

UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Laboratoire de Biotechnologies, Environnement et Santé

THÈSE DE DOCTORAT

En Biologie

Spécialité : Biotechnologies Végétales

ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE DES FEUILLES DE LAURIER NOBLE (*LAURUS NOBILIS* L.), EFFETS BIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES

Par

Asmaa MILIANI

Devant le jury composé de :

F. Z. KARA – TOUMI	Professeur, USD Blida 1	Présidente
S.BELHADJ	Professeur, UZA Djelfa	Examinatrice
N. SMAIL SAADOU	Professeur, UMM Tizi ousou	Examinatrice
K. HOUALI	Professeur, UMM Tizi ousou	Examineur
F. SAIDI	Professeur, USD Blida 1	Directrice de thèse
C. CHAOUIA	M.C.A., USD Blida 1	Co- directrice de thèse

Blida, Juillet 2018

RESUME

Notre travail porte sur l'extraction, la caractérisation et la quantification de quelques métabolites secondaires actifs de l'espèce *Laurus nobilis* L. appelée communément Rend. Les effets antimicrobiens, antioxydants, toxiques et antidiabétiques que peuvent engendrer les extraits de cette plante ont été aussi évalués.

Le profil chromatographique de l'huile essentielle et de l'hydrolat est composé principalement de 1.8 cineol et de linalool, comme composés majoritaires avec des valeurs respectivement de 24.658 % et 15,223%. L'étude histologique au niveau du limbe et du pétiole a mis en évidence la présence de grosses poches entourées de cellules sécrétrices.

Le criblage préliminaire basé sur des tests spécifiques a révélé la présence de substances ayant de grandes valeurs thérapeutiques (flavonoïdes, tanins, coumarines, des proanthocyanidols, des alcaloïdes, des saponosides, des senosides, des mucilages, des caroténoïdes, des stéroïdes, des stérols et des terpènes). L'analyse quantitative a montré une présence importante des polyphénols et des flavonoïdes dans les feuilles de *Laurus nobilis*. L'extrait méthanolique représente la teneur la plus élevée en polyphénols totaux ($179,09 \pm 4,55 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait) et en flavonoïdes ($9,68 \pm 1,64 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait).

L'activité antimicrobienne a montré que l'huile essentielle possède un spectre antimicrobien considérable contre toutes les souches pathogènes testées à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* qui reste insensible.

L'évaluation de l'activité antioxydante a révélé que l'extrait méthanolique présente, non seulement, un effet piègeur significatif du radical DPPH, mais aussi une inhibition élevée de l'oxydation couplée de β -carotène/acide linoléique ($p < 0.05$) et un pouvoir réducteur du fer, comparativement aux antioxydants standards (Quercétine et BHT).

De plus, l'étude de la toxicité aiguë a montré que l'huile essentielle de feuilles de *Laurus nobilis* est légèrement toxique avec une DL50 égale à $748,75 \pm 1,25$ mg/kg du poids corporel. Toute fois, l'extrait aqueux, l'extrait méthanolique et l'hydrolat de feuilles de *Laurus nobilis* n'ont montré aucun signe de toxicité aiguë.

Le diabète induit expérimentalement chez des rats mâles par une injection unique de la streptozotocine à raison de 60 mg/kg pendant trois semaines suite à différents traitements par les extraits de feuilles a permis de mettre en évidence que les extraits polaires (méthanolique et aqueux) entraînent une diminution de la glycémie, du cholestérol et des triglycérides avec une augmentation modérée de poids corporel .

Mots clé: *Laurus nobilis*, antimicrobienne, antioxydante, huile essentielle, hydrolat, extrait aqueux, extrait méthanolique, diabète, toxicité aiguë, streptozotocine.

ABSTRACT

In this work, we have performed the extraction, characterization and quantification of some active secondary metabolites of the *Laurus nobilis* species commonly known as "Rend". As well as their anti-microbial, anti-oxidant, toxic and antidiabetic effects have been evaluated.

The chromatographic profile of the essential oil and the hydrosol is mainly composed of 1.8 cineol and linalool, as majority compounds, with values of 24.658% and 15.223% respectively. The histological study on the limb and the petiole revealed the presence of large pockets surrounded by secretory cells.

The preliminary screening based on specific tests revealed the presence of substances with high therapeutic values (flavonoids, tanins, coumarins, proanthocyanidins, alkaloids, saponosides, senosides, mucilages, carotenoids, steroids, sterols and terpenes).

The quantitative analysis showed a significant presence of polyphenols and flavonoids in *Laurus nobilis* leaves. The methanolic extract represents the highest content of total polyphenols (179.09 ± 4.55 μg EAG / mg of extract) and flavonoids (9.68 ± 1.64 μg EQ / mg of extract).

The antimicrobial activity proved that the essential oil has a considerable antimicrobial spectrum towards all pathogenic strains tested. However no effects have been observed on *Pseudomonas aeruginosa*.

The evaluation of the antioxidant activity revealed that the methanolic extract has not only a significant scavenging effect of the DPPH radical, but also a high inhibitory power of the β -carotene / linoleic acid coupled oxidation ($p < 0.05$) and a reducing power of iron compared to standard antioxidants (Quercetin and BHT).

Furthermore, the acute toxicity study revealed that the essential oil of *Laurus nobilis* leaves is slightly toxic with an LD50 of 748.75 ± 1.25 mg/kg of body weight. While the aqueous and methanolic extracts and leaf hydrosol showed no signs of acute toxicity.

The diabetes treatment has been experimentally induced on male rats by a single injection of streptozotocin (60 mg/kg) along three weeks, with different leaf extracts proved that the polar extracts (methanolic and aqueous) induced a decrease in blood glucose levels as well as lipid rates (cholesterol and triglycerides) with a moderate increase in body weight.

Key words: *Laurus nobilis*, antimicrobial, antioxidant, essential oil, hydrosol, aqueous extract, methanolic extract, diabetes, acute toxicity, streptozotocin.

الملخص

تتمحور هذه الدراسة حول تحديد ووصف وقياس تركيز بعض المركبات العضوية الثانوية الفعالة المستخرجة من نبات الرند المعروف بإسم *Laurus nobilis* L. من جهة، و إبراز الخصائص الطبية و التأثيرات السامة لمختلف مستخلصات هذه النبتة من جهة أخرى.

إن التحليل الكروماتوغرافي المر فوق بطيف الكتلة سمح لنا بالتعرف على أن 1.8 cineleo و linalool هما المكونان الأساسيان لكل من الزيت و الماء العطري بنسبة تقدر بـ 24.658% و 15.223% على التوالي .

كشفت الدراسة النسيجية على مستوى النصل و العنق عن وجود جيوب كبيرة تحيط بها خلايا إفرازية للزيت الأساسي.

الانتقاء الكيميائي تم الكشف عن عدة مركبات أخرى ذات قيمة علاجية، و المتمثلة في المواد الهلامية النباتية ، اشباه قلوية، العفص ، الفلافونويد ، الكاروتينات ، غليكوزيد سنامكي، الستيرويد، السبونوزيدات ، التربين و الستيروول .

وقد كشف التحليل الكمي عن وجود كمية معتبرة من الفينولات و الفلافونويدات في الأوراق . يحوي المستخلص الميثانولي على الكمية الأكبر من الفينولات ($179,09 \pm 4,55$ ميكرو غ مكافئ حمض الغاليك / مع مستخلص) و الفلافونويدات ($9,68 \pm 1,64$ ميكرو غ مكافئ الكرسيتين/ مع مستخلص) .

بينت الدراسة الميكروبيولوجية أن الزيت الأساسي يمتلك مجال مضادا للميكروبات معتبر ضد جميع السلالات المسببة للأمراض التي تم اختبارها. ومع ذلك، لم يلاحظ أي تأثير على *Pseudomonas aeruginosa* .

و كشف تقييم النشاط المضاد للأكسدة أن المستخلص الميثانولي لا يظهر فقط القدرة عن إزاحة الجذر DPPH ، بل أيضا عن تثبيط عال للأكسدة المزدوجة للبيتاكاروتين و حمض اللينوليك ($P < 0,05$) و القدرة على إرجاع الحديد ، مقارنة مع مضادات الأكسدة النموذجية (Quercétine و BHT) .

بالإضافة إلى ذلك ، فقد بينت دراسة السمية الحادة أن الزيت الأساسي لأوراق هذه النبتة ضعيف السمية حيث قدرت الجرعة القاتلة لـ 50% من الحيوانات المخبرية بـ $748,75 \pm 1,25$ مغ / كغ من وزن الجسم . في حين أن المستخلص المائي، المستخلص الميثانولي و الماء العطري لم يظهرُوا أي علامة للتسمم الحاد.

أظهر علاج مرض السكري المحدث تجريبيا على جرذان ذكورية عن طريق الحقن لمادة ستربتوزوتوسين (STZ) بتركيز 60 مغ/كغ لمدة ثلاث اسابيع ان المستخلص المستخلص المائي و الميثانولي يعمل على خفض نسبة السكر في الدم و مستوى الدهون و تحسين وزن الجسم .

الكلمات المفتاح : *Laurus nobilis* ، مضاد للميكروبات ، مضاد للأكسدة ، الزيت الأساسي ، الماء العطري ، المستخلص المائي، المستخلص الميثانولي، سكر الدم، السمية الحادة، ستربتوزوتوسين .

DÉDICACES

À ma très chère mère Fadila pour ses dévouements, son amour, ses sacrifices et ses encouragements. Que ce travail soit, pour elle, un faible témoignage de ma profonde affection et tendresse.

Je teins à adresser un hommage à mon père Abd El Kader, le destin ne nous a pas laissé le temps pour jouir ce bonheur ensemble.

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

À Maroua Miliani, de toujours être là pour me faire avancer et de pouvoir tout partager avec moi, de me soutenir à n'importe quel moment et quoi que je fasse, d'être ma petite sœur chérie qui sait m'écouter, qui aura toujours une place au premier.

À toute ma famille.

À Medhat Shahin , de tout ce que déjà tu représentes pour moi, de ton soutien, de ta présence, de tout ce que tu m'apportes au quotidien.

À tous mes amis.

Enfin à toutes les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans ma vie à un moment ou à un autre et qui ont participé à faire de moi celle que je suis aujourd'hui.

Asmaa

REMERCIEMENTS

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à ma directrice de thèse Mme Professeur SAIDI Fairouz et à ma Co-directrice de thèse Mme Docteur CHAOUIA Cherifa pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elles m'accordé m'ont permet de réaliser ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame KARA – TOUMI Fatma Zohra, professeur à l'université SAAD DAHLAB - BLIDA 1- d'avoir accepté de présider le jury.

Je tiens également mes vifs remerciements aux membres de jury Mme SMAIL SAADOUN Nouria, professeur à l'université Mouloud Mammeri de Tizi ousou, Mr HOUALI Karim, professeur à l'université Mouloud Mammeri de Tizi ousou et Mr CHEMAT Smain, directeur de recherche CRAPC, pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner cette thèse.

Mes remerciements vont aussi à tous les enseignants chercheurs du département de Biologie et Physiologie Cellulaire et spécialement ceux du laboratoire de recherche Biotechnologies, Environnement et santé.

Toute ma gratitude va enfin à toutes les personnes qui y ont contribué de près ou de loin trouvent ici ma sincère reconnaissance et mes remerciements.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ
ABSTRACT

الملخص

DÉDICACES
REMERCIEMENTS
TABLE DES MATIÈRES
LISTE DES FIGURES
LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION.....	15
Chapitre 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
1.1. Plantes aromatiques et médicinales.....	17
1.1.1. Plantes médicinales.....	17
1.1.2. Plantes aromatiques.....	17
1.1.3. Phytothérapie.....	17
1.1.4. Aromathérapie.....	18
1.1.5. Hydrolathérapie.....	18
1.1.2. Principales substances actives de la plante.....	18
1.1.2.1. Alcaloïdes.....	19
1.1.2.2. Saponosides.....	19
1.1.2.3. Phénols.....	19
1.1.2.4. Flavonoïdes.....	20
1.1.2.5. Tanins.....	20
1.1.2.6. Anthocyanes.....	20
1.1.2.7. Huiles essentielles.....	21
1.1.2.8. Glucosides.....	21
1.1.2.9. Coumarines.....	21
1.1.2.10. Mucilages.....	22
1.1.2.11. Caroténoïdes.....	22
1.2. Étude botanique Laurier noble.....	22
1.2.1. Position systématique.....	23
1.2.2. Origine et distribution de la plante.....	23
1.2.3. Description botanique de la plante.....	24
1.2.4. Composition chimique.....	25
1.2.5. Utilisation et vertus thérapeutiques des feuilles de <i>Laurus nobilis</i>	26

Chapitre 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	28
2.1. Matériels.....	28
2.1.1. Matériel biologique.....	28
2.1.1.1. Matériel végétal.....	28
2.1.1.2 Matériel animal.....	28
2.1.1.3. Souches microbiennes.....	29
2.2. Méthodes.....	29
2.2.1. Identification botanique de la plante.....	29
2.2.1.1. Aspect macroscopique.....	29
2.2.1.2. Aspect microscopique.....	30
2.2.2. Extraction de la fraction aromatique de <i>Laurus nobilis</i>	30
2.2.2.1. Cinétique d'extraction.....	30
2.2.2.2. Extraction par hydrodistillation.....	30
2.2.2.3. Isolation des huiles essentielles.....	31
2.2.2.4. Détermination du rendement en huile essentielle.....	32
2.2.2.5. Analyses physico-chimiques, organoleptiques et chromatographiques de la fraction aromatique (HE, HY).....	32
2.2.2.5.1. Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle et de l'hydrolat.....	32
2.2.2.5.2. Mesure des indices chimiques.....	32
2.2.2.5.3. Mesures des grandeurs physiques.....	34
2.2.2.5.4. Analyses chromatographique de la fraction aromatique (HE et HY).....	36
2.2.2.6. Préparation des extraits de <i>Laurus nobilis</i>	36
2.2.2.6.1. Détermination du taux d'humidité.....	36
2.2.2.6.2. Extrait aqueux.....	37
2.2.2.6.3. Extrait méthanolique.....	37
2.2.2.6.4. Calcul du rendement en extraits.....	38
2.2.2.6.5. Etude phytochimique de <i>Laurus nobilis</i>	38
2.2.2.6.6. Dosage des poly phénols et des flavonoïdes	43
2.2.2.6.6.1. Dosage des polyphénols.....	43
2.2.2.6.6.2. Dosage des flavonoïdes.....	44
2.2.2.7. Etude de l'activité antimicrobienne de <i>Laurus nobilis</i>	44
2.2.2.7.1. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne (aromatogramme).....	45
2.2.2.7.2. Etude quantitative de l'activité antimicrobienne	46
2.2.2.7.2.1. Détermination des CMI.....	46
2.2.2.7.2.2. Détermination des CMB/CMF.....	46
2.2.2.7.3. Étude <i>in vitro</i> de l'activité antifongique (Méthode de contact direct).....	47
2.2.2.8. Evaluation de l'activité antioxydante.....	48
2.2.2.8.1. Effet scavenger du radical DPPH.....	48
2.2.2.8.2. Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	49
2.2.2.8.3. Test de blanchissement du β -carotène.....	50
2.2.2.9. Etude de la toxicité aigue	51
2.2.2.10. Évaluation de l'effet antidiabétique.. ..	54
2.2.2.10.1. Induction du diabète expérimentale.....	54
2.2.2.10.2. Evolution du poids des rats.....	55
2.2.2.10.3. Prélèvement du sang.....	55
2.2.2.10.4. Examens biochimiques.....	56

2.2.2.11. Analyse statistique.....	56
Chapitre 3: RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	57
3.1. Résultats de l'étude botanique de la plante.....	57
3.1.1. Étude macroscopique.....	57
3.1.1.1. Feuilles.....	58
3.1.1.2. Fleurs.....	58
3.1.1.3. Fruits.....	60
3.1.2. Étude microscopique.....	61
3.1.2.1. Feuille.....	61
3.1.2.2. Pétiole.....	63
3.2. Extraction de la fraction aromatique de <i>Laurus nobilis</i>	64
3.2.1. Étude de la cinétique d'extraction.....	64
3.2.2. Extraction et rendement en huile essentielle.....	65
3.2.3. Extraction de l'huile essentielle dissoute dans l'hydrolat (HY).....	66
3.2.4. Étude analytique de l'huile essentielle.....	66
3.2.4.1. Caractéristiques organoleptiques.....	66
3.2.4.2. Caractéristiques physico-chimiques de l'HE du <i>laurus nobilis</i>	67
3.2.4.3. Analyses chromatographiques de la fraction aromatique.....	68
3.2.4.3.1. Composition chimique de l'huile essentielle.....	68
3.2.4.3.2. Composition chimique de l'hydrolat.....	69
3.3. Extraction et rendement en extraits bruts.....	70
3.3.1. Taux d'humidité.....	70
3.3.2. Rendement en extraits.....	71
3.3.3. Screening phytochimique des extraits	72
3.3.4. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes.....	73
3.4. Étude de l'activité antimicrobienne de <i>Laurus nobilis</i>	75
3.4.1. Activité antimicrobienne de l'HE.....	75
3.4.2. Activité antifongique de l'HE.....	81
3.5. Étude de l'activité antioxydante de <i>Laurus nobilis</i>	85
3.5.1. Effet scavenger du radical DPPH.....	85
3.5.1.1. Pouvoir de piégeage du radical DPPH des extraits volatils (HE et HY).....	85
3.5.1. 2.Pouvoir de piégeage du radical DPPH des extraits polaires (EAQ et EM).....	87
3.5.1. Activité antioxydante des extraits et des standards exprimée par l'IC50.....	89
3.5.2. Réduction du fer : (FRAP Ferric Reducing Antioxidant Power).....	90
3.5.3. Test de blanchissement du β -carotène.....	91
3.6. Étude de la toxicité aigue des extraits de feuilles	94
3.6.1. Observations cliniques et de survie.....	94
3.7. Étude de l'activité antidiabétique	95
3.7.1. Évolution du poids des rats	96
3.7.2. Évolution de glycémie des rats	97
3.7.3. Évaluation des paramètres lipidiques.....	99
CONCLUSION.....	101
APPENDICES	
RÉFÉRENCES	

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Branche florifère (Femelle) (Original)	24
Figure 1.2 : Branche florifère (Mâle) (Original).....	24
Figure 1.3 : Feuilles et baies de <i>Laurus nobilis</i> L. (Original).....	25
Figure 2.1 : Hydrodistillation de feuilles du <i>Laurus nobilis</i> (Dispositif Clevenger) (Original).....	31
Figure 2.2: Mécanisme réactionnel du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH).....	48
Figure 3.1 : Feuille adulte (Original).....	57
Figure 3.2 : Face inférieure d'une feuille juvénile (Loupe G×4.5) (Original).....	58
Figure 3.3 : Face supérieure d'une feuille juvénile (Loupe G×4.5) (Original).....	58
Figure 3.4 : Fleurs femelles(Original).....	59
Figure 3.5 : Fleurs mâles(Original).....	59
Figure 3.6 : Fleurs mâles (loupe G×4.5) (Original).....	59
Figure 3.7 : Fleurs femelles (loupe G×4.5) (Original).....	60
Figure 3.8 : Baie de <i>Laurus nobilis</i> (Original).....	61
Figure 3.9 : Coupe transversale d'une portion de limbe de feuille de <i>Laurus nobilis</i> (MP G×40) (Original).....	62
Figure 3.10 : Mise en évidence de la structure sécrétrice dans le limbe de feuille de <i>Laurus nobilis</i> (MP G×100) (Original).....	62
Figure 3.11 : Coupe transversale du pétiole de <i>Laurus nobilis</i> (MP G×40)(Original)..	63
Figure 3.12 : Mise en évidence de la structure sécrétrice dans le pétiole de <i>Laurus</i> <i>nobilis</i> (MP G×100) (Original).....	63
Figure 3.13 : Cinétique d'extraction de l'HE de <i>Laurus nobilis</i>	64
Figure 3.14: Taux d'humidité des feuilles sèches de <i>Laurus nobilis</i>	71
Figure 3.15 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	74
Figure 3.16 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	74
Figure 3.17 Pouvoir de piégeage du radical DPPH des extraits volatils (HE et HY) de <i>Laurus nobilis</i> et de la Rutine (témoin positif).....	86
Figure 3.18: Pouvoir de piégeage du radical DPPH des extraits polaires (EAQ et EM) de <i>Laurus nobilis</i> et des témoins positifs (Tocophérol, Quercétine et BHT).....	87
Figure 3.19: Test du pouvoir réducteur des extraits de <i>Laurus nobilis</i> (HE, HY, EAQ et EM) et des témoins positifs (BHT, Tocophérol et Acide ascorbique)....	90
Figure 3.20: Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits de et du témoin positif (BHT).....	92
Figure 3.21: Variation du poids corporel chez les rats témoins sains, diabétiques non traités (TDNT) et traités (TDTM, DEM, DEAQ, DHY et DHE) en fonction du temps.....	97
Figure 3.22 : Variation de la glycémie chez les rats témoins sains, diabétiques non traités (TDNT) et traités (TDTM, DEM, DEAQ, DHY et DHE) en fonction du temps	98

