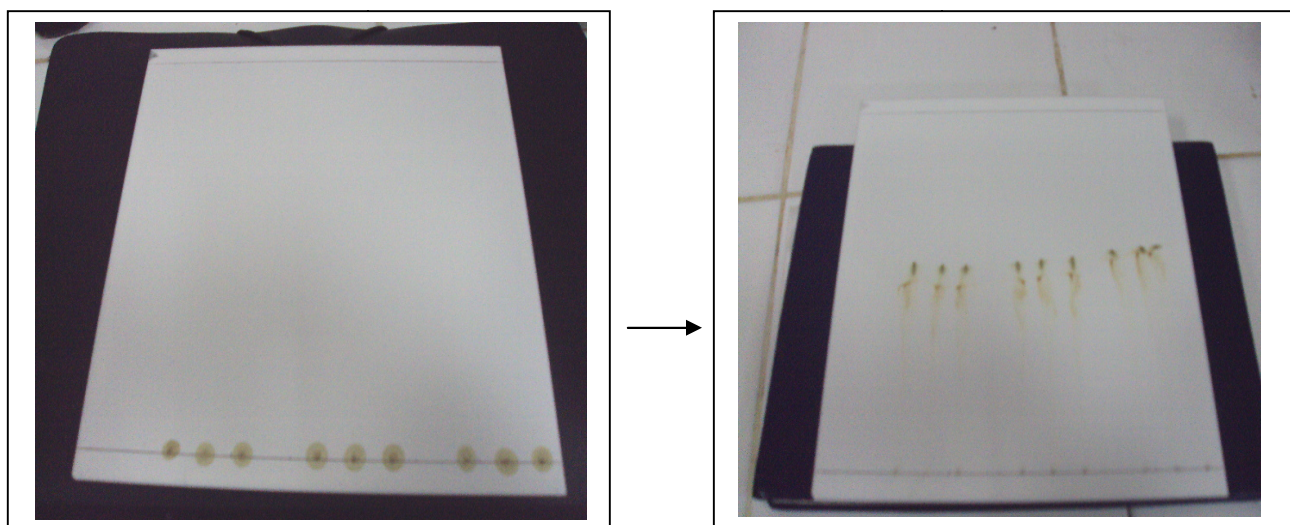


Figure 3.37: Migration de l'extrait méthanolique (Originale)

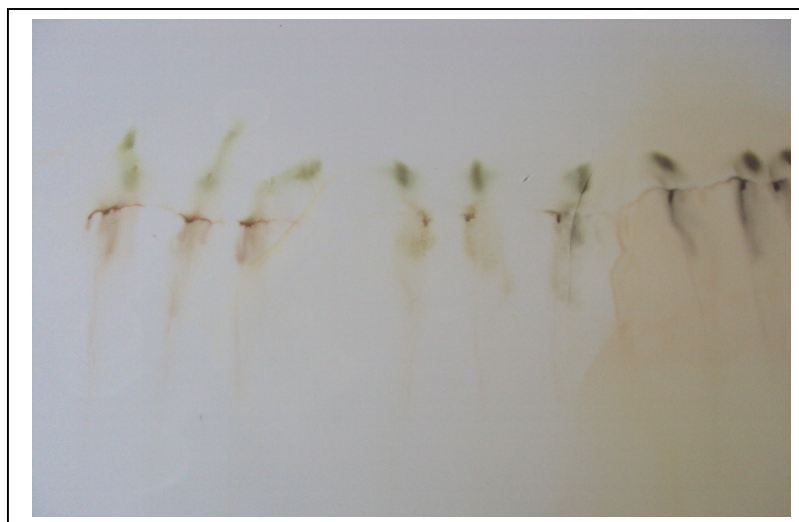


Figure 3.38 : Plaque de CCM après révélation(Originale)

3.4.3. Screening phytochimique

Les résultats de la composition phytochimique préliminaire de l'extrait aqueux de *Laurus nobilis* par screening chimique sont repris dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6:Le criblage phytochimique de *Laurus nobilis*

Groupes chimiques	Résultats des réactions en tubes
Alcaloïdes	+
Flavonoïdes	+
Flavones	-
Flavanones	-
Flavonols	+
Flavanols	+
Tanins	+
Tanins catéchiques	+
Tanins galliques	-
Leucoanthocyanes	-
Catéchols	-
Saponosides	+

Nous pouvons observer que les essais phytochimiques effectués sur la poudre et l'infusé des feuilles de *Laurus nobilis* ont révélé la présence de polyphénols tels que les flavonols, les flavanols, les tanins catéchiques, des alcaloïdes et des saponosides. Les tests de recherches des leucoanthocyanes, des catéchols, des tanins galliques, des flavones et des flavanones se sont révélés négatifs dans l'extrait de *Laurus nobilis*.

Les résultats obtenus à l'issu du criblage phytochimique corroborent avec ceux de certains auteurs [16] [108] [109].

3.5. Etude de l'activité antimicrobienne de *Laurus nobilis*

3.5.1. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne

Après incubation durant 24 heures à 37°C pour les bactéries et 48 heures à 25°C pour les levures, nous avons retiré les boîtes de Pétri pour interpréter les résultats.

Durant l'incubation l'huile essentielle contenue dans les disques absorbants s'est diffusée dans le milieu et selon la sensibilité des germes à cette huile, il y a eu apparition ou non de zone d'inhibition. Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'HE, EM, HY, Inf de *Laurus nobilis* sont consignés dans le tableau 3.7.

Tbleau3.7 : Les diamètres des zones d'inhibition des souches utilisées

	Extrait testés Germes testés	HE	EM	HY	Inf
Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	66.33 mm	29 mm	-	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	30.00 mm	-	-	-
	<i>Enterococcus faecium</i>	21.17 mm	-	-	-
Gram négatif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	49.50 mm	-	-	-
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	12.00 mm	-	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	21.67 mm	-	-	-
Levures	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18.33 mm	-	-	-
	<i>Candida albicans</i>	13.33 mm	-	-	-

La sensibilité aux différents extraits est classifiée selon le diamètre des zones d'inhibition comme suit : non sensible pour le diamètre moins de 9 mm , légèrement sensible pour un diamètre entre 9-12 mm, modérément sensible pour un diamètre entre 13-18 mm et extrêmement sensible pour le diamètre supérieur à 18 mm [114].

D'après le test ANOVA (appendice E) il y a une différence significative de l'effet de l'huile essentielle sur les germes testés ce qui explique que les microorganismes étudiés n'ont pas manifesté la même sensibilité vis-à-vis de l'HE (Figure 3.37).

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* montre une activité antimicrobienne sur toutes les souches testées. Toutefois aucun effet n'a été observé sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Le comportement de *Pseudomonas aeruginosa* n'est pas surprenant car elles possèdent une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides. Cette résistance est associée à la nature de sa membrane externe [112].

Il a été rapporté que les composés responsables de l'action antibactérienne de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* semblent vraisemblablement être linolol, α terpinéol, eugénol, caryophyllène, nérolidol, α -humulène et viridiflorol [113].

En prenant en considération les diamètres d'inhibition, l'HE est extrêmement active sur *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecium*, *K. pneumonia*, *E. coli*. Au contraire, elle est légèrement active vis-à-vis *B. bronchiseptica* mais inactive sur *P. aeruginosa*.

L'hypersensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* peut s'expliquer par la probabilité de sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes. En effet, tels que la température, le pH et les extraits naturels dus à l'absence de la membrane externe [115].

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-). Ceci peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram (-) et Gram (+). Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle la membrane externe, qui se compose de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. Néanmoins, la présence des porines dans cette couche permettra la diffusion libre des molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 600 Da [116][117][118][119][120]. Cependant, l'inhibition de la croissance des bactéries Gram (-) a été rapportée. Cette inhibition se combine avec les facteurs qui peuvent déranger l'intégrité de la cellule et/ou la perméabilité de la membrane, telle que les basses valeurs du pH et de fortes concentrations en NaCl [121].

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* a exercé une activité antifongique modérée vis-à-vis de *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans* avec des diamètres d'inhibition respectivement de 18.33 mm et 13.33 mm.

Les tests antimicrobiens menés sur l'infusion (10%) et l'hydrolat se sont révélés négatives ; ces produits n'ont donc aucun effet antimicrobien.

L'évaluation de l'effet antimicrobien de l'hydrolat de *Laurus nobilis* a permis d'affirmer les résultats obtenus par OSMAN et MUSA où l'hydrolat s'est avéré inefficace vis à vis les microorganismes suivants : *B.subtillis*, *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* 0157 :H7 ATCC 33150, *K.pneumoneae* FMC5, *S.aureus* ATCC 2392 ,*S.aureus* ATCC 28213 [110].

L'extrait méthanolique présente une activité inhibitrice uniquement sur *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 29 mm. Cette action de l'extrait méthanolique confirme les résultats d'OSMAN et al, sur les mêmes souches [111].

Les résultats de l'activité antimicrobienne des différents extraits de *Laurus nobilis* peuvent s'observer dans les figures suivantes : Figure3.38 ; 3.39 ; 3.40 ; 3.41 ; 3.42 ; 3.43 ; 3.44 ; 3.45 ; 3.46.

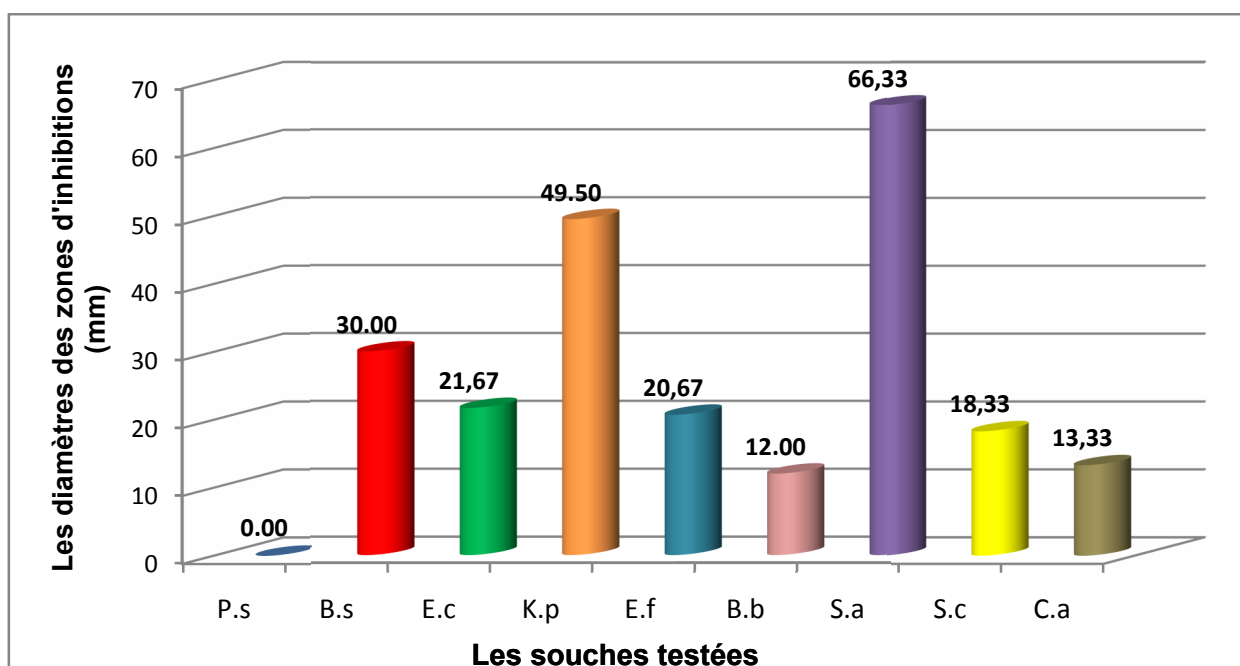
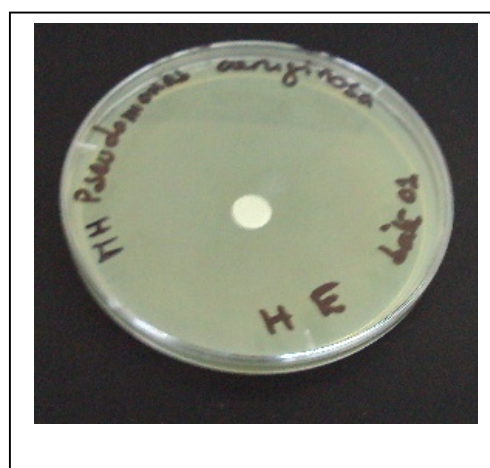
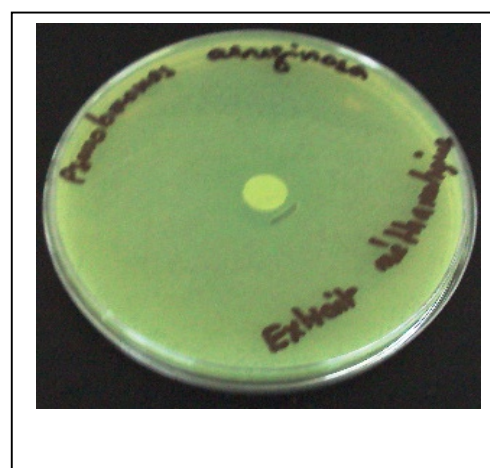


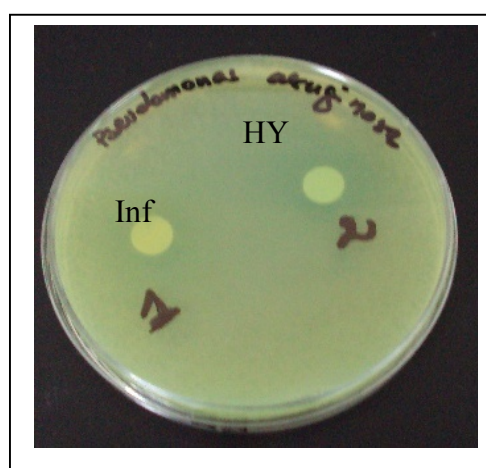
Figure 3.39: Les diamètres des zones d'inhibition des souches testées pour l'huile essentielle.



HE



EM



Inf

HY

Figure 3.40 : Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur *Pseudomonas aeruginosa*

(Originale)

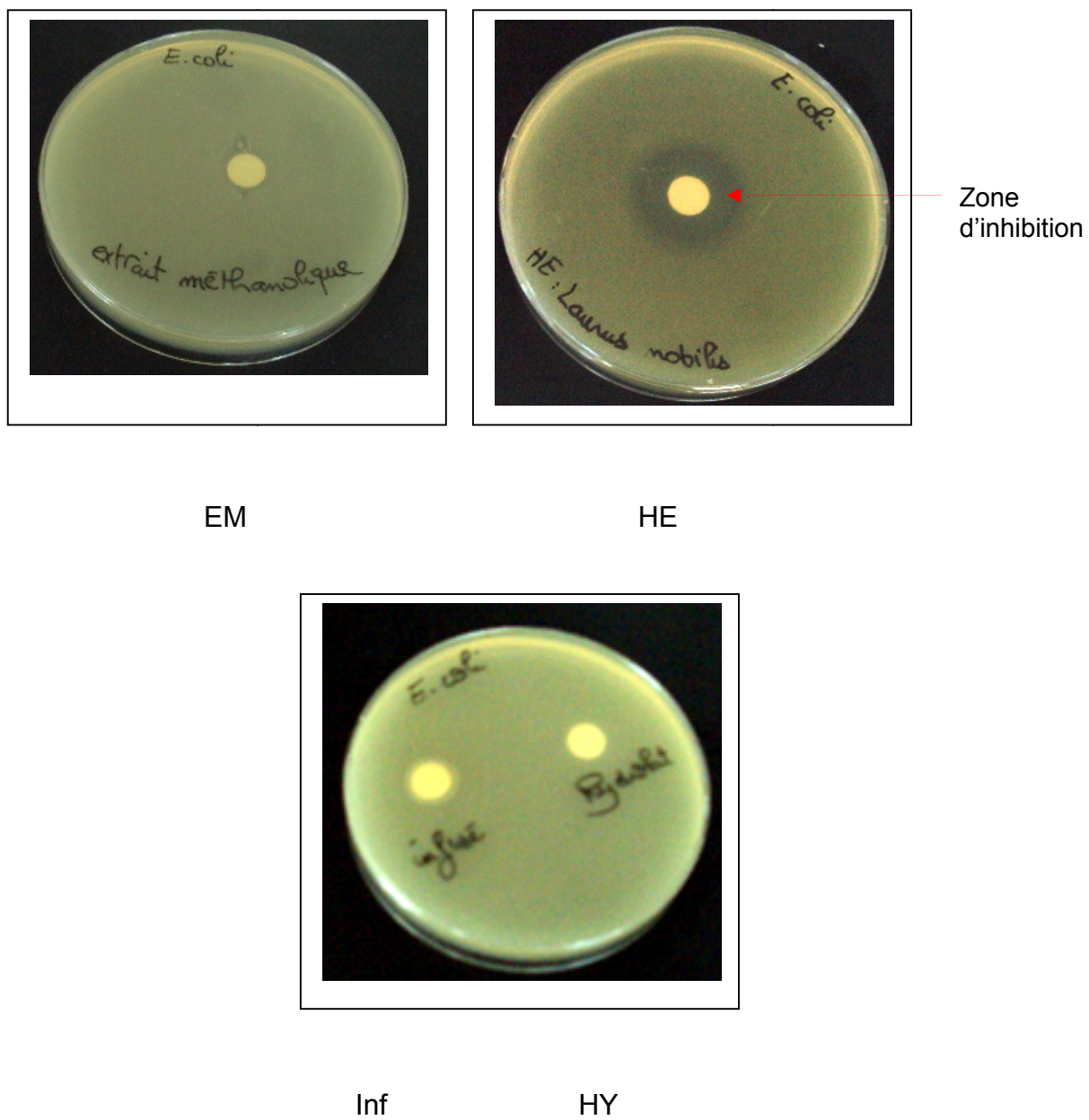


Figure 3.41: Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur *Escherichia coli*

(Originale)

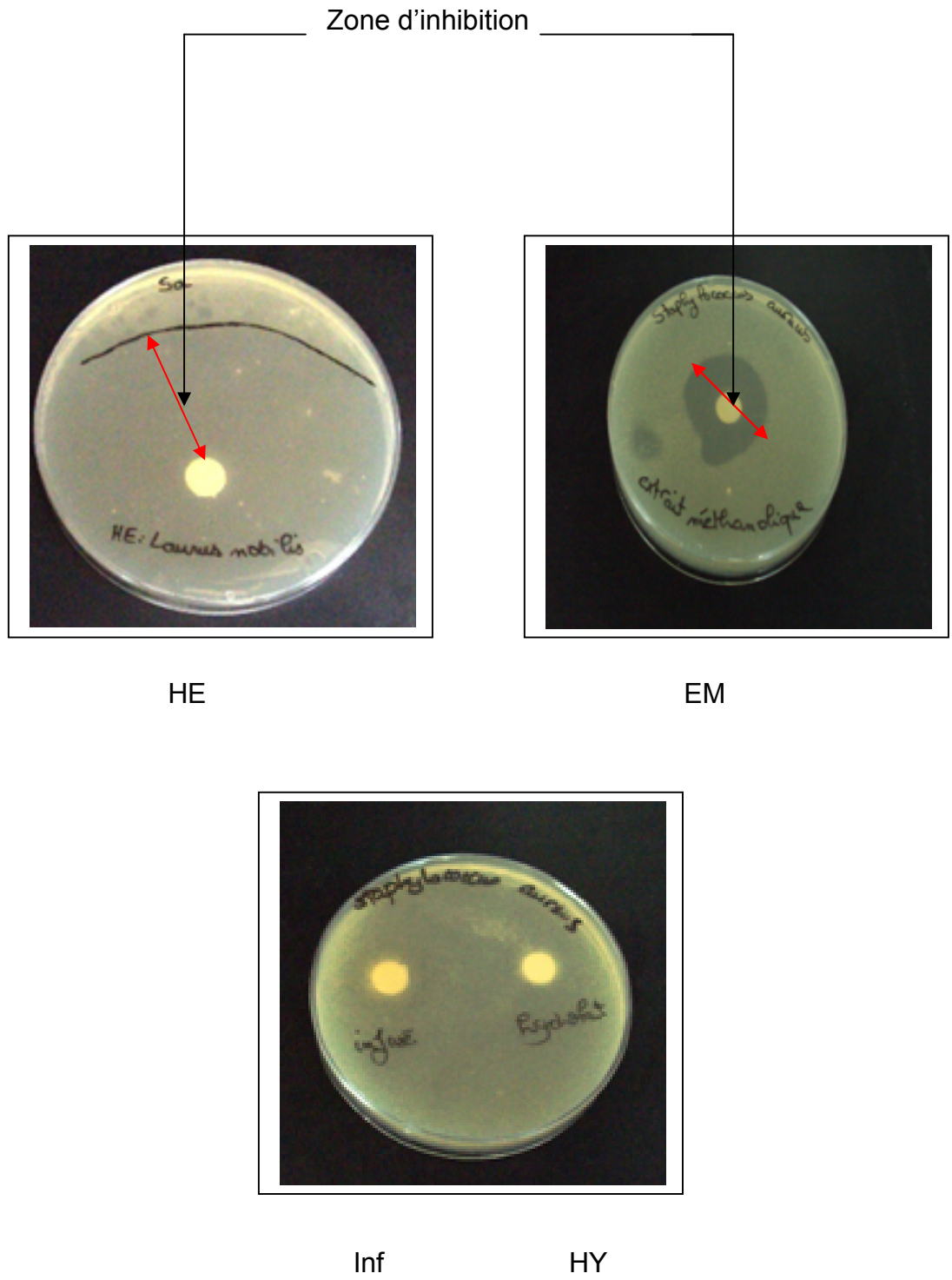
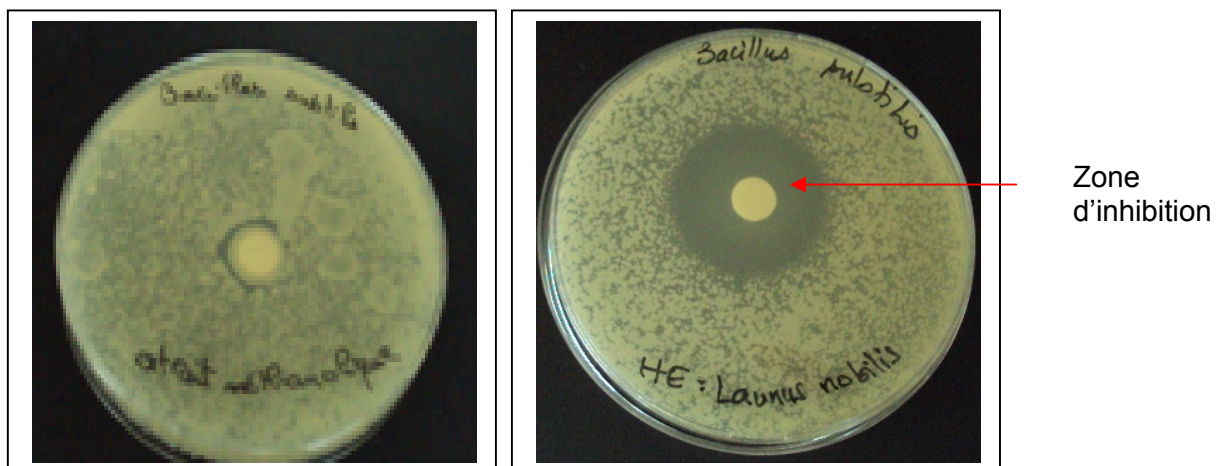
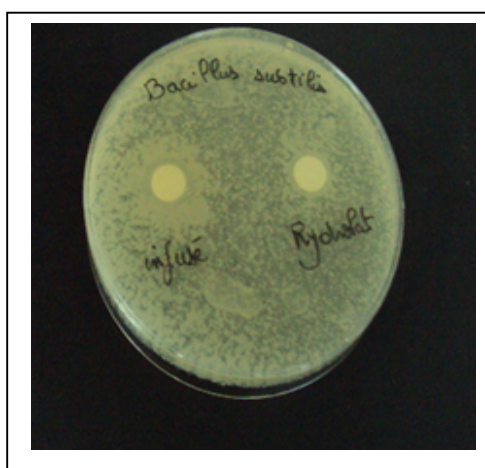


Figure 3.42 : Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur *Staphylococcus aureus*
(Originale)