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Classification botanique de <i>Laurus nobilis</i> L.....	24
Tableau 3.1 : propriétés organoleptiques de l'HE et de l'HY.....	66
Tableau 3.2 : Caractéristiques physico-chimique de l'huile essentielle.....	67
Tableau 3.3 : Composés majoritaires de l'huile essentielle.....	68
Tableau 3.4: Composition chimique de l'hydrolat.....	70
Tableau 3.5 : Aspect, couleur et rendement des extraits de <i>Laurus nobilis</i>	71
Tableau 3.6 : Criblage phytochimique des extraits.....	72
Tableau 3.7 : Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes.....	73
Tableau 3.8 : Diamètres de zones d'inhibition, concertations minimales inhibitrices (CMI), concertations minimales bactéricides (CMB) et concertations Minimales fongicides (CMF).....	76
Tableau 3.9 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne	82
Tableau 3.10: Concentrations minimales inhibitrices (CMI = CMF) et concentrations minimales fongicides (létales) (CML) de l'huile essentielle de <i>Laurus nobilis</i> vis-à-vis des souches fongiques testées	84
Tableau 3.11: Activité antioxydante des extraits et des témoins positifs exprimée par l'IC50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$).....	89
Tableau 3.12: Pouvoir anti-radicalaire des extraits de <i>Laurus nobilis</i>	92
Tableau 3.13: Comportement et signes de toxicité aigue de l'HE.....	95
Tableau 3.14 : Evaluation des paramètres sériques	99

INTRODUCTION

Depuis des milliers d'années, l'homme a su exploiter les richesses naturelles qui l'entouraient pour se nourrir et se soigner. C'est en consommant les baies, les feuilles et les racines des végétaux qui poussaient autour de lui et en observant les effets qu'ils avaient sur le bétail et sur lui-même qu'il a progressivement identifié les propriétés curatives des plantes. Sur chaque continent se sont ainsi développées différentes traditions, basées sur un savoir empirique qui s'est transmis et enrichi au fil des générations [1].

La promotion de la phytothérapie nous permettra de sauvegarder le savoir de nos ancêtres qui tend à disparaître [2]. Alors actuellement, beaucoup de laboratoires pharmaceutiques s'intéressent de près aux savoirs médicaux des guérisseurs et des peuplades primitives menant une vie très proche de la nature. Les plantes médicinales sont aussi un facteur économique majeur pour les pays en voie de développement [3].

De nos jours, nous comprenons de plus en plus, que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés aux produits des métabolites secondaires. Leurs propriétés sont actuellement pour un bon nombre reconnues et répertoriées, et donc mises à profit, dans le cadre de la médecine traditionnelle et également dans la médecine allopathique moderne [4] [5].

Aujourd'hui, on estime que les principes actifs provenant des végétaux représentent environ 25% des médicaments prescrits. Soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes. En Afrique, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui contribuent pour 90% du traitement médical. Jusqu'en 2004, on a estimé que près de 75% de la population africaine ont toujours recours aux plantes pour se soigner. De plus ce type de soin est considéré souvent comme faisant partie de la médecine douce [5].

Les extraits des plantes commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Ils font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies contemporaines.

Ce travail vise à contribuer à l'étude des activités biologiques et pharmacologiques des extraits d'une plante aromatique *Laurus nobilis* L., qui appartient à la famille des lauracées. C'est une des familles de plantes les plus utilisées comme source mondiale d'épices.

Cette étude s'intègre également dans le contexte plus global de la mise en valeur de la biodiversité des plantes aromatiques algériennes dont les objectifs principaux peuvent se résumer ainsi:

- Étude macroscopique et microscopique de *Laurus nobilis* L. ;
- Extraction de l'huile essentielle et de l'hydrolat de feuilles du *Laurus nobilis* et la détermination de leurs composition chimique par CG-MS ;
- Extraction des fractions polaires des feuilles (extrait aqueux et extrait méthanolique) ;
- Screening phytochimique et dosage de certains métabolites secondaires contenus dans les feuilles tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes;
- Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle par diffusion sur gélose et la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI), bactéricides (CMB) et fongicides (CMF) ;
- Étude de l'activité antioxydante des extraits selon trois méthodes (Effet scavenger du radical DPPH, Réduction du fer et test de blanchissement du β -carotène) ;
- Évaluation de la toxicité aiguë de différents extraits de feuilles de *Laurus nobilis* ;
- Évaluation de l'effet antidiabétique des extraits de feuilles de *Laurus nobilis* sur des rats rendus diabétiques par la streptozotocine.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Plantes aromatiques et médicinales

1.1.1. Plantes médicinales

SCHAWENBERG et *al.*, souligne qu'une plante médicinale est toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies. Certaines plantes contenant toute une gamme de matières efficaces peuvent avoir des actions très différentes suivant leur préparation [6].

Les plantes médicinales ou pharmaceutiques interviennent dans la préparation des médicaments. En médecine, les remèdes préparés à partir des plantes sont appelés galéniques (du nom de Galien, médecin du premier siècle) [7].

1.1.2. Plantes aromatiques

Les plantes aromatiques sont constituées par des organes apportant une odeur et une saveur destinées à améliorer le bien-être. Il peut s'agir soit d'une plante entière ou d'un organe (feuilles, fleurs, fruits, bourgeons, graines, rhizomes ou bulbes) [8]. Une plante aromatique se différencie des autres plantes par ces principes odoriférants et parfumés appelés huiles essentielles [9].

1.1.3. Phytothérapie

Étymologiquement, la phytothérapie vient du grec *phytos* qui veut dire plantes et *thérapia* qui veut dire soins ou traitement [10].

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 à base de plantes) et enfin en balnéothérapie (bain, compresses) [11] [12].

1.1.4. Aromathérapie

L'aromathérapie désigne une branche particulière de la médecine par les plantes. Ce terme est composé de deux racines grecques : aroma signifiant parfum et thérapie, méthode visant à soigner la maladie ou 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 [13].

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 [14].

1.1.5. 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 l'entité, Corps-Esprit [15]. 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 [15] [16]. Les hydrolats peuvent être consommés sous forme de tisanes, en spray oral, par gouttes ou également comme tonique cutané [15].

1.1.2. Principales substances actives de la plante

Les plantes renferment des composants chimiques qui se répartissent en des grands groupes: les protides, les glucides, les lipides et les acides nucléiques d'une part, les pigments, les tanins, les polymères, les hormones et les essences végétales dites huiles essentielles d'autre part. Les premiers sont les constituants du métabolisme primaire. Ils sont en permanence au sein de la plante. Les autres proviennent du métabolisme secondaire et ne sont pas toujours présents chez les végétaux [17]. Les métabolites secondaires sont un groupe de molécules qui interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que

dans la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux. Ils interviennent aussi dans la défense contre les prédateurs et les pathogènes. Ils agissent comme agents allélopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits [18].

1.1.2.1. Alcaloïdes

Formant un groupe très large, les alcaloïdes possèdent presque tous un atome d'azote qui les rend pharmaceutiquement très actifs. Certains sont des médicaments connus qui ont des vertus thérapeutiques avérés, c'est le cas d'un dérivé de la pervenche « *Vincarosea* » employé qui traite certains cancers [19]. Ils paraissent jouer un rôle défensif chez la plante contre les herbivores et les pathogènes. En raison de leur activité biologique puissante, beaucoup d'entre eux ont été exploités comme des produits pharmaceutiques, des stimulants, des narcotiques et des poisons [20][21].

1.1.2.2. Saponosides

Ce sont des molécules de forme hétérosidique. Ils se divisent en saponosides à génine triterpenique et stéroïdique. Les saponosides (saponines) doivent leur nom au fait que comme le savon, elles produisent de la mousse en contact avec l'eau [22].

Les saponines stéroïdiques ont une structure chimique similaire à celle de nombreuses hormones humaines (cortisol et œstrogène) et confèrent aux plantes qui les contiennent une activité hormonale, comme la réglisse « *Glycyrrhiza glabra* ». Les triterpenoïdes présents dans les racines de primevère « *Premulaveris* » sont de puissants expectorants, mais peuvent aussi faciliter l'absorption des éléments nutritifs [23].

1.1.2.3. Phénols

Ce sont des substances qui possèdent un cycle aromatique portant une fonction hydroxyl (phénol) ou plusieurs (polyphénol) [24]. Il existe une très grande variété de composés phénoliques, du plus simple comme l'acide salicylique au plus complexe comme les tanins. On suppose que les plantes en les produisant,

cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages [19]. Les phénols sont surtout des antiseptiques « arbutoside de la busserole » et des antalgiques [21]. Les acides phénoliques comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydantes et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales [19].

1.1.2.4. Flavonoïdes

Les flavonoïdes des pigments végétaux, en particulier, jaune et orange. Les flavonoïdes présents dans de nombreuses plantes sont des anti-inflammatoires. La rutine présente dans plusieurs arbres tels le citronnier renforce les parois des vaisseaux capillaires [23]. Ce sont aussi des antiagrégants plaquettaires non toxiques qui empêchent l'adhésion du thrombus à la paroi vasculaire [21].

1.1.2.5. Tanins

Les tanins sont des substances de saveur astringente ayant la propriété de tanner la peau et de se combiner aux protéines animales par des liaisons hydrogènes [25]. Ce sont des composés polyphénoliques qui permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure [19]. Il existe des tanins galliques (dont le motif structural de base est l'acide gallique) et des tanins catéchiques (oligomères et polymères d'aglycones polyphénoliques) [21] [26]. Tous les organes végétaux peuvent en renfermer (racines, écorces, feuilles), mais on note une accumulation dans les organes âgés (écorces) [26]. Ils donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles [23]. Ils se trouvent dans le cytoplasme de la cellule végétale, ou concentrés dans des poches spéciales, tels que les vacuoles à tanin [27].

1.1.2.6. Anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments végétaux hydrosolubles de couleur rouge, violette ou bleue [23][28][29]. Ils sont issus de l'hydrolyse des anthocyanidines (dérivés polyphénoliques) [24]. Ces pigments sont très répandus

dans le règne végétal. Ils sont proches des flavonoïdes sur le plan de l'origine, de la structure et des propriétés pharmacologiques [30].

Ils diminuent la perméabilité des capillaires et augmentent leurs résistances. Ils ont aussi une action anti-œdémateuse. Ce sont aussi des colorants végétaux autorisés [31].

1.1.2.7. Huiles essentielles

Il s'agit de mélanges de composés lipophiles, volatiles et souvent liquides, extraits de la plante grâce à des procédés physiques. Les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante [22]. Elles sont largement utilisées en parfumerie. Les huiles essentielles sont des composés oxygénés, parfois d'origine terpénoïde et possédant un noyau aromatique. Les huiles essentielles ont de multiples propriétés [32][33][34][35].

1.1.2.8. Glucosides

Un glucoside est constitué de deux composantes, une partie aglycone et une partie de sucre. La partie aglycone comprend les métabolites secondaires tels que les coumarines, flavonoïdes, hydroxyanthracène. Les glucosides jouent un grand rôle dans le stockage des réserves nutritives et de défense de la plante. Le cyanure glycosides, (par exemple amygdalin de l'abricot), sort le cyanure hydrogène toxique quand les cellules sont endommagées et agissent comme un système de défense [36]. Les glucosides cardiaques comme la digitoxine, ont une action directe et puissante sur le cœur, ils l'aident à maintenir le rythme cardiaque en cas d'affaiblissement [23].

1.1.2.9. Coumarines

Pour la première fois, la coumarine fut isolée de la *fève tonka* (*Coumarouna odorata*) [37]. Ce sont des lactones issues de la cyclisation des acides *o*-hydroxy-Z-cinnamiques. Largement distribuées dans le règne végétal, elles sont surtout abondantes chez quelques familles, notamment les Apiaceae et les Rutaceae. Structuralement, elles peuvent être simples ou polycycliques [38]. Ils peuvent contribuer à fluidifier le sang, soigner les affections cutanées. Ce se sont de puissants vasodilatateurs [30].

1.1.2.10. Mucilages

Ce sont des polysaccharides qui forment de véritables mosaïques moléculaires. Cette structure chimique leur confère la propriété remarquable de gonfler au contact de l'eau avec la formation de masses plastiques ou de solutions visqueuses. Ils agissent par action mécanique d'où l'effet laxatif. Le mucilage forme une couche protectrice sur la muqueuse intestinale contre les substances irritantes [39][40]. Elle peut être utilisée pour protéger les tissus enflammés et calmer la douleur [19]. Un effet hypoglycémiant a été observé avec le fenugrec et le tamarin, éventuellement par ralentissement de la résorption des sucres induit par les mucilages [8].

1.1.2.11. Caroténoïdes

Ce sont des molécules tétraterpéniques, constituées de l'enchaînement de 8 unités isopréniques, possédant un chromophore caractéristique (au moins 10 doubles liaisons conjuguées) expliquant leur couleur jaune-orangée et leur sensibilité à l'oxydation. Les caroténoïdes sont employés en industrie agro-alimentaire principalement pour leur pouvoir colorant (safran : *Crocus sativus* L.) mais on peut aussi noter qu'ils sont préconisés en cas de photodermatose puisqu'ils interfèrent avec les processus de photo-oxydation [41].

1.2. Étude botanique de Laurier noble

Le laurier noble, ou laurier-sauce (*laurus nobilis* L.) est un arbuste ou un arbre de la famille des Lauraceae, à feuilles persistantes et coriaces [42]. Etymologiquement, le nom latin *laurus* signifiant « toujours vert » fait allusion au feuillage persistant de la plante et *nobilis* du latin « fameux » [43]. Son nom et aussi symbole du succès dans nos jours à travers le baccalauréat du latin « Bacca Lauri » soit baies de laurier [44].

1.2.1. Position systématique

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure QUEZEL et SANTA [45]. Synthétisée dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 : Classification botanique de *Laurus nobilis* L.

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

1.2.2. Origine et distribution de la plante

Originaire de l'Asie Mineure, mais, on le rencontre aujourd'hui dans l'ensemble des pays méditerranéens, dans l'ex-Yougoslavie ainsi qu'en Inde [23] [22] [46] [47].

Le laurier est aussi largement cultivé dans le Maghreb. Actuellement cette espèce, spontanée ou cultivée, est présente dans le sud et l'ouest de l'Europe, et aux Etats-Unis comme plante ornementale [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] [56] [57] [58] [59] [60]. Il est commun dans les ravins et les forêts humides tell Algérois et Constantinois [61].

1.2.3. Description botanique de la plante

Le laurier noble est un arbre généralement dioïque, de 2 à 10 m de hauteur .Les branches sont dirigées dressées, de couleur verte [51] [52] [62] [63] [64] [65] [66].

Les feuilles sont alternes, coriaces, persistantes, longues de 16 cm sur 8 cm large, atténuées en court pétiole, penninervées, entières et à bordures crénelées (Figure 1.1, 1.2 et 1.3) [61].

Les feuilles présentent une forme elliptique ou lancéolée. Elles dégagent une forte odeur aromatique lorsqu'on les froisse. C'est la conséquence de l'existence de grosses cellules sécrétrices éparses dans la mésophylle des limbes [67].

Les fleurs sont petites. Elles apparaissent en mars–avril. Elles sont de couleur 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 involucrées (Figure 1.1et 1.2) [23][61][67].

Le fruit est une baie globuleuse, d'un noir profond à maturité, atteignant 2 cm de diamètre, sa pulpe est verte, grasse et parfumée (Figure 1.3) [23].

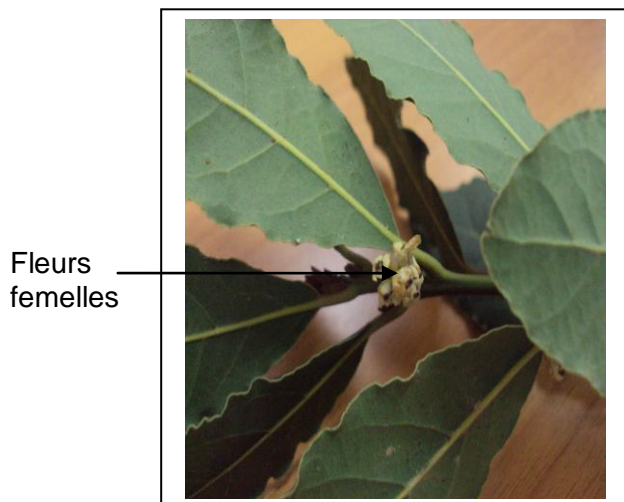


Figure 1.1: Branche florifère (Femelle) (Original)

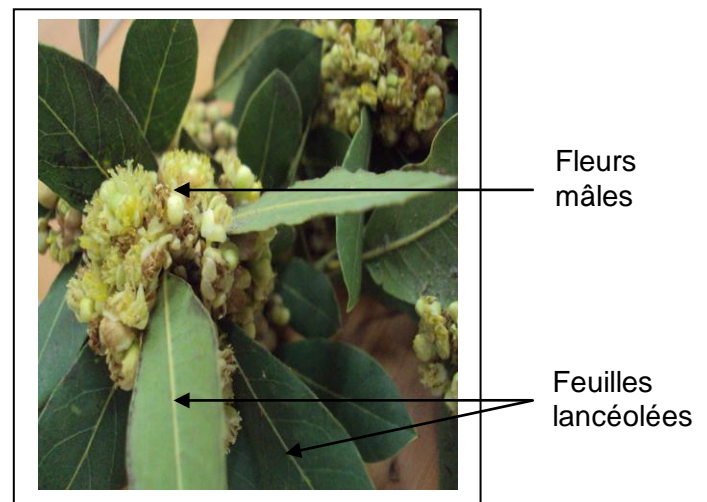


Figure 1.2: Branche florifère (Mâle) (Original)

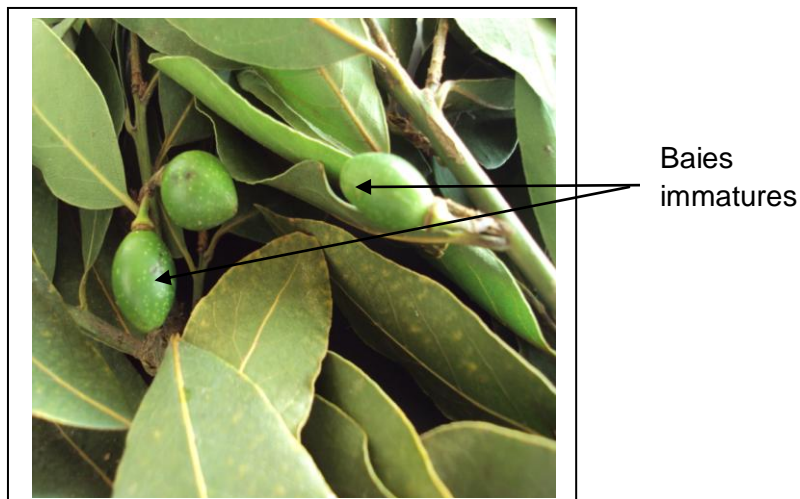


Figure 1.3 : Feuilles et baies de *Laurus nobilis* L. (Original)

1.2.4. 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. Les feuilles fournissent environ 10 à 30 ml /kg (1-3 %) d'huile essentielle par distillation [68].