EM

HE

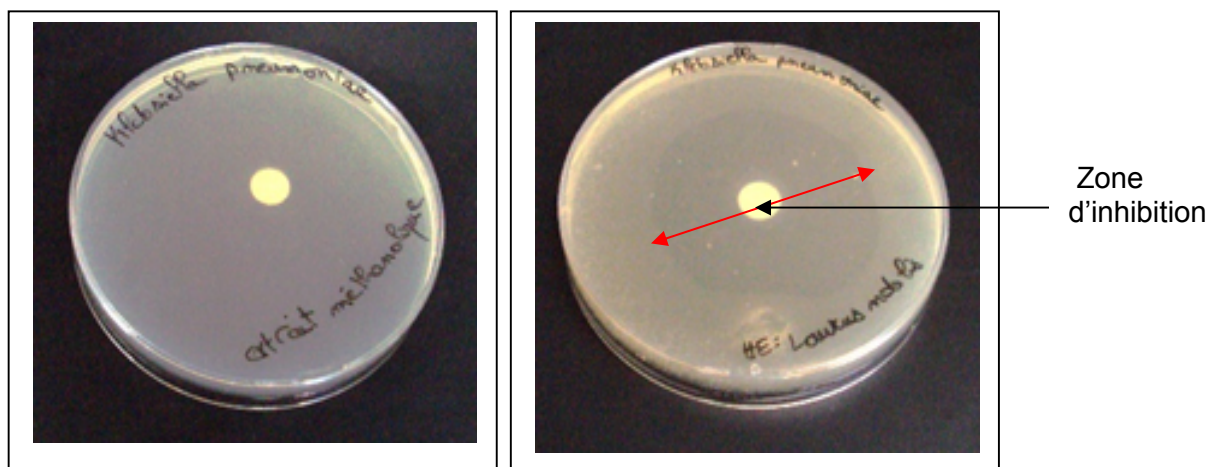


Inf

HY

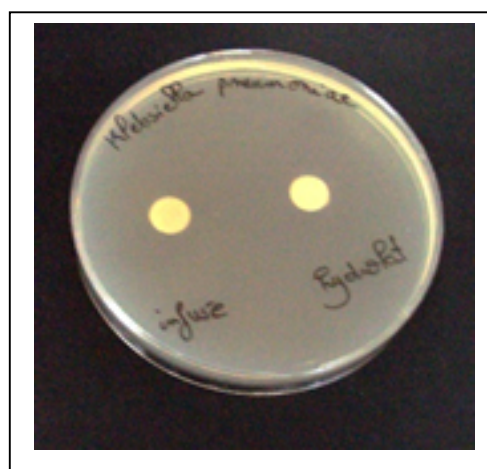
Figure 3.43: Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur *Bacillus subtilis*

(Originale)



EM

HE

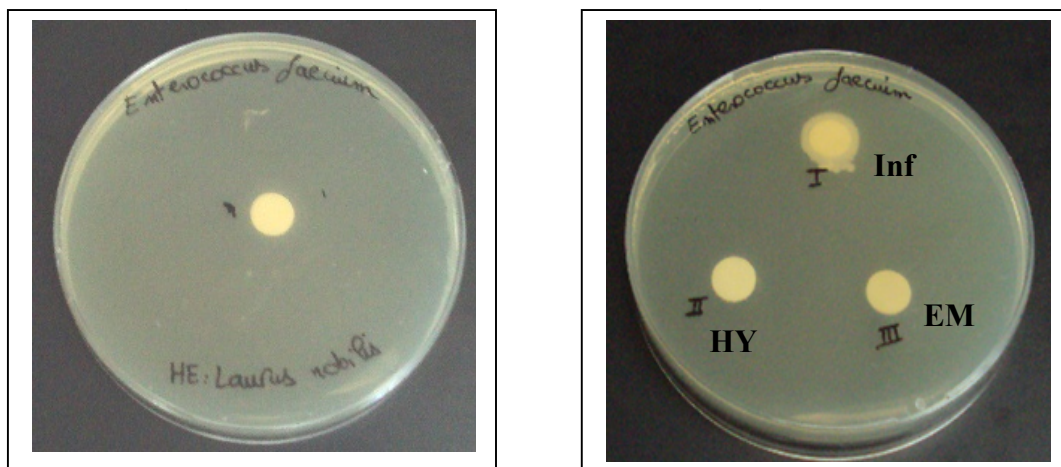


Inf

HY

Figure 3.44 : Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur *Klebsiella pneumoniae*

(Originale)



HE

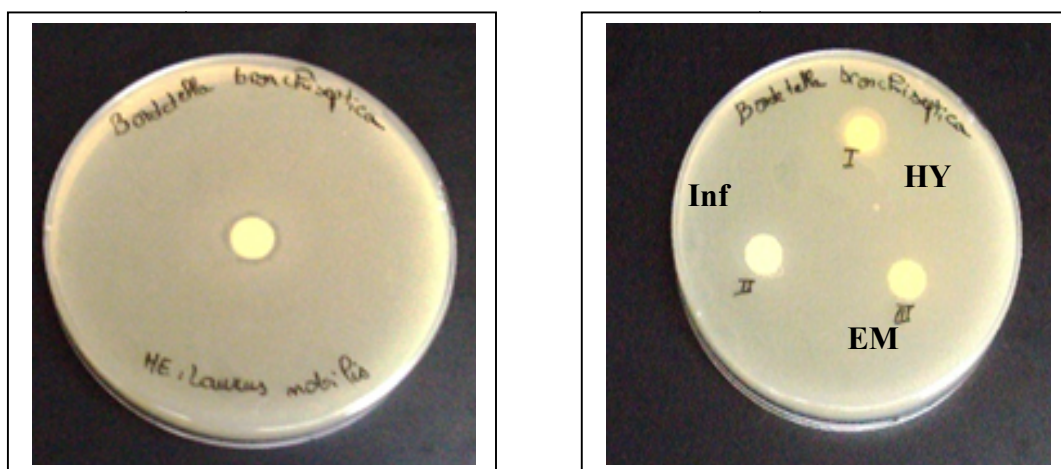
Inf

HY

EM

Figure 3.45: Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur *Enterococcus faecium*

(Originale)



HE

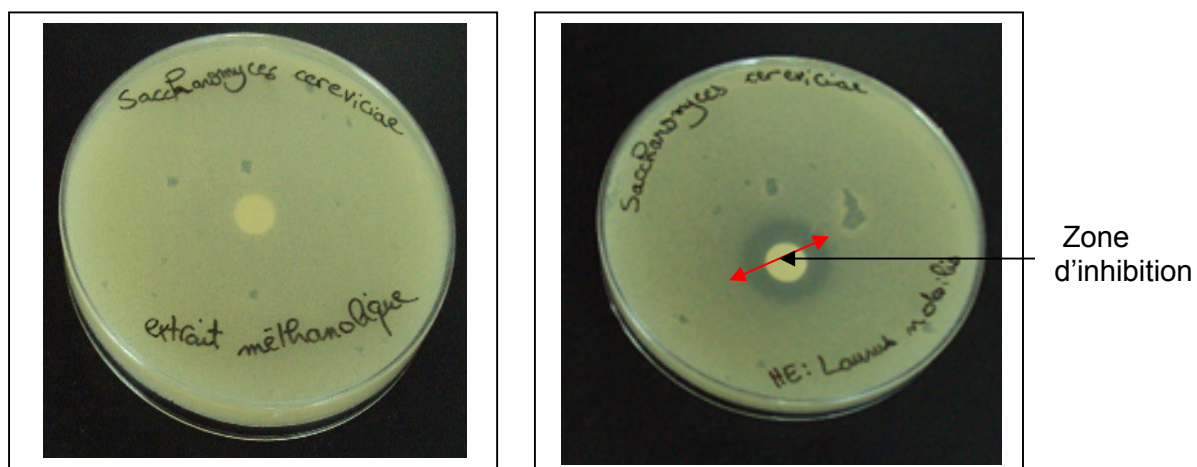
Inf

HY

EM

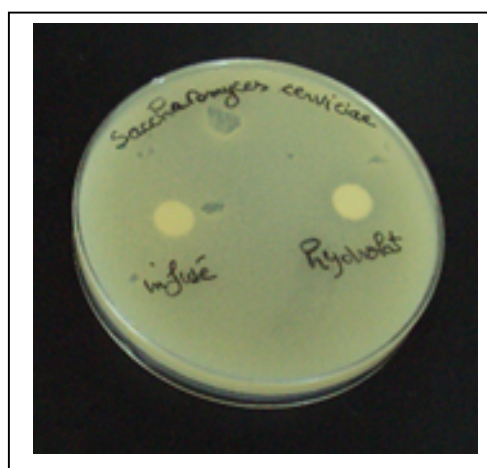
Figure 3.46: Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur *Bordetella bronchiseptica*

(Originale)



EM

HE

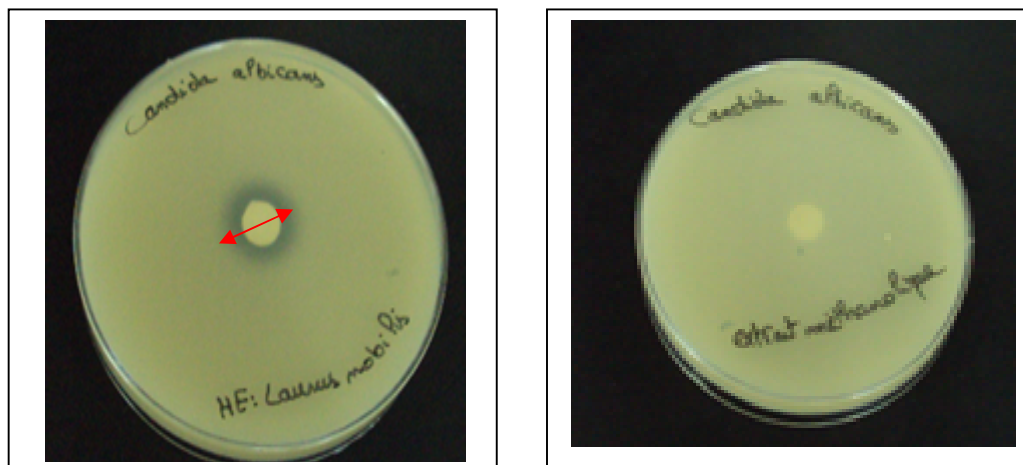


Inf

Hy

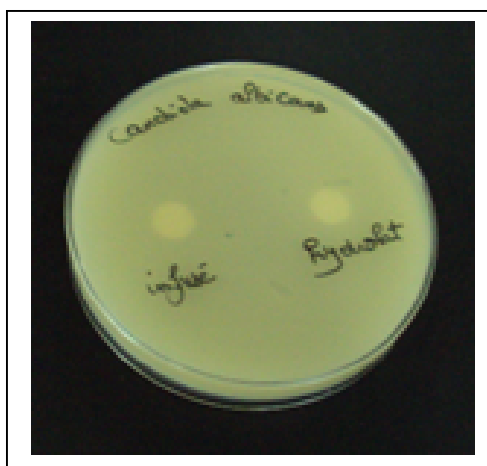
Figure 3.47: Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur *Saccharomyces cerevisiae*

(Originale)



HE

EM



Inf

HY

Figure 3.48: Aromatogramme des HE, HY, EM, Inf sur *Candida albicans*

(Originale)

3.5.2. Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne

La détermination des paramètres d'inhibition (CMI et CMB) nous a permis non seulement de confirmer, quantifier et comparer les activités, mais aussi de caractériser la nature de l'effet révélé par l'extrait sur un microorganisme donné.

Pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration minimale bactéricide et fongicide (CMB) (CMF) de l'HE vis-à-vis des germes testés. Les résultats retenus sont ceux des souches sensibles.

Les résultats sont reportés dans le tableau 3.8.

Tableau 3.8 : Résultats de la CMI et de la CMB

Les souches testées	CMI (%)	CMB et CMF(%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.125	0.25
<i>Bacillus subtilis</i>	0.03	0.25
<i>Escherichia coli</i>	0.25	0.25
<i>Enterococcus faecium</i>	0.5	1
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	1	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.125	0.125
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.125	> 2
<i>Candida albicans</i>	0.25	0.5

Les valeurs de CMI concordent d'une manière générale avec celles des diamètres d'inhibition. Les extraits ayant induit une importante zone d'inhibition

présentent les plus petites CMI sur les souches correspondantes. Ce n'est pas le cas pour *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumonia* ou ils ont montré des grandes zones d'inhibition alors que leur CMI est de 0.125%. Il apparaît donc que la plus faible CMI a été observée chez *Bacillus subtilis* avec une valeur de 0.03%.

La plus forte CMI est observée chez *Bordetella bronchiseptica*, elle est de 1%. De fortes concentrations sont nécessaires pour inhiber la croissance *Bordetella bronchiseptica*.

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* exerce une activité bactériostatique sur *Escherichia coli* et *Enterococcus faecium* avec des valeurs de CMI respectivement de 0.25% et 0.5%. Toutefois, le test ANOVA montre que les zones d'inhibition sont comparables (appendice E).

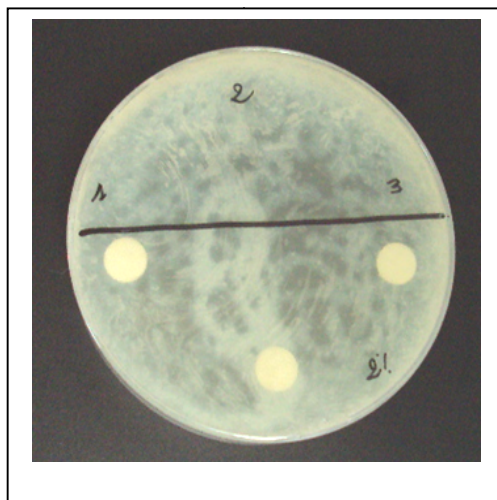
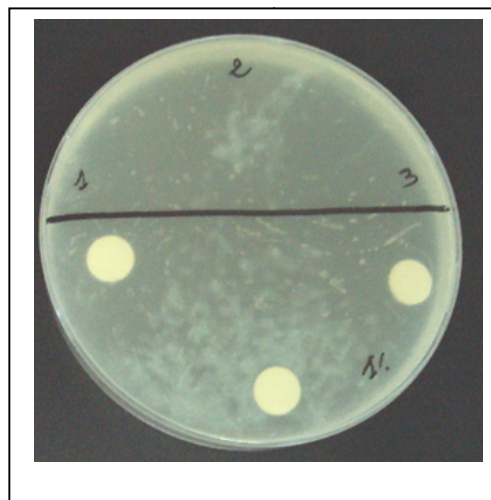
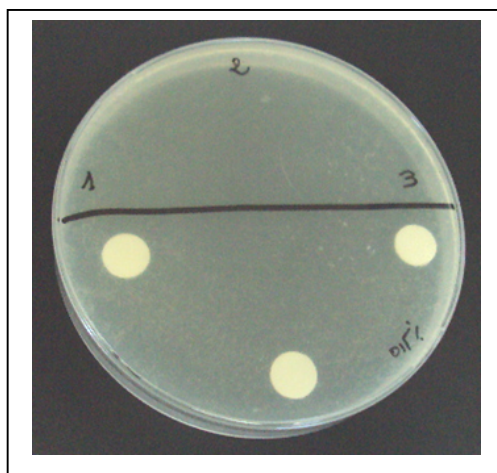
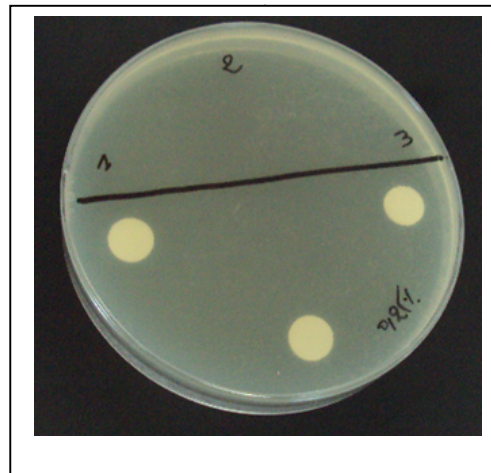
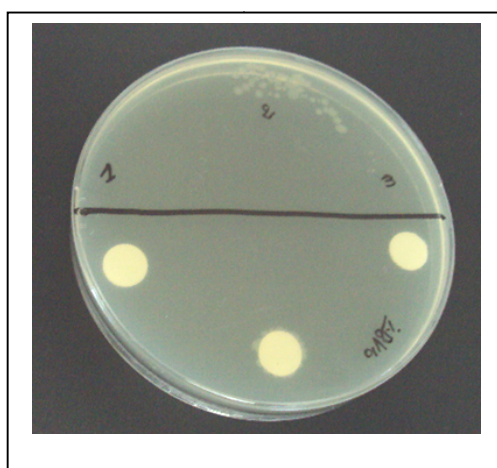
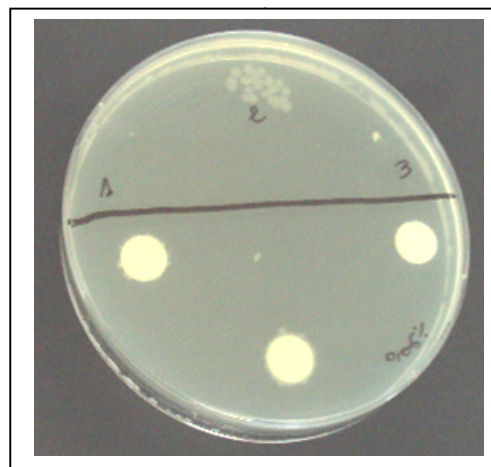
L'huile essentielle de *Laurus nobilis* exerce une activité fongistatique sur *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans* avec des valeurs de CMI respectivement de 0.125 % et 0.25 %.

L'huile essentielle a montré une action bactéricide vis-à-vis des germes étudiés. Ces bactéries présentent une sensibilité inégale vis-à-vis HE. Cette dernière par ordre décroissant se présente comme suit : *Bordetella bronchiseptica* > *Enterococcus faecium* > *Staphylococcus aureus* = *Bacillus subtilis* = *Escherichia coli* > *Klebsiella pneumonia*.

Nous remarquons que chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumonia* les CMI sont égales au CMB. Ce qui conduit à conclure que la CMI de ces deux souches est la plus faible concentration capable d'entraîner la mort d'au moins 99,99% des bactéries d'un inoculum.

Les résultats obtenus montre aussi une action fongicide à l'égard de *Candida albicans* et fongistatique à l'égard de *Saccharomyces cerevisiae*.

Les résultats de la CMI et de la CMB de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* sont présentés dans les figures suivantes : Figure 3.47 ; 3.48 ; 3.49 ; 3.50 ; 3.51 ; 3.52 ; 3.53 ; 3.54 ; 3.55 ; 3.56 ; 3.57.

HE de *Laurus nobilis* à 2%HE de *Laurus nobilis* à 1%HE de *Laurus nobilis* à 0.5%HE de *Laurus nobilis* à 0.25%HE de *Laurus nobilis* à 0.125%HE de *Laurus nobilis* à 0.06%

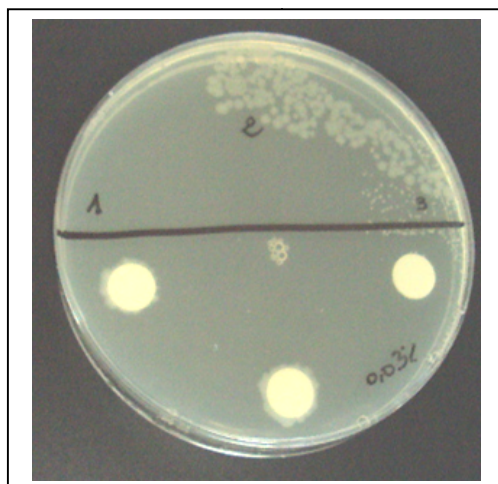
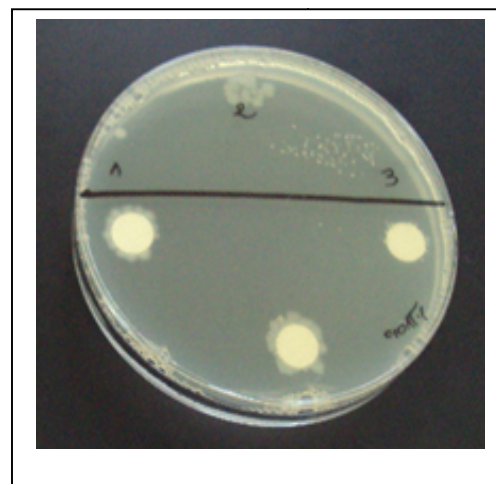
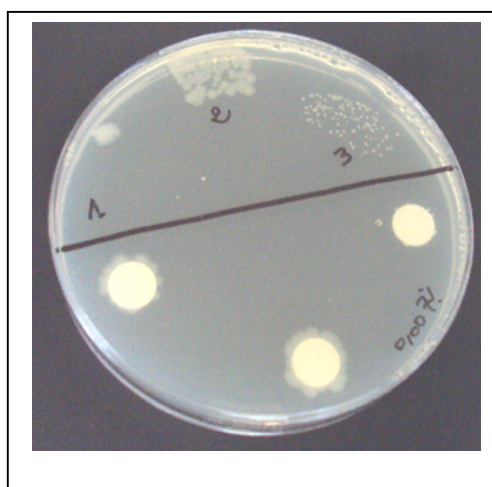
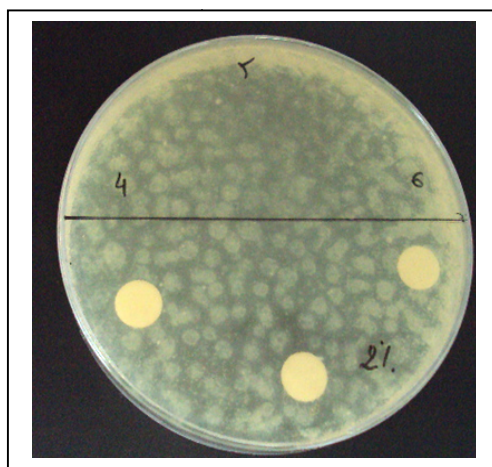
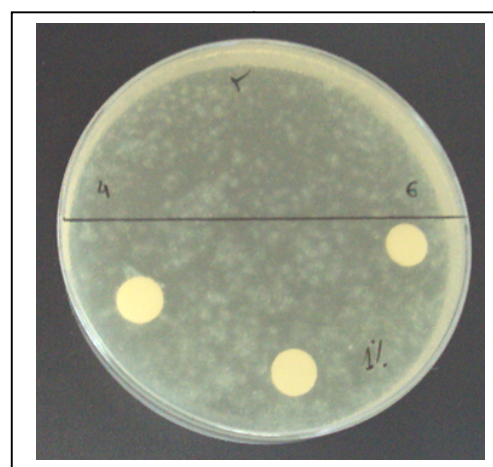
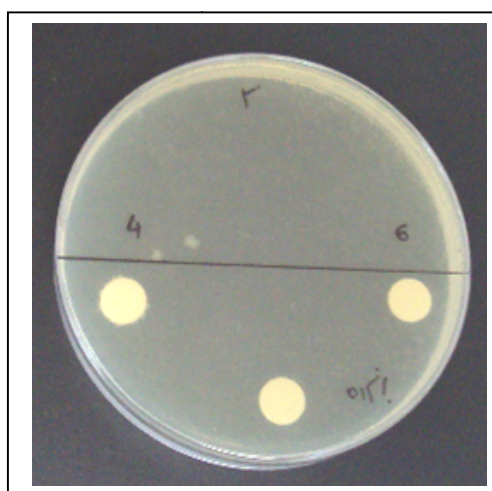
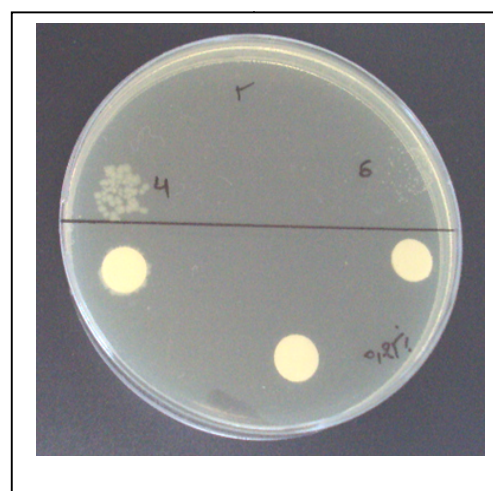
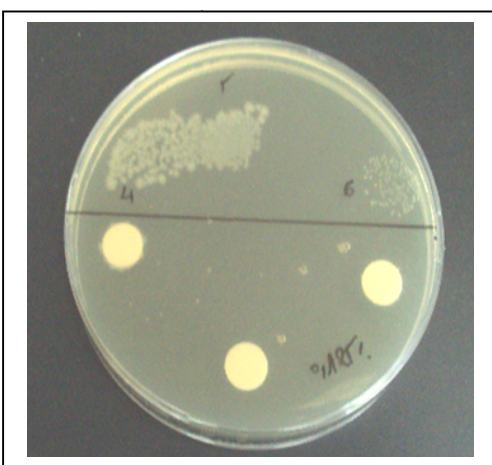
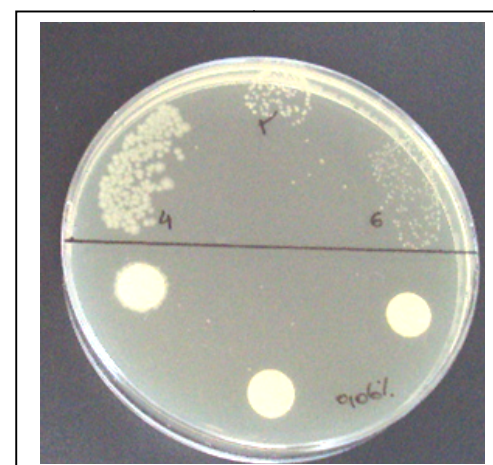
HE de *Laurus nobilis* à 0.03%HE de *Laurus nobilis* à 0.015%HE de *Laurus nobilis* à 0.007%