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 [69].
- Les monoterpénols (18%) en majorité linalol. Ce sont des antibiotiques et immunostimulants.
- Les monoterpènes (23%) surtout pinènes et sabinènes, qui 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 [69].

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) [70], des alcaloïdes isoquinoléiques (réticuline, aporphinoïdes) [68] et des vitamines (α -tocophérol)[71].

1.2.5. Utilisation et vertus thérapeutiques 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 [72][73][65][74][75]. Cette plante a aussi des applications importantes en médecine traditionnelle et représente récemment un sujet de recherche scientifique intéressant [59][70][76][77][78][79][80][81][82][83][84][85][86][87][88][89][90][91]. Le laurier noble 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 [23].

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 [23] [92]. En outre, l'huile essentielle est utilisée par l'industrie cosmétique, et en parfumerie [48][51][52][58][61][73][93][94].

L'extrait aqueux est utilisé dans la médecine traditionnelle turque comme anti hémorroïdal, antirhumatismal, antidiabétique, diurétiques et pour le traitement du mal d'estomac [51][54][59][62][72][73][77][95][96][97][98][99][100]. Il peut être utilisé aussi comme antidote lors des morsures de serpent [70].

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) [91]

[101][102][103][104].

Dans la médecine traditionnelle iranienne, les feuilles de cette plante ont été utilisées pour traiter l'épilepsie et la maladie de Parkinson [105].

En Maroc, les feuilles sont prises oralement pour traiter le désordre du foie et pour l'hygiène dentaire [106].

La concrète et le beurre de laurier noble 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 végétal vétérinaire pour les affections de la peau et de la mamelle [107].

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 [108].

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 [109].

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 [110].

CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériels

2.1.1. Matériel biologique

2.1.1.1. Matériel végétal

Les feuilles de *Laurus nobilis* L. ont été récoltées au mois de mars 2014 dans la région montagneuse de Blida (Ben Ali). Les plantes évoluent spontanément sur le versant Nord-Ouest à une altitude d'environ 750 m, elles évoluent sous bois en situation ombragée. Une partie des feuilles fraîches est destinée pour l'extraction des composés aromatiques (HE et HY) alors que 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 entre solvant / échantillon. Ainsi, une meilleure infiltration du solvant au sein du matériel végétal permet une augmentation de l'extraction (solide-liquide).

2.1.1.2 Matériel animal

Les différentes analyses pharmaco-toxicologiques ont été effectuées sur des souris et des rats provenant de l'animalerie du CRD-SAIDAL d' El Harrach.

- Souris : L'animal utilisé est la souris NMRI (Naval Médical Research Institute, Bethesda, Maryland, USA). La souris blanche est la race albinos de la souris domestique *Mus musculus*. Nous avons utilisé durant notre expérimentation 300 souris (mâles et femelles), âgés de 4 à 6 semaines, dont le poids est de 20 ± 2 g chacune.

- Rats : Ce sont des rats de race *Wistar Albinos* d'élevage qui sont très utilisés par les laboratoires. Leur facilité d'élevage permet de les faire reproduire

en grand nombre. Nos tests ont porté sur 35 rats mâles, âgés d'environ 3 mois, d'un poids égal à 200 ± 2 g chacun.

2.1.1.3. Souches microbiennes

L'étude microbiologique a porté sur 35 souches (25 bactéries, 02 levures et 08 champignons), provenant du laboratoire de microbiologie du CRD-SAIDAL d'El Harrach.

2.2. Méthodes

✓ Site expérimental

Nos essais expérimentaux ont été réalisés au niveau des structures suivantes :

- Laboratoire de recherche Biotechnologies, Environnement et Santé, Faculté SNV, université Saad Dahlab de Blida1 ;
- Laboratoires des substances naturelles, microbiologie et de pharmacotoxicologie du CRD-SAIDAL d' El Harrach;
- Laboratoire d'analyse physico-chimique du biotique de groupe SAIDAL ;
- Laboratoire d'histologie de l'hôpital PARNET 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

Les étapes suivies pour l'identification de la plante sont comme suit :

2.2.1.1. Aspect macroscopique

Des spécimens de la plante récoltés ont été comparés à ceux archivés au niveau de l'herbier du jardin d'essai (forme et taille des feuilles et des fleurs, la disposition des feuilles sur la tige, type d'inflorescence, pigmentation de la corolle des fleurs).

Nous avons compté le nombre de pétales, de sépales et d'étamines. La forme des feuilles et celle des baies ont été observées

2.2.1.2. Aspect microscopique

Afin de localiser les sites sécréteurs d'HE, nous avons réalisé des coupes transversales sur la feuille et sur le pétiole au niveau du laboratoire d'histologie de l'hôpital PARNET du Bâche Djarah. L'étude histologique a été faite par la réalisation des coupes au microtome (LEICA RM 2125 RT) des fragments d'organes de *Laurus nobilis* inclus dans la paraffine [111][112] (Appendice D.1).

2.2.2. Extraction de la fraction aromatique de *Laurus nobilis*

2.2.2.1. Cinétique d'extraction

La cinétique se définit comme étant l'évolution du rendement en fonction du temps.

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

Les différentes étapes suivies pour la réalisation de la cinétique sont mentionnées dans l'Appendice D.2.

Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R \% = \frac{MHE \cdot 100}{MV}$$

R : rendement ;

MHE : masse de l'huile essentielle ;

MV : masse du végétal utilisé dans l'hydrodistillation.

2.2.2.2. Extraction par hydrodistillation

L'hydrodistillation du *Laurus nobilis* (feuilles fraîches) est réalisée à l'aide d'un dispositif de type Clevenger (Figure 2.1).

Les feuilles fraîches (200g) sont introduites dans un ballon de 3 litres rempli d'eau au 2/3, l'ensemble est porté à ébullition pendant 2 heures. 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 à l'aide d'un système de circuit fermé, la température se situe entre 12°C à 13°C. Ainsi, les vapeurs chargées d'huile essentielle, se condensent en liquide [113].

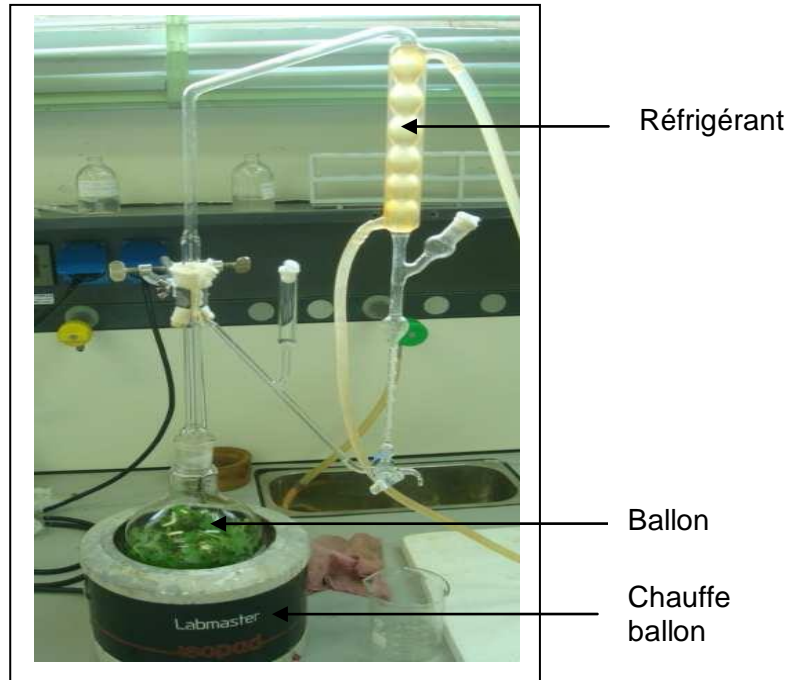


Figure 2.1 : Hydrodistillation de feuilles du *Laurus nobilis* (Dispositif Clevenger) (Original)

2.2.2.3. Isolation des huiles essentielles

Après deux heures 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.

2.2.2.4. Détermination du rendement en huile essentielle

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction et la masse végétale traitée [114].

$$R\% = \frac{MHE \cdot 100}{MV}$$

MHE : Masse d'huile essentielle récupérée(g);

MV : Masse de la matière végétale fraîche (g);

R : Rendement en huile essentielle (%).

2.2.2.5. Analyses physico-chimiques, organoleptiques et chromatographiques de la fraction aromatique (HE et HY)

Ces analyses nous permettent d'évaluer les propriétés organoleptiques et physicochimiques de la fraction aromatique. Elles sont effectuées selon les normes d'Afnor [115].

2.2.2.5.1. Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle et de l'hydrolat

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

2.2.2.5.2. 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 0.1 mol/l jusqu'au virage rose de la solution. Noter le volume du KOH.

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 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). Le volume d'HCL 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. Le volume de HCl correspond au V_0 .

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 hydro-éthanolique utilisé [94].

2.2.2.5.3. 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, on dispose 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.

2.2.2.5.4. 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.

2.2.2.6. Préparation des extraits de *Laurus nobilis*

2.2.2.6.1. Détermination du taux d'humidité

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.

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, rempli au 2/3 de son volume par du toluène (C_7H_8). 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 un temps 24 heures.

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

$$TH = \frac{V \cdot 100 \cdot 0,998}{M}$$

TH : Taux d'humidité ;

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

M : Masse végétale fraîche utilisée ;

0,998 : Densité de l'eau.

La teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10% [116].

2.2.2.6.2. Extrait aqueux

L'extrait aqueux (EAQ) est préparé en suivant la méthode décrite par LJUBUNCIC et ses collaborateurs [117], avec quelques modifications. Cet extrait est obtenu à partir de l'infusion de 10 g de poudre des feuilles dans 100 ml d'eau distillée sous agitation magnétique à 90°C pendant 20 mn à raison de 350 Tr/mn. Ensuite une filtration rapide sur compresses stériles, puis sur papier filtre a été effectuée. Le filtrat est placé dans l'étuve à 50°C et, conservé par la suite à - 4°C jusqu'à son utilisation (Appendice E.1).

2.2.2.6.3. Extrait méthanolique

L'extraction est réalisée selon la méthode de LAKIĆ et ses collaborateurs [118] avec modification, L'extrait méthanolique des feuilles de *Laurus nobilis* a été préparé à partir de la matière sèche finement broyée à l'aide d'un broyeur

électrique, 100 g de poudre de feuille sont macérés dans 1 litre de mélange méthanol/eau distillé (80/20) à l'ombre pendant 24 heures. Le macérât est par la suite filtré deux fois sur compresses stériles puis à travers le papier filtre. Une deuxième macération a été réalisée sur le sédiment en respectant les mêmes étapes que la première macération pendant 48 heures. Une troisième macération a été réalisée sur le deuxième sédiment de la même façon mais pendant 72 heures. Les filtrats sont recombinaés puis évaporés par un rota-vapeur à 35°C et les résidus finaux sont séchés dans une étuve à 45°C, jusqu'à l'obtention d'un extrait sous forme de poudre qui sera conservé à - 4°C jusqu'à son utilisation (Appendice E.2).

2.2.2.6.4. Calcul du rendement en extraits

Le rendement de la plante en extraits est le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de la plante à traiter [119].

Le rendement est exprimé en pourcentage est calculé comme suit :

$$R\% = PE/PA \times 100$$

Où

R: Rendement de l'extrait en pourcentage;

PE: Poids de l'extrait en gramme;

PA: Poids de la plante en gramme.

2.2.2.6.5. Etude phytochimique de *Laurus nobilis*

C'est une technique qui permet de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence ou l'absence des substances chimiques. Ils sont réalisés soit sur la poudre de *Laurus nobilis*, soit sur un infusé. Les résultats seront classés selon :

- Réaction franchement positive : + + +
- Réaction moyennement positive : + +
- Réaction positive : +

- Réaction difficile à interpréter : ±
- Réaction négative : - [120].

✓ Alcaloïdes

Introduire 1ml de filtrat dans un tube à essais, ajouter cinq gouttes de réactif de Dragendorff. En laissant reposer 10 minutes. En présence d'alcaloïde, le réactif de dragendorff, donne un précipité rouge-orange [121][122][123].

✓ tanins

Introduire dans un tube à essai 5 ml de l'infusé à 5%, ajouter goutte à goutte environ 1ml de solution aqueuse diluée de FeCl_3 à 1% : en présence des tanins, il se développe une coloration verdâtre (tanins catéchiques) ou bleu noirâtre (tanins galliques).

La différenciation des tanins (cathéchiques et galliques) est obtenue par la réaction de Stiasny (10 ml de formol + 5 ml d'acide chlorhydrique) : A 30ml d'infusé à 5%, ajouter 15 ml de réactif de Stiasny puis chauffer au bain -Marie à 90°C pendant 15 à 30 minutes dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux.

L'apparition d'un précipité montre la présence des tanins cathéchiques. Filtrer et saturer le filtrat avec 10 ml d'une solution d'acétate de sodium pulvérisée puis ajouter quelques gouttes de solution de FeCl_3 à 1% (1ml). Le développement d'une teinte bleu-noirâtre indique la présence des tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny [124].

✓ Flavonoïdes

- Anthocyanes

2 ml d'infusé sont ajoutés à 2 ml d'acide chlorhydrique 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes [125].

- Proanthocyanidols

À 2 ml d'infusé sont additionnés 2 ml d'acide chlorhydrique concentré, l'ensemble est chauffé durant cinq minutes dans un bain-Marie bouillant, l'apparition d'une coloration rouge indique une réaction positive [125].

- Réaction cyanhydrique (Cyanidine)

Dans un tube à essai, introduire 5 ml d'infusé et ajouter 5 ml d'alcool chlorhydrique (éthanol à 95%, eau distillée, HCl concentré à parties égales en volume) puis quelques copeaux de zinc ou de magnésium et 1 ml d'alcool isoamylique. L'apparition d'une coloration : rose orangée (flavones), rose violacé (flavonones) ou rouge (flavonols, flavanonols) rassemblé dans la couche surnageant d'alcool isoamylique indique la présence d'un flavonoïde libre (génine) [123].

- Leucoanthocyanes

Nous avons effectué la réaction à la cyanidine sans ajouter les copeaux de magnésium. On chauffe au bain-Marie pendant 15 mn. En présence de leucoanthocyanes, il se développe une coloration rouge cerise ou violacée. Les catéchols donnent une teinte brun-rouge [123].

- Anthraquinones libres (Réaction de Bornträger)

À 1g de poudre, ajouter 10 ml de chloroforme et chauffer pendant 3 mn sur bain-Marie. Filtrer à chaud et compléter à 10 ml avec le même solvant si nécessaire.

À une partie du résidu de la poudre épuisée par le chloroforme, ajouter 10 ml d'eau distillée et 1 ml d'acide chlorhydrique concentré. Ensuite maintenir le tube à essais dans un bain marie bouillant pendant 15 minutes. Refroidir le tube sous un courant d'eau et filtrer.

À 1 ml de l'extrait chloroformique obtenu, ajouter 1 ml de NH_4OH diluée puis agiter. Une coloration plus au moins rouge indique la présence d'antraquinones libres [120][125][126][127].

- Anthraquinones combinés

Sur la poudre précédemment épuisée par le dichlorométhane, ajouter 10 ml d'eau distillée et 1 ml de HCl, chauffer au bain marie pendant 15 mn puis filtrer. Prendre 5 ml de ce filtrat, extraire avec 5 ml de dichlorométhane. A la phase organique ajouter 1 ml de NH_4OH diluée à 25%. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence d'antraquinone sous la forme d'O-hétérosides [122].

- ✓ Hétérosides cardiotoniques (Réaction de Libermann Burchard)

Ajouter à 1g de poudre 10 ml d'éthanol à 60% et 5 ml d'acétate de plomb à 10%. Chauffer sur bain - Marie pendant 10 mn et filtrer. Agiter le filtrat avec 10ml de chloroforme sans formation d'émulsion. Laisser décanter. Puis soutirer la phase chloroformique et évaporer à sec. Reprendre le résidu avec 2 ml d'isopropanol.

A 1 ml de l'extrait, ajouter 1/5 du volume d'anhydride acétique, puis, goutte à goutte de l'acide sulfurique concentré : il se développe d'abord une coloration rouge, ensuite bleue et enfin verte. La réaction de Liebermann est caractéristique pour les substances dérivées de la bufanolide [116].

- ✓ stérols et terpènes (Réaction de Liebermann-Buchard)

Introduire dans un tube à essais 1 g de poudre et 20 ml d'éther. Boucher, agiter et laisser en contact pendant 24 heures. Après ce temps, filtrer et compléter à 20 ml avec de l'éther.

Évaporer à sec dans une capsule 10 ml d'extrait. Dissoudre le résidu obtenu dans 1 ml d'anhydride acétique avec 1 ml de chloroforme et recueillir la solution dans un tube à essais. Ajouter 1 à 2 ml d'acide sulfurique concentré au fond du tube à essais à l'aide d'une pipette et ne pas agiter. La formation d'un anneau

rouge-brunâtre ou violet à la zone de deux liquides et la coloration verte ou violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérols et de triterpènes [124].

✓ Caroténoïdes (Carr et Price)

Après évaporation jusqu'à sec de 5 ml d'extrait méthanolique, ajouter 2 à 3 gouttes d'une solution saturée de trichlorure d'antimoine dans du chloroforme ou dans du tétrachlorure de carbone (CCl_4). Il se développe en présence de caroténoïdes une coloration bleue devenant rouge par la suite [120][128].

✓ Stéroïdes (Test de Salkowski)

5 gouttes de H_2SO_4 concentré sont ajoutées à 1 ml d'extrait, l'observation d'une coloration rouge dans l'extrait indique la présence de stéroïdes.

✓ Sennosides

Dans une fiole conique introduire 2,5 g de poudre ; puis ajouter 50 ml d'eau distillée et 2 ml d'acide chlorhydrique concentré, chauffer dans un bain-Marie pendant 15 mn, laissez refroidir et agiter avec 40 ml d'éther, séparer la couche étherée puis évaporer.

Au résidu refroidi, ajouter 5 ml d'ammoniaque diluée (1/2). Il se développe une coloration jaune ou orange en présence de sennosides. Chauffer au bain-Marie pendant 2 mn, il se développe une coloration violette rouge en présence de sennosides.

✓ Saponosides (Test de mousse)

Dans un tube à essai un ml d'infusé est agité vigoureusement pendant 2 mn. L'observation de mousse indique la présence de saponosides dans l'infusé [122].

✓ Glucosides (Réaction à l'acide sulfurique)

Mettre deux gouttes de l'acide sulfurique concentré sur une masse de la poudre végétale. En présence des glucosides. La masse se colore en rouge brique, puis en violet [116].

✓ Mucilage

On introduit 1 ml du décocté à 10 % dans un tube à essai et on ajoute 5 ml d'éthanol absolu. Après une dizaine de minutes, l'obtention d'un précipité floconneux par mélange, indique la présence de mucilages [120][123][128].

✓ Coumarines

On fait bouillir 2 g de poudre végétale dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 min dans un bain marie, après refroidissement on filtre. On prend 5 ml du filtrat auquel on ajoute 10 gouttes de KOH 10 % et quelques gouttes d'HCl 10 %, l'apparition d'un trouble indique la présence des coumarines [129].