Figure 3.49 : Résultats de la CMI pour *B.subtillis* (1), *E.coli* (2) , *S.aueus* (3), avec l'huile essentielle de *Laurus nobilis* à différents concentrations (Originale)

HE de *Laurus nobilis* à 2%HE de *Laurus nobilis* à 1%HE de *Laurus nobilis* à 0.5%HE de *Laurus nobilis* à 0.25%HE de *Laurus nobilis* à 0.125%HE de *Laurus nobilis* à 0.06%

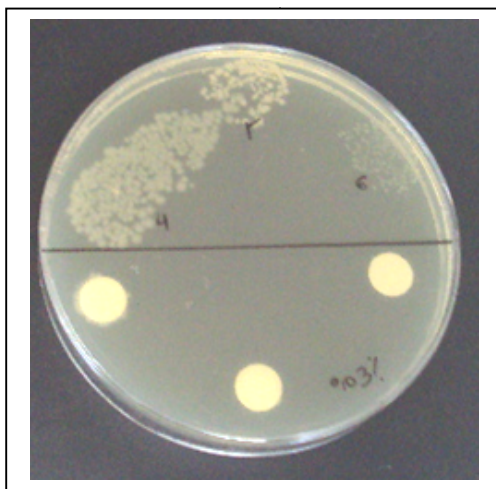
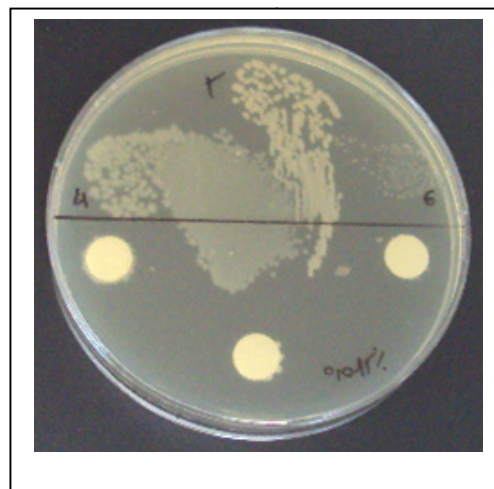
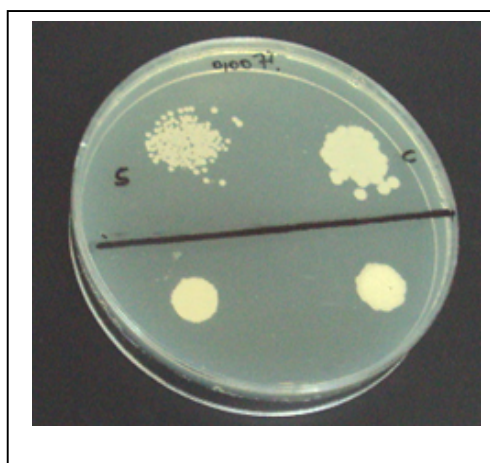
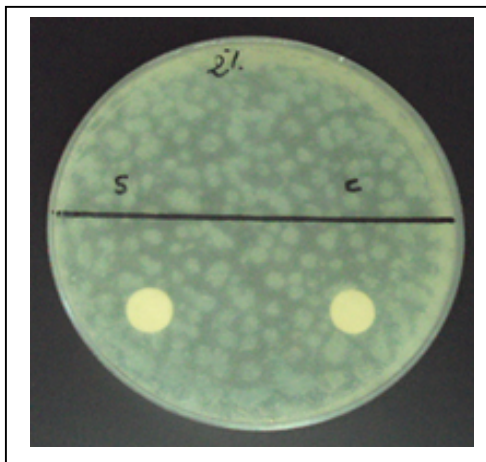
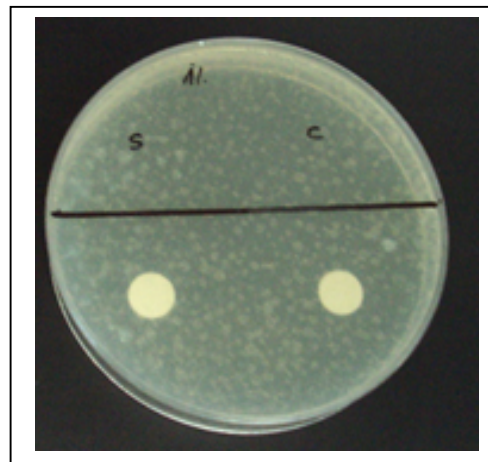
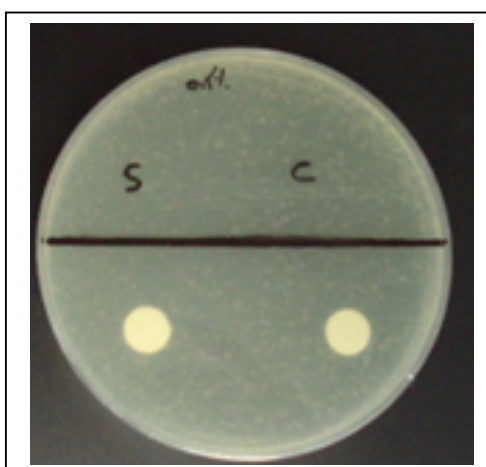
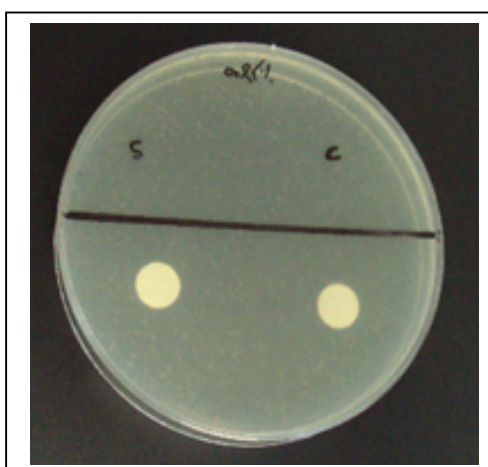
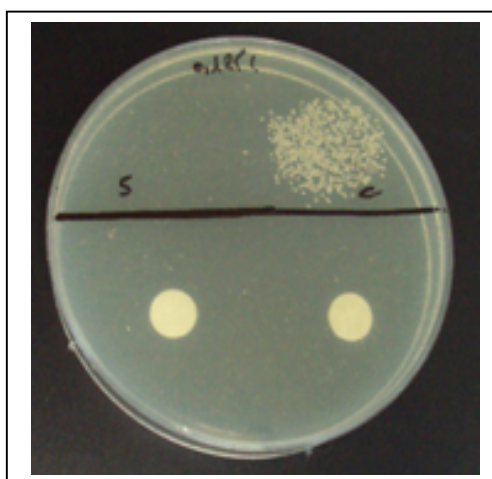
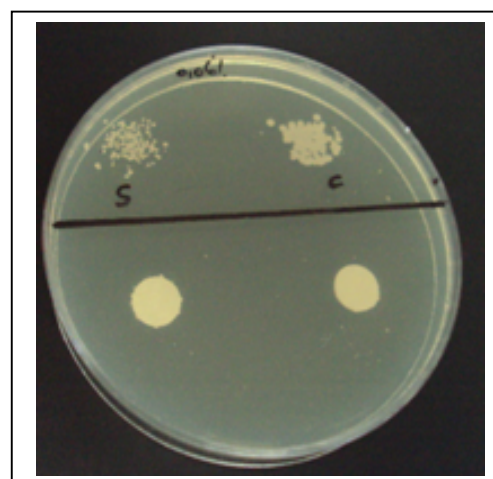
HE de *Laurus nobilis* à 0.03%HE de *Laurus nobilis* à 0.015%HE de *Laurus nobilis* à 0.007%

Figure 3.50: Résultats de la CMI pour *B. bronchiseptica* (4), *K.pneumoneae* (5), *E. faecium* (6), avec l'huile essentielle de *Laurus nobilis* à différents concentrations (Originale).

HE de *Laurus nobilis* à 2%HE de *Laurus nobilis* à 1%HE de *Laurus nobilis* à 0.5%HE de *Laurus nobilis* à 0.25%HE de *Laurus nobilis* à 0.125%HE de *Laurus nobilis* à 0.06%

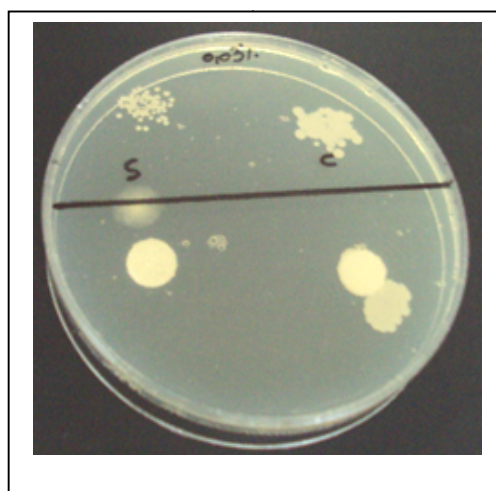
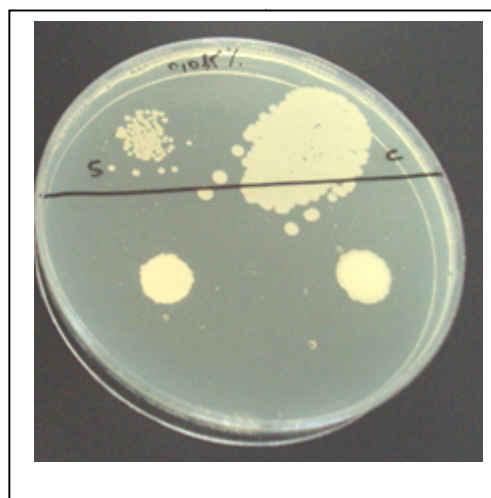
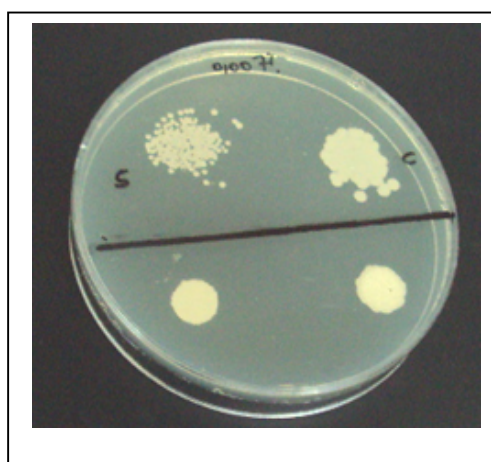
HE de *Laurus nobilis* à 0.03%HE de *Laurus nobilis* à 0.015%HE de *Laurus nobilis* à 0.007%

Figure 3.51: Résultats de la CMI pour *Saccharomyces cerevisiae* (s), *Candida albicans* (c) , avec l'huile essentielle de *Laurus nobilis* à différents concentrations.

(Originale)

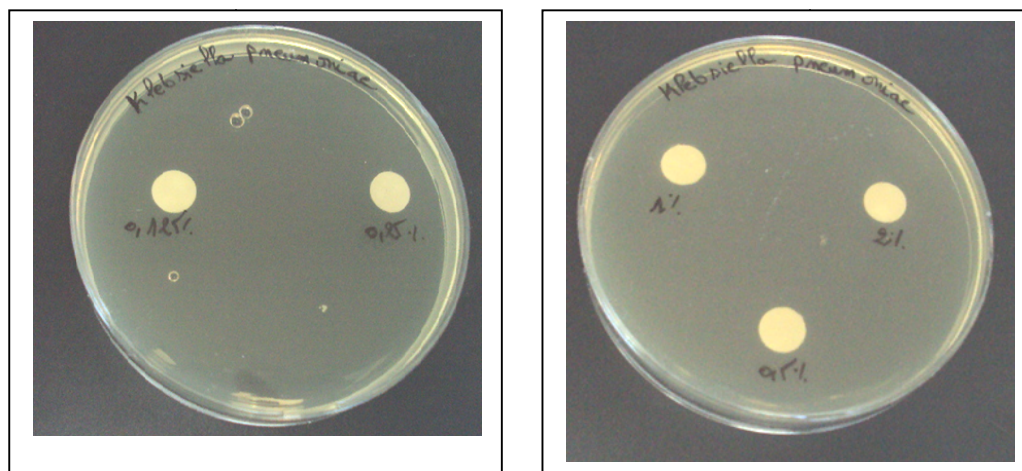


Figure 3.52: Résultats de la CMB pour *K. pneumoniae*

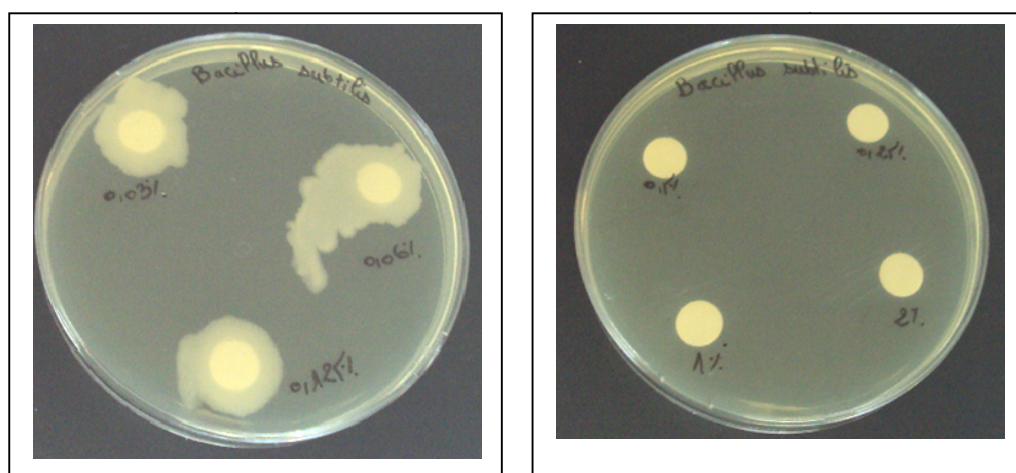


Figure3.53 : Résultats de la CMB pour *B.subtilis*

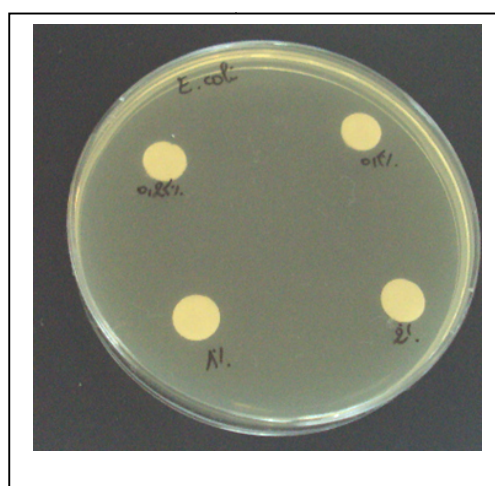


Figure3.54 : Résultats de la CMB pour *E.coli*

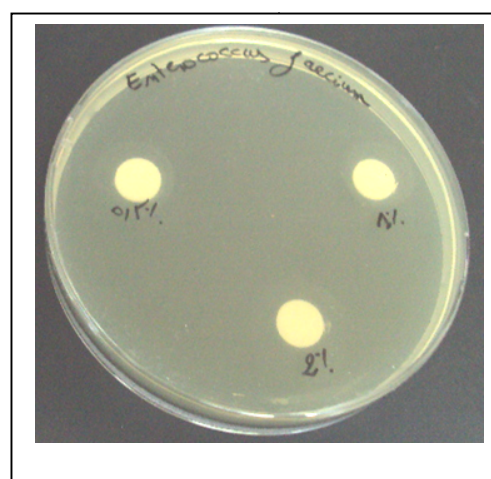


Figure3.55 : Résultats de la CMB pour *E. faecium*

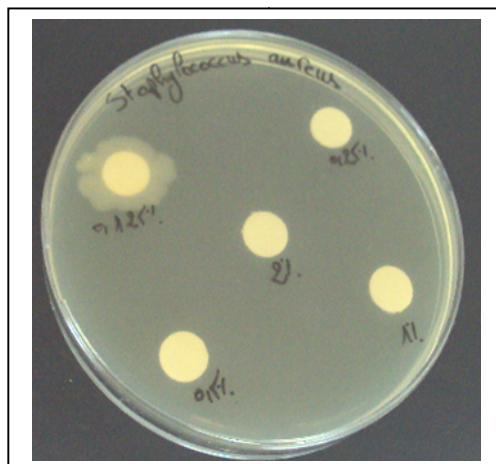


Figure 3.56 : Résultats de la CMB pour *S.aureus* (Originale)

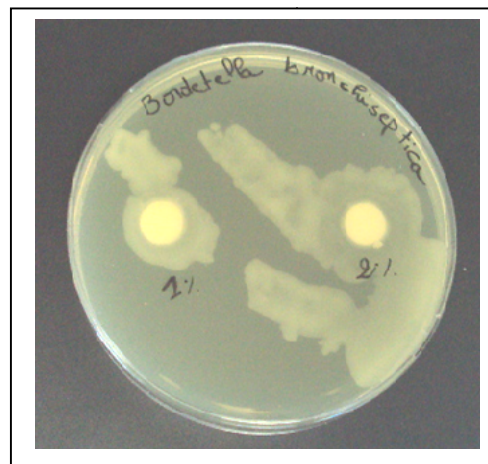


Figure 3.57: Résultats de la CMB pour *B. Bronchiseptica* (Originale)

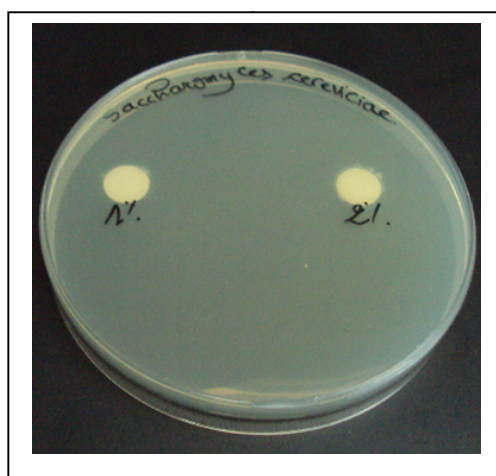


Figure 3.58 : Résultats de la CMB pour *S.cerevisiae* (Originale)

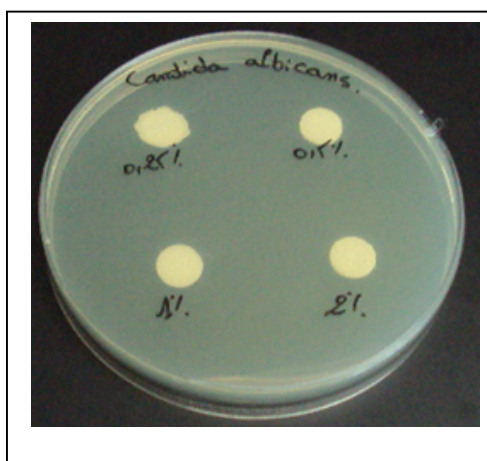
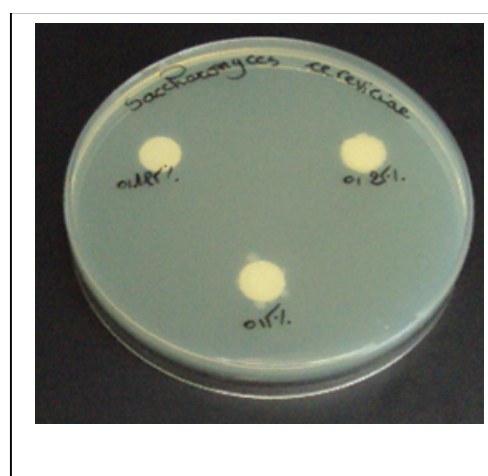


Figure 3.59: Résultats de la CMB pour *C.albicans* (Originale)

3.6. Activité antioxydante DPPH

Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydzy) en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron ; la forme non radicalaire DPPH-h est formé .L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de plante (*Laurus nobilis*) ont été fait en comparaison avec celle des différents antioxydants : tocophérol, rutine et la quercétine.

3.6.1 Activité antioxydante de l'huile essentielle et de l'hydrolat

Les résultats de l'activité antioxydante (DPPH) de l'huile essentielle et de l'hydrolat du *Laurus nobilis* ainsi que ceux de la rutine, quercétine, et du tocophérol sont donnés dans le tableau 3.9.

Tableau 3.9 : Activité antioxydante (DPPH) pour l'huile essentielle, l'hydrolat, rutine, tocophérol et de la quercérine (moyennes de trois mesures \pm écart-type)

Concentration en mg/l	Activité antioxydante en %				
	HE	HY	Rutine	Tocophérol	Quercétine
100	15,90 \pm 0.29	6,34 \pm 0.43	17,93 \pm 0,62	38.08 \pm 1.26	68,96 \pm 0,50
200	29,86 \pm 0.30	9.15 \pm 0.49	30,40 \pm 0,74	41.52 \pm 0.44	76,52 \pm 0,28
400	34,82 \pm 0.32	15.00 \pm 0.80	33,78 \pm 0,42	42.48 \pm 0,48	78,57 \pm 0,30
600	35,40 \pm 0.22	15.19 \pm 0.70	53,78 \pm 0,38	52,30 \pm 0,33	80,12 \pm 0,69
800	36,36 \pm 0.42	22.40 \pm 0.49	61,64 \pm 0,36	65,42 \pm 0,26	85,42 \pm 0,45
1000	40,70 \pm 0.15	23.51 \pm 0.12	62,25 \pm 0,19	80,53 \pm 0,72	86,48 \pm 0,48

Les résultats du tableau 3.9 montrent que c'est la quercétine qui est le piègeur du radical DPPH le plus puissant parmi les trois témoins utilisés. Nos résultats concordent avec ceux observés par certains auteurs, que les flavonoïdes sont des capteurs puissants de radicaux [122][123][124] .

Les valeurs des concentrations inhibitrices IC₅₀ (mg/l) des témoins (rutine et tocophérol) montrent une activité assez importante puisqu'ils agissent à des concentrations élevées. Toutefois, la quercétine présente une activité antiradicalaire supérieure à 50 % quelque soit la concentration utilisée. Par conséquent, il nous a été impossible de déterminer la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (tableau 3.10).

Tableau 3.10: Concentration inhibitrice du tocophérol et de la rutine

Echantillons	IC ₅₀ (mg/l)
Tocophérol	551.54 ±1.15
Rutine	562.22 ±2.84

Il apparaît que l'HE et l'HY de laurier noble présentent une capacité de réduction relativement inférieure à celle de la rutine, le tocophérol et la quercétine.

Pour une concentration maximale de 1000 mg/l l'activité de réduction du DPPH par HE ne dépasse pas 41%. Ainsi, il nous a été impossible de déterminer la concentration inhibitrice de 50% des radicaux.

Nos observations sur l'activité de piéger les radicaux libres par HE viennent s'opposer à ceux observées par FERREIRA et *al.*, où ils ont montré que l'huile essentielle de *laurus nobilis* présente une activité antioxydante intéressante avec un pouvoir d'inhibition de DPPH de 53% pour 0.1 mg/ml. Cette différence du résultat semble être due à la différence de la composition chimique de nos huiles essentielles avec celle testée par FERREIRA et *al.*, [57].

Nos résultats montrent aussi que pour des concentrations élevées 800 mg/l et 1000 mg/l en HY, l'activité anti-radicalaire est inférieure non seulement à celle de l'HE mais aussi aux antioxydants de références (rutine, tocophérol et quercétine) (Figure 3.58).

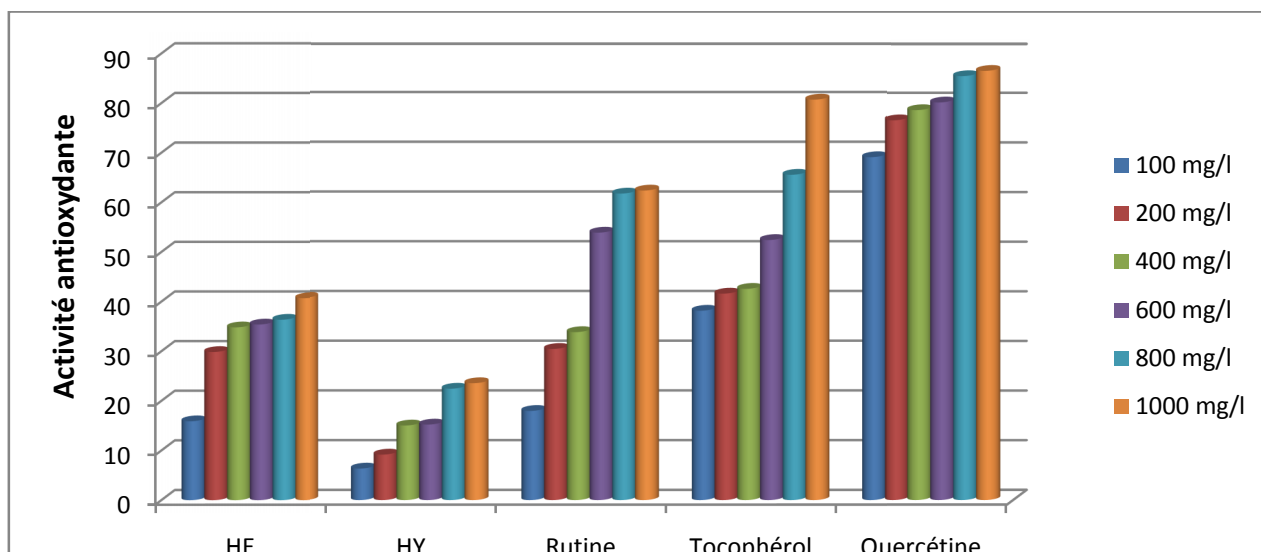


Figure 3.60: Activité antioxydante (DPPH) de l' HE, HY, Rutine, Tocophérol, Quercétine.

3.6.2. Activité antioxydante de l'extrait méthanolique

Les résultats du test ant-iradicalaire (DPPH) par l'extrait méthanolique (EM) et l'antioxydant de référence sont résumés dans le tableau 3.11 et la figure 3.59.

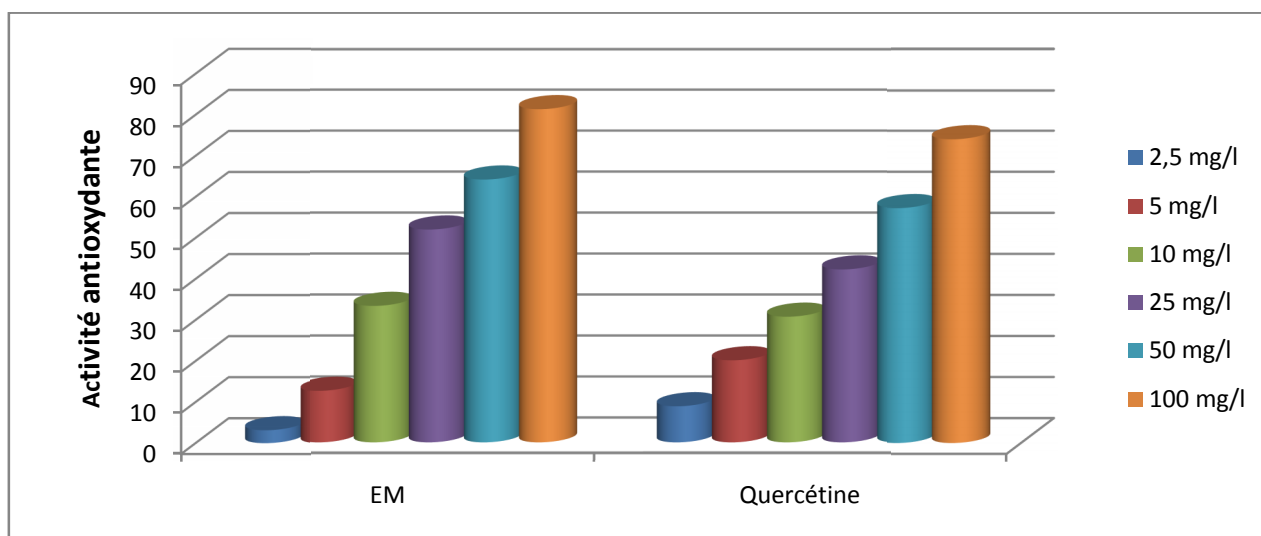


Figure 3.61: Activité antioxydante de l'extrait méthanolique et de la quercétine.

Tableau 3.11 : Activité antioxydante de l' l'extrait méthanolique et de la quercitrine (moyennes de trois mesures \pm écart-type).

Concentration en mg/l	Activité antioxydante en %	
	Extrait méthanolique	Quercétine
2,5	3,14 \pm 0,95	8,80 \pm 0,38
5	12,58 \pm 0,54	20,02 \pm 0,88
10	33,30 \pm 0,58	30,66 \pm 0,66
25	51,93 \pm 0,56	42,20 \pm 0,65
50	64,13 \pm 0,41	57,21 \pm 0,55
100	81,30 \pm 0,37	73,99 \pm 0,53

Comme figurant dans le tableau 3.11, l'extrait méthanolique (EM) est un excellent antioxydant. Il présente une capacité de neutralisation du radical libre DPPH puissante puisqu'il agit à de faibles concentrations.

Nous notons une faible activité pour les concentrations 2.5 mg/l et 5 mg/l, au-delà de ces concentrations l'activité antioxydante de l' l'extrait est supérieure à celle de la quercétine.

Nous remarquons aussi que pour une concentration de 100 mg/ml de l'extrait méthanolique nous obtenons une activité supérieure à celle observée pour une concentration de 1000 mg/l avec l'HE.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par SIMIĆ et *al.*, [125].

L'étude menée par FERREIRA et *al.*, a montré que l'isoquercitrine, les glycosides flavonol et la vitamine E présents dans le laurier noble peuvent expliquer l'activité antioxydante démontrée par l'extrait méthanolique [57].

Les valeurs des concentrations inhibitrices IC₅₀ (mg/l) montrent une activité importante pour l'extrait méthanolique par rapport à celui de la quercétine, sachant qu'une faible concentration entraîne une forte activité anti- radicalaire (tableau 3.12).

Tableau 3.12 : Concentration inhibitrice de l'extrait méthanolique et de la quercétine (moyennes de trois mesures \pm écart-type).

Echantillons	IC ₅₀ (mg/l)
Extrait méthanolique	23.45 \pm 0,45
Quercétine	37,99 \pm 0,32

3.7. Etude de la toxicité

Après administration par voie orale, de l'huile essentielle aux six lots de dix souris chacun dont 5 mâles et 5 femelles. Chaque lot de souris reçoit une dose. Les doses sont comprises entre 2000 mg/kg et 62 mg/kg d'HE (Tableau 3.13). Les pourcentages de mortalité ont été relevés et consignés.

Tableau3.13: Mortalité des souris

Lots	Nbre d'animaux par lots	Dose (mg/kg)	Nbre de mortalité	% de mortalité
1	10	2000	10	100
2	10	1000	7	70
3	10	500	3	30
4	10	250	1	10
5	10	125	0	0
6	10	62.5	0	0

L'administration de l'HE pour les doses 1000 mg/kg et 2000 mg/kg provoquent chez les souris mâles des convulsions suivies immédiatement par la mort.

Chez les femelles, ces mêmes concentrations en HE s'expriment par une léthargie et un coma. Par la suite un œdème musculaire est visible et les premiers morts sont enregistrés une heure après l'ingestion de l'HE.

Les souris de deux sexes réagissent de la même manière à une dose de 500 mg/kg . Sur les membres antérieurs on observe un œdème musculaire.

Le même comportement léthargique est observé chez les souris de deux sexes après administration de l'HE à une dose de 250 mg/kg. Toutefois, l'œdème musculaire n'a pas été constaté.

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* administré par voie orale est modérément toxique car la DL 50 est de 902.50 mg/kg.

L'huile essentielle administrée par voie orale à des doses de 125 mg/kg et 62.5 mg/kg est dépourvue de toxicité aigue chez les souris des deux sexes.

Aucune mortalité n'a été observée durant une période de 14 jours d'observation chez les souris ayant reçu l'infusion et l'hydrolat de *Laurus nobilis* à des doses 2000 mg/kg et 5000 mg/kg. Ces dernières ne présentent donc aucune toxicité aigue.

3.8. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

La recherche de propriété anti-inflammatoire a été réalisée sur le modèle d'œdème plantaire induit chez les souris par l'injection d'une suspension à 1% de carragénine (test de Levy) (appendice C).

Afin d'analyser l'effet anti-inflammatoire de *Laurus nobilis* nous avons testé différents extrait à différentes doses .

La réaction inflammatoire au niveau des pattes postérieures gauches de toutes les souris, se manifeste par l'apparition d'un œdème plantaire exprimé en pourcentage dans le figure 3.60.

L'œdème provoqué par la carragénine dans des pattes gauches des souris montre trois phases distinctes :

- Une première phase qui fait intervenir l'histamine et la 5-hydroxy-tryptamine qui favorisent la vasodilatation, la transsudation plasmatique et l'œdème,

- Une seconde phase qui fait appel aux kinines comme médiateurs augmentent la perméabilité vasculaire,
- Une troisième phase dont le médiateur est supposée être la prostaglandine associée à la migration leucocytaire dans la zone enflammée.

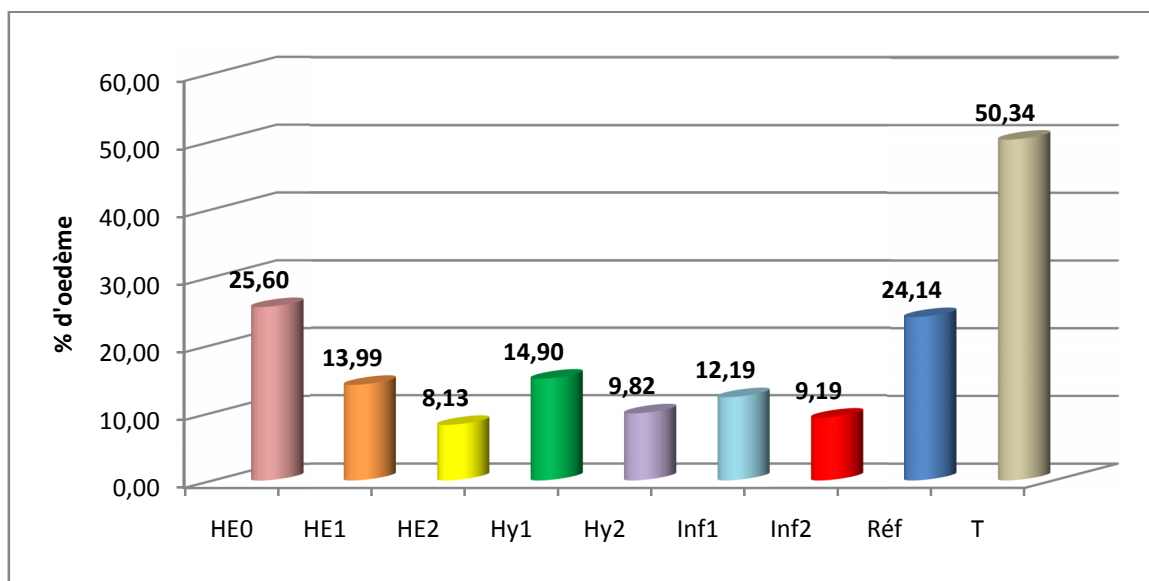


Figure 3.62 : Pourcentage d'œdème chez les souris NMRI.

D'après le test ANOVA (appendice E) il y a une différence significative quant à la réponse des souris prétraitées ou non. Cette réaction se traduit par un pourcentage d'œdème plus élevée sur les pattes antérieures gauches du lot témoin. Les souris traitées par les différents extraits de *Laurus nobilis* présentent un pourcentage d'œdèmes réduit (Figure 3.60).

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée par le calcul des pourcentages de réduction de l'œdème plantaire (Figure 3.61).

Le test de Student–Newman-Keuls (appendice E), montre que les sous ensembles constitués des lots HE2, HE1, HY1, HY2, Inf1, Inf2 sont homogènes ($\alpha=0.742$) mettant en évidence leurs effets similaires.

A la lumière de ces résultats, il apparaît que l'huile essentielle (HE2) est dotée d'une activité anti-inflammatoire importante. Elle est suivie de l'infusé (Inf2) et de l'hydrolat (HY2) (Figure 3.61).

Ce travail met en évidence que l'activité anti-inflammatoire des différents extraits testés est aussi appréciable que celle du produit de référence Ibuprofène .

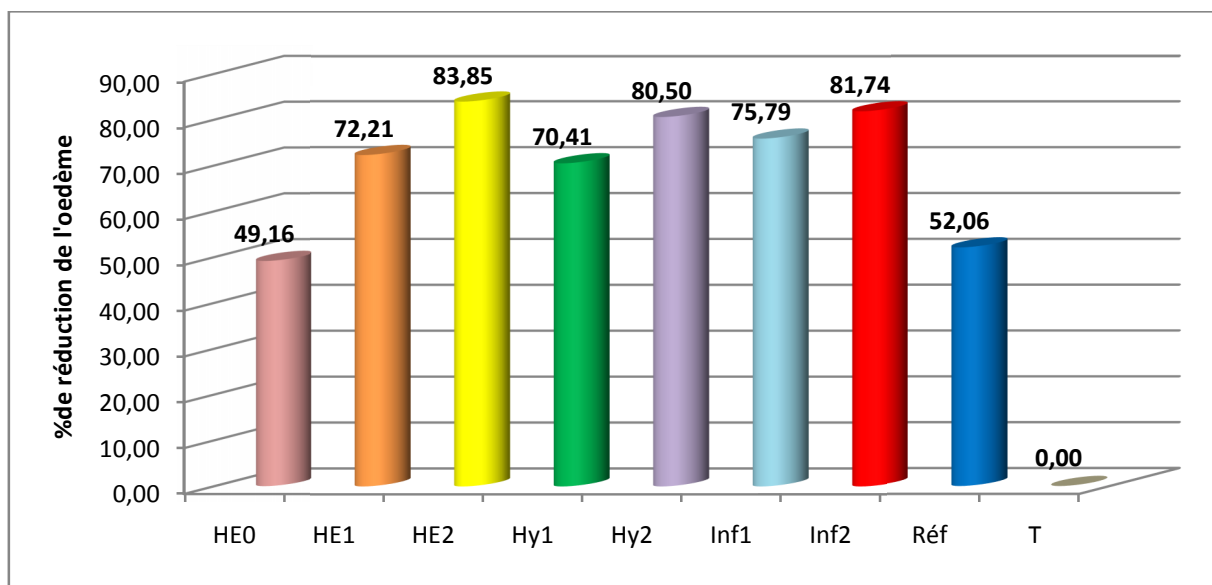


Figure 3.63: Pourcentage de réduction d'œdème chez des souris NMRI.

L'infusion et l'huile essentielle de *Laurus nobilis* présentent une activité anti-inflammatoire intéressante ce qui est en concordance avec la bibliographie [126] [127]. En outre la composition de l'huile essentielle en α pinène, β pinène, sabinène et terpinéol contribue éventuellement à l'effet anti-inflammatoire [126]. Toutefois, l'activité anti-inflammatoire de l'hydrolat de *laurus nobilis* n'a pas encore fait l'objet d'une étude.

3.9. Evaluation de l'activité antalgique

Nous avons vérifié l'effet des différents extraits de *Laurus nobilis* sur la douleur provoquée chez la souris par l'injection intra-péritonéale d'une solution diluée d'acide acétique (Writhing test) (appendice C).

Le test ANOVA (appendice E) montre une différence significative entre les souris prétraitées ou non prétraitées. Chez les souris du lot témoin, le nombre de crampes est très élevé par rapport à celles des lots ayant reçu les différents traitements (Figure3.62).

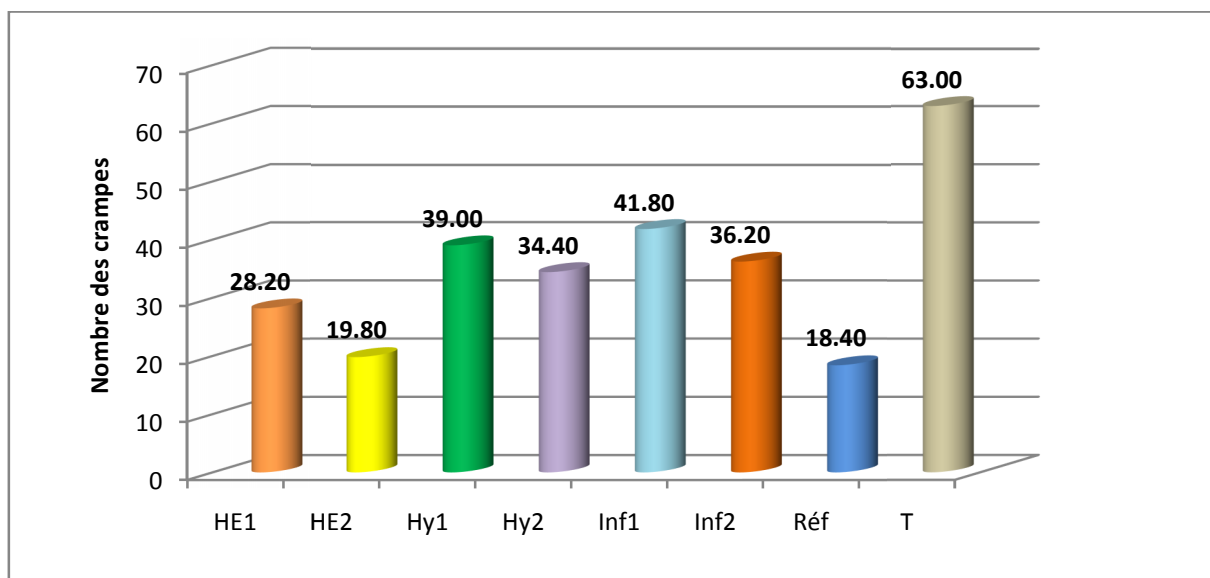


Figure 3.64: Nombre de crampes comptabilisées sur des souris NMRI

L'activité antalgique est exprimée en pourcentage de réduction de la douleur pour chaque lot traité par les différents extraits, ibuprofène et l'eau (Figure 3.63).

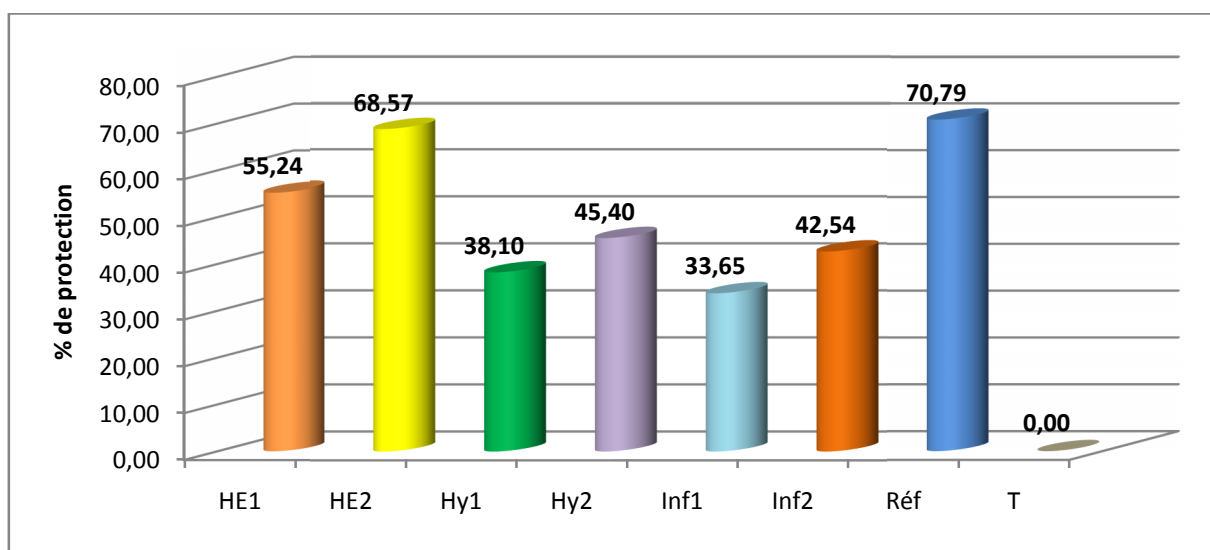


Figure 3.65 : Pourcentage de protection contre les crampes abdominales chez les souris NMRI.

Le test de Student–Newman-Keuls (appendice E), révèle que les sous ensembles constitués des lots HE2 et Réf sont homogènes ($\alpha=0.346$). Ce résultat montre leurs effets similaires (appendice E).

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* à une dose de (HE2) réduit la douleur abdominale provoquée par l'acide acétique. Le pourcentage de réduction de la douleur est de 68.57% suivi par HE1 avec un pourcentage de 55.81% et de l'hydrolat HY2 (45.39%).

Il semble que le pourcentage de réduction des crampes abdominales de l'huile essentielle pour la dose (HE2) (68.57%) est proche de celle provoquée par l'ibuprofène (70.79%). Le test ANOVA (appendice E) révèle l'absence de différence significative entre l'effet des deux substances ($\alpha > 0.05$).

L'effet antalgique des différents extraits de *Laurus nobilis* signalés en médecine traditionnelle auraient été retrouvés en expérimentation. Un effet antalgique auraient été mis en évidence dans les parodontopathies, les douleurs des rhumatismes et la colique abdominale [127] [128][129] .

3.10. Evaluation de l'activité diurétique

Pour l'étude expérimentale de l'activité diurétique des différents extraits de *Laurus nobilis*, nous avons utilisé des rats Wistar. Les animaux sont placés dans des cages à métabolisme munies d'un dispositif spécial qui permet de recueillir les urines dans des tubes gradués. La collecte se fait pendant 6 heures après l'administration des produits (appendice C).

D'après le test ANOVA (appendice E) il y a une différence significative entre le volume d'urine recueilli des différents lots ($\alpha=0.05$) (Figure 3.64).

Le test de Student–Newman-Keuls (appendice E), révèle que les sous ensembles constitués des lots HE1 et T sont homogènes ($\alpha=0.314$). Ce résultat montre que ingérée à faibles doses l'huile essentielle ne modifie pas l'excrétion urinaire par rapport au témoin.

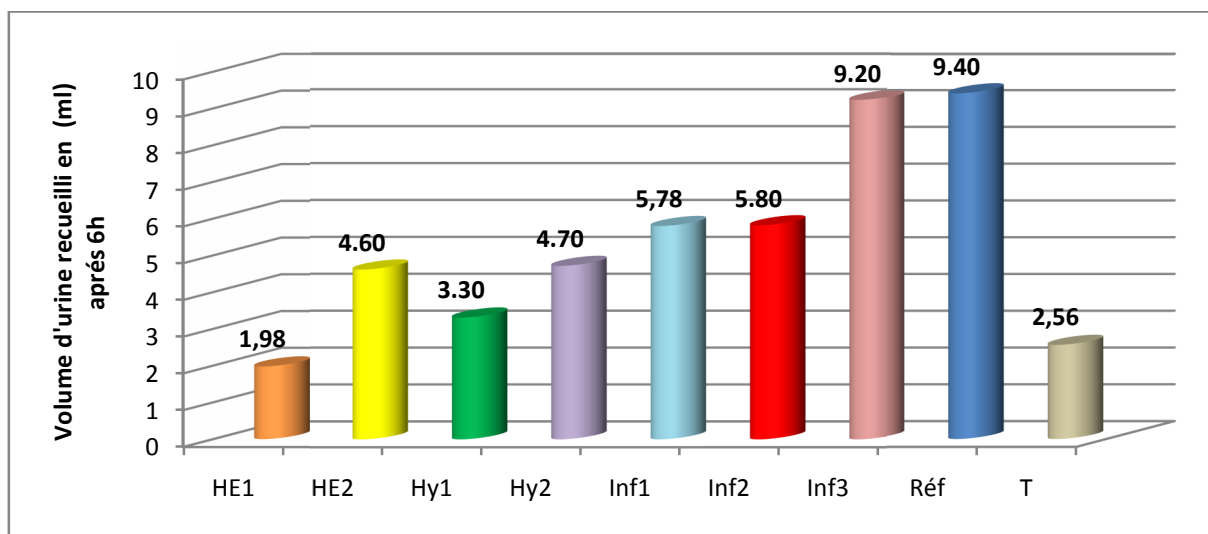


Figure 3.66: Effet de différents extraits de *Laurus nobilis* sur la diurèse chez les rat WISTAR

La détermination de volume d'urine recueilli permet de calculer l'excrétion urinaire volumétrique (E.U.V)

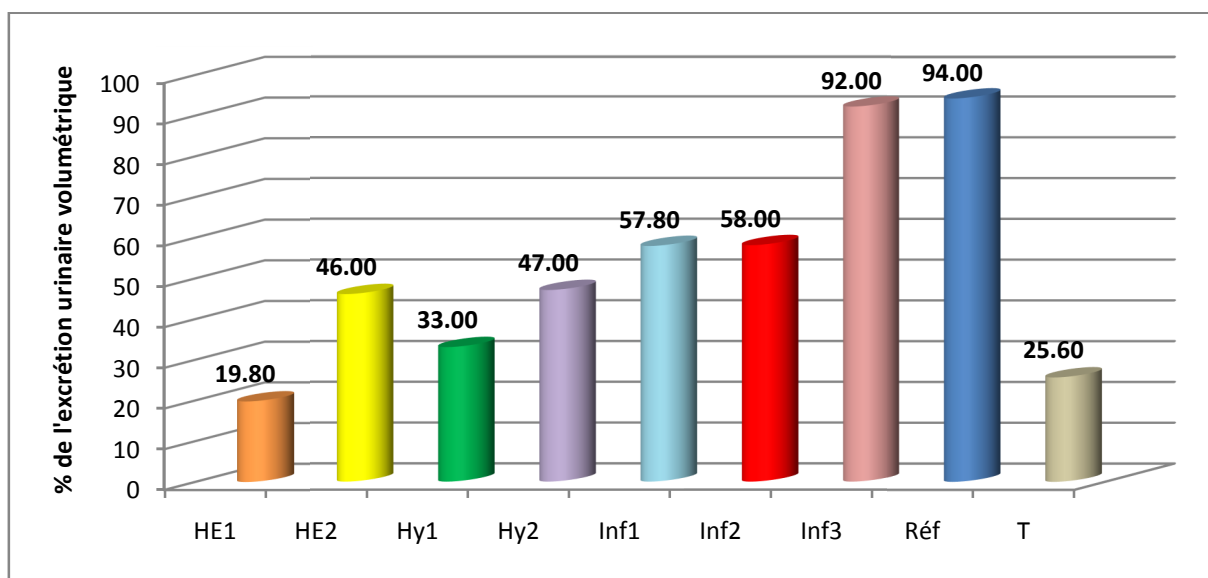


Figure 3.67 : Excrétion urinaire volumétrique des différents extraits de *Laurus nobilis*

On remarque une variation de la réponse en fonction de la dose administrée. En général, l'augmentation de la dose des différents extraits de *Laurus nobilis* entraîne une hausse proportionnelle de l'excrétion urinaire (Figure3.66).