2.2.2.6.6. Dosage des poly phénols et des flavonoïdes

2.2.2.6.6.1. Dosage des polyphénols

La teneur en composés phénoliques des différents extraits de *Laurus nobilis* a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu [130][131][132] basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) du réactif de Folin-Ciocalteu par les groupement oxydables des composés polyphénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleu. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon [133]. Brièvement, 500 µl du réactif Folin-Ciocalteu sont ajoutés à 100 µl d'extrait avec des concentrations bien déterminées. Quatre minutes après, 400 µl de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) d'une concentration de 75 mg/ml sont additionnées au mélange réactionnel. Après incubation de 2 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue à 765 nm.

La courbe d'étalonnage est réalisée par l'acide gallique (0-160 µg/ml). Les concentrations des composés phénoliques sont déterminées à partir de la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimées en µg équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µg EAG/ mg).

2.2.2.6.6.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans l'extrait de *Laurus nobilis* [134][135][136]. 500 µl de chaque extrait à analyser sont ajoutés à 1500 µl de méthanol à 95 %, 100 µl de AlCl₃ à 10 % (m/v), 100 µl d'acétate de sodium 1 M et 2,8 ml d'eau distillée. Le mélange est agité puis incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min. Le blanc est réalisé par remplacement de l'extrait par du méthanol à 95 % et l'absorbance est mesurée à 415 nm en utilisant un spectrophotomètre UV. Les résultats sont exprimés en µg équivalent quercétine/mg d'extrait en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine.

2.2.2.7. Etude de l'activité antimicrobienne

- Souches microbiennes étudiées

Les germes qui ont été testés pour déceler l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* sont les suivants :

- Onze souches de collections internationale ATCC (American Type Culture Collection) : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Escherichia coli* ATCC 4157, *Entérocooccus faecium* ATCC 6569, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Entérocooccus faecalis* ATCC 29212, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Proteus mirabilis* ATCC 49452, *Listera monocytogenes* ATCC 15313, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525.
- Quatorze souches cliniques isolées de patients hospitalisés ont été conservées jusqu'à leurs utilisation lors de notre expérimentation (au centre hospitalier universitaire Mustapha Pacha): *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Lactobacillus* sp., *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella oxytoca*, *Providencia alcalifaciens*, *Salmonella* sp., *Serratia marcescens*, *Shigelle* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*.

- Nous avons utilisé deux levures de références à savoir *Candida albicans* ATCC 24433, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601.
- Huit souches fongiques utilisées appartiennent à trois genres de moisissures : *Fusarium moniliforme* ATCC 52539, *Fusarium sporotrichoides* VTT D-72014, *Fusarium oxysporum* MNHN 963917, *Penicillium expansum* ATCC 24692, *Penicillium digitatum* PHI26, *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992, *Aspergillus flavus* MNHN 994294, *Aspergillus niger* ATCC 16404,

Ils nous ont tous été fournis par le laboratoire de microbiologie du CRD-SAIDAL d'El Harrach.

- Milieux de cultures et produits actifs

Trois milieux de culture ont été utilisés :

- Muller-Hinton pour les bactéries ;
- Sabouraud pour les levures ;
- Potato-Dextrose-Agar (PDA) pour les champignons.

2.2.2.7.1. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne (aromatogramme)

La technique d'aromatogramme 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 uniformément ensemencée avec une suspension de la souche 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 [137][138][101]. 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 Saidal. Elle a été aussi utilisée par certains auteurs [139][140][141][142][143][144][145][146][147].

Le protocole expérimental suivi pour la réalisation de la méthode de l'aromatogramme est mentionné dans l'Appendice D.3.

2.2.2.7.2. Etude quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE

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.

2.2.2.7.2.1. Détermination des CMI

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 [148], puis inoculer ce milieu avec les souches testées. Ces différentes dilutions nous permettent de définir la plus faible concentration qui inhibera la croissance microbienne [149].

Le protocole expérimental suivi pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) est mentionné dans l'Appendice D.4.

2.2.2.7.2.2. 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.

Le protocole expérimental suivi pour déterminer les concentrations minimales bactéricides (CMB) et les concentrations minimales fongicides (CMF) des souches testées est mentionné dans l'Appendice D.5.

2.2.2.7.3. Étude *in vitro* de l'activité antifongique de l'HE (Méthode de contact direct)

L'évaluation de l'activité de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* sur la croissance mycélienne des huit souches de champignons a été entreprise en utilisant la technique de contact direct [150], avec de légères modifications. Cette méthode repose sur l'étude de l'effet de l'incorporation de différentes concentrations de l'huile essentielle dans le milieu de culture sur la croissance des souches fongiques.

Du fait de la non miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc aux milieux de culture, une mise en émulsion de ces huiles a été réalisée par le Tween 80, afin d'obtenir dans le milieu une répartition homogène des composés à l'état dispersé [151].

Une série de dilutions des huiles essentielles a été préparée pour obtenir les concentrations finales 0 (témoin), 0.03, 0.625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 et 2 %. Ainsi, 20 ml de la solution a été coulée, sous agitation magnétique, dans les boîtes de Pétri. Un disque de 6 mm de diamètre de culture jeune de 7 jours de chaque champignon (10^5 spores /ml) a été déposé au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu de culture et les différentes concentrations en huile essentielle. L'incubation a été effectuée à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 7 jours. Le diamètre de disque imprégné des champignons a étudiés reflète la croissance mycélienne du champignon pendant les 7 jours d'incubation [152][153][154][155].

En effet, le pourcentage d'inhibition (PI) a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{PI} = (D_0 - D_1) / D_0 \times 100$$

D_0 : Diamètre moyen de 3 répétitions de la croissance mycélienne estimée du champignon testé sur milieu témoin (mm) ;

D_1 : Diamètre moyen de 3 répétitions de la croissance mycélienne de boîte traitées avec l'une des concentrations de l'huile essentielle (mm).

L'étude de la nature de l'inhibition de l'huile essentielle a été réalisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). La distinction entre la concentration minimale fongistatique (CMF) et la concentration minimale fongicide ou létale (CML) est déterminée par le transfert des disques mycéliens à partir des boîtes de Pétri, où l'inhibition par l'huile est complète dans la technique utilisée, dans un nouveau milieu PDA dépourvu de cette huile. Il est fongistatique si la croissance du champignon reprend à nouveau et fongicide ou létale s'il n'y a pas de croissance [156].

2.2.2.8. Évaluation de l'activité antioxydante

La mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits de *Laurus nobilis* testé a été réalisée par trois méthodes: le piégeage du radical libre DPPH, le test de blanchiment de β -carotène et la réduction du fer.

2.2.2.8.1. Effet scavenger du radical DPPH

Le DPPH (2,2 -diphényl -1- picrylhydrazyl) est un radical libre stable possédant un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Cette délocalisation empêche la polymérisation du composé, qui reste sous forme monomère relativement stable à température ambiante. Ainsi, cet état induit l'apparition d'une couleur violet foncée bien caractéristique de la solution DPPH.

Cette couleur disparaît en présence d'antioxydant lorsque le DPPH est réduit, passant au jaune pâle du groupe pécryl, et l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [157]. Le suivi de la délocalisation est réalisé par spectrophotométrie à 517 nm [158][159][160].

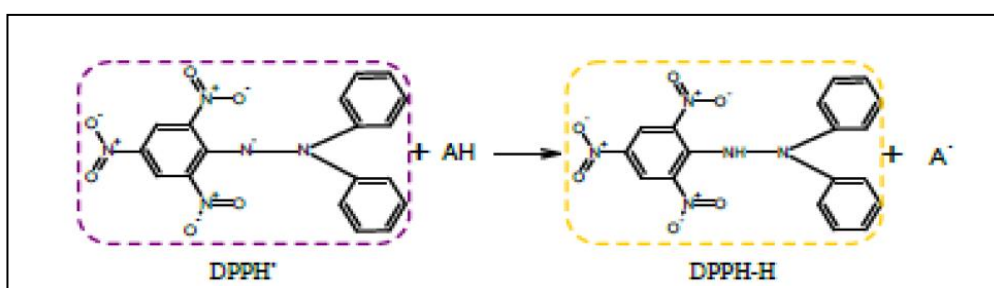


Figure 2.2: Mécanisme réactionnel du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)

Mode opératoire

Le test utilisant le DPPH a été réalisé en suivant la méthode décrite par BURITS et BUCAR [161], CUENDET et *al.*, [162] où 25 µl de chacune des dilutions des d'extraits ou témoins positifs testés sont mélangés dans la cellule placée dans la cuvette du spectrophotomètre avec 975 µl d'une solution méthanolique 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 BHT, Rutine, Tocophérol et Quercétine ont été utilisés comme témoins positifs. L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée de la manière suivante :

$$I \% = (A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}}$$

Où:

A_{blanc} : Absorbance du témoin DDPH au temps zéro avant l'addition de l'échantillon testés ;

$A_{\text{éch}}$: Absorbance de l'échantillon testé après 30 mn.

Les concentrations en extraits testés et en témoins positifs, en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, ont été tracées à la fin de la réaction afin d'obtenir le paramètre IC50. L'IC50 est définie comme étant la concentration d'extrait nécessaire pour piéger 50% des radicaux DPPH• [163][164]. Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures ± écart-type.

2.2.2.8 2. Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

La méthode est basée sur la réaction de la réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe^{2+} , la réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}). L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm.

Mode opératoire

Le protocole expérimental utilisé est celui de OYAIZU [165], où 0.125 ml de l'échantillon à différentes concentrations, est mélangé avec 2.5 ml d'une solution tampon phosphate à 0.2 M (pH= 6.6) et 2.5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé à 50°C pendant 30 min, puis refroidi à la température ambiante. Ensuite, 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 1500 tr/mn pendant 10 min. On récupère 2.5 ml du surnageant qui sont ajoutés à 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml d'une solution de chlorure de fer ($FeCl_3, 6H_2O$) à 0.1%. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'augmentation indique une augmentation du pouvoir réducteur. Le test a été répété 3 fois pour chaque échantillon étudié.

Le BHT, Tocophérol et acide ascorbique ont été utilisés comme témoins positifs.

2.2.2.8.3. Test de blanchissement du β -carotène

L'activité antioxydante des extraits de *Laurus nobilis* est mesurée selon la méthode de KARTAL et *al.*, [166], TEPE et *al.*, [167]. L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrométrie à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement de β -carotène. Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

Mode opératoire

Dans ce test, la capacité antioxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par KARTAL et *al.*, [166]. L'émulsion de β -carotène /acide linoléique est préparée par

solubilisation de 0,5 mg de β carotène dans 1 ml du chloroforme, 25 μ l de l'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 sont additionnés. Le chloroforme est complètement évaporé au rotavapeur, par la suite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés. L'émulsion résultante est agitée vigoureusement. On prend 350 μ L de solution d'extraits ou témoin positif (BHT) qu'on solubilise dans du méthanol (2 mg/ml) auxquels on additionne 2,5 ml de l'émulsion précédente.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant (contrôle négatif dans lequel l'échantillon est remplacé par 350 μ l de méthanol) est suivie par une lecture à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures. L'activité antioxydante relative des extraits (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AAR} = [\text{Abs}_{48\text{h}} (\text{échantillon}) / \text{Abs}_{48\text{h}}(\text{BHT})] \times 100$$

2.2.2.9. Etude de la toxicité aiguë

Afin d'éviter tout éventuel risque de toxicité lors des tests biologiques, il était nécessaire de réaliser des essais de toxicité, pour cela on a administré aux souris mâles et femelles différentes concentrations des extraits de *Laurus nobilis* solubilisé dans l'eau physiologique, et il est impératif d'ajouter un lot témoin auquel on administre l'eau physiologique.

- Administration

L'administration de différentes concentrations des extraits de *Laurus nobilis*, solubilisé dans l'eau physiologique à raison de 0,03 ml/Kg de poids corporel de souris soit 0,6 ml pour les souris de 20 grammes, ont été effectuée par gavage orale à l'aide d'une sonde de gavage. Les souris utilisées ont initialement été soumises à un jeun hydrique de 16 heures, puis elles ont été pesées et réparties en cinq groupes de dix souris (5 mâles et 5 femelles) [168][169].

Les groupes ont été traités comme suit :

- Groupe 1: (2 lot témoin) : 0,6 ml d'eau physiologique/souris;
 - Groupe 2: 7 lots, l'huile essentielle est administrée par voie orale à des doses croissantes de 50,100, 200, 500,1000, 2000 et 5000 mg/kg de poids corporel;
 - Groupe 3: 7 lots administré par voie orale d'hydrolat à des doses croissantes de 50,100, 200, 500,1000, 2000 et 5000 mg/kg de poids corporel;
 - Groupe 4: 7 lots administré par voie orale d'extrait méthanolique à des doses croissantes de 50,100, 200, 500,1000, 2000 et 5000 mg/kg de poids corporel;
 - Groupe 5: 7 lots administré par voie orale d'extrait aqueux à des doses croissantes de 50,100, 200, 500,1000, 2000 et 5000 mg/kg de poids corporel.
- Observation

Après l'administration de l'extrait, les souris sont surveillées en permanence pendant deux heures avec prise de notes sur les signes de toxicité apparents. Pour le reste de la période de l'expérience (14 jours), les souris sont surveillées quotidiennement pour signaler s'il y a eu des morts ou des changements dans l'alimentation et la consommation d'eau ou encore des signes comportementaux ou cliniques supplémentaires de toxicité.

Les principaux signes recherchés sont :

- Contraction abdominale ;
- Activité : démarche anormale, activité réduite;
- Respiration : changement de rythme ;
- Convulsion ;
- Diarrhée ;
- Coma.

A la fin de l'étude, toutes les souris vivant sont sacrifiées. Le nombre de souris décédées est exprimé en pourcentage.

- Expression des résultats

Les paramètres de toxicité évalués au cours de notre étude étant :

La dose maximale tolérée (DMT), elle représente la dose maximale qui ne tue aucun animal lorsque l'extrait est administré.

La dose létale 100% (DL100) est la première dose qui entraîne la mort de 100% de l'effectif des souris du lot.

La dose médiane DL50 d'un extrait est égale à la dose qui entraîne la mort de 50% de l'effectif des souris d'un lot.

La DL50 est déterminée par la méthode arithmétique de BEHRENS et KARBER [170] et par l'équation de DRAGSTEDT et LANG [171].

La méthode de BEHRENS et KARBER se calcule comme suit :

$$DL50 = DL100 - (\sum (a \times b)/n)$$

DL50 = Dose donnant 50 % de morts ;

DL100 = Dose donnant 100 % de morts ;

a = moyenne des morts entre deux doses successives ;

b = différence entre deux doses successives ;

n = nombre d'animaux utilisés par lot.

La méthode de DRAGSTEDT et LANG en utilisant la formule suivante :

$$DL50 = (50 (X_2 - X_1) + X_1 Y_2 - X_2 Y_1) / (Y_2 - Y_1)$$

Y_1 : Pourcentage de mortalité correspondant à X_1 ;

Y_2 : Pourcentage de mortalité correspondant à X_2 ;

X_1 : dose inférieure encadrant la DL50 ;

X_2 : dose supérieure encadrant la DL50.

La valeur de la DL50 permet de classer les extraits étudiés sur l'échelle de toxicité proposée en 1980 par HODGE et STERNER chez le rat ou la souris [172]:

- Extrêmement toxique : DL50 < 1 mg/kg de poids corporel ;
- Très toxique : DL50 de 1 à 50 mg/kg de poids corporel;
- Moyennement toxique : DL50 de 50 à 500 mg/g de poids corporel;
- Faiblement toxique : DL50 de 500 à 5000 mg/kg de poids corporel ;
- Pratiquement non toxique : DL50 de 5000 à 15000 mg/kg de poids corporel ;
- Relativement sans danger: DL50 > 15000 mg/kg de poids corporel.

2.2.2.10. Évaluation de l'effet antidiabétique

2.2.2.10.1. Induction du diabète expérimentale

Chez les rats mâles *Wistar albinos* maintenus à jeun pendant une nuit, le diabète est induit par une injection intrapéritonéale unique d'une solution de streptozotocine à raison de 60 mg/kg poids corporels [173]. Le STZ a été préparé juste avant l'administration dans une solution physiologique (NaCl 0.9%) pour avoir la concentration injectée décrite (60 mg/kg). Les six rats témoins subissent également une injection unique d'eau physiologique afin de rester dans les mêmes conditions d'expérimentation. Deux jours après l'injection, la glycémie est mesurée à jeun à l'aide d'un glucomètre [174].

Les rats qui ont montré une glycémie supérieure à 200 mg/dl ont été déclarés diabétiques et ont ainsi été sélectionnés pour le protocole expérimental [175][176][177].

Après l'installation du diabète chez les rats, ces derniers sont repartis en sept lots de cinq rats comme suit :

Lot 1: Groupe témoin sain (TS), reçoit 10 ml/kg d'eau physiologique 0.9% per os, et une fois par jour pendant 3 semaines.

Lot 2: Groupe diabétique (TDNT: témoin négatif), reçoit 10 ml/kg d'eau physiologique 0.9% per os, et une fois par jour pendant 3 semaines.

Lot 3: Groupe diabétique traité (TDTM: témoin positif), reçoit 500 mg/kg de Metformine per os, et une fois par jour pendant 3 semaines.

Lot 4: Groupe diabétique traité (DHE), reçoit 50 mg/kg de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* per os, et une fois par jour pendant 3 semaines.

Lot 5: Groupe diabétique traité (DHY), reçoit 250 mg/kg l'hydrolat de *Laurus nobilis* per os, et une fois par jour pendant 3 semaines.

Lot 6: Groupe diabétique traité (DEM), reçoit 250 mg/kg de l'extrait méthanolique de *Laurus nobilis* per os, et une fois par jour pendant 3 semaines.

Lot 7: Groupe diabétique traité (DEA), reçoit 250 mg/kg de l'extrait aqueux de *Laurus nobilis* per os, et une fois par jour pendant 3 semaines.

Les lots sont traités pendant 3 semaines en seule prise journalière. Le traitement se fait par un gavage intra gastrique [178].

2.2.2.10.2. Evolution du poids des rats

Le poids des rats mâles des différents lots est contrôlé dès le premier jour du traitement, hebdomadairement jusqu'à la fin du traitement. Il est impératif d'ajuster les doses de traitement pour les lots chaque semaine selon le changement du poids afin de maintenir la même dose par Kilogramme du poids corporel.

2.2.1.10.3. Prélèvement du sang

Les animaux ont été anesthésiés avec un coton imbibé d'éther di éthyle, puis environ 2 ml de sang ont été prélevés pour chaque animal au niveau de la veine rétro orbitale à l'aide d'un tube capillaire. Le sang prélevé a été recueilli dans des tubes étiquetés de 4 ml contenant un anticoagulant. Les tubes contenant l'EDTA sont centrifugés pendant 5 minutes à 3500 /mn et puis, à l'aide d'une pipette pasteur, le plasma est délicatement prélevé et introduit dans des tubes Eppendorfs préalablement étiquetés. Le plasma ainsi obtenu est conservé dans un congélateur à -20°C jusqu'à son utilisation, on l'occurrence l'analyse des paramètres biochimiques.

2.2.2.10.4. Examens biochimiques

Les analyses biochimiques sont effectuées suivant des méthodes enzymatiques et/ou colorimétriques par un auto-analyseur de type (Technicon RA 1000). Les paramètres dosés sont : le glucose, le cholestérol total et les triglycérides.

2.2.2.11. Analyse 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 20 (Armonk, NY: IBM Corp). L'analyse de la variance est suivie par le test 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 RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Étude botanique de la plante

Une observation macroscopique et microscopique, nous ont permis de décrire les organes et de localiser les sites sécréteurs de la plante étudiée.