On note une augmentation de l'E.U.V. à la suite de l'administration de l'infusé. Cette augmentation est graduelle. Le maximum est observé à la dose inf3 avec un pourcentage d'excrétion égale à 92%.

L'augmentation de la diurèse pour la dose Inf3 est proche de celle engendrée par le Furosémide (Réf). Le test ANOVA (appendice E) révèle l'absence de différence significative entre l'effet des deux substances ($\alpha=0.05$). Ce résultat montre leurs effets similaires.

En fait le Furosémide, agit sur tout le néphron : il augmente le flux sanguin rénal dans la zone corticale du rein, ce qui contribue à réduire la réabsorption d'eau et des électrolytes par la portion tubules [130].

Le laurier noble est utilisé traditionnellement pour son effet diurétique, nos résultats confirment ce fait [127].

3.11. Evaluation de l'activité sédatrice

Nous avons recherché l'effet sédatif chez les souris. Elle reçoit les extraits de *Laurus nobilis* à tester et est introduite de force dans un environnement non familier : un actimètre. Nous mesurons alors l'activité comportementale de la souris, c'est-à-dire le nombre de déplacements. Les substances sédatives réduisent les paramètres comportementaux (appendice C).

D'après le test ANOVA (appendice E) il y a une différence significative vis à vis du nombre de déplacements des souris introduites de force dans l'actimètre. Nous avons observé un nombre très élevé de déplacements pour le lot témoin. Les lots de souris ayant reçu les différents traitements à base de laurier noble se déplacent normalement et le nombre de déplacement est réduit (Figure 3.66).

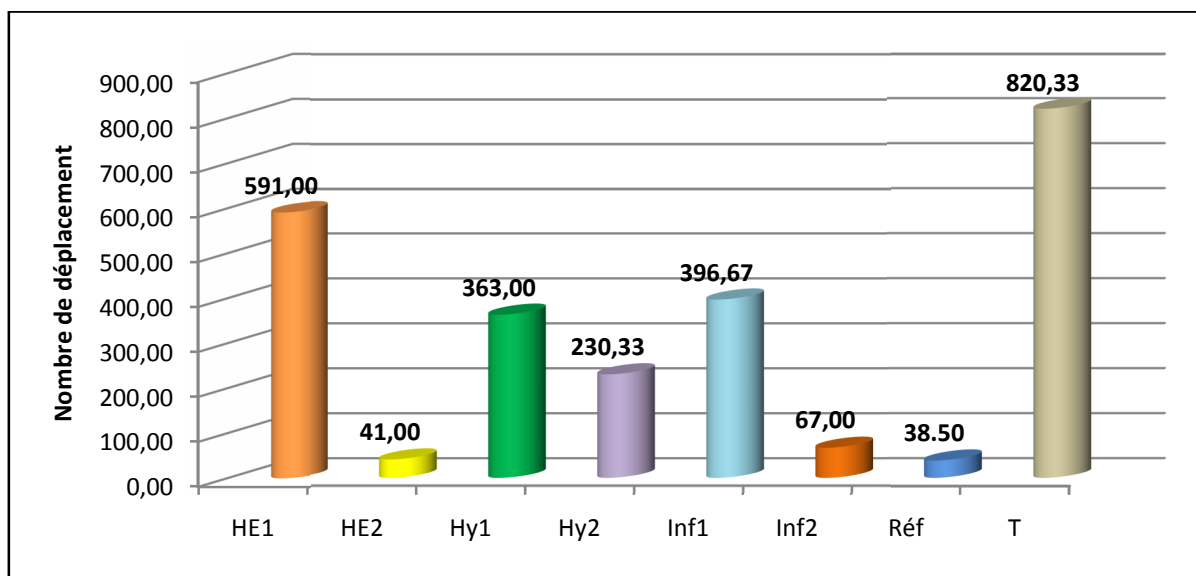


Figure 3.68: Nombre de déplacements comptabilisés par l'actimètre sur des souris NMRI.

L'activité sédatrice est exprimée en pourcentage de réduction des déplacements pour chaque lot traité par les différents extraits, imipramine (Réf) et l'eau (témoin) (Figure3.67).

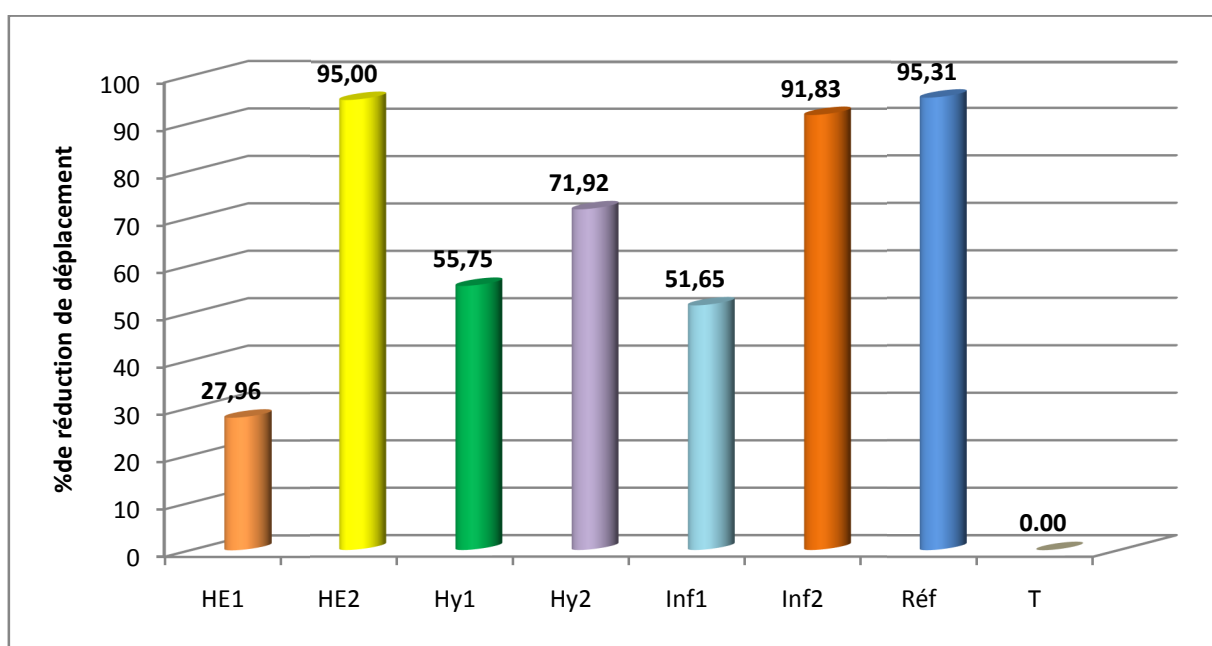


Figure 3.69 : Pourcentage de réduction de déplacement par les différents produits testés .

Le test de Student–Newman-Keuls (appendiceD), révèle que les sous ensembles constitués des lots HE2 et Réf sont homogènes ($\alpha=0.314$) mettant en évidence leurs effets similaires (appendice E).

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* à une dose de (HE2) a présenté un effet sédatif vis-à-vis des souris stressées par leur introduction forcée dans l'actimètre. Ainsi, le pourcentage de réduction des déplacements (HE2) est de 95% suivi par Inf2 avec un pourcentage de 91.83% et ensuite l'hydrolat HY2 (71.92%).

Il semble que le pourcentage de réduction des déplacements de l'huile essentielle pour la dose (HE2) (95%) est proche de celle provoquée par l'imipramine(Réf) (95.31%).Le test ANOVA (appendice E) révèle l'absence de différence significative entre l'effet des deux substances ($\alpha >0.05$). Ce résultat montre leurs effets similaires.

Les résultats obtenus à l'issu du test sédatif montrent que les différents extraits des feuilles de *Laurus nobilis* (HE, HY, Inf) réduisent de façon appréciable le stress induit chez les souris par leur introduction forcée dans l'actimètre. Des résultats similaires ont été observés chez les souris en convulsion, traitées par l'huile essentielle de *Laurus nobilis* [57].

Ces résultats mettent une éventuelle validation de l'indication traditionnelle de *Laurus nobilis* sur les qualités sédatif et équilibrant du système nerveux [128][129][130] .

Conclusion

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

Les extraits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles auxquels on attribue un pouvoir inhibiteur des microorganismes, des capacités antioxydantes et pharmacologiques.

Dans le présent travail, on s'est intéressé aux effets biologiques et pharmacologiques des extraits (huile essentielle, hydrolat, extrait méthanolique et infusé) de feuilles de *Laurus nobilis*, plante largement utilisée en médecine traditionnelle et en cuisine à travers le monde.

L'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles a fourni des rendements peu rentables à l'échelle industrielle (0.62%). La cinétique d'extraction a montré que la quasi-totalité de l'huile essentielle est extraite après 90 minutes.

Les observations, au microscope photonique, des coupes histologiques de feuilles de *Laurus nobilis* ont montré l'existence de grosses cellules sécrétrices, de formes ovoïdes, éparses dans les parenchymes palissadique .

Lors du processus d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation, un sous produit se forme à partir de l'eau ayant servi à l'extraction des molécules odorantes. Ce produit est l'hydrolat. Le rendement en hydrolat est de

ce qui est très intéressant à l'échelle industrielle.

L'utilisation de techniques fines telle que la chromatographie gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse a permis d'identifier la composition chimique de *Laurus nobilis*. En effet, la GC-MS a permis d'identifier la composition moléculaire de l'huile essentielle et de la fraction aromatique de l'hydrolat de la plante. Ils sont composés essentiellement de monoterpènes dont le 1.8 cineol, composés majoritaires avec une valeur respectivement de 20.69 % et 14.51%.

Il en ressort que ces deux extraits présentent des composants en commun tel que sabinène, 1.8 cineole, linalool et methyl eugenol. mais dans des proportions différentes.

La teneur en substances non volatiles miscibles dans les solvants polaires est de 45.15% pour la plante entière.

La chromatographie sur couche mince ne nous a pas donné les résultats escomptés en ce qui concerne l'extrait méthanolique de la plante. En effet, la séparation des métabolites secondaires recherchés n'a pas été possible avec cette technique. Elle n'a permis qu'une caractérisation de ces derniers, dont les flavonoides, les tanins et les coumarines par l'utilisation de révélateurs chimiques.

Les essais phytochimiques effectuées sur la poudre et l'infusé des feuilles de *Laurus nobilis* ont révélé la présence de polyphénols tels que les flavonols, flavanols, tanins catéhiques, d'alcaloïdes, et des saponosides.

Les différents extraits de *Laurus nobilis* ont été testés *in vitro*, par la méthode de diffusion à partir d'un disque solide, pour leur pouvoir inhibiteur contre un ensemble de souches pathogènes. Les tests antimicrobiens menés sur l'infusion (10%) et l'hydrolat se sont révélés négatifs. Ces composés n'ont donc aucun effet antimicrobien.

L'extrait méthanolique présente une activité inhibitrice uniquement sur *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 29 mm.

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* montre une activité antimicrobienne contre toutes les souches testées sans prendre en considération leur morphologie et de leur Gram une exception est signalée pour *Pseudomonas aeruginosa*.

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* a exercé une activité antifongique modérée vis-à-vis *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans* avec des diamètres d'inhibition respectivement de 18.33 mm et 13.33 mm.

L'étude quantitative in vitro de l'activité antimicrobienne par la détermination des CMI, CMB et CMF suivant la méthode des dilutions sur milieu solide a montré que :

L'huile essentielle a présenté des CMI comprises entre 1% et 0.03 %. *Bacillus subtilis* s'est avérée très sensible avec une CMI plus faible de 0.03 %.

La plus forte CMI est observée chez *Bordetella bronchiseptica*, elle est de 1% ainsi cette souche nécessite une forte concentration en huile essentielle pour inhiber sa croissance.

L'huile essentielle montre une action bactéricide vis-à-vis les germes étudiés. Ces bactéries présentent une sensibilité inégale vis-à-vis l'huile essentielle ; celle-ci se présente comme suit : *Bordetella bronchiseptica* > *Enterococcus faecium* > *Staphylococcus aureus* = *Bacillus subtilis* = *Escherichia coli* > *Klebsiella pneumonia*.

Nous avons obtenu une action fongicide à l'égard de *Candida albicans* et fongistatique à l'égard de *Saccharomyces cerevisiae*.

L'activité antioxydante in vitro est étudiée avec la méthode de réduction du radical libre¹, 1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH). Les extraits polaires (extrait méthanolique) possèdent des capacités de neutralisation du radical libre DPPH puissantes, puisqu'ils agissent à de faibles doses.

Nous remarquons que pour des concentrations élevées 800 et 1000mg/l, l'huile essentielle et l'hydrolat présentent une activité antioxydante inférieure à celle des antioxydants de référence.

L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH a confirmé les propriétés puissantes que possèdent les flavonoïdes à réduire les radicaux libres.

D'après nos résultats nous pouvons éventuellement avancer que les huiles essentielles ont plutôt un pouvoir antimicrobien alors que les extraits méthanoliques sont des agents antioxydants.

L'infusion et l'hydrolat de *Laurus nobilis* ne présente aucune toxicité aigue même après deux semaines d'observation, tandis que l'huile essentielle administré par voie orale est modérément toxique car la DL50 est de 902.50 mg/kg.

Il est clairement mis en évidence que l'activité anti-inflammatoire des différents extraits testés est aussi appréciable que celle du produit de référence (Ibuprofène). Il apparaît que l'huile essentielle à une dose 1000 mg/kg est dotée d'une activité anti-inflammatoire importante suivi de l'infusé à une dose de 5 g/kg et de l'hydrolat à une dose de 5 g/kg.

L'effet antalgique de différents extraits de *Laurus nobilis* est signalé en médecine traditionnelle. Il semble que le pourcentage de réduction de crampes abdominales de l'huile essentielle pour la dose 1000 mg/kg (68.57%) est proche de celle provoquée par l'ibuprofène (référence) (70.79%).

Il semble que l'augmentation de la diurèse pour l'infusion à une dose de 10 g/kg est similaire à celle provoquée par le Furosémide (référence).

Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle pour la dose 1000 mg/kg présente une activité sédatrice similaire à celle provoquée par l'imipramine (référence), avec un pourcentage de réduction de déplacement égal à 95 % et 95.31% respectivement.

Loin d'avoir apporté les réponses à toutes les questions, cette étude a levé néanmoins le voile sur *Laurus nobilis*.L. Ce travail ouvre de larges perspectives sur une recherche plus étendue aussi bien dans le domaine des connaissances fondamentales que dans celui des sciences appliquées avec pour objectif la valorisation économique de la flore spontanée de notre pays.

Nos résultats préliminaires montrent que tous les extraits testés témoignent des activités : antimicrobienne, antioxydante et pharmacologique. D'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

- 1) Tester d'autres méthodes d'extractions et leurs influences sur la composition chimique et les effets biologique et pharmacologique.
- 2) Partant du fait qu'une substance pouvant être très active in vitro, peut perdre cette activité une fois pénétrée dans le corps : Une étude in vivo est souhaitable, pour obtenir une vue globale sur l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits testés.
- 3) Isolement et caractérisation des composés actifs dans les différents extraits par des méthodes plus spécifiques.
- 4) Evaluation d'autres effets biologiques in vitro et in vivo des extraits et de leurs composés actifs en utilisant différentes techniques.

REFERENCES

1. Bernadet, M., “ Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles”, Editions Dangles, France, (2000) ,450p.
2. Bremness, L., “ Les plantes aromatiques et Médicinales ”,Bordas Editions, France, 2005, 304p.
3. Farombi, E.O., “African indigenous plant with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents”, African Journal of Biotechnology, V. 2(12), (2003), 662-671.
4. Fronty, L. et Duronsy, Y., “ Tisanes et Infusions”, Chêne, France, 2005, 1p.
5. Winckle, R., “ Astro Plantes : se soigner par les plantes selon son signe astral”, Edition Alpen, Monaco, (2006), 86-87.
6. Scimeca, D. et Tétau, M., “ Votre santé par les plantes : le guide phyto utile pour toute la famille”,_Edition Alpen, Monaco, (2005) , 9-16.
7. Luc Sallé, J., “ Le totum en phytothérapie ”, Frisson –Roche, Paris, (1991), 35-43.
8. Volack, J., Stotola, J. et Severa, F., “Plantes médicinales ”, Gründ, Paris, (1983), 35-43.
9. El Abed, D. et Kambouche, N., “ Les huiles essentielles ”, El Gharb, Oran, (2003) ,11-55.
10. Luttge, U., Kluge, M. et Bauer, G., “ Botanique”, Tec et Doc, Paris, (1996), 213-216.
11. Guignard, J.L., “ Biochimie végétale ”, Masson , Paris, (1996) ,187-241.
12. Grúnwald, J. et Jäniche, C., “ Le guide de la phytothérapie”, Le grand livre du mois ,Paris, (2006), 59-60.

13. Wichtl, M. et Anton, R., “ Plantes thérapeutiques : tradition, pratiques officinales”, Tec et Doc, Paris, (2003) ,692p.
14. Willem, J.P., “ 60 petits maux pour soignés par les huiles essentielles”, Albin Michel, Paris, (2009), 7-8.
15. Fabrocini, V. et Fabrocini, C., “Comment se soigner avec l’aromathérapie” , DeVecchi S.A ,Paris, (1999), 8-9.
16. Thurzova, L., Sabrier, D. et Devroye, C., “ Les plantes –santé qui poussent autour de nous ”, Bordas, Bruxelles, (1981) ,17-27.
17. Padrini, F. et Lucheroni, M.T., “ Le grand livre des huiles essentielles : guide pratique pour trouver vitalité, bien –être et beauté grâce aux essences ”, Vecchi, Paris, (2003) ,11-13.
18. Roux, D. et Catier, O., “Botanique, Pharmacognisie, Pytothérapie”, Wolters Kluwer, France, (2007), pp : 14,81.
19. Teucher, E., Anton, R. et Lobstein, A., “ Plantes aromatiques. Épices. Aromates, Condiments et Huiles essentielles”, Tec et Doc, Paris, (2005), 38-44.
20. Valnet, J., “ Phytothérapie : traitement des maladies par les plantes ”, Maloine S.A, Paris, (1983), 12p.
21. Moatti, R., Fauron , R. et Donadieu, Y., “ La phytothérapie thérapeutique différente”, Maloine S.A, Paris, (1983), 27p.
22. Willem, J.P., “ Aroma famille : 100 petits maux de la vie quotidienne traités par les huiles essentielles”, Albin Michel, Paris, (2005), 13p.
23. Festy, D., “ Ma bible des huiles essentielles”, LEUC. S, Paris, (2007),17-18.
24. Afnor. “ Recueil de normes : Les huiles essentielles.Mographie relatives aux huiles essentielles”, AFNOR, Paris, (2000), 661-663.
25. Milpied, H., “ Progrès en dermato-allergologie”, John Libbey Eurotext, France, (2009), 128p.
26. Bosson, L. et Dietz, G., “ L’hydrolathérapie : Thérapie des eaux florales”, Amyris SPRL, Bruxelles, (2005), 10-22.

27. Sommerad, J.C., “ Parfums de confidences l’aromathérapie sensorielle”, Terre D’homme, France,(2008), pp : 44-45,56.
28. Price, L. et Price, S., “Understanding hydrolats: The specific hydrosols for aromatherapy”, Churchill Livingstone, New York, (2004), 294p.
29. Jeannot, V., Chahboun, J., Russel, D. et Casabianca, H., “*Origanum compactum Benth*am: Composition of the hydrolat aromatic fraction, comparison with the essential oil and its interest in aromatherapy”, Int.J.Aromather,v.13,(2003), 90-94.
30. Leclerc, H., “Les épices : plantes condimentaires de la France et des colonies”, Masson et C^{ie},Paris, (1929), 91p.
31. Depoërs, P., Ledoux, F. et Meurin, P., “ De la lumière à la guérison : La phytothérapie entre science et tradition”, Amyris, Bruxelles, (2008),181-182.
32. Iserin, P., “ Larousse encyclopédie des plantes médicinales”, Larousse, Paris, (2001), 12p.
33. Bärtels, A., “ Guide des plantes du bassin méditerranéen”, Eugen Ulmer, Paris, (1998), 38p.
34. Quezel, P. et Santa, S., “Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales”, Edition C.N.R.S,Paris, (1963), 977p.
35. Barla, A., Topçu, G., Öksüz, S., Tümen, G. et Kingsto D.G.I., “ Identification of cytotoxic sesquiterpènes from *Laurus nobilis*”,International Food chemistry ,v.104 ,(2007), 1487-1484.
36. Demir, V., Guhan, T., Yagcioglu, A.K. et Ddegirmencioglu, A., “ Mathematical modeling and the determination of some quality parameters of air-dried bay leaves”,Biosystems Engineering ,v.88, n°3, (2004), 325-335.
37. Pariente, L., “Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique”, Académie nationale de pharmacie, Paris, (2001), 1643p.
38. Deysson, G., “Cours de botanique générale, Quatrième série : Organisation et classification des plantes vasculaires, deuxième partie : Systématique”, CDU et SEDES, paris, (1979), 262p.

39. Beloued, A., "Plantes médicinales d'Algérie", Office des publications universitaires, Alger, (2001) ,124p.
40. Boullard, B., "Plantes médicinales du monde : réalités et croyances", ESTEM, Paris, (2001), 306p.
41. Schauenberg. et Ferdinand., "Guide des plantes médicinales", Delachaux et Niestlé S.A, Paris, (1977), 279p.
42. Delille. L., "Plantes médicinales d'Algérie", BERTI, Alger, (2007) ,141p.
43. Brunton, J., "Pharmacognosie,Phytochimie,plantes médicinales", Tec et Doc, Paris,(2009), 483-560.
44. Fiorini, C., David, B., Fourastét, I. et Vercauteren J., "Acylated Kaempferol glycosides from *Laurus nobilis* leaves", J.Phytochemistry, V. 47, n° 5, (1998), 821-824.
45. Kivçak, B. et Mert, T., "Preliminary evaluation of cytotoxic properties of *Laurus nobilis* leaf extracts", Fitoterapia, (2002), V. 73, 242-243.
46. Gómez-Coronado, D.J.M., Ibañez., Javier. et Rupérez.Barbas C., "Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin", Journal of Chromatography A, V.1045, (2004), 227-233.
47. Simić, M., Kundaković ,T. et Kovačević, N., " Preliminary assay on the antioxidant activity *Laurus nobilis* extracts ".Fitoterapia, V.74, (2003), 613-616.
48. Bardeau, F., "La mémoire par les fleurs ", Robert Laffont, Paris, (1976), 310p.
49. Aqili Khorasani, M.S., "Collection of drugs ", Educational Organization, Tahran, (1992), 624-630.
50. van, A.R., "Medicinal plants of the word: Chemical constituents, Traditional and Modern uses ", Humana Press Inc, New Jersey, (2001), 262p.
51. Cabaret, J., "Plante pour soigner les animaux", Poins Vétérinaire, Paris, (1967), 192p.

52. Ertaş, M. et Hakki Alma, M., "Pyrolysis of Laurel (*Laurus nobilis*) extraction residues in fixed-bed reactor: Characterization of bio-oil and bio-char", *J.Anal.Pyrolysis*, V. 88, (2010), 22-29.
53. Di Leo Lira, P., Retta, D., Tkacik, E., Ringuélet, J., Coussio, J.D., Van Baren, C. et Bandoni, A. L., "Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis*) from Argentina", *Industrial Crops and Products*, V. 30,(2009), 259-264.
54. Gérault, G. et Mary, R., "Le guide de l'aromathérapie", Albin Michel, Paris, (2009), pp : 1, 114,139.
55. Guinetert, E., Durant ,P., Post, M., Grinand, R. et Bernigault, R., "Mesure de la resistance aux radicaux libres".Sixième Journées de la recherche Avicole, (2005), 554-558.
56. René Revuz, J.E., "Traité EMC : Cosmétologie et Dermatologie esthétique", Elsevier Masson, Paris, (2009), 432p.
57. Ferreira, A., Proença , C., Serralheiro, M. L. M. et Araùjo, M. E. M., "The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the medicinal plant from Portugal", *J.Ethnopharmacology*, V.108, (2006), 31-37.
58. Demo, A., Petrakis, C., Kefalas, P. et Bosliou, D., "Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plants leaves", *Food Research international*, V. 31, n° 5, (1998), 351-354.
59. Ben Amer, M. et Léonard, L., "Les psychotropes: pharmacologie et toxicomanie" Les Press de l'Université de Montréal, Québec, (2002), pp : 23,127.
60. Sayyah, M., Valizadeh, J. et Kamalinejad, M., "Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole and maximal electroshock induced seizures", *Phytomedicine*, V. 9, (2002), 212-216.
61. Kaileh, M., Vanden Berghe, W., Boone, E., Essawi ,T. et Hageman G., "Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity", *Journal of Ethno pharmacology*, V.113, (2007), 510-516.