3.1.1. Étude macroscopique

3.1.1.1. Feuilles

Elles sont simples, alternes, avec un pétiole mesurant de 2 à 5 cm, longues de 5 à 12 cm et larges de 2 à 6 cm. Elles sont lancéolées, allongées ou en ellipses étroites, aiguës ou légèrement acuminées à l'extrémité supérieure et sont resserrées en coin à la base et légèrement entaillées et ondulées en bordures.

Les feuilles adultes sont coriaces, les plus juvéniles sont duveteuses (Figures 3.1 3.2 et 3.3).

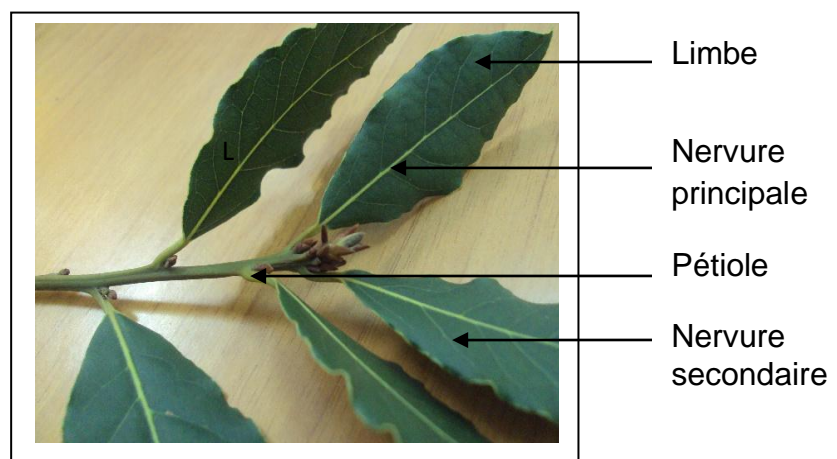


Figure 3.1 : Feuilles adultes (Original)

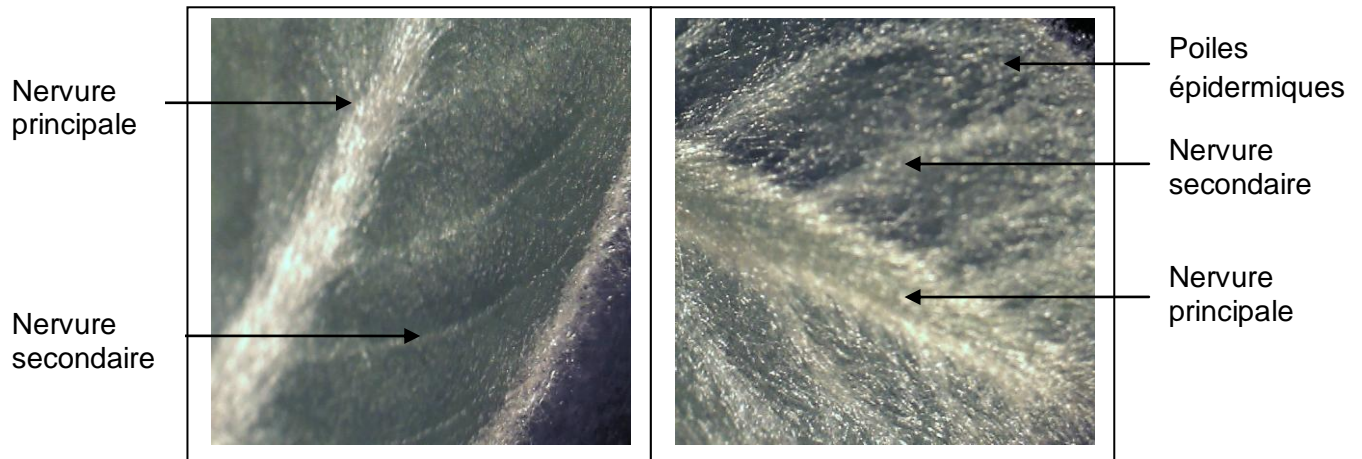


Figure 3.2: Face inférieure d'une feuille juvénile (Loupe Gx4.5) (Original)

Figure 3.3: Face supérieure d'une feuille juvénile (Loupe Gx4.5) (Original)

3.1.1.2. Fleurs

Les fleurs sont petites odorantes en forme d'étoile. A fin du printemps, elles sont de couleurs blanchâtres à jaunes. Les fleurs sont groupées à l'aisselle des feuilles en petits bouquets en forme d'ombelles axillaires ou en courts panicules. Elles sont enfermées dans un involucre formé de bractées caduques à 4 dents (lobes).

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 3.5;3.6).

Les fleurs femelles vertes blanchâtres, portent 4 staminodes (étamines stériles), un ovaire courtement pétiolé, divisé en 3 loges et un stigmate court et émoussé (Figures 3.4 ; 3.7).

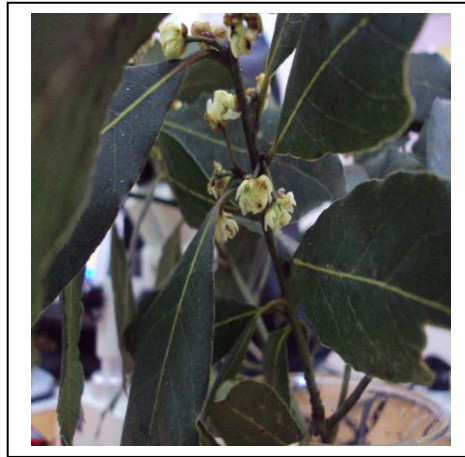


Figure 3.4 : Fleurs femelles
(Original)



Figure 3.5 : Fleurs mâles
(Original)

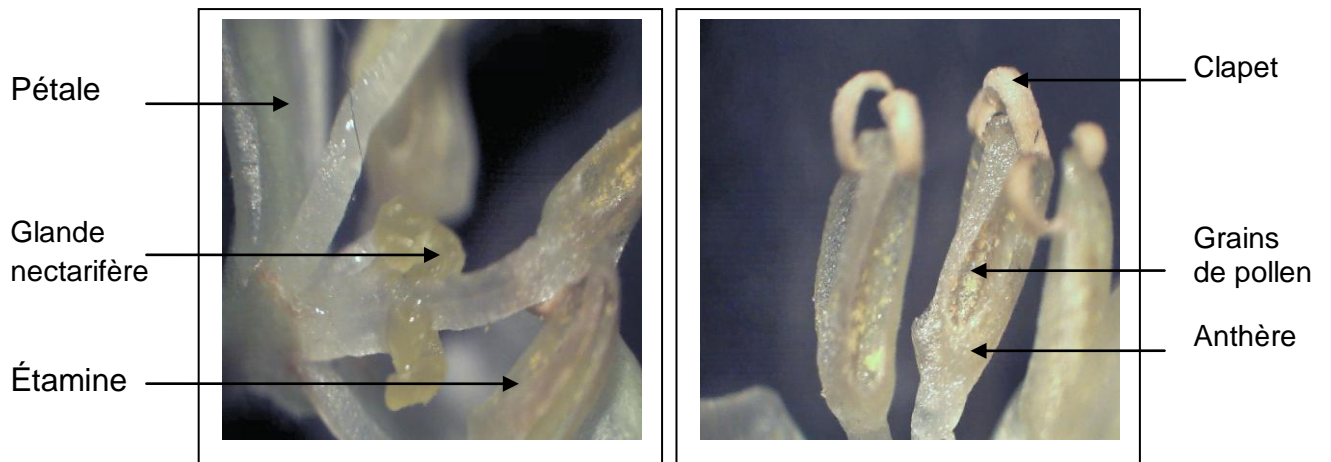


Figure 3.6 : Fleurs mâles (loupe Gx4.5) (Original)

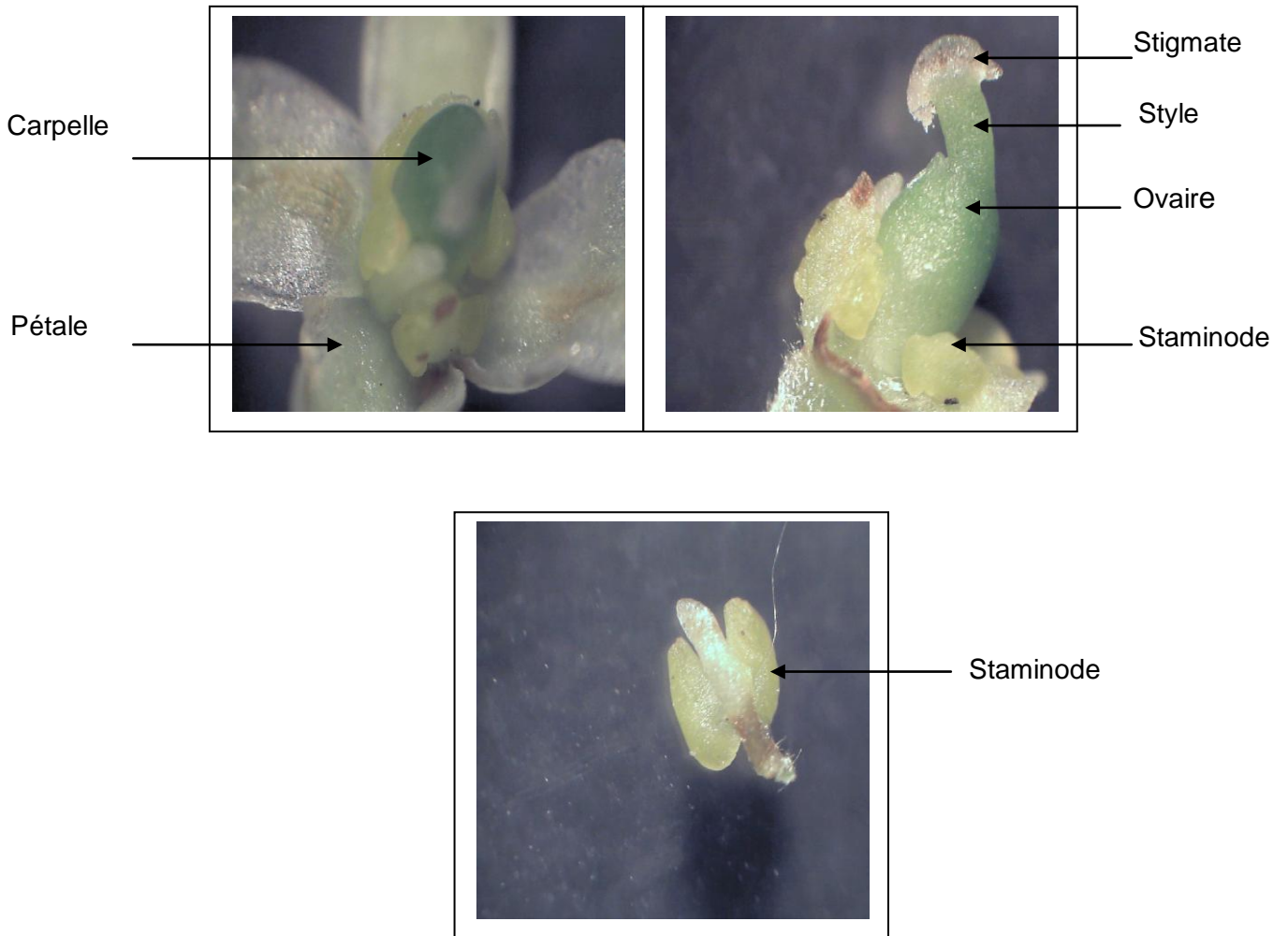


Figure 3.7 : Fleurs femelles (loupe Gx4.5) (Original)

3.1.1.3. Fruits

Les fruits ou baies de *laurus nobilis* (baies globuleuses, drupes aromatiques charnues) ayant une forme ovale ou ellipsoïde. Les fruits sont de couleur vert et violet au noir profond à maturité (septembre). Les fruits secs sont drupacés, ovoïdes, d'environ 15 mm à 2 cm de long et 10 mm de large. La surface extérieure est glabre, brillante et presque noir. Elle est grossièrement ridée en raison de la contraction de la région étroite succulente sous l'épiderme. De l'extérieur vers l'intérieur, le fruit est constitué par le péricarpe, le mésocarpe, l'endocarpe (Figure 3.8).

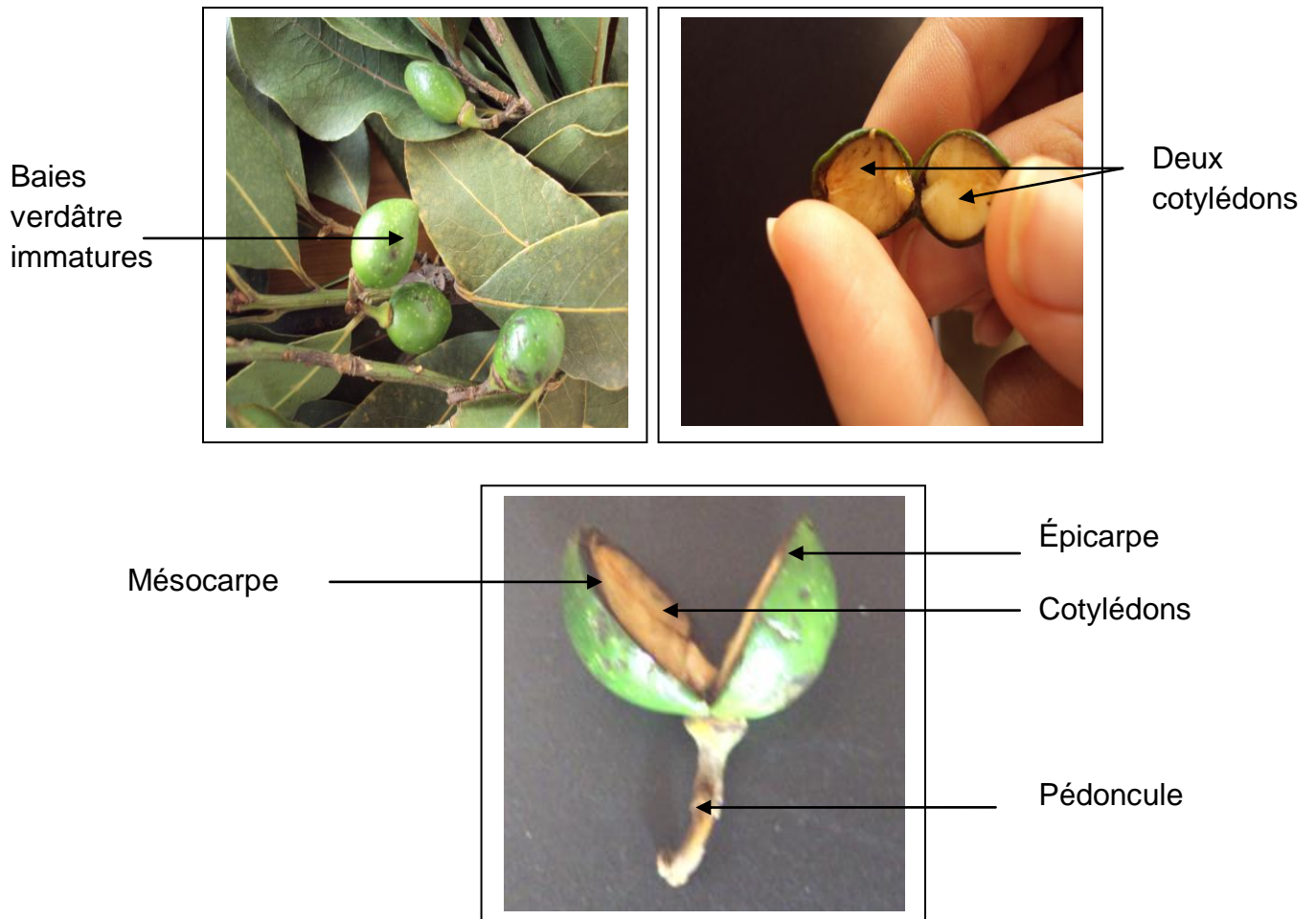


Figure 3.8: Baie de *Laurus nobilis* (Original)

3.1.2. Étude microscopique

Afin de localiser les structures sécrétrices à l'intérieur des tissus végétaux, nous avons effectué des coupes transversales au niveau du limbe des feuilles et des pétioles.

3.1.2.1. Feuille

Les structures du limbe foliaire sont recouvertes d'un épiderme supérieur et inférieur qui entoure un mésophyle hétérogène. Ce dernier est constitué par deux types de parenchyme chlorophyllien.

- Parenchyme palissadique dont les cellules sont rectangulaires juxtaposés les unes contre les autres. Elles sont très riches en chloroplastes. Le rôle essentiel de ces cellules est la photosynthèse. Entre ces cellules on

observe des poches entourées par des cellules sécrétrices. Celles-ci stockent les huiles essentielles de *Laurus nobilis* (Figures 3.9 et 3.10).

- Parenchyme lacuneux dont les cellules sont petites et arrondies. Elles laissent des lacunes entre elles qui sont en relation directe avec les stomates. Le rôle de ce parenchyme est doublé, car il assure la photosynthèse et les échanges. Aucune structure sécrétrice n'est observée dans ce tissu (Figures 3.9).

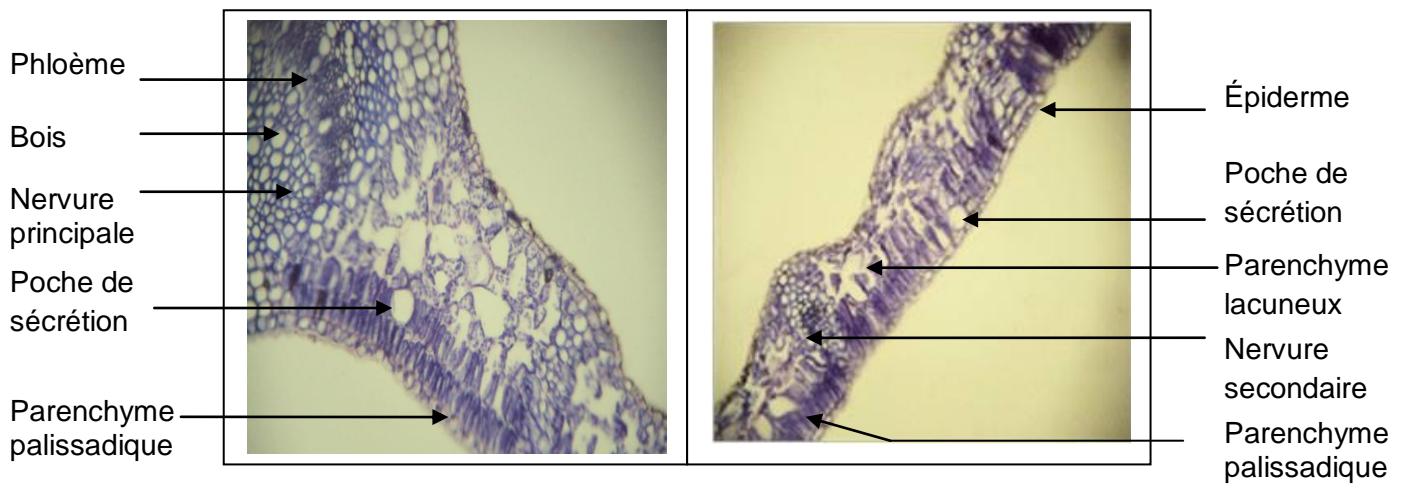


Figure 3.9 : Coupe transversale d'une portion de limbe de feuille de *Laurus nobilis* (MP Gx40) (Original)

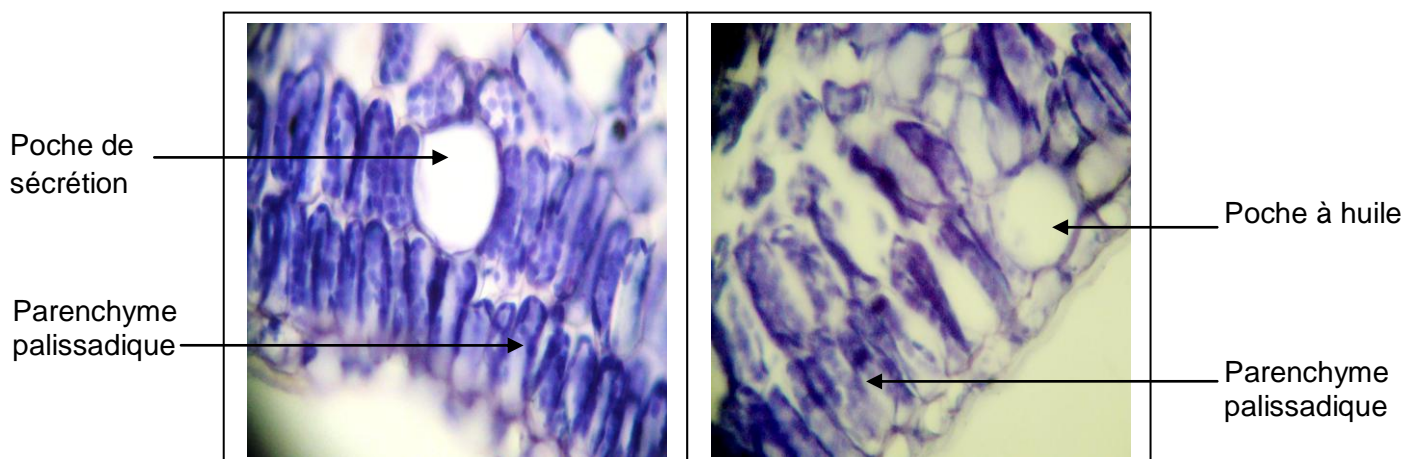


Figure 3.10 : Mise en évidence de la structure sécrétrice dans le limbe de feuille de *Laurus nobilis* (MP Gx100) (Origina)

3.1.2.2. Pétiole

La structure anatomique du pétiole est marquée par l'existence d'un plan de symétrie. Les faisceaux conducteurs libéro-ligneux y sont ordinairement disposés en un arc de cercle dont la concavité est tournée vers la face supérieure de la feuille (Figure 3.11). Dans le parenchyme cortical, nous observons des poches entourées de cellules sécrétrices (Figure 3.12).