62. Fang, F., Sang, S.Y., Chen, K., Goss Lau, A., Tang Ho, C.T. et Rosen, R., "Isolation and identification of cytotoxic compounds from bay leaf (*Laurus nobilis*)", *Food Chemistry*, V. 93, (2005), 497-501.
63. Papachristos, D.P. et Stamopoulos, D.C., "Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae)", *Stored Products Research*, V. 38, (2002), 117-128.
64. Erler, F., Ulug, I. et Yalan Kaya, B., "Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*", *Fitoterapia*, V.77, (2006), 491-494.
65. Rozman, V., Kalinovic, I. et Korunic, K., "Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects", *Journal of Stored Products Research*, V. 43, (2007), 349-355.
66. Alkanova, A., Ashaeva, L.A., Anchkova, L.I., et Buzue, V.V.V., "The study of sugar decreasing action of *Laurus nobilis* leaves", *Farmatsiya*, V. 33, (1984), 49-51.
67. Khan, A., Bryden, N.A., Polansky, M.M. et Anderson, R.A., "Insulin potentiating factor and chromium content of selected foods and spices", *Biol Trace Elem Res*, 24(3), (1990), 183-8.
68. Yanardag, S. et Can, S., "Effects of *Laurus nobilis* L. leaves and blood glucose levels in normal and alloxan-diabetic rabbits", *Chemica Acta Turcica*, V. 22, (1994), 169-75.
69. Gürbüz, İ., Üstün, O., Yeşilada, E., Sezik, E. et Akyürek, N., "In vivo gastro protective effects of five Turkish folk remedies against ethanol-induced lesions", *Journal of Ethnopharmacology*, V.83, (2002), 241-244.
70. Liliane, R.E., Kawano, T., "Effects of *Laurus nobilis* (Lauraceae) on *Biomphalaria glabrata*", *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro*, V. 82, (1987), 315-320.
71. Barla, A., Topçu, G., Öksüz, S., Tümen, G. et Kingston, D. G. I., "Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis* L.", *Food Chemistry*, V. 104, (2007), 1478-1484.
72. Yoshikawa, M., Shimoda, H., Uemura, T., Morikawa, T., Kawahara, Y. et Matsuda, H., "Alcohol absorption inhibitors from bay leaf (*Laurus nobilis*): Structure-Requirements of Sesquiterpenes for the activity", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, V. 8, (2000), 2071-2077.

73. Matsuda, H., Shimoda, H., Uemura, T. et Yoshikawa, M., "Preventive effect of sesquiterpenes from bay leaf on blood ethanol elevation in ethanol-loaded rat", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, V. 9, (1999), 212-216.
74. Khalil, E. A., Afifi, F.U. et Al-Hussaini, M., "Evaluation of the wound healing effect of some Jordanian traditional medicinal plants formulated in Pluronic F127 using mice (*Mus musculus*)", *Journal of Ethnopharmacology*, V. 109, (2007), 104-112.
75. Matsuda, H., Kagerura, T., Toguchida, I. et Ueda, H., "Inhibitory effects of sesquiterpenes from bay leaf on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: structure requirement and role of heat shock protein induction", *Life science*, V.66, n° 22, (2000), 2151-2157.
76. Franchomme, P., "L'aromatologie à visée anti infectieuse", *Phytomédecine*, V.1, (1981), 25-47.
77. Lee, K. H., Huang, E.S., Pagana, J.S. et Geissman, T.A., "Cytotoxicity of sesquiterpenes lactones", *Cancer Research*, V.31, (1971), 1649-1654.
78. Inouye, S., Yamaguchi, H. et Takizawa, T., "Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method", *J.Infect .Chemother*, V.7, n° 4,(2001), 251-254.
79. Lah lou, M., "Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils", *Phytotherapy Research*, V.18, (2004), 435-448.
80. Moro Buronzo, A., "Grand guide des huiles essentielles", Edition Hachette, Paris, (2008), 23-25.
81. Atanda, O.O., Akpan, I.O. et Iwafemi, F., "The potential of some spice essential oil in the control of *A.parasiticus* CFR233 and aflatoxin production" *Food Control*,V.18, (2007), 601-607.
82. Liu, M.H., Otsuka, N., Noyori, K., Shiota, S., Ogawa, W., Kuroda, T., Hatano, T. et Suchiya, T., "Synergistic effect of Kaempferol Glycosides purified from *Laurus nobilis* and Fluoroquinolones on Methicillin – Resistant *Staphylococcus aureus*", *Biol.Pharm.Bull*,V.31, (2008), 1794-1797.

83. De Caroto, U., Maccioni, O., Trupo, M. et Di Sanzo, G., "Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi", *Crop production*, V. 29, (2010), 142-147.
84. Flesar, J., Havlik, J., Kloucek, P., Rada, V., Titera, D., Bednar, M., Stropnický, M. et Kokoska, L., "In vitro growth-inhibitory of plant –derived extracts and compounds against *Paenibacillus Larvae* and their acute oral toxicity to adult", *Veterinary Microbiology*, V.03, (2010), 18.
85. Gabe, M., "Technique histologique", Laboratoire d'évolution, Faculté des sciences, Edition Masson et Cie, Paris, (1968), 113p.
86. Perrier, R., Auffret Van der Kemp, T. et Zonzain ,F., "Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques ", Edition Doin, Paris , (1997), 476p.
87. Wyler, H., " Introduction au laboratoire de chimie organique ", Université de Lausanne, (1991).
88. Fougbe, J.S., Tillequin, F., Paris, M., Jacquemin, H. et Paris, R.R., "Sur une Pipéracée de Guyane,le *Piper marginatum* ", *Annales pharmaceutiques Françaises*, V.34, n° 9-10, (1976), 339-343.
89. Muanda, F.N., " Identificatin de polyphenols ,evaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques ", Thèse de doctorat en chimie organique , Université Paul Verlaine-Metz, (2010).
90. Fauchère ,J.L. et Avril, J.L., "Bactériologie générale et médicale", Ellipses Editions, Paris, (2002), 365p.
91. Dean, S.G. et Ritchie, G., "*Antibacterial properties of plant essential oils*", *International Journal Food Microbiology*, V. 5, (1987), 165-180.
92. Zaika, L.L., "*Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination*", *J. Food Safety*, V.9, (1988), 97-118.
93. Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Kole, C.R. et al, "Antibacterial activity of essential oils from *Cymbopogon*: inter-and intraspecificdifférences", *Microbios*,V.84,(1995), 239-245.

94. Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. et Arsenakis, M., "Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V.44,n° 5,(1996), 1202-1205.
95. Smith-Palmer, A., Stewart, J. et Fyfe, L., "Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens", *Letters in Food Microbiology*, V. 26, (1998), 118-122.
96. Lis-Balchin, M., Hart, S.L. et Deans, S.G., "Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils (*Melaleuca alternifolia* , *Leptospermum scoparium* or Manuka and *Kunzea ericoides* or Kanuka) ", originating in Australia and New Zealand. *J Phytother Res*, V.14, (2000), 623-629.
97. Burt, A.S. et Reinders, R.D., "Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7", *Lett. Applied Microbiol*, V.36, (2003), 162-167.
98. Okogun, G.R.A., Bethran, E.B., Anthony, N., Okere Jude, C. et Anegebe, C., "Epidemiological Implications of Preferences of Breeding Sites of Mosquito species in Midwestern Nigeria", *Ann. Agric. Environ. Med*, V.10, (2003), 217-222.
99. Faleiro, L., Miguel, G., Gomes, S., Costa, L., Venâncio, F., Teixeira A., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., et Pedro, L.G., "Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L, (Cav.) and *Origanum vulgare* L", *Journ. Agri. Food Chem.* V.53, (2005), 8162-8168.
100. Viala, A., "Éléments de Toxicologie", Edition Tec et Doc, Paris, (1998), 1-12.
101. Dutertre, H. et Dubernet, C., "Le préparateur en pharmacie , Toxicologie Galénique", Éditions Tec et Doc ,Paris, (2000) , 8-23.
102. Hopkins, W.G. et Evard, C.M., "Physiologie végétale". Edition Deboeck Université, Bruxelles, (2003), 23p.
103. Lucchesi, M.E., "Extraction sans solvant assistée par micro ondes : Conception et application à l'extraction des huiles essentielles", Thèse de Doctorat en sciences (option chimie), Faculté des Sciences et Technologies, Université de la Réunion, (2005), 15-21.

104. Mosta, N.M., “Essential oil yield and composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp) as influenced by harvesting frequency and plant shoot age”, Thesis of Doctorat MSC Agronomy, Faculty of agricultural sciences, University of Pretoria, South Africa, Oct 2006.
105. Baghdadi, H.H., Ahmed, S.S., Fournier, G. et Refaat, A.M., “On the Essential oil of *Laurus nobilis* Grown Egypt”, *Egypt.J.Hort*, V.19, n°1, (1992), 93-97.
106. Paolini, J., Leandri, C., Desjobert, J.M., Barboni, T. et Costa, J., “Comparaison of liquid-liquid extraction with headspace methods for the characterization of volatile fractions of commercial hydrolats from typically Mediterranean species”, *Journal of chromatography A*, V.1193,(2008), 37-49.
107. Ouchikh, O., Chahed, T., Ksouri, R., Ben Taarit, M.F., aleh, H., Abdelly, C., Kchouk, M.E. et Marzouk, B., “The effects of extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of *Laurus nobilis* vegetative organs”, *Journal of Food Composition and Analysis*, V. 24, (2011), 103-110.
108. Conforti, F., Statti, G., Uzunov, D. et Menichini, F., “Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurus nobilis* L.leaves and *Foeniculum vulgare* subsp.piperitum (Ucria) coutinho seeds”, *Biol Pharm Bull*, V.29,n ° 10,(oct 2006) , 2056-64.
109. Christel, F. et Fourast, I., “Contribution to the phytochemical study of *Laurus nobilis* L.(Lauraceae) ” , Thèse de doctorat , Institut national poly technique de Toulouse, France,(1996).
110. Sağdıç, O. et Özcan, M., “Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols” , *Food control*, V.14, (2003), 141-143.
111. Sağdıç, O., Karahan, A.G., Özcan, M. et Özcan, G., “Effect of some spice extracts on bacterial inhibition” , *Food Science and Technology International* ,V. 9 ,(2003), 353.
112. Man, C.M. et Cox, S.D., “The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) ” , *J.Appl Microbiol*,(2000), 30.
113. Santoyo, S., Lioria, R., Jaime, L., Ibañez, E., Señoráns, F.J. et Reglero, G., “Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis* L.Chemical and functional characterization”, *Eur Food Res Technol* , V.222, (2006), 565-571.

114. Junior, A. et Zani, C., "Biological screening of Brazilian medicinal plants", *Braz.J.Sci*, V.95, (2000), 367-373.
115. Balentine, C.W., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Duong, D.Q. et Pohlman, F.W., "The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef", *Meat Science*, V.73 (2006), 413-421
116. Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M. et Abdelly, C., "Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .C. R", *Biologies*, V.331, (2008), 372-379.
117. Hayouni, E.A., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M., "The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts", *Food Chem* (in press), (2007).
118. Turkmen, N., Velioglu, Y.S., Sari, F. et Polat, G., "Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea", *Molecules*, V. 12, (2007), 484-496.
119. Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D. et Corke, H., "The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts", *International J Food Microbiology*, V.117, (2007), 112-119.
120. Koné, W.M., Kamanzi Atindehou, K., Terreux, C., Hostettmann, K., Traoré, D. et Dosso, M., "Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity", *J Ethnopharmacol*, V.93, (2004), 43-49.
121. Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G. et Georgakis, S. A., "Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C", *Meat Science*, V.76, (2007), 172-181.
122. Fuhrman, B., Lavy, A. et Aviram, M., "Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation", *Am. J. Clin. Nutr*, V. 61, (1995), 549-554.
123. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. et Paganga, G., "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids", *Free Radic. Biol. Med*, V.20, (1996), 933-956.
124. Jovanovic, S.V., Steenken, S., Simic, M.G. et Ghara, Y., "Antioxidant properties of flavonoid", *AHDIEQ Journal*, V.7, (1998), 137-161.

125. Simić, M., Kundaković, T. et Kovačević, N., "Preliminary assay on the antioxidant activity of *Laurus nobilis* extracts", *Fitoterapia*, V.74, (2003), 613 - 616.
126. Sayyah, M., Saroukhani, G., Peirovi, A. et Kamalinejad, M., "Analgesic and Anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis*. L", *Phytotherapy research*, V.17, (2003), 733-736.
127. Ross, A.I., "Medicinal plants of the world: Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses", Edition Humana Press Inc, United States of America, (2001), 261-266.
128. Gérault, G. et Mary, R., "Le guide de l'aromathérapie", Edition Albin Michel, Paris, (2009), pp : 1, 114,139.
129. Lamendin, H. et Roux, D., "Soignez votre bouche par les plantes: Remèdes d'hier et aujourd'hui", Edition Harmattan, Paris, 93p.
130. Moulin, M. et Coquerel, A., "Pharmacologie", Edition Masson, Paris, (2002), 498p.

APPENDICE A

➤ Liste des abréviations, symboles et conventions :

AFNOR	: Association Française de normalisation
APOL	: Apolaire
ATCC	: American Type Culture Collection
CCM	: Chromatographie sur couche mince
Cm	: Centimètre
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
CMB	: Concentration minimale bactéricide
CMF	: Concentration minimale fongicide
CG/SM	: Chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse
°C	: Degrés Celsius
d^{20}	: Densité relative à 20 °C
DL50	: Dose létale
DO	: Densité optique
DPPH	: 1,1 –Diphenyl-2-picrylhydrazyl
EUV	: Excrétion urinaire volumétrique
g	: Gramme
EtOH	: Ethanol
HY	: Hydrolat
HE	: Huile essentielle
IA	: Indice d'acide
IC50	: Concentration inhibitrice à 50%
IE	: Indice d'este
Inf	: Infusion

IR	: Indice de réfraction
Kg	: Kilogramme
m	: Masse
MVF	: Masse végétale fraîche
MH	: Muller-Hinton
ml	: Millilitre
mm	: Millimètre
mn	: Minute
µm	: Micromètre
µl	: Microlitre
Ptp	: Poids de tube plein
Ptv	: Poids de tube vide
PPM	: Partie par million
POL	: Polaire
SA	: Sabouraud
TH	: Taux d'humidité
T	: Témoin
V	: Volume
Ps	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Bs	: <i>Bacillus subtilis</i>
Ec	: <i>Escherichia coli</i>
Kp	: <i>Klebsiella pneumonia</i>
Ef	: <i>Enterococcus faecium</i>
Bb	: <i>Bordetella bronchiseptica</i>
Sa	: <i>Staphylococcus aureus</i>
Sc	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ca	: <i>Candida albicans</i>

APPENDICE B

➤ **Appareillage, verrerie, consommable et réactifs**

▪ Liste des appareillages

- Dispositif d'extraction
- Balance de précision (SCALTEC SBC 31)
- Bec benzène
- Bain marie
- Evaporateur rotatif (Stuart RE300)
- Extracteur pilote
- Etuve
- Pycnomètre
- Polarimètre automatique de type SCHMIDT HAENSCH
- Plaque chauffante
- Chauffe ballon
- Loupe binoculaire avec caméra
- Microscope photonique
- Microtome
- Distributeur de la paraffine
- Appareil DEAN et STARK
- Plaque refroidissante
- Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse (Network GC System ,6890N, Agilent Technologies ; Mass Selective Detector)
- Soxhlet
- Spectrophotomètre
- Cage à métabolisme

- Actimètre
- Liste de la verrerie et consommables
 - Béchers : 100 ml ,250ml, 500ml.
 - Erlen Meyer 100 m l, 250ml
 - Ballon à fond plat à col rodé
 - Ampoules à décanter
 - Tubes à essai
 - Pipettes graduées stériles
 - Pipettes pasteur
 - Lame en verre et lamelles
 - Boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre
 - Disques d'antibiogramme stériles de 9 mm de diamètre
 - Spatule inox
 - Bistouri
 - Seringues (1 ml ,5 ml, 10 ml, 20ml)
 - Burette 20 ml
 - Pincés
 - Anse de platine
 - Ampoule à décanter
 - Entonnoirs
 - Cuve à CCM
 - Scalpels
 - Portoirs
 - Sonde
- Liste des solutions, milieu de culture et réactifs
 - Ether diéthylique
 - Ether de pétrole
 - Sulfate de sodium
 - Eau distillé
 - Eau physiologique
 - Ethanol 100°, 95°, 70°

- Butanol
- Hydroxyde de potassium
- Acide chlorhydrique
- Acide sulfurique
- Rouge de phénol
- Iodure de potassium
- Nitrate de bismuth
- Formol
- Acide acétique glacial
- Chlorure de sodium
- Chlorure de fer
- Chlorure d'aluminium
- Chlorure de mercure
- Dichlorométhane
- Copeaux de magnésium
- Ammoniaque
- Méthanol
- Toluène
- Paraffine
- Vert de méthyle
- Carmin aluné
- Baume de Canada
- Sulfate de sodium anhydre
- Hydroxyde de potassium
- Acétate de sodium
- Alcool iso amylique
- Méthanol
- Chloroforme
- Muller –Hinton
- Sabouraud
- Tween80
- Rutine
- Quercétine
- Tocophérol

- DPPH
- Carragénine (Mucopolysaccharide sulfaté extrait d'une algue)
- Furosémide
- Imipramine
- Ibuprofène

APPENDICE C

➤ Photos de l'appareillage et des tests biologiques

C 1. Etapes de la confection des coupes histologiques

- Inclusion à la paraffine



Figure C₁ : Distributeur de la paraffine

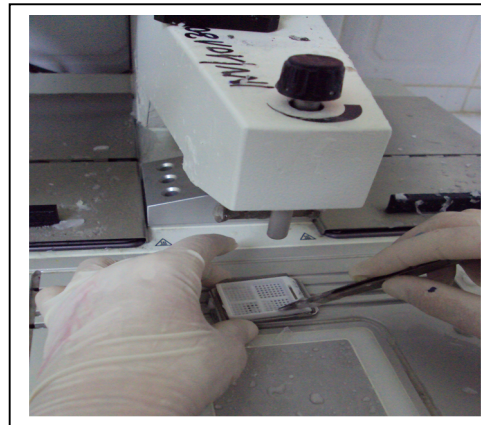


Figure C₂ : Inclusion des organes à la paraffine dans des cassettes

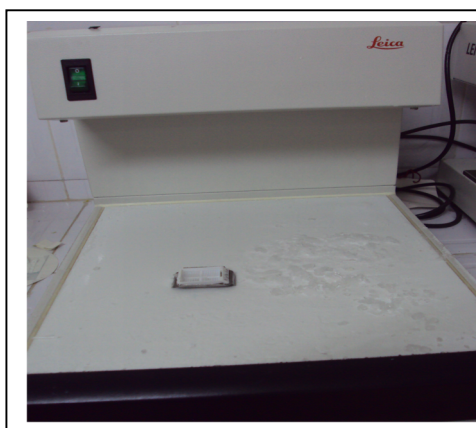


Figure C₃ : Le durcissement de la paraffine dans une plaque refroidissante

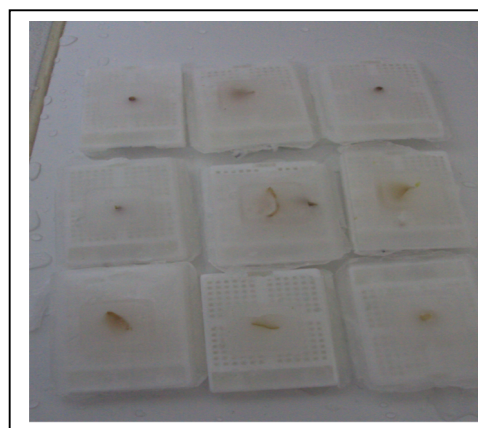


Figure C₄ : Les blocs des organes

- Confection des coupes et coloration



Figure C₅ : Des coupes sériées à l'aide d'un microtome manuel

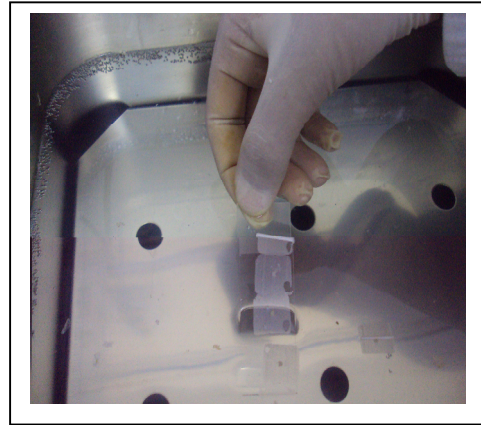


Figure C₆ : Les rubans des coupes mises dans un bain marie



Figure C₇ : Déparaffinage



Figure C₈ : Réhydratation

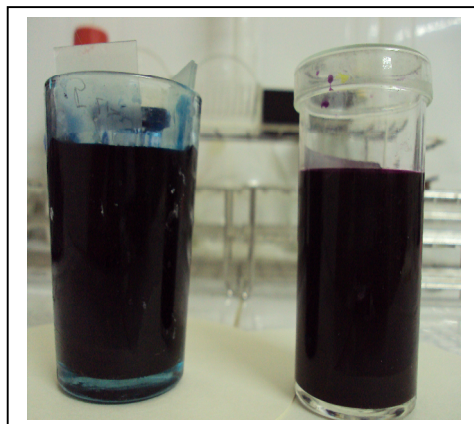


Figure C₉: Double coloration vert-carmino

C 2. Etapes de la cinétique d'extraction



Figure C₁₀ :Hydrodistillateur



Figure C₁₁ : Erlen-meyer à cols rodés contenant le distillat à différents pointages de temps



Figure C₁₂ : Décantation



Figure C₁₃ : Tubes à huiles essentielles

C₃. Etapes de l'extraction de l'huile essentielle



Condenseur

Alambic contenant
le végétal

Essencier

Figure C₁₄ : Hydrodistillation à l'échelle pilote



Huile essentielle

Eau aromatique

Figure C₁₅ : La décantation

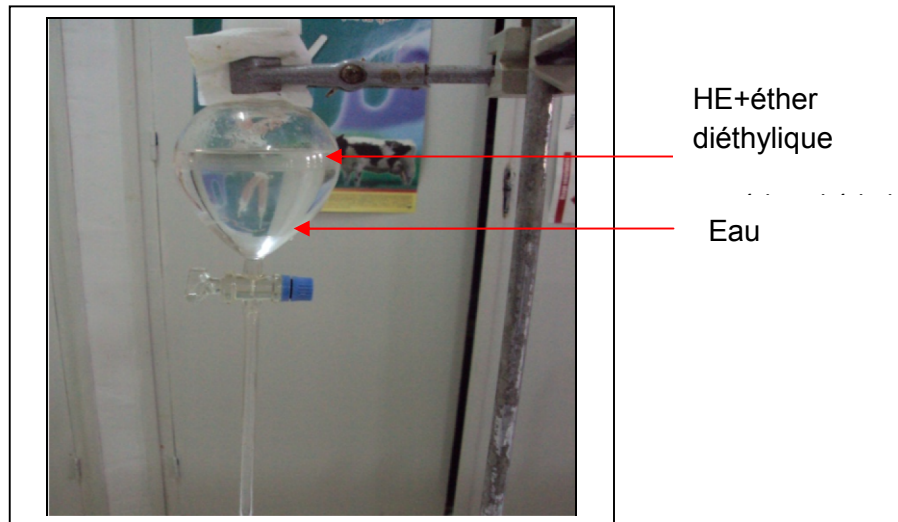


Figure C₁₆ : Séparation liquide-liquide

C 4 . Indice d'acide

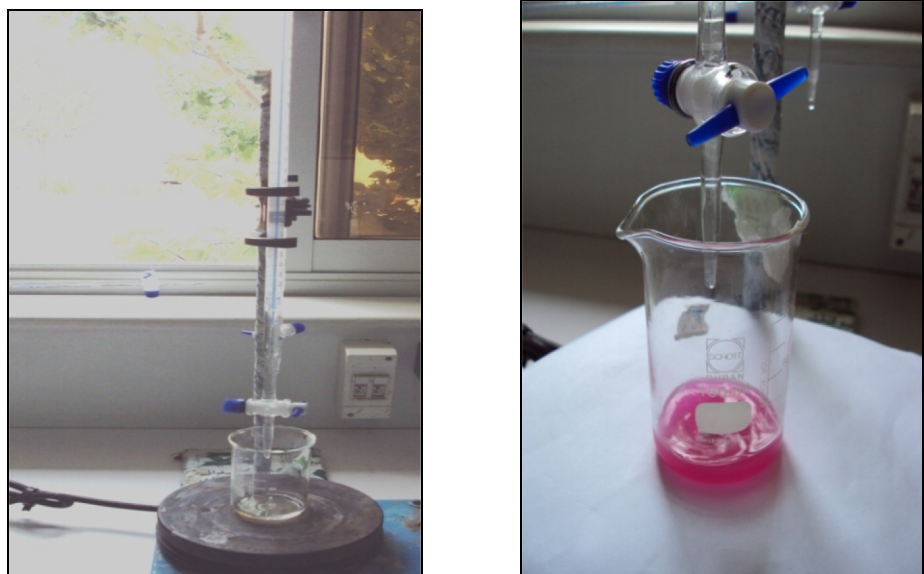


Figure C₁₇ : Titrage acide-base

C₅. Indice d'ester

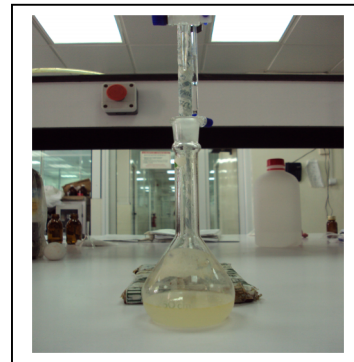
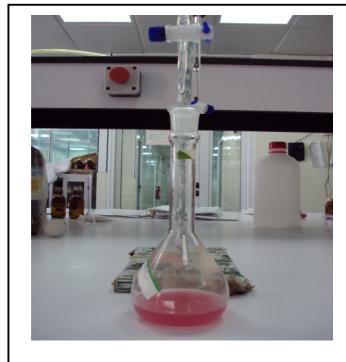
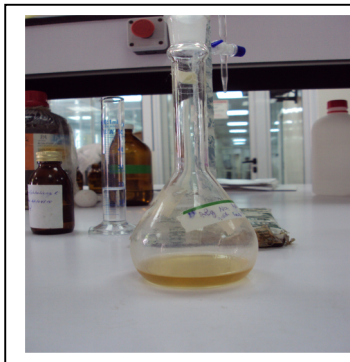
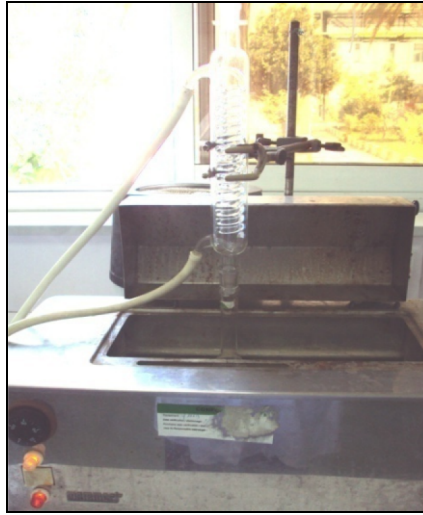


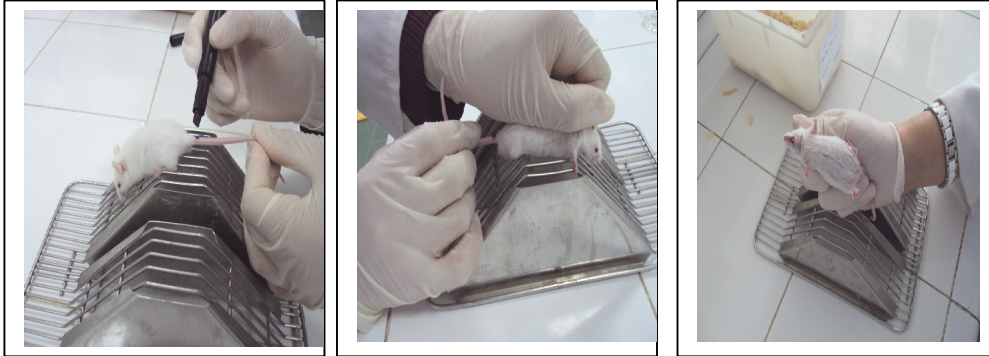
Figure C₁₈: Titrage acide-base

C₆. la dessiccation des souris

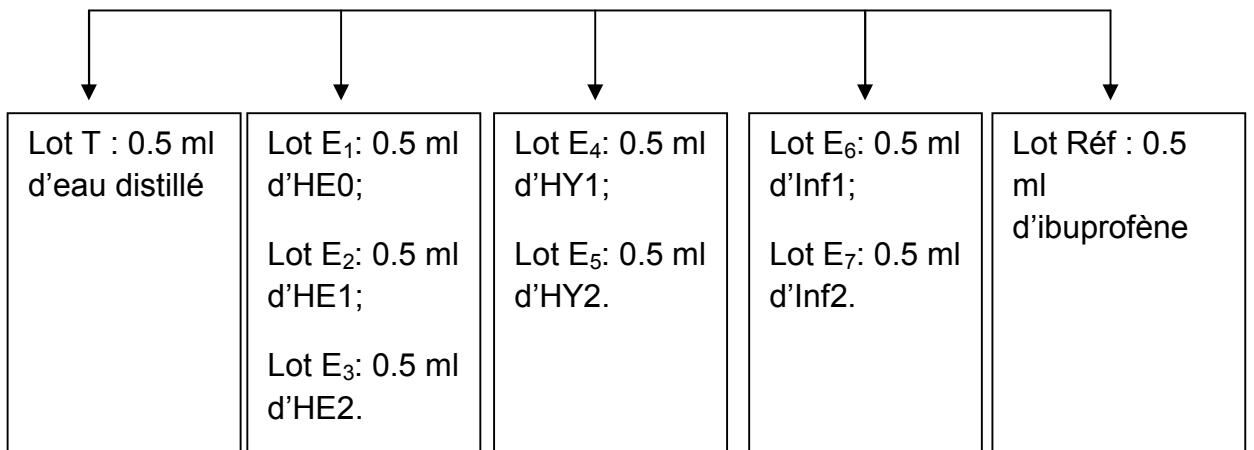


C 7 .Protocole expérimental de l'activité anti-inflammatoire (Test de Levy)

Contention de la souris



Administration par gavage gastrique aux 9 lots de 5 souris les solutions suivantes.



AT₀+30 minute

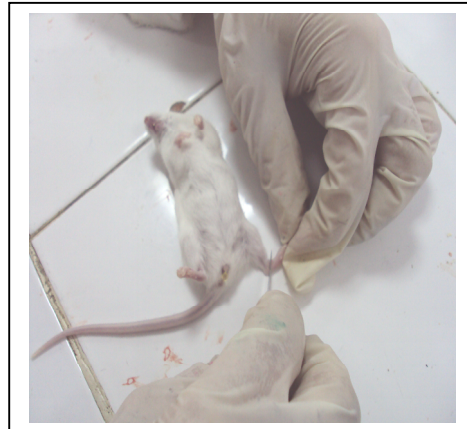
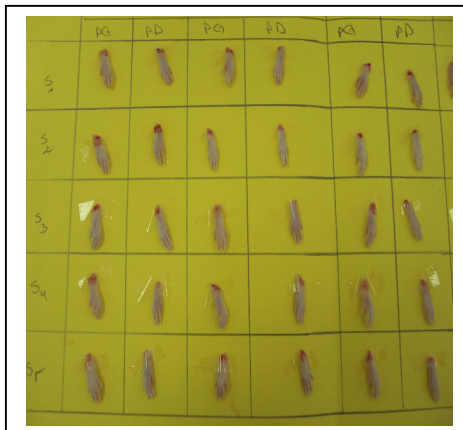
Injecter la solution de carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche sous un volume de 0.025 ml aux 9 lots



Injection de 0.025 ml
de carragénine
Patte postérieur
gauche

Les 9 lots de souris sont sacrifiés

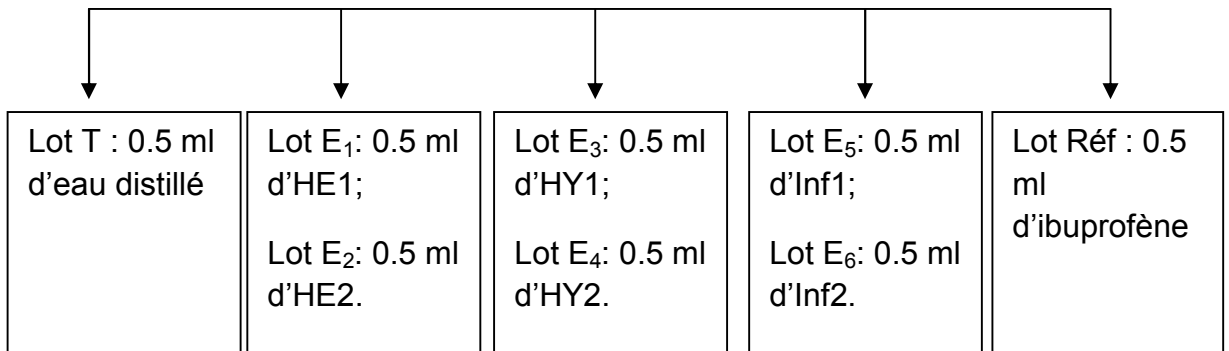
Coupure des pattes postérieures à la hauteur de
l'articulation pour les 9 lots



La pesée des pattes postérieures des 9 lots
sur une balance analytique

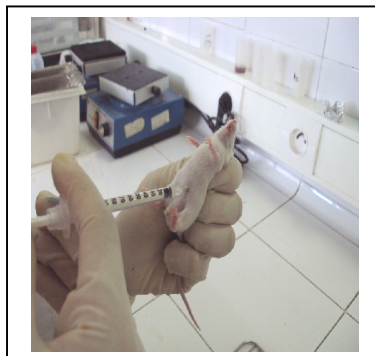
C₈. Protocole de l'activité antalgique (Writhing test)

Administration par gavage gastrique aux 8 lots de 5 souris les solutions suivantes.



Après 30 min

Injection de 0.2 ml d'une solution d'acide acétique à 1% à tous les lots par voie intra péritonéale

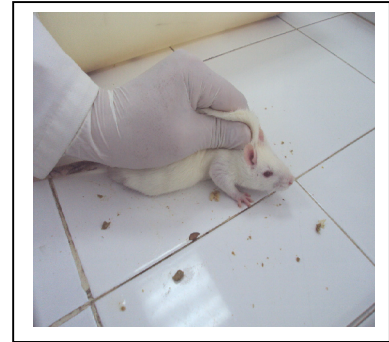
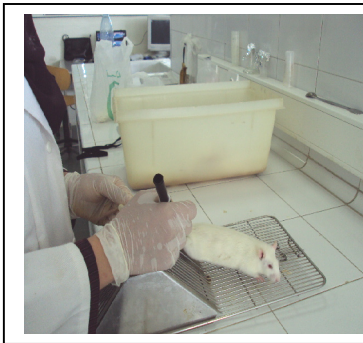


Transférer les souris dans des cages afin de comptabiliser le nombre de crampe, observé pendant une période de 10 min

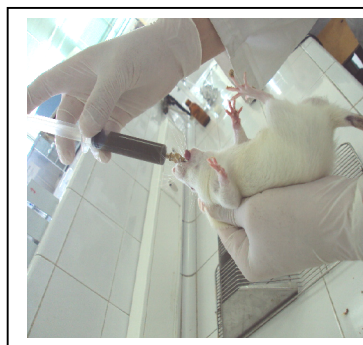
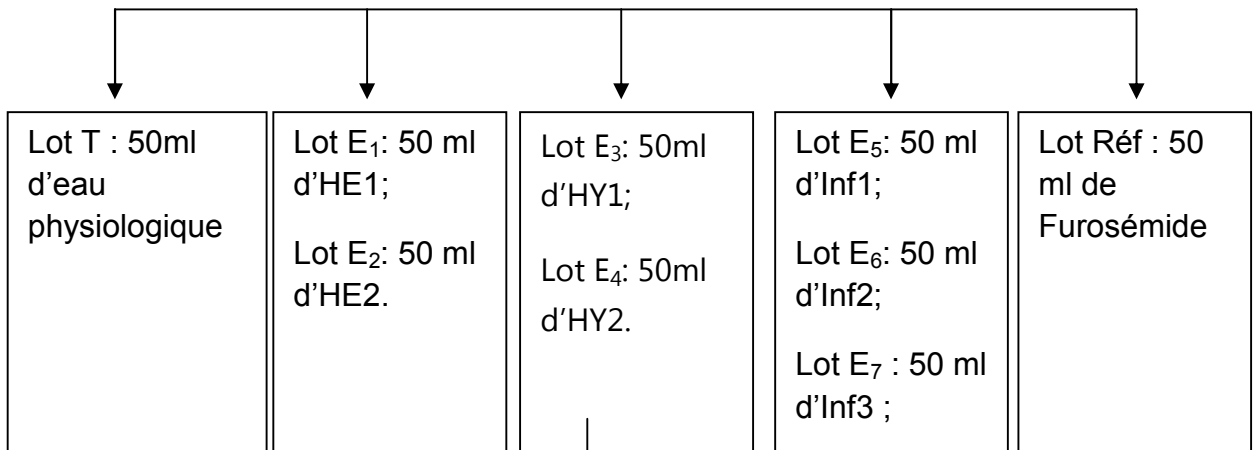


C 9 .protocole de l'activité diurétique

Contention des rats

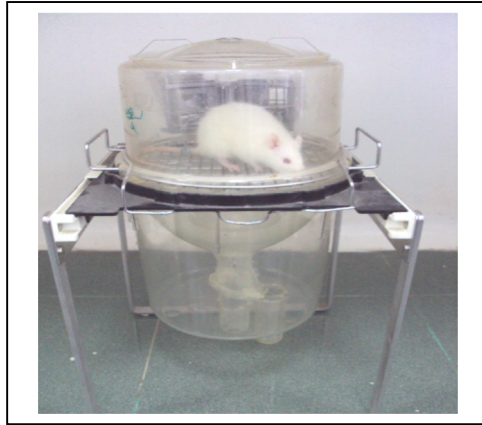


Administration par gavage gastrique aux 9 lots de 5 rats les solutions suivantes.



Placer chaque rat dans une cage à métabolisme.

↓
▶ T= 0

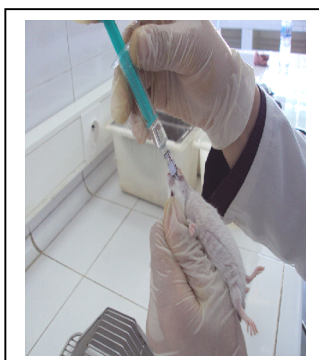
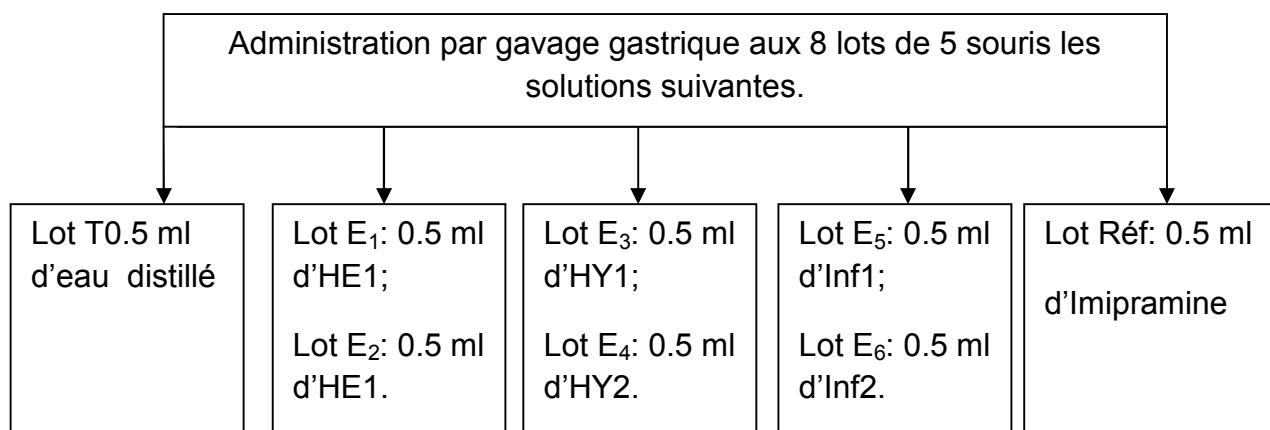


Après T=6 h

Mesure de volume d'urée recueilli



C₁₀. Protocole de l'activité sédatrice



Placer une souris dans chaque cage à plexiglas de l'actimètre



Les lectures se font après 30 minutes

C₁₁.Photos de l'appareillage



Figure C₁₉: Pycnomètre



Figure C₂₀: Réfractomètre



Figure C₂₁: Polarimètre



Figure C₂₂: Soxhlet



Figure C₂₃: Etuve pour incuber les champignons à 25C°



Figure C₂₄: Etuve pour incuber les bactéries à 37 C°

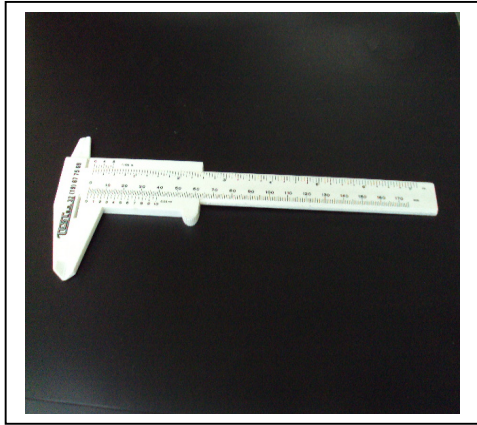


Figure C₂₅ : Pied-colis



Figure C₂₆ : Balance



Figure C₂₇ :Plaque chauffante



Figure C₂₈ : Broyeur électrique



Figure C₂₉ : Microscope photonique



Figure C₃₀ : Loupe couplé à un appareil photos



Figure C₃₁ : Dessiccateur



Figure C₃₂: Balance de précision



Figure C₃₃ : Stérilisateur



Figure C₃₄ : Spectrophotomètre

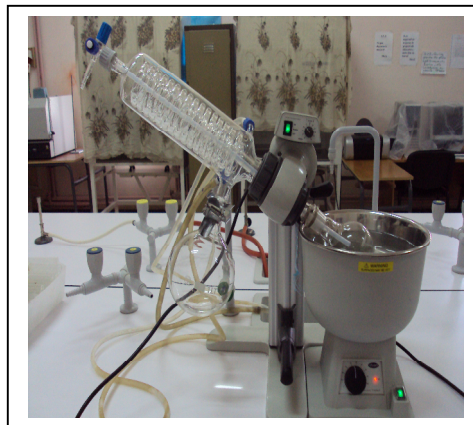


Figure C₃₅ : Evaporateur rotatif



Figure C₃₆ : Cage pour rats



Figure C₃₇ : Cage pour souris

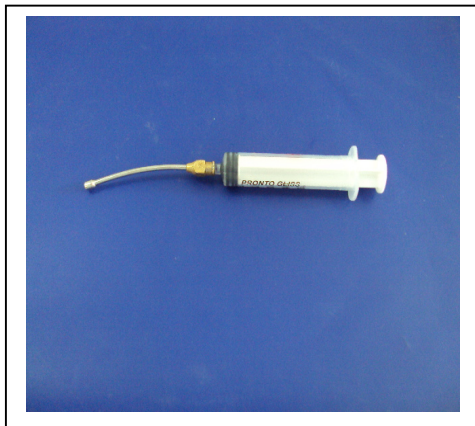


Figure C₃₈ : Sonde pour rats

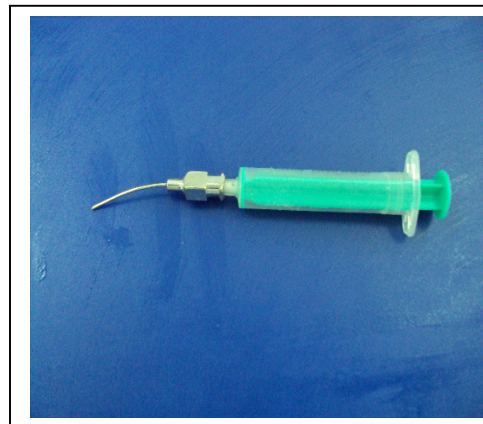


Figure C₃₉ : Sonde pour souris

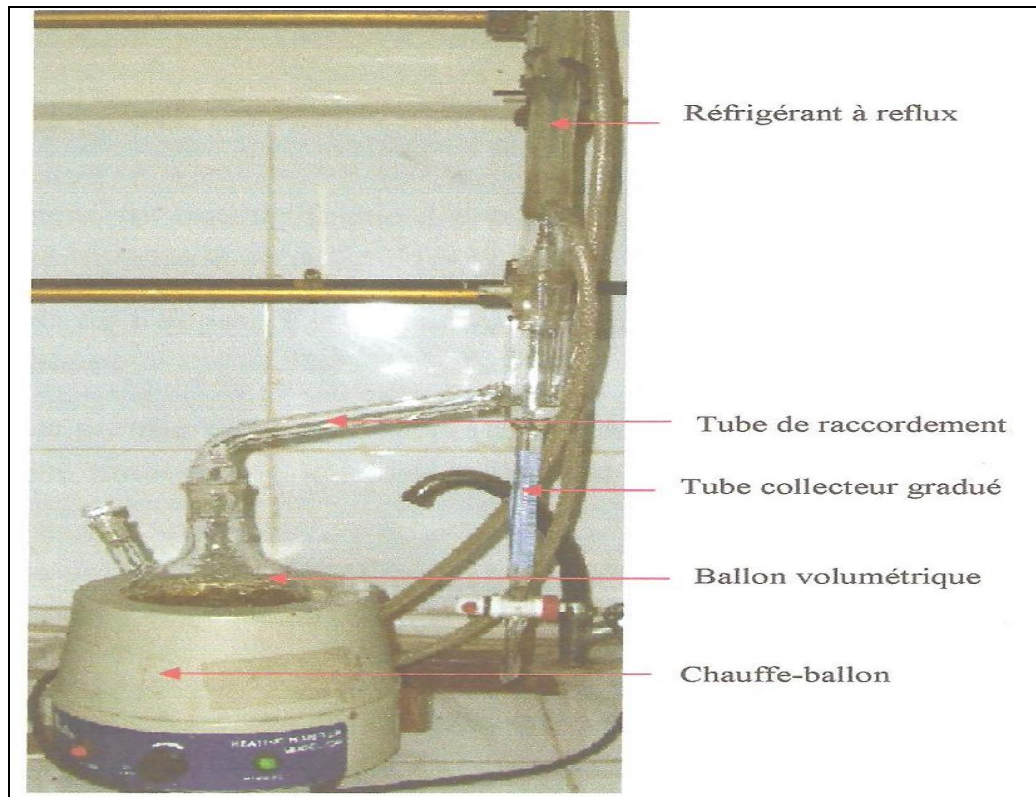


Figure C₄₀ : Appareil DEAN et STARK

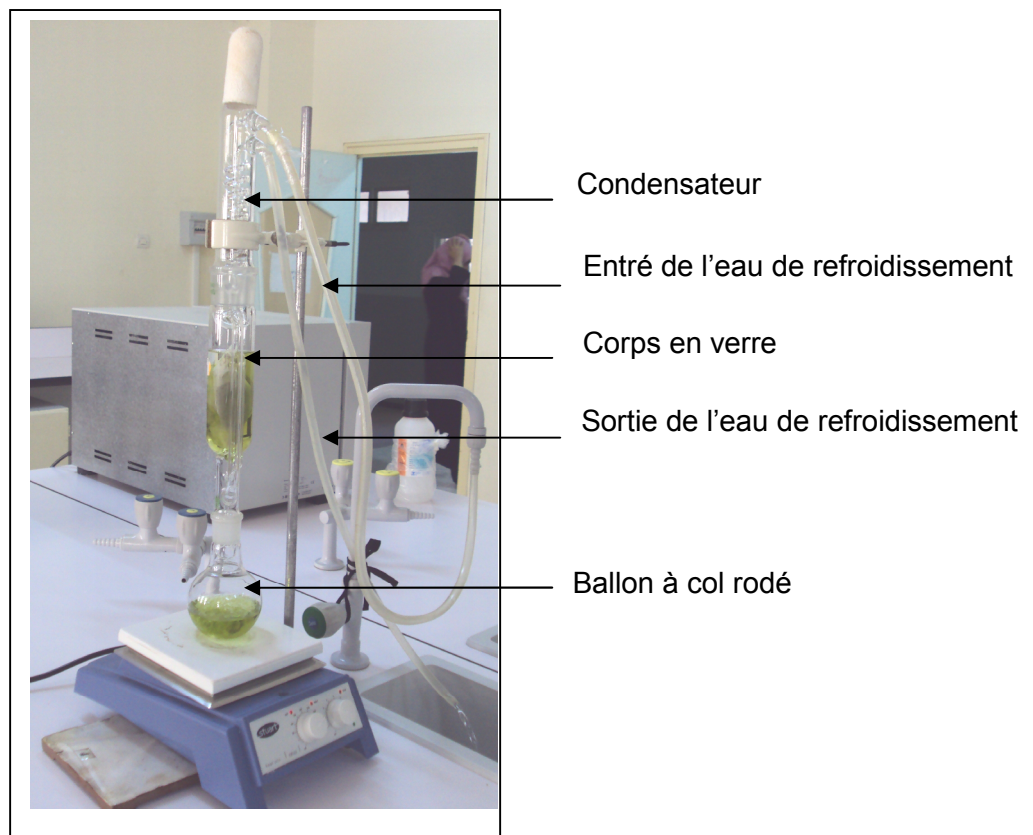


Figure C₄₁ : Soxhlet

APPENDICE D

1. Étude statistique de l'évolution du rendement en HE en fonction du temps

Tableau D₁ : Statistique descriptives

Temps (mn)	0	10	15	30	45	60	90	120	150	180
Rendements	0.009±	0.01±	0.03±	0.26±	0.47±	0.56±	0.62±	0.63±	0.63±	0.63±
(%)	0.01	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.03	0.02	0.01	0.01

2. Étude statistique de l'évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne

Tableau D₂ : Statistique descriptives

Lot	N	M±ES	Ecart type	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne
P.a	3	0,0000 ± 0.0000	0.0000	[0,0000 ± 0.0000]
B.s	3	30,0000 ± 0.0000	0,0000	[30,0000 ± 30,0000]
E.c	3	21.6667 ± 0.33333	0.57735	[20.2324± 23.1009]
K.p	3	49.5000± 0.5000	0.86603	[47.3487± 51.6513]
E.f	3	21.1667± 0.33333	0.57735	[19.7324± 22.6009]
B.b	3	12.0000±0.0000	0.00000	[12.0000± 12.0000]
S.a	3	66.3333± 0.33333	0.57735	[64.8991± 67.7676]
S.c	3	18.3333± 0.66667	1.15470	[15.4649± 21.2018]
C.a	3	13.3333 ±0.28868	0.28868	[12.6162±14.0504]

Tableau D₃ : Test d'homogénéité des Variances

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification.
7.684	8	18	.000

Tableau D₄: Test ANOVA

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	9984.241	8	1248.030	3547.033	.000
Intra-groupe	6.333	18	.352		
Total	9990.574	26			

Tableau D₅ : Test d'homogénéité intergroupe
Test Student-Newman-Keuls^a

	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
P.a	3	.0000							
B.b	3		12.0000						
C.a	3			13.3333					
S.c	3				18.3333				
E.f	3					21.1667			
E.c	3					21.6667			
B.s	3						30.0000		
K.p	3							49.5000	
Sa	3								66.3333
Sig		1.000	1.000	1.000	1.000	.316	1.000	1.000	1.000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées

Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000

Tableau D₆ : Test ANOVA

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	9984.241	8	1248.030	3547.033	.000
Intra-groupe	6.333	18	.352		
Total	9990.574	26			

Tableau D₇ : Test d'homogénéité des variances pour les bactéries Ef et Ec.