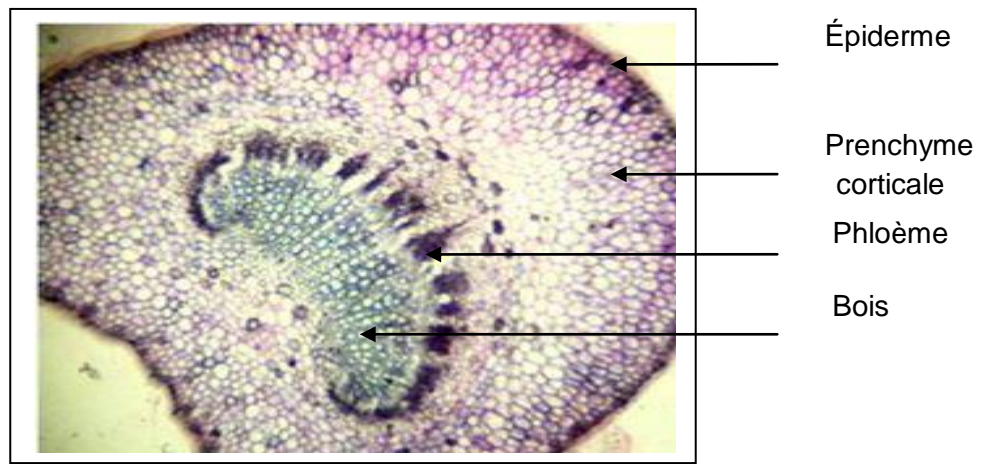


Figure 3.11 : Coupe transversale du pétiole de *Laurus nobilis* (MP Gx40) (Original)

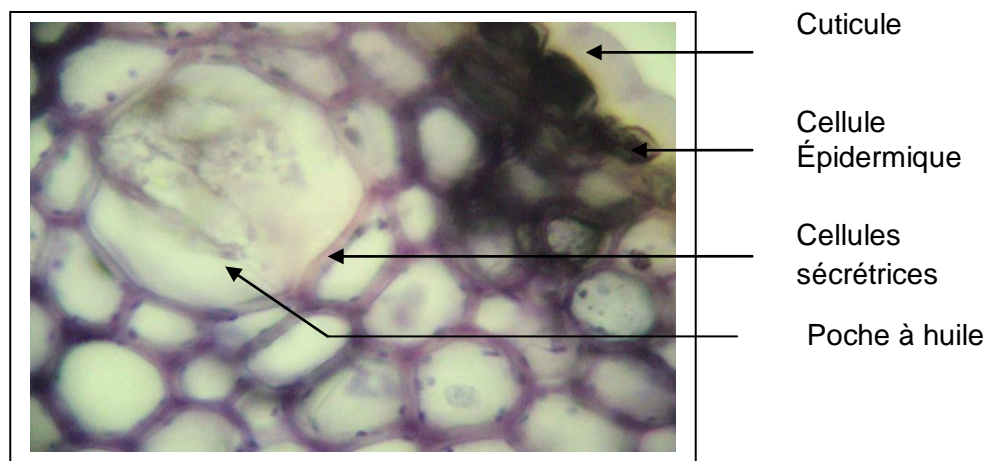


Figure 3.12 : Mise en évidence de la structure sécrétrice dans le pétiole de *Laurus nobilis* (MP Gx100) (Original)

Les observations des coupes réalisées au microscope photonique , nous ont permis de visualiser les différents tissus foliaires et de localiser avec précision les structures sécrétrices caractéristiques des feuilles et des pétioles de *Laurus nobilis*. Au terme de cette étude, nous pouvons dire que *Laurus nobilis* ne possède que des structures sécrétrices endogènes. Ces résultats ont été confirmés par les travaux de SEREBRYNAYA et *al.*, [179].

Dans son étude, TALEB -TOUDERT [180] a réalisé des observations au niveau des feuilles avec microscopie photonique et à balayage électronique. Ils ont pu constater des canaux sécréteurs sous le parenchyme palissadique de la feuille. Ils se présentent sous forme de cellules isolées comme dans le cas de toutes les plantes appartenant à la famille des lauraceae .Ils sont très nombreux, de forme arrondie et entourés par une assise de cellules sécrétrices.

3.2. Extraction de la fraction aromatique de *Laurus nobilis*

3.2.1. Étude de la cinétique d'extraction

Cette étude nous a permis de suivre la cinétique d'extraction et l'évolution du rendement en HE. Elle est présentée dans la figure 3.13.

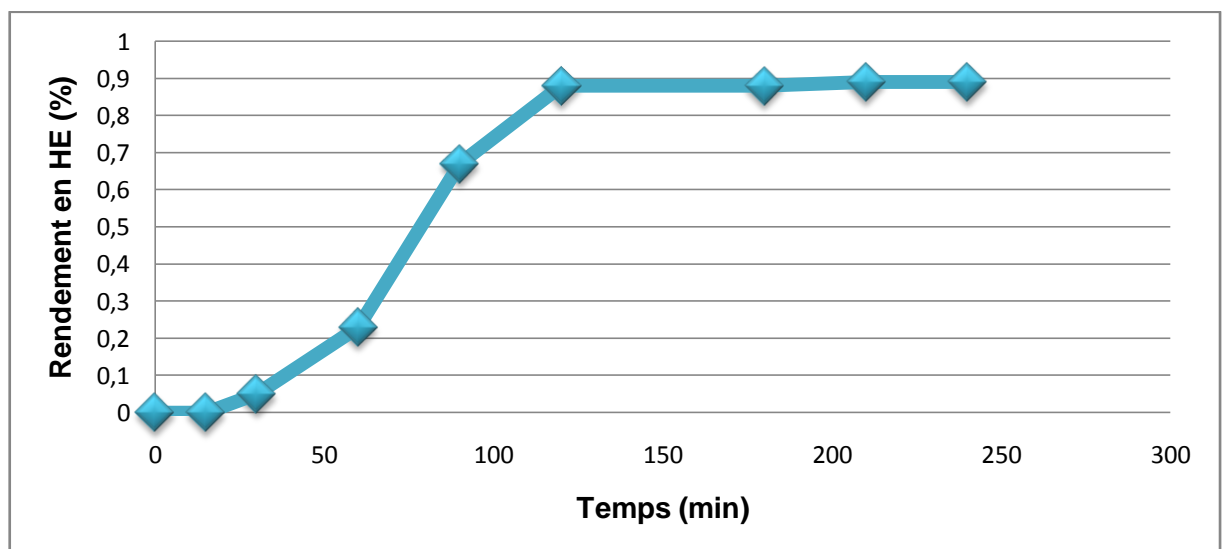


Figure 3.13 : Cinétique d'extraction de l'HE de *Laurus nobilis*

La courbe de la cinétique d'extraction des HEs se caractérise par une partie ascendante où la majeure partie de l'huile extraite correspond à un temps de 120

minutes suivi d'une stabilité. L'allure de la courbe de la figure 3.13 présente trois étapes :

- Un palier pour un rendement nul, correspondant à la phase de chauffage de la matrice qui dure 20 minutes.
- Une augmentation de la quantité d'HE extraite à partir de la quarantième minute jusqu'à 120 minutes où on obtient un optimum avec 0,89% .
- Un deuxième palier, où on observe une stagnation de la production de l'HE.

En effet, le rendement augmente rapidement durant les premières 120 minutes où plus de 80% de l'huile sont extraites, son évolution devient plus lente par la suite pour atteindre un rendement égal à 0,89% à partir de 100 g de feuilles fraîches.

Le temps de l'hydrodistillation est relativement assez long (deux heures). Il s'explique par la localisation endogène des sites sécréteurs. Lorsque les HEs 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. De plus, l'épiderme de la feuille de *Laurus nobilis* est renforcé par la présence d'une épaisse cuticule qui rend la feuille coriace. Elles seront alors lentement évaporées en comparaison avec les structures localisées superficiellement [181][182].

3.2.2. Extraction et rendement en huile essentielle

L'hydrodistillation des feuilles fraîches de *Laurus nobilis* a été réalisée avec un extracteur de type Clevenger. Le rendement en HE est de 0,82%.

Ce rendement en HE est relativement comparable à ceux obtenus sur la même plante originaire de Turquie (0,86%), mais il reste supérieur à celui observé chez la plante originaire d'Égypte (0,68%) [183].

Le rendement en HE de feuilles de *Laurus nobilis* peut varier d'une région à l'autre selon les facteurs pédo-climatiques. Une étude a rapporté un taux de 0,63 ; 0,65 et 0,79% en HE extraite des plantes cultivées dans 3 origines différentes respectivement Tizi-Ouzou, M'sila, Larba [184]. Ainsi, certaines études confirment

que les fluctuations observées dans le rendement en HE peuvent être attribuées non seulement à l'origine de la plante mais également à des facteurs biotique et abiotique [185][186][187].

D'autres auteurs imputent ces changements aux méthodes d'extraction [182][187][188][189][190][191][192].

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

La récupération de cette huile est réalisée par extraction liquide-liquide avec un solvant organique (éther diéthylique). Le rendement en HY est de 0,46% ce qui est très intéressant à l'échelle industrielle.

3.2.4. Étude analytique de l'huile essentielle

3.2.4.1. Caractéristiques organoleptiques

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur et odeur) de l'huile essentielle et de l'hydrolat de *Laurus nobilis* L. ont été notées et présentées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Propriétés organoleptiques de l'HE et de l'HY

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

Les paramètres organoleptiques des HEs sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes d'Afnor [115][193].

3.2.4.2. Caractéristiques physico-chimiques de l'HE du *Laurus nobilis*

Nous avons déterminé les constantes physico-chimiques selon des méthodes normalisées (Tableau 3.2).

Les résultats des caractéristiques physico-chimiques, obtenus pour l'HE de *Laurus nobilis* sont donc conformes à celle édictées par la norme d'Afnor (2000).

Plusieurs études ont démontré que les paramètres physico-chimiques des HEs sont influencés par les conditions édaphiques et climatiques [185][194][195].

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

	Pouvoir rotatoire	Indice de réfraction	Densité	Miscibilité à l'éthanol à 80°	Indice d'acide	Indice d'ester
Résultats de l' étude	-19°	1,4760	0,923	1v/3v	1,32	43,67
Résultats obtenus par GUEDOUARI [181]	-14°	1,4773	0,915	1v/3v	2,6	40,5
Résultats obtenus par PAOLINI et al.,[191]	-18,12	1,4730	0,944	/	/	/

L'indice d'acide montre la quantité des acides libres présents dans l'HE. Il peut aussi nous renseigner sur la susceptibilité à subir des altérations, notamment l'oxydation. D'après les résultats obtenus l'HE de *Laurus nobilis* a présenté un indice d'acidité de 1,32, celle-ci est très inférieure par rapport à celles préconisées par la norme d'Afnor (2000), qui sont de l'ordre de 4,5 à 6,5. Un indice d'acide est inférieur à deux, est un caractère d'une bonne conservation de l'huile [196].

L'écart remarqué pour la valeur de l'indice d'acide de l'HE de *Laurus nobilis* par rapport aux valeurs promulguées par la norme d'Afnor (2000), peut s'expliquer par la durée de stockage de 1 mois et la bonne méthode d'extraction. Ces facteurs peuvent avoir une influence sur le comportement et les caractéristiques des HEs.

Un indice de réfraction varie avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. Le faible indice de réfraction de l'HE indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques [197][198].

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais non suffisante pour caractériser les huiles essentielles. Il est donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques. Ces dernières sont souvent utilisées comme moyen analytique complémentaire pour l'analyse structurale des substances volatiles. Elles sont utilisées pour identifier qualitativement et quantitativement l'HE de *Laurus nobilis*.

3.2.4.3. Analyses chromatographiques de la fraction aromatique

3.2.4.3.1. Composition chimique de l'huile essentielle

Les résultats de l'analyse par CG/SM de l'HE sont présentés dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3: Composés majoritaires de l'huile essentielle

Composés	(%)
1.8cineol	24,658
Linalol	18,563
α -terpineol	9,875
Methyl eugenol	9,871
Eugenol	9,478
L-4-terpineol	9,382
Elemicine	1,808
Diisooctyl phthalate	0,867
Exo-2-Hydroxycineole acetate	0,253
Sabinene	0,246
γ -terpene	0,196
Cis-linalolxide	0,198
Total	85,395

Le profil chromatographique de l'huile essentielle a permis d'identifier 12 composés. Le 1,8-cinéol et le linalool apparaissent comme les constituants majoritaires de l'HE avec respectivement 24,658 % et 18,563 %, suivi de α –

terpineol (9,875 %), de Methyl eugenol (9,871 %), d'Eugenol (9,478 %) et de L-4-terpineol (9,382 %) (Appendice F.1).

La teneur en 1.8 cinéol de l'HE de *Laurus nobilis* de Ben Ali (24,658%) est inférieure à celle observée chez la même plante originaire du Maroc dont la teneur est de 52,43% [54], de Antakya (46,61 %), de Yayladagi (47,63 %) , de Samandagi (59,94 %)[58] et de Croatia (45,5%)[199]. Cette divergence dans les résultats explique le rôle que peuvent jouer les facteurs environnementaux et climatiques sur la composition biochimique et sur la qualité des extraits végétaux [200][201][202].

Les résultats obtenus corroborent avec ceux de OUIBRAHIM et *al.*, [203]. En effet, on constate que le 1,8 cineole est le constituant majoritaire de l'HE de *Laurus nobilis* d'Algérie avec une teneur de 35,31%. Par ailleurs, cet échantillon fait ressortir une teneur considérable en β -Linalol 22,52% et en Camphene 7,37%.

Nos résultats concordent aussi avec ceux rapportés par MEDIOUNI BEN JEMAA et *al.*, [204] qui ont démontré que les principal composé commun des HES de laurier provenant de l'Algérie, de la Tunisie et du Maroc est le 1,8 cineole.

MARZOUKI et *al.*, [63] ont également signalé que les HES de *L. nobilis* cultivé en Tunisie et en Algérie n'ont pas révélé de différences dans leur composition chimique. En outre, OZCAN et CHALCHAT [205] soulignent que la variation quantitative et qualitative des huiles essentielles de *Laurus nobilis* concerne principalement les composés mineurs.

3.2.4.3.2. Composition chimique de l'hydrolat

Pour pouvoir quantifier les composants chimiques des HYs par CG-SM, 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.

Tableau 3.4: Composition chimique de l'hydrolat

Composés	(%)
1.8cineol	15,223
Linalol	8,456
Terpinyl acetate	7,237
Sabinene	6,352
Methyl eugenol	4,871
Thymol	0,817
Phenol,2-Methyl-5-(1-Methyethyl)	0,654
Total	43,591

La fraction volatile de l'hydrolat est composée principalement par le 1.8 cineol (15.204%), accompagné par d'autres constituants à des teneurs relativement faibles : linalol (8.456%), terpinylacetate (7,237%) et sabinène (6.352%) (Appendice F.2).

Il en ressort que ces deux extraits (HE, HY) présentent des composants en commun tel que 1.8 cineole, linalool, sabinène, et méthyl eugénol, a des concentrations différentes. Cependant, quelques composés ont été rapportés seulement dans l'hydrolat tel que thymol (0,817%), Phenol,2-Methyl-5-(1-Methyethyl) (0,654%) et terpinylacetate (7,237%).

Plusieurs études ont montré que les molécules oxygénées hydrophiles se trouvent en grandes quantités dans les hydrolats. Au contraire, les composés lipophiles comme les hydrocarbures terpéniques sont généralement quasi absents [206][207][208][209].

3.3. Extraction et rendement en extraits bruts

3.3.1. Taux d'humidité

Les résultats de cette analyse ont révélé un taux d'humidité inférieure à 10% pour *Laurus nobilis* (7,56 % \pm 0,2) (Figure 3.14). Une teneur en eau, inférieure à 10% confère à la poudre préparée une meilleure conservation à long terme.

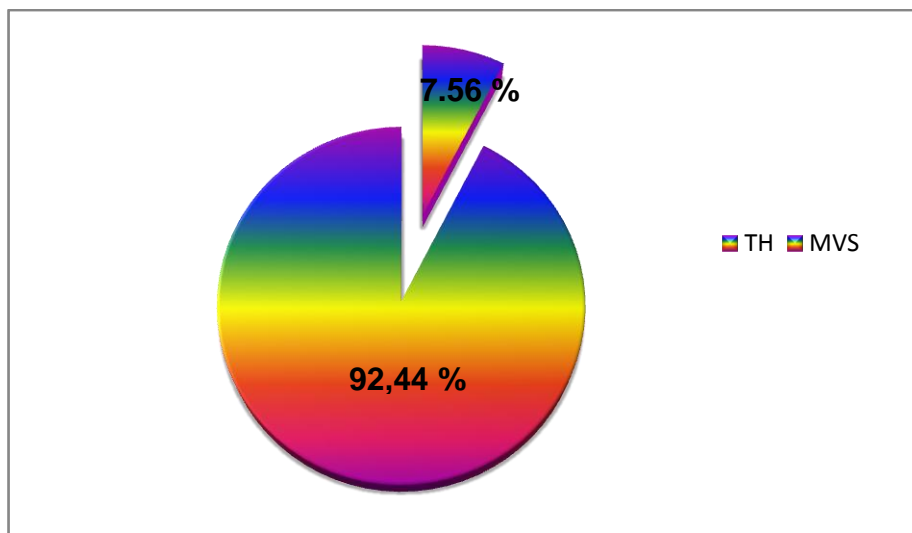


Figure 3.14: Taux d'humidité des feuilles sèches de *Laurus nobilis* (MVS: matière végétale sèche; TH : taux d'humidité)

3.3.2. Rendement en extraits

Pour l'obtention de différents extraits de la poudre de feuilles de *Laurus nobilis*, nous avons réalisé des extractions aqueuses (avec l'eau distillée) et organiques (avec le méthanol).