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
9.600	1	3	.053

Tableau D₈ : Test ANOVA pour les bactéries Ef et Ec.

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	.833	2	.417	1.875	.296
Intra-groupes	.667	3	.222		
Total	1.500	5			

Tableau D₉ : Test d'homogénéité des variances pour les bactéries Gram⁺

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
8.000	2	6	.020

Tableau D₁₀ : Test ANOVA pour les bactéries Gram⁺

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	3492.667	2	1746.333	7858.500	.000
Intra-groupes	1.333	6	.222		
Total	3494.000	8			

Tableau D₁₁ : Test d'homogénéité des variances pour les bactéries Gram⁻

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
11.077	3	8	.003

Tableau D₁₂: Test ANOVA pour les bactéries Gram⁻

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	4003.563	3	1334.521	4927.462	.000
Intra-groupes	2.167	8	.271		
Total	4005.729	11			

Tableau D₁₃ : Test d'homogénéité des variances pour les levures

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
8.471	1	4	.044

Tableau D₁₄ : Test ANOVA pour les levures

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	40.042	1	40.042	56.529	.002
Intra-groupes	2.833	4	.708		
Total	42.875	5			

3. Etude statistique de l'activité antioxydante

Tableau D₁₅: Statistiques descriptives de l'activité antioxydante de l'huile essentielle

Activité antioxydante de l'huile essentielle	
Concentration en mg/l	A%
100	15,90 ± 0.29
200	29,86 ± 0.30
400	34,82 ± 0.32
600	35,40 ± 0.22
800	36,36 ± 0.42
1000	40,70 ± 0.15

Tableau D₁₆: Statistiques descriptives de l'activité antioxydante de l'hydrolat

Activité antioxydante de l'hydrolat	
Concentration en mg/l	A%
100	6,34 ± 0.43
200	9.15 ± 0.49
400	15.00 ± 0.80
600	15.19 ± 0.70
800	22.40 ± 0.49
1000	23.51 ± 0.12

Tableau D₁₇: Statistiques descriptives de l'activité antioxydante du tocophérol

Activité antioxydante du tocophérol	
concentration en mg/l	A%
100	38.08 ± 1.26
200	41.52 ± 0.44
400	42.48 ± 0,48
600	52,41 ± 0,18
800	65,42 ± 0,26
1000	80,53 ± 0,72

Tableau D₁₈: Statistiques descriptives de l'activité antioxydante de la rutine

Activité antioxydante de la rutine	
concentration en mg/l	A%
100	17,93 ± 0,62
200	30,40 ± 0,74
400	33,78 ± 0,42
600	53,78 ± 0,38
800	61,64 ± 0,36
1000	62,25 ± 0,19

Tableau D₁₉: Statistiques descriptives de l'activité antioxydante de quercétine

Activité antioxydante de quercétine	
concentration en mg/l	A%
100	68,96 ± 0,50
200	76,52 ± 0,28
400	78,57 ± 0,30
600	80,12 ± 0,69
800	85,42 ± 0,45
1000	86,48 ± 0,48

Tableau D₂₀: Statistiques descriptives de l'activité antioxydante du quercétine

Activité antioxydante du quercétine	
Concentration en mg/l	A%
2,5	8,80 ± 0,38
5 l	20,02 ± 0,88
10	30,66 ± 0,66
25	42,20 ± 0,65
50	57,21 ± 0,55
100	73,99 ± 0,53

Tableau D₂₁: Statistiques descriptives de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique

Activité antioxydante de l'extrait méthanolique	
Concentration en mg/l	A%
2,5	3,14 ±0,95
5	12,58 ± 0,54
10	33,30 ±0,58
25	51.93 ±0,56
50	64.13 ±0,41
100	81.30 ±0,37

Tableau D₂₂: Test d'homogénéité des variances pour les échantillons HE, HY, Rutine, Tocophérol et Quercétine à une concentration de 1000 mg/l

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
6.054	4	10	.010

Tableau D₂₃: Test ANOVA pour les échantillons HE, HY, Rutine, Tocophérol et Quercétine à une concentration de 1000 mg/l

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	8467.520	4	2116.880	8496.294	.000
Intra-groupes	2.492	10	.249		
Total	8470.012	14			

Tableau D₂₄: Test d'homogénéité intergroupe pour les échantillons HE, HY, Rutine, Tocophérol et Quercétine à une concentration de 1000 mg/l

échantillon	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Student-Newman-Keuls ^a						
HY	3	23.5133				
HE	3		40.7033			
Rutine	3			62.2467		
Tocophérol	3				80.5267	
Quercétine	3					86.4767
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3.000.

Tableau D₂₅: Test d'homogénéité des variances pour les échantillons EM et Quercétine à une concentration de 100 mg/l.

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
.757	1	4	.433

Tableau D₂₆: Test ANOVA pour les échantillons EM et Quercétine à une concentration de 100 mg/l.

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	80.154	1	80.154	253.77 3	.000
Intra-groupes	1.263	4	.316		
Total	81.418	5			

4. Etude statistique de l'activité anti-inflammatoire

Tableau D₂₇: Statistique descriptives

Lot	N	M±ES	Ecart type	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne
HE0	5	0,031820 ± 0,0034592	0,0077351	[0,025640 ± 0,037320]
HE1	5	0,017100 ± 0,0038753	0,0086654	[0,011160 ± 0,024040]
HE2	5	0,010540 ± 0,0026139	0,0058449	[0,005758 ± 0,014480]
HY1	5	0,019600 ± 0,0025415	0,0056829	[0,01594 ± 0,024554]
HY2	5	0,012100 ± 0,0013642	0,0030504	[0,009841 ± 0,014699]
Inf1	5	0,016480 ± 0,0022850	0,0051095	[0,012340 ± 0,020240]
Inf2	5	0,012320 ± 0,0025728	0,0057530	[0,008140 ± 0,017210]
Réf	5	0,032140 ± 0,0084638	0,0189256	[0,016507 ± 0,046280]
T	5	0,061108 ± 0,0083757	0,0187287	[0,048300 ± 0,075804]

Tableau D₂₈: Test d'homogénéité des variances

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
2,771	8	36	,017

Tableau D₂₉: Test ANOVA

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	,010	8	,001	11,989	,000
Intra-groupes	,004	36	,000		
Total	,014	44			

Tableau D₃₀: Test d'homogénéité intergroupe

échantillon		N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
			1	2	3
Student-Newman-Keuls ^a	HE2	5	,010540		
	HY2	5	,012100	,012100	
	Inf2	5	,012320	,012320	
	Inf1	5	,016480	,016480	
	HE1	5	,017100	,017100	
	HY1	5	,019600	,019600	
	HE0	5		,031820	
	Réf	5		,032140	
	T	5			,061108
Signification			,742	,061	1,000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 5,000.

Tableau D₃₁: Test d'homogénéité des variances pour les lots HE1.HE2.HY1.HY2.INF1.INF2

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
,625	5	24	,682

Tableau D₃₂: Test ANOVA pour les lots HE1.HE2.HY1.HY2.INF1.INF2

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	,000	5	,000	1,790	,153
Intra-groupes	,001	24	,000		
Total	,001	29			

5. Etude statistique de l'activité antalgique

Tableau D₃₃: Statistique descriptives

Lot	N	M±ES	Ecart type	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne
HE1	5	28,2000 ± 1,3928	3,1144	[25,6000 ± 30,2000]
HE2	5	19,8000 ± 0,8602	1,9235	[18,2000 ± 21,2000]
HY1	5	39,0000 ± 0,5477	1,2247	[35,0000 ± 37,0000]
HY2	5	34,4000 ± 1,1661	2,6076	[26,0000 ± 23,0000]
Inf1	5	41,8000 ± 1,4966	3,3466	[39,0000 ± 40,0000]
Inf2	5	36,2000 ± 0,9695	2,1679	[65,0000 ± 70,0000]
Réf	5	18,4000 ± 0,7483	1,6733	[111,0000 ± 122,0000]
T	5	63,0000 ± 0,7071	1,5811	[816,0000 ± 825,0000]

Tableau D₃₄: Test d'homogénéité des variances

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
,768	7	32	,618

Tableau D₃₅: Test ANOVA

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	7004,000	7	1000,571	186,587	,000
Intra-groupes	171,600	32	5,363		
Total	7175,600	39			

Tableau D₃₆: Test d'homogénéité intergroupe

Lots		N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05						
			1	2	3	4	5	6	
Student-Newman-Keuls ^a	Réf	5	18,40						
	HE2	5	19,80						
	HE1	5		28,20					
	HY2	5			34,40				
	Inf2	5			36,20	36,20			
	HY1	5				39,00	39,00		
	Inf1	5					41,80		
	T	5							63,00
	Signification			,346	1,000	,228	,065	,065	
Scheffe ^a	Réf	5	18,40						
	HE2	5	19,80						
	HE1	5		28,20					
	HY2	5			34,40				
	Inf2	5			36,20	36,20			
	HY1	5			39,00	39,00			
	Inf1	5				41,80			
	T	5						63,00	
	Signification			,995	1,000	,236	,074	1,000	

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 5,000.

Tableau D₃₇: Test d'homogénéité des variances pour les lots HE2 ; Réf.

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
,069	1	8	,800

Tableau D₃₈:Test ANOVA pour les lots HE2 ; Réf.

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	4,900	1	4,900	1,508	,254
Intra-groupes	26,000	8	3,250		
Total	30,900	9			

6. Etude statistique de l'activité diurétique

Tableau D₃₉:Statistique descriptives

Lot	N	M±ES	Ecart type	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne
HE1	5	1.9800± .02000	0.04472	[1.9400± 2.0000]
HE2	5	4.6000± 0.42544	0.95131	[3.9600± 5.4400]
HY1	5	3.3000± 0.30000	0.67082	[2.8000± 3.8000]
HY2	5	4.7000± 0.37417	0.83666	[4.1000±5.4000]
Inf1	5	5.7800± 0.56427	1.26174	[5.0000± 6.7600]
Inf2	5	5.8000± 0.37417	0.83666	[5.2000± 6.4000]
Inf3	5	9.2000 ± 3,2829	0.44721	[9.0000 ± 9.6000]
Réf	5	9.4000± 0. 20000	0.54772	[9,0000 ± 9.8000]
T	5	2.5600±0. .22935	0.51284	[2.1800 ±2.9400]

Tableau D₄₀:Test d'homogénéité des variances

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
2.527	8	36	.027

Tableau D₄₁:Test ANOVA

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	279.322	8	34.915	61.470	.000
Intra-groupes	20.448	36	.568		
Total	299.770	44			

Tableau D₄₂:Test d'homogénéité intergroupe

Lots	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Student-Newman-Keuls ^a	HE1	5	1.9800			
	T	5	2.5600	2.5600		
	HY1	5		3.3000		
	HE2	5			4.6000	
	HY2	5			4.7000	
	Inf1	5			5.7800	
	Inf2	5			5.8000	
	Inf3	5				9.2000
	Ref	5				9.4000
	Sig.		.232	.129	.074	.677

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 5,000.

Tableau D₄₃: Test d'homogénéité des variances pour les lots HE1, T.

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
.894	1	8	.372

Tableau D₄₄: Test ANOVA pour les lots HE1, T.

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	1.369	1	1.369	3.840	.086
Intra-groupes	2.852	8	.356		
Total	4.221	9			

Tableau D₄₅: Test d'homogénéité des variances pour les lots HE2, HY2, Inf1, Inf2.

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
.371	3	16	.775

Tableau D₄₆: Test ANOVA pour les lots pour les lots HE2, HY2, Inf1, Inf2.

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	6.524	3	2.175	2.232	.124
Intra-groupes	15.588	16	.974		
Total	22.112	19			

Tableau D₄₇: Test d'homogénéité des variances pour les lots Inf3 et Réf.

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
1.524	1	8	.252

Tableau D₄₈: Test ANOVA pour les lots pour les lots Inf3 et Réf.

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	.100	1	.100	.400	.545
Intra-groupes	2.000	8	.250		
Total	2.100	9			

7. Etude statistique de l'activité sédative

Tableau D₄₉: Statistique descriptives

Lot	N	M±ES	Ecart type	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne
HE1	6	591,0000 ± 1.9322	4.7329	[587,6667 ± 594,3333]
HE2	6	41,0000 ± 0.7303	1.7889	[39,6667 ± 42,3333]
HY1	6	363,0000 ± 2.7568	6.7528	[358,0000 ± 368,0000]
HY2	6	230,0000 ± 2.1396	5.2409	[226,6667 ± 234,0000]
Inf1	6	396,6700 ± 1.4757	3.6148	[394,0000 ± 399.3333]
Inf2	6	67,0000 ± 0.9661	2.3664	[65,3333 ± 68,6667]
Réf	6	38.50000 ± 0.4282	1.0488	[37.6667 ± 39.3333]
T	6	820,3333 ± 1.6465	4.0332	[817.3333 ± 823.3333]

Tableau D₅₀:Test d'homogénéité des variances

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
4.131	7	40	.002

Tableau D₅₁:Test ANOVA

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	3363690.479	7	480527.211	28539.107	.000
Intra-groupes	673.500	40	16.838		
Total	3364363.979	47			

Tableau D₅₁:Test d'homogénéité intergroupe

lots	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	
Student-Newman-Keuls ^a	Réf	6	38.5000					
	HE2	6	41.0000					
	Inf2	6		67.0000				
	HY2	6			230.3333			
	HY1	6				363.0000		
	Inf1	6					396.6667	
	HE1	6						591.0000
	T	6						
	Sig.		.298	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 6.000.

Tableau D₅₂: Test d'homogénéité des variances pour les lots pour les lots HE2 et Réf.

Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
1.125	1	10	.314

Tableau D₅₃: Test ANOVA pour les lots pour les lots HE2 et Réf.

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	18.750	1	18.750	8.721	.014
Intra-groupes	21.500	10	2.150		
Total	40.250	11			

Tableau D₅₄: Pourcentage d'œdème enregistré lors de l'activité anti-inflammatoire sur des souris NMRI.

Lots	%d'œdème
HE0	25,5952
HE1	13,9921
HE2	8,1315
HY1	14,8981
HY2	9,8182
Inf1	12,1893
Inf2	9,1927
Réf	24,1353
T	50,3444

Tableau D₅₅: Pourcentage de réduction d'œdème enregistré lors de l'activité anti-inflammatoire sur des souris NMRI.

Lots	% de réduction de l'œdème
HE0	49,1597
HE1	72,2091
HE2	83,84833
HY1	70,4075
HY2	80,4978
Inf1	75,7881
Inf2	81,7404
Réf	52,0596

Tableau D₅₆: Nombre de crampes comptabilisées après injection de l'acide acétique sur des souris NMRI.

Lots	Nombre des crampes
HE1	28,2000 ± 1,3928
HE2	19,8000 ± 0,8602
HY1	39,0000 ± 0,5477
HY2	34,4000 ± 1,1661
Inf1	41,8000 ± 1,4966
Inf2	36,2000 ± 0,9695
Réf	18,4000 ± 0,7483
T	63,0000 ± 0,7071

Tableau D₅₇: Pourcentage de protection des différents produits testés lors de l'activité antalgique.

Echantillon	pourcentage de la protection (%)
HE1	55,2381
HE2	68,5714
HY1	38,0952
HY2	45,3968
Inf1	33,6508
Inf2	42,5397
Réf	70,7937

Tableau D₅₈: Volume d'urine recueilli par les différents extraits après 6 heures

Lots	volume d'urine recueilli après 6h
HE1	1.9800 ± .02000
HE2	4.6000 ± 0.42544
HY1	3.3000 ± 0.30000
HY2	4.7000 ± 0.37417
Inf1	5.7800 ± 0.56427
Inf2	5.8000 ± 0.37417
Inf3	9.2000 ± 3,2829
Réf	9.4000 ± 0.20000
T	2.5600 ± 0. 22935

Tableau D₅₉:Nombre de déplacements comptabilisés par l'actimètre après injection de l'acide acétique sur des souris NMRI

Lots	Nombre de déplacement
HE1	591,00
HE2	41,00
HY1	363,00
HY2	230,33
Inf1	396,67
Inf2	67
Réf	38,50
T	820,3333

Tableau D₆₀:Pourcentage de réduction de déplacement par les différents produits testées lors de l'activité sédative

Echantillon	pourcentage de réduction du déplacement (%)
HE1	27,9561
HE2	27,9561
HY1	55,7497
HY2	71,9220
Inf1	51,6457
Inf2	91,8326
Réf	95.3068

APPENDICE E

Table pour la dilution de l'alcool (Table de Gay-Lussac) appelée aussi Table de mouillage de l'alcool

		Concentration initiale													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration finale	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55	
15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64	
10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85	

Les chiffres en noir indiquent la quantité d'eau en mL à ajouter à 100mL d'alcool de concentration initiale x (en bleu) pour obtenir la concentration désirée.

APPENDICE F

Alzheimer : est une maladie neurodégénérative du tissu cérébral qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales et notamment de la mémoire.

Androcée : ensemble des étamines (partie mâle de la fleur).

Antirhumatismal : est une substance utilisée pour traiter certaines affections rhumatologiques (les rhumatismes).

Anthère : partie de l'étamine portée par le filet, contenant le pollen dans les loges polliniques.

Anti-spasmodique : qui réduit les spasmes, les crampes, et les contractions musculaires.

Aphtes : sont des lésions douloureuses qui apparaissent sur la muqueuse buccale et qui peuvent toucher la langue ou la gorge.

Arthrite : affections inflammatoires aiguës ou chroniques qui touchent les articulations.

Baie : fruit charnu, en général indéhiscent et contenant une ou plusieurs graines, les pépins. Le péricarpe de la baie est composé de l'extérieur vers l'intérieur par un épicarpe très fin, un mésocarpe charnu (appelé sarcocarpe) et d'un endocarpe charnu.

Calice : enveloppe extérieure de la fleur, composée de sépales.

Cancer : est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme.

Carpelle : Organe reproducteur femelle de la fleur, formé d'un ovaire contenant le ou les ovules, et d'un stigmate.

Cytotoxique : est la propriété qu'a un agent chimique ou biologique d'altérer des cellules, éventuellement jusqu'à les détruire.

Dengue : maladie virale est transmise par la piqûre d'un moustique diurne du genre *Aedes*, lui-même infecté par un virus de la dengue de la famille des flavivirus. Cette infection virale entraîne classiquement fièvre, mal de tête,

douleurs musculaires et articulaires, fatigue, nausées, vomissements et éruption cutanée.

Dioïque: Terme qualifiant les plantes dont les fleurs mâles et les fleurs femelles se trouvent sur des pieds différents.

Encéphalite : est une inflammation de l'encéphale (cerveau).

Epilepsie : est une affection neurologique qui est le symptôme d'une hyperactivité cérébrale paroxystique pouvant se manifester par des convulsions ou une perte de conscience, voire par des hallucinations complexes inaugurales, avec ou sans convulsions.

Étamine : organe reproducteur mâle d'une fleur ; elle est composée d'une anthère habituellement à deux loges fixée à un filet.

Fièvre jaune : est une maladie hémorragique virale aiguë transmise par des moustiques infectés. Le terme «jaune» fait référence à la jaunisse présentée par certains patients.

Flatulence : est la production de gaz gastro-intestinaux, provoquant des ballonnements, accumulés dans l'intestin ou l'estomac et expulsés hors du corps de façon volontaire ou involontaire par l'anus ou la bouche caractéristique.

Fourbure : est une affection du pied du cheval d'origine systémique qui se traduit par une boiterie intense et d'évolution rapide sur les antérieurs ou les quatre membres.

Gale : **scabiose** ou **mal de Sainte-Marie** :est une affection contagieuse de la peau spécifique à l'Homme, déterminée par la femelle d'un acarien microscopique (*Sarcoptes scabiei*) qui creuse dans l'épiderme des galeries (sillons) où elle dépose ses œufs, provoquant de vives démangeaisons nocturnes..

Hémorroïdes : sont des veines dilatées qui se forment dans l'anus ou le rectum.

Hypoglycémiant : qui abaisse le taux de glucose dans le sang.

Involucre : désigne une collerette d'écailles ou de bractées libres ou soudées ensemble à la base d'une inflorescence.

Laticifère : canal uni-ou pluricellulaire permettant la sécrétion du latex.

Malaria : ou paludisme est dû à un parasite, le Plasmodium, transmis par les moustiques anophèles qui en sont porteurs. Chez l'être humain, ces parasites se multiplient dans le foie puis s'attaquent aux globules rouges. Le paludisme se manifeste par de la fièvre, des maux de tête et des vomissements. Ces symptômes apparaissent généralement dix à quinze jours après la piqûre de

moustique. En l'absence de traitement, le paludisme peut entraîner rapidement le décès par les troubles circulatoires qu'il provoque.

Ombelle : est une inflorescence simple dans laquelle les pédoncules floraux sont tous insérés au même point de la tige, et les fleurs sont toutes disposées sur une même surface sphérique, ou parfois plane.

Parkinson : est une maladie neurologique chronique affectant le système nerveux central responsable de troubles essentiellement moteurs d'évolution progressive.

Pédiculose : est une parasitose (infestation de la peau par les poux), contagieuse et désagréable en raison du prurit qu'occasionnent les morsures des poux, mais bénigne.

Pelade : provoque une perte de pilosité par plaques, le plus souvent au cuir chevelu. La peau du crâne conserve son apparence normale, mais est simplement dépourvue de cheveux par endroits. On la nomme aussi alopécie en plaques.

Penninervé : se dit d'une feuille dont la nervure principale porte, de part et d'autre, des nervures secondaires disposées comme les barbes d'une plume.

Pistil (Gynécée) : c'est l'ensemble des pièces fertiles femelles, il est constitué d'un ou plusieurs carpelles, libres ou soudés entre eux.

Polymérisation : désigne la réaction chimique, ou le procédé, permettant la synthèse de polymères à partir de molécules réactives qui peuvent être des monomères ou des prépolymères linéaires.

Principe actif : est la molécule qui dans un médicament possède un effet thérapeutique.

Pyrolyse : est la décomposition d'un composé organique par la chaleur (sans flamme, pour éviter l'oxydation et la combustion) pour obtenir d'autres produits (gaz et matière) qu'il ne contenait pas.

Staminode : est une étamine stérile ou avortée, souvent rudimentaire. Elle ne produit pas de pollen. Les staminodes sont souvent discrets et ressemblant aux étamines.

Stigmate : l'extrémité du pistil, ses villosités recueillent le pollen.