La détermination des rendements en extraits bruts a montré une rentabilité importante en extraits polaires (EM et EA) chez la plante avec des valeurs respectivement 20,45 % et de 18,57 %.

Le rendement des extractions, l'aspect et la couleur des extraits sont reportés dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5: Aspect, couleur et rendement des extraits de *Laurus nobilis*

Extraits	Aspect	Couleur	Rendement (%)
EM	Pâte collante	verdâtre	20.45
EA	Poudre	Jaune	18.57

Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie, le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans

lesquelles l'extraction a été effectuée. La méthode d'extraction affecte également tout le contenu total en phénols et en flavonoïdes [210].

3.3.3. Screening phytochimique des extraits

Les résultats de la composition phytochimique préliminaire des extraits de *Laurus nobilis* par screening chimique sont repris dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6 : Criblage phytochimique des extraits

Groupes chimiques	<i>Laurus nobilis</i>
Tanins catéchétiques	++
Tanins galliques	+
Flavonoïdes	+++
Anthocyanes	-
Proanthocyanidols	+
Quinones libres	-
Quinones combinés	-
Hétéroside cardiotonique	-
Leucoanthocyanes	-
Alcaloïdes	+
Saponosides	++
Senosides	+
Mucilages	++
Coumarines	++
Stérols et terpènes	+
Caroténoïdes	+
Stéroïdes	++
+++ : forte présence ; + : faible présence ; - : absence	

Au regard du tableau 3.6, les composés chimiques majoritaires pour la plante sont les flavonoïdes. De plus, les extraits de *Laurus nobilis* sont caractérisés par la présence des proanthocyanidols, des alcaloïdes, des saponosides, des tanins, des senosides, des mucilages, des coumarines, des caroténoïdes, des stéroïdes, des stérols et des terpènes. On note dans les extraits, l'absence des dérivés quinoniques, des hétérosides cardiotonique, des leucoanthocyanes et des anthocyanes. Les résultats obtenus à l'issu du criblage phytochimique corroborent avec ceux de certains auteurs [73][211][212].

Cette étude a révélé la richesse des feuilles de *Laurus nobilis* en composants actifs reconnus pour leurs propriétés biologiques et thérapeutiques intéressantes.

3.3.4. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Afin de caractériser les extraits préparés à partir des feuilles de *Laurus nobilis*, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés pharmacologiques des plantes leur sont attribués [213]. La méthode de dosages des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu [130]. L'acide gallique a été utilisé comme standard.

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium [134] en utilisant comme standard la quercétine. Les résultats sont représentés dans le tableau 3.7 et les gammes d'étalonnages dans les figures 3.15 et 3.16.

Tableau 3.7: Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes

Extrait	Teneur en polyphénols (μg EAG/mg)	Teneur en flavonoïdes (μg EQ/mg)
EM	179,09 \pm 4,55	9,68 \pm 1,64
EA	132,63 \pm 2,14	2,85 \pm 1,97

Les valeurs représentent la moyenne \pm SD (n=3) ; μg EAG : μg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ; μg EQ/mg : μg d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

Les résultats du dosage des polyphénols montrent que l'EM présente la fraction contenant la valeur la plus élevée en polyphénols (179,09 \pm 4,55 μg EAG/mg d'extrait), suivi par l'EAQ (132,63 \pm 2,14 μg EAG/mg d'extrait). Cela est probablement lié aux conditions climatiques de l'habitat (température élevée, forte exposition solaire, sécheresse et salinité), qui stimulent la biosynthèse de métabolites secondaires tels que les composés phénoliques. En effet, le contenu phénolique d'une plante dépend d'un nombre de facteurs intrinsèques (génétiques) et extrinsèques (l'environnement) [214][215].

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que l'EM est le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de $(9,68 \pm 1,64 \mu\text{g EQ/mg d'extract})$, suivi par l'EAQ $(2,85 \pm 1,97 \mu\text{g EQ/mg d'extract})$. Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes indique la présence de ces deux métabolites secondaires dans les deux extraits. Différemment, les mêmes fractions donnent une teneur en polyphénols et en flavonoïdes relativement inférieure à celle rapportée par YAKHLEF [216].

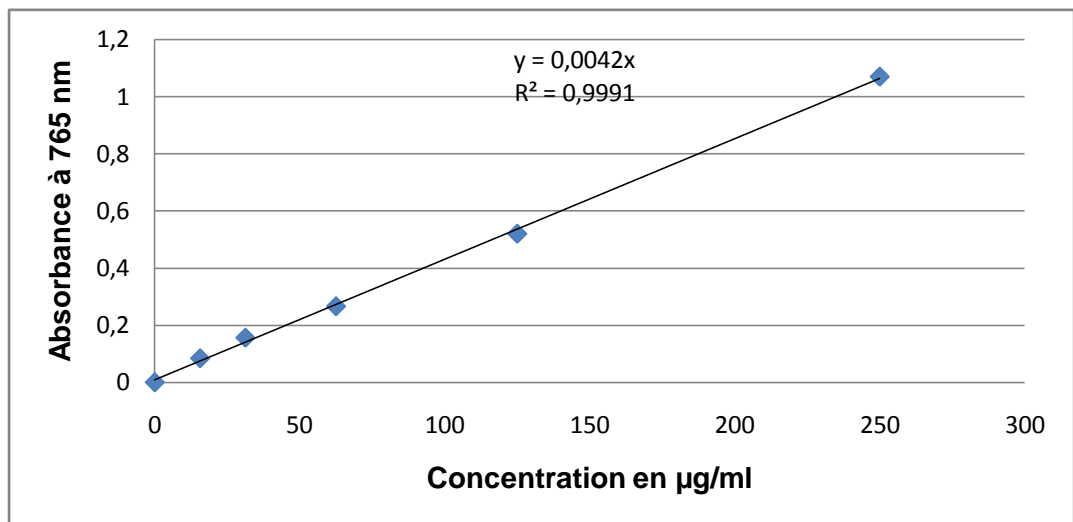


Figure3.15: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique
(moyenne \pm écart-type)

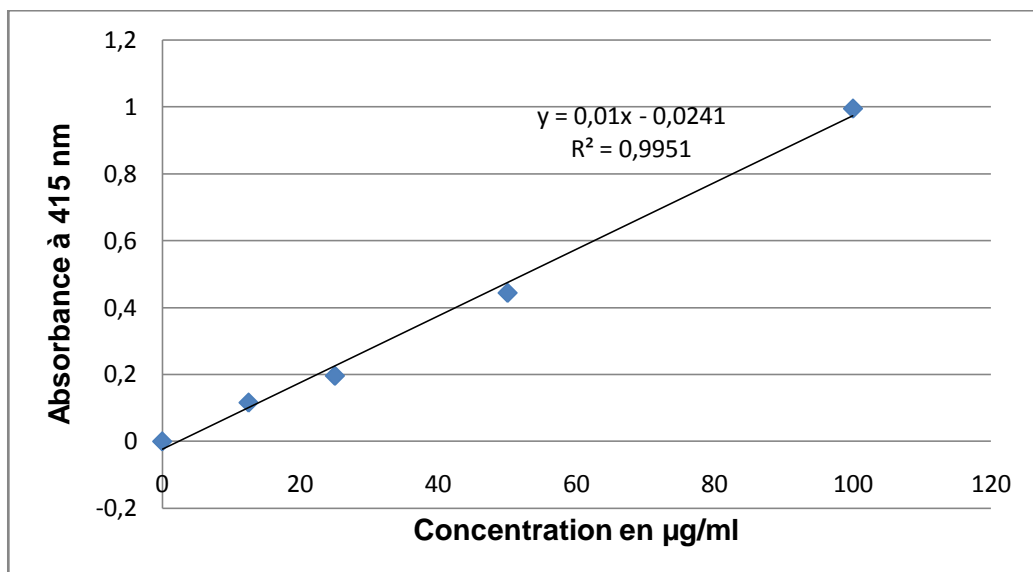


Figure 3.16: Courbe d'étalonnage de la quercétine
(moyenne \pm écart-type)

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

3.4.1. Activité antimicrobienne de l'HE

Nous avons réalisé une étude qualitative et quantitative de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*, les résultats sont consignés dans le tableau 3.8.

D'après le test ANOVA (Appendice G.1), il y a une différence significative de l'effet de l'huile essentielle sur les microorganismes testés. Ainsi, ils n'ont pas manifesté la même sensibilité vis-à-vis de l'HE.

L'HE de *Laurus nobilis* montre une activité antimicrobienne sur toutes les souches testées, à l'exception de *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 [217][218][219][220].

Il a été rapporté que les composés responsables de l'action antibactérienne de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* semblent vraisemblablement être due au linolol, α terpinéol, eugénol, caryophyllène, nérolidol, α -humulène et viridiflorol [65].

En prenant en considération les diamètres d'inhibition, l'HE est extrêmement active sur *S. aureus*, *K. pneumonia*, *B. subtilis*, *E. faecium*, *Salmonella* sp, *E. coli*, *Enterobacter* sp, *S. typhimurium*, *Shigella* sp. Au contraire, elle est modérément active vis-à-vis *B. bronchiseptica*, *E. faecalis*, *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *L. monocytogenes*, *A. baumannii*, *Lactobacillus* sp, *C. freundii*, *K. oxytoca*, *P. alcalifaciens*, *S. marcescens*, *S. epidermidis* mais inactive sur *P. aeruginosa*.

On observe que les différentes souches de bactéries étudiées réagissent différemment à l'huile essentielle testée, même s'il s'agit de deux souches d'une même espèce bactérienne (*S. aureus* ATCC6538 et *S. aureus* clinique). 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 19,30 mm et 14 mm.

Tableau 3.8 : Diamètres de zones d'inhibition, concertations minimales inhibitrices (CMI), concertations minimales bactéricides(CMB) et concertations minimales fongicides(CMF).

Souches microbiennes	Diamètre de zones d'inhibition (mm)	CMI (%)	CMB/CMF (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0,000±,0000	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC9372	32,233±0,9292	0,03	0,25
<i>Escherichia coli</i> ATCC4157	22,267±0,6429	0,25	0,25
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC4617	14,700±0,6245	1	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	67,233±0,6807	0,125	0,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC4352	48,633±1,3650	0,125	0,125
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	15,500±0,6245	0,25	0,5
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC13047	18,100±0,2646	0,25	0,5
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 49452	16,200±0,4359	0,25	0,5
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	14,967±0,5033	0,06	0,25
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC6569	22,300±0,7550	0,5	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	33,500±1,3454	0,25	0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,000±,0000	-	-
<i>Escherichia coli</i>	20,100±0,8544	0,5	0,5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	18,667±0,5859	0,5	1
<i>Lactobacillus</i> sp.	16,033±0,2517	0,25	0,5
<i>Citrobacter freundii</i>	17,700±1,0440	0,125	0,25
<i>Enterobacter</i> sp.	20,667±0,5774	0,125	0,5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	17,600±0,6000	0,25	0,5
<i>Providencia alcalifaciens</i>	16,397±0,5514	0,25	0,5
<i>Salmonella</i> sp.	24,573±0,5605	0,5	1
<i>Serratia marcescens</i>	15,010±0,0361	0,5	1
<i>Shigella</i> sp.	23,273±0,4456	0,25	0,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16,470±0,6883	0,25	0,5
<i>Salmonella typhimurium</i>	22,000±0,3606	0,5	1
<i>Candida albicans</i> ATCC2443	14,000±,5568	0,25	0,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC2601	19,300±0,4359	0,125	> 2

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 *B bronchiseptica*, elle est de 1%. De fortes concentrations sont nécessaires pour inhiber la croissance de *Bordetella bronchiseptica*. L'huile essentielle de *Laurus nobilis* exerce une activité bactériostatique sur *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* avec des valeurs de CMI respectivement de 0,25% et 0,5%.

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* exerce une activité fongistatique sur *S. cerevisiae* et *C. 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 de l'HE. Les résultats obtenus montrent aussi une action fongicide à l'égard de *Candida albicans* et fongistatique à l'égard de *Saccharomyces cerevisiae*.

Nos résultats concordent avec ceux OUIBRAHIM et *al.*, [203] qui ont rapporté l'efficacité de l'HE sur la totalité des micro-organismes testés, dont les diamètres d'inhibitions sont nettement inférieurs aux diamètres enregistrés soient 13,5 mm pour *E coli* ATCC25922 ; 11,1 mm pour *P mirabilis* ; 12 mm pour *K pneumoniae* ; 11 mm pour *K oxytoca* ; 12,7mm pour *Enterobacter sp.* ; 11,4 mm pour *P alcalifaciens* ; 16,4 mm pour *Shigelle sp.* ; 12,5 mm pour *Salmonella sp.* ; 11,5 mm pour *S marcescens* ; 8,7 mm pour *C freundii* ; 9,2 mm pour *A baumannii* ; 11,3 mm pour *E faecalis* ; 14 mm pour *S aureus* ATCC25923 et 12,7 mm pour *S epidermidis*. Par ailleurs, ELHARAS et *al.*, [221], ont révélé que l'huile essentielle du laurier originaire du Maroc exerce une grande activité inhibitrice sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* avec des diamètres d'inhibition respectivement de 8,5 cm et 2,12 cm.

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* de Bejaia a également été étudiée pour son action sur cinq souches bactériennes de références : *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC27853, *E. coli* NAR, *K. pneumoniae* E47 et *Listeria innocua* CLIP74915 [222]. L'HE a été efficace sur la totalité des micro-organismes testés,

donnant des diamètres d'inhibitions nettement inférieurs aux diamètres enregistrés soient 29,5 mm pour *E. coli* NAR, 26,5 mm pour *K. pneumoniae* E 47 et 29,5 mm pour *S. aureus*. La souche de *P. aeruginosa* ATCC27853 a montré une nette résistance.

De même, l'HE du *Laurus nobilis* originaire du Portugal présente une forte activité antibactérienne/ Elle agit contre tous les micro-organismes qui détériorent les aliments [223].

MOGHADER et al., [224] ont démontré l'efficacité de l'HE de *Laurus nobilis* issue de la province du Kerman (Iran) sur plusieurs souches de Gram (-) et de Gram (+). Ils ont enregistré des zones d'inhibitions de croissances de 29, 26 et 18 mm sur des bactéries de Gram (+) *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. faecalis* respectivement. Notamment, Ils ont enregistré des zones d'inhibitions de croissances de 24, 27, 21, 18, 26 et 28 mm sur des bactéries de Gram (-) qui sont respectivement *P. aeruginosa*, *S. flexneri*, *K. pneumoniae*, *S. typhi*, *S. marcescens* et *E. coli*. L'effet de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* sur les souches bactériennes était supérieur à celui de la tétracycline et inférieur aux valeurs retrouvées dans nos résultats. La souche de *P. aeruginosa* a été plus sensible à l'HE de *Laurus nobilis* de Kerman qu'à l'HE testés.

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont la réputation d'être des germes résistants aux agents biocides, cela est lié à leur grande capacité à développer des résistances vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens, leur implication fréquente dans les infections nosocomiales [217]. Plusieurs auteurs rapportent la faible sensibilité des souches de *P.aeruginosa* vis-à-vis des huiles essentielles [219][225][226][227].

La résistance de *Pseudomonas aeruginosa* est due à sa capacité de former une organisation complexe, composée de différentes strates appelée biofilm. Il est établi que le traitement de telles bactéries nécessite des concentrations élevées d'agents antimicrobiens [228].

Les activités bactériostatiques et bactéricides de 22 huiles essentielles dont le laurier noble contre sept souches bactériennes (*Aerobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Staphylococcus albus et *Staphylococcus aureus*) ont été évalués par KIVANC et AKGUL en Turquie [229]. *Laurus nobilis* s'est montré actif contre toutes les bactéries testées avec une sensibilité prononcée pour *S. aureus* et *P. vulgaris*.

La sensibilité de *S. aureus* à l'huile essentielle de *Laurus nobilis* observée dans notre étude a été également constatée par DERWICH *et al.*, [54]. L'activité antibactérienne de *Laurus nobilis* provenant du Maroc a été étudiée *in vitro* sur trois souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* et *Klebsiella pneumoniae*, l'huile essentielle testée a montré une meilleure action sur les souches de *S. aureus* avec une zone d'inhibition de 13 mm et une CMI équivalente à 0,35 mg/ml.

L'hypersensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes [230].

D'après plusieurs travaux, les auteurs soulignent que les bactéries à Gram (-) sont plus résistantes que les Gram (+), ceci est dû aux différences structurales de leurs membranes externes [231][232][233][234][235], la pénétration des composés actifs présents dans les HEs est donc différente [219]. Chez les bactéries Gram (-), la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace, riche en lipopolysaccharide dont les charges négatives de surface empêchent la diffusion des molécules hydrophobes [236][237]. Toutefois, quelques composés phénoliques de faible poids moléculaire peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires à l'aide de leurs groupes fonctionnels et arriver jusqu'à la membrane intérieure plus vulnérable [219]. Ainsi, les composés hydrophobes sont capables de perturber la membrane plasmique et la membrane externe des bactéries Gram (-) en induisant sa perméabilité et la mort de la cellule [238].

Certains résultats ont montré que les bactéries Gram (-) sont généralement les plus sensibles à l'action des huiles essentielles que les bactéries Gram (+) [140][239].

D'autres auteurs ne trouvent pas de différence significative entre la sensibilité des bactéries Gram (-) et celle des bactéries Gram (+) [139] [240]. Les différentes

bactéries Gram (-) et Gram (+) testées manifestent une action variable à l'égard des huiles essentielles utilisées puisque *Klebsiella pneumoniae* Gram (-) a montré une grande sensibilité par rapport à celle de *Bacillus subtilis* et d'*Enterococcus faecium* qui sont des bactéries Gram (+).

Les souches bactériennes testées et la méthode utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne peuvent également être la cause de divergences dans les résultats [241].

Le mécanisme d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes et fongiques reste difficile à cerner, compte tenu de la composition complexe des huiles volatiles [242] [243]. La variabilité des constituants des huiles suggèrent qu'elles agissent sur plusieurs sites d'action dans les micro-organismes, étant donné que chaque composé possède son propre mode d'action [244].

Les caractéristiques des huiles essentielles sont attribuées aux dérivés terpénoïdes et phénylpropanoïdes dont elles sont constituées. L'activité de ces molécules bioactives dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées [244].

Les terpènes ainsi que les flavonoïdes peuvent pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne et induire sa rupture. Le contenu cytoplasmique est déchargé à l'extérieur de la cellule impliquant sa destruction [245][246]. Également, une perturbation chémo-osmotique et une fuite de potassium intra-cytoplasmique peuvent survenir, suivi de la libération d'acides nucléiques, de l'ATP, et du phosphate inorganique [242][246][247].

D'après MASSON et WASSERMAN [248], les composés phénoliques et les aldéhydes possèdent un mécanisme similaire, avec une efficacité inhibitrice proportionnelle à leur degré d'hydrophobicité. Certains composés phénoliques des HEs interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant

la phosphorylation de l'ADP [249][250]. De ce fait la synthèse de l'ADN, l'ARN, des protéines et des polysaccharides peuvent être inhibés par les huiles essentielles [251].

De nombreux auteurs, ont constaté que le changement dans la composition chimique des huiles essentielles affecte directement leurs propriétés biologiques [252][253]. Ce qui mène à attribuer l'activité antibactérienne aux composants chimiques des HEs.

L'HE de *Laurus nobilis*, contient une forte quantité en 1,8 cinéole. Ce composant est à l'origine du pouvoir inhibiteur de l'HE de *Laurus nobilis*. Plusieurs recherches, ont mis en évidence son effet sur plusieurs souches telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* et *Bacillus subtilis* [254].

Selon WANG et ses collaborateurs, l'impact des composés mineurs n'est pas à négliger. Ils ont démontré que les HEs entières ont une activité antimicrobienne supérieure à un mélange de composants majeurs des mêmes huiles essentielles, ce qui suggère que les composants mineurs peuvent avoir un effet synergique [255].

3.4.2. Activité antifongique de l'HE

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* a été testée sur la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes dans le but de déterminer son activité antifongique. En effet, différentes concentrations ont été testées : 0,03 ; 0,625 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1, et 2 % (Tableau 3.9).

L'étude statistique ($p < 0,05$) (Appendice G.2) a montré que les différentes concentrations de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* présentent une activité antifongique efficace. Pour différencier les concentrations par rapport à leurs effets, nous avons fait un suivi de la croissance mycélienne pendant 7 jours d'incubation. Une évolution hétérogène entre les différentes concentrations a été constatée durant cette période (Tableau 3.9).

Tableau 3.9 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne

Concentration HE en (%)	% Inhibition (moyenne \pm écart-type)			
	<i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 16992	<i>Aspergillus flavus</i> MNHN 994294	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<i>Penicillium expansum</i> ATCC 24692
0,03	3,33 \pm 0,5	2,99 \pm 3,2	1,71 \pm 0,5	4,22 \pm 0,9
0,625	4,02 \pm 1,8	39,40 \pm 1,7	5,34 \pm 0,3	13,64 \pm 1,0
0,125	4,64 \pm 2,6	67,75 \pm 1,3	21,27 \pm 1,6	38,61 \pm 0,2
0,25	5,49 \pm 1,2	75,08 \pm 2,9	24,71 \pm 0,0	60,23 \pm 0,5
0,5	6,66 \pm 0,7	78,24 \pm 0,7	50,28 \pm 1,3	62,63 \pm 1,2
1	61,03 \pm 2,1	87,62 \pm 1,8	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
2	63,51 \pm 1,6	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0

Concentration HE en (%)	% Inhibition (moyenne \pm écart-type)			
	<i>Fusarium moniliforme</i> ATCC 52539	<i>Fusarium sporotrichioides</i> VTT D-72014	<i>Fusarium oxysporum</i> MNHN 963917	<i>Penicillium digitatum</i> PHI26
0,03	2,46 \pm 1,4	0,83 \pm 2,2	23,70 \pm 1,3	17,72 \pm 0,1
0,625	4,28 \pm 2,3	2,43 \pm 0,4	26,82 \pm 0,6	26,92 \pm 0,5
0,125	20,96 \pm 0,9	4,99 \pm 1,1	52,29 \pm 2,4	42,03 \pm 0,7
0,25	37,88 \pm 0,3	36,92 \pm 0,0	69,25 \pm 1,2	72,77 \pm 1,5
0,5	39,15 \pm 1,9	57,25 \pm 0,6	82,98 \pm 1,8	100 \pm 0,0
1	56,71 \pm 1,1	79,72 \pm 1,2	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
2	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0

On note que l'huile essentielle de *Laurus nobilis* a induit un pourcentage d'inhibition très important après 7 jours d'incubation. Cette dernière est estimée à 100% pour les concentrations 0,5 ; 1 et 2 %.

Les concentrations 1 et 2 % se présentent comme étant les plus efficaces durant toute la période d'incubation et pour tous les champignons testés. Toutefois, il est à signaler que les deux doses 1 et 2 % ont permis une inhibition de 100% dès le premier jour, jusqu'à la fin de l'incubation.

Contrairement à *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992, les résultats obtenus montrent qu'après 7 jours d'incubation, le pourcentage d'inhibition atteint 63,51% à une concentration de 2 %. Cette inhibition incomplète a été constatée uniquement pour *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992 qui semble être le champignon le plus résistant à l'huile essentielle de *Laurus nobilis*.

En effet, cette efficacité peut être due au réservoir des composés phénoliques et terpéniques de cette plante. Dans ce sens, une étude publiée par VALNET a montré que les composés chimiques ayant une efficacité antibactérienne et antifongique à large spectre sont les phénols, les aldéhydes, les alcools et les cétones terpéniques [256].

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles ne peut pas être liée à celle de leurs produits majoritaires, il est nécessaire de tenir compte de l'existence des interactions et des phénomènes de synergie entre ces composés majoritaires et ceux qui sont minoritaires [257]. Des phénomènes de synergie entre les différents constituants peuvent être à l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible pour les composés majoritaires [258][259].

WILSON et *al.*, a montré que les composés des huiles essentielles des plantes qui agissent contre les champignons peuvent être utilisés pour contrôler des maladies fongiques des fruits et des légumes [260].

Une autre étude présentée par WILSON et *al.*, a montré que des composés fongitoxiques des huiles essentielles pourraient être une alternative au bromure de méthyle utilisé comme fumigants dans le sol [260].

Une étude présentée par SARI et HADDOUCHI a montré l'effet antifongique des huiles essentielles de *Laurus nobilis* sur *Aspergillus flavus* O2, *Fusarium oxysporum* F16, *Penicillium spp* BT2, *Aspergillus niger* BDB5, *Rhizopus stolonifer* O1 [260][261].

Par ailleurs, nous avons observé qu'à une concentration de 0,5 ; 1 et 2 % l'inhibition de la croissance des champignons complète est atteinte, il serait intéressant de savoir si l'huile essentielle est fongistatique ou fongicide à ces concentrations.

A la lumière des résultats obtenus (Tableau 3.10), il est important de noter que l'huile essentielle de *Laurus nobilis* a inhibé complètement la croissance mycélienne du *Penicillium digitatum* PHI26 dès la concentration CMI =0,5 %. Ainsi, on note que l'HE de *Laurus nobilis* a inhibé complètement la croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum* MNHN 963917, d'*Aspergillus niger* ATCC 16404 et du *Penicillium expansum* ATCC 24692 dès la concentration CMI =1 %.

Tableau 3.10 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales fongicides (létales) (CML=CMF)

Souches fongiques	CMI (%)	CML=CMF (%)
<i>Fusarium moniliforme</i> ATCC 52539	2	> 2
<i>Fusarium sporotrichoides</i> VTT D-72014	2	2
<i>Fusarium oxysporum</i> MNHN 963917	1	2
<i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 16992	> 2	> 2
<i>Aspergillus flavus</i> MNHN 994294	2	> 2
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	1	1
<i>Penicillium digitatum</i> PHI26	0,5	1
<i>Penicillium expansum</i> ATCC 24692	1	2

Quant à *Fusarium moniliforme* ATCC 52539, *Fusarium sporotrichoides* VTT D-72014 et *Aspergillus flavus* MNHN 994294, ils sont très sensibles à l'action de l'HE car l'inhibition est de 100% qui correspond à une CMI = 2%. Le pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle est estimé à 63,51% à une CMI de l'ordre de 2% pour *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992.

L'HE de *Laurus nobilis* montre un effet fongistatique sur *Fusarium moniliforme* ATCC 52539 et *Aspergillus flavus* MNHN 994294. Alors que pour les souches *Fusarium sporotrichoides* VTT D-72014, *Fusarium oxysporum* MNHN 963917, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Penicillium digitatum* PHI26 et *Penicillium expansum* ATCC 24692, l'huile essentielle présente un effet fongicide.

Par ailleurs, *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992, montre une résistance élevée à l'huile essentielle même à fortes concentrations (63,51 % à 2 %). Ce résultat peut être dû au fait que ce champignon neutralise l'effet de cette huile en la métabolisant du fait de sa faible concentration.

HOUICHER et al., ont montré que la souche *Aspergillus parasiticus* était la souche la plus résistante à l'huile essentielle de *Laurus nobilis* avec CMF > 20 µl ml⁻¹ [263].

3.5. Étude de l'activité antioxydante

Cette activité a été testée avec trois méthodes complémentaires en l'occurrence, le piégeage du radical libre DPPH, la réduction du fer et le test de blanchiment du β -carotène.

3.5.1. Effet scavenger du radical DPPH

L'activité antiradicalaire des extraits de *Laurus nobilis* a été évaluée par spectrophotométrie en suivant la réduction du radical DPPH, qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm [264]. Le DPPH est un radical libre nous permettant de déterminer le potentiel de piégeage des extraits grâce à sa sensibilité à détecter les composants actifs à de faibles concentrations [265].

3.5.1.1. Pouvoir de piégeage du radical DPPH des extraits volatils (HE et HY)

La figure 3.17 illustre l'efficacité des extraits volatils et des antioxydants de références à piéger le radical DPPH, traduite par le taux d'inhibition en fonction des différentes concentrations.

L'HE et l'HY présentent un pouvoir d'inhibition respectivement de $16,37 \pm 0,47\%$ et de $6,54 \pm 0,64\%$ pour la concentration 100 mg/l. Le pouvoir d'inhibition de l'HE et de l'HY est respectivement de $55,18 \pm 0,54\%$ et de $51,06 \pm 0,52\%$ à une concentration 1000 mg/l (Figure 3.17).

Les résultats obtenus ont montré que les extraits volatils présentent un pouvoir d'inhibition relativement faible à celle de la rutine (témoin positif). Cette dernière a révélé un pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH qui a atteint ($72,00 \pm 0,36\%$) à la concentration de 1000 mg/ml (Figure 3.17).

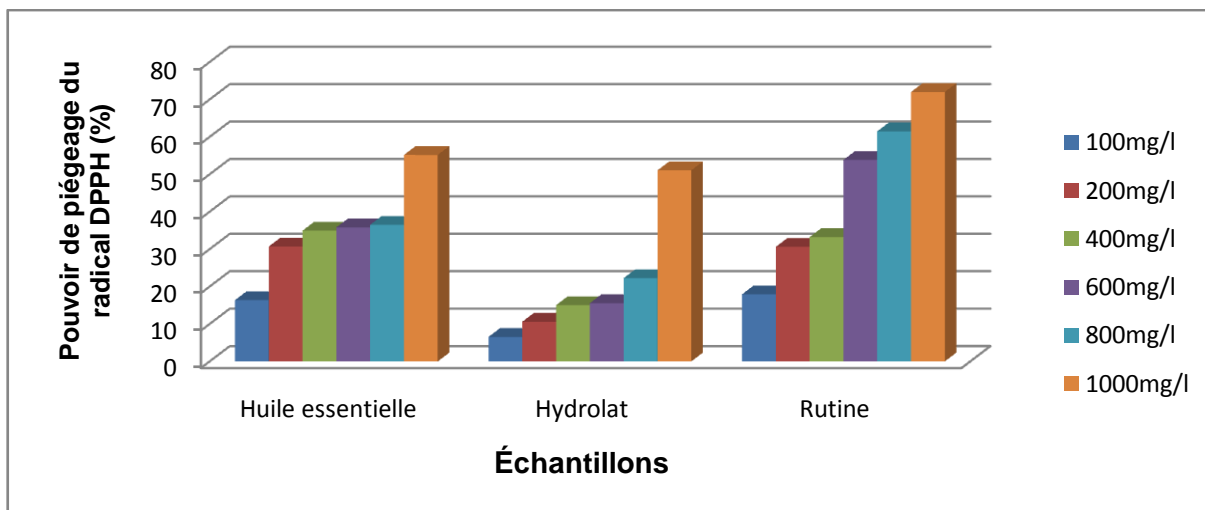


Figure 3.17: Pouvoir de piégeage du radical DPPH des extraits volatils (HE et HY) de *Laurus nobilis* et de la Rutine (témoin positif)

L'analyse statistique (Appendice G.3) nous a permis de mettre en évidence l'effet significatif de la nature de l'antioxydant (HE, HY, Rutine) et de la concentration sur le pouvoir de piégeage du radical DPPH. Le test de Newman et Keuls nous a permis de classer ces variables selon leurs pouvoirs réducteurs comme suit :

- Nature des antioxydants Rutine >HE > HY ;
- Les concentrations 1000 >800 >600 > 400 >200 >100 mg/l.

Nos résultats montrent que l'HE et l'HY de *Laurus nobilis* possède une activité antioxydante mais elle est moins efficace que celle des standards. Cette activité est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'huile essentielle. En présence d'un radical libre DPPH•, l'atome H est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable DPPH. Ainsi, on observe une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité de l'antioxydant donneur d'hydrogène [266].

En général, les interactions synergiques entre les différents constituants d'une HE sont à l'origine d'un pouvoir antioxydant beaucoup plus important [267][268]. En effet, certains constituants des HEs autres que les composés phénoliques tels que le γ -terpinène possèdent aussi une forte activité antioxydante [268].

FERREIRA et *al.*, ont montré que l'activité antioxydante de l'huile essentielle, l'extrait éthanolique et la décoction de *Laurus nobilis*, montrent des valeurs élevées en activité antioxydante par rapport aux extraits polaires [269].

3.5.1.2. Pouvoir de piégeage du radical DPPH des extraits polaires (EA et EM)

Les résultats de l'activité de piégeage du radical DPPH par les extraits polaires et les témoins positifs sont rapportés dans la figure 3.18.

Les résultats montrent que l'évolution de l'activité antiradicalaire est dose-dépendante, elle s'accroît avec l'augmentation des concentrations des extraits dans le milieu réactionnel.

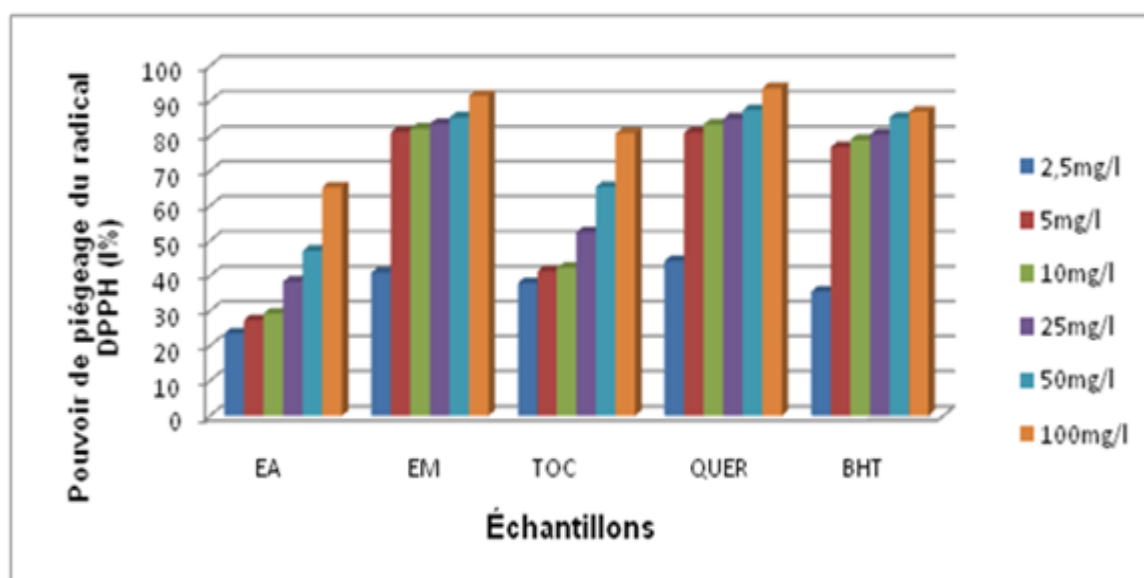


Figure 3.18: Pouvoir de piégeage du radical DPPH des extraits polaires (EA et EM) de *Laurus nobilis* et des témoins positifs (Tocophérol, Quercétine et BHT)

Les résultats de la figure 3.18 montrent que c'est la quercétine qui est le piégeur du radical DPPH le plus puissant parmi les trois témoins positifs utilisés (Tocophérol, Quercétine et BHT). Les extraits polaires (EM et EA) possèdent des capacités de neutralisation du radical libre DPPH intéressantes, puisqu'ils agissent à faibles doses, mais reste significativement inférieur 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.

L'analyse statistique (Appendice G.3) nous a permis de mettre en évidence l'effet significatif de la nature de l'antioxydant (EM, EA, Tocophérol, Quercétine, BHT) et de la concentration sur le pouvoir de piégeage du radical DPPH. Le test de Newman et Keuls nous a permis de classer ces variables selon leurs pouvoirs réducteurs comme suit :

- Nature des antioxydants Quercétine > EM > BHT > Tocophérol > EA ;
- Les concentrations 100 > 50 > 25 > 10 > 5 > 2,5 mg/l.

La présence dans le laurier de l'isoquercitrine, les glycosides flavonol et la vitamine E peuvent expliquer l'activité antioxydante démontrée [70][76][83].

Les composés phénoliques semblent être très performants pour leurs activités antioxydantes du fait de la présence de nombreux hydroxyles, pouvant réagir avec les radicaux libres [270][271][272]. L'activité antiradicalaire des extraits polaires (EM et EA) est probablement liée à leur contenu en polyphénols et en flavonoïdes.

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leurs capacités antioxydantes. L'activité de ces molécules à piéger les radicaux libres dépend essentiellement de leurs structures. Les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui renferment des groupements 3'- 4' dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3 OH sur le cycle C [272][273][274].

L'efficacité de l'antioxydant (AH) augmente si la force de la liaison A-H est faible et le radical (A) résultant doit être le plus stable possible, ce qui est le cas pour les composés phénoliques et flavonoïdes. Ces derniers sont des donateurs d'électrons ou d'hydrogènes [275], chélateurs des ions métalliques [276][277]. Plusieurs études ont montré que les groupements hydroxyles dans les composés phénoliques et flavonoïdes sont responsables de leurs pouvoirs antioxydants [278][279], et aussi les sites d'hydroxylation des différents noyaux affectent la

potentialité antioxydante [280] . Pour les flavonoïdes, les formes aglycones sont plus actives que les formes glycosylées [275].

3.5.1.3. Activité antioxydante des extraits et des témoins positifs exprimée par l'IC50

L'activité antioxydante des extraits testés est aussi exprimée par l'IC50 (tableau 3.11). La valeur de chaque IC50 exprime la concentration de l'extrait exigé pour réduire 50% de DPPH en solution.

L'IC50 et l'activité antioxydante des extraits testés sont inversement proportionnels [281].

La quercétine est le piègeur du radical DPPH le plus puissant parmi les quatre témoins positifs utilisés (Rutine, Tocophérol, Quercétine et BHT) avec un IC50 de $0,907 \pm 0,03$ $\mu\text{g/ml}$ (Tableau 3.11), en l'occurrence, les flavonoïdes sont des capteurs puissants de radicaux [282][283][284].

Tableau 3.11: Activité antioxydante des extraits et des témoins positifs exprimée par l'IC50 ($\mu\text{g/ml}$)

Extraits et témoins positifs	IC50 \pm écart-type ($\mu\text{g/ml}$)
Huile essentielle	1340,313 \pm 1,20
Hydrolat	3461,603 \pm 2,05
Extrait méthanolique (EM)	0,984 \pm 0,22
Extrait aqueux (EA)	5,305 \pm 0,08
Rutine	479,399 \pm 0,35
Tocophérol	2,549 \pm 0,12
BHT	1,268 \pm 0,23
Quercétine	0,907 \pm 0,03

La comparaison des extraits EM, EA, HE et HY révèle que l'EM représente l'extrait le plus actif avec une IC50 de ($0,984 \pm 0,22$ $\mu\text{g/ml}$), suivi par l'EA avec une IC50 de l'ordre de ($5,305 \pm 0,08$ $\mu\text{g/ml}$). L'HY représente l'activité antiradicalaire la plus faible avec une IC50 de l'ordre de ($3461,603 \pm 2,05$ $\mu\text{g/ml}$).

3.5.2. Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

L'évaluation de l'activité antioxydante par la réduction du fer est une méthode facile et reproductible, pour cela elle est très utilisée pour distinguer les extraits les plus actifs [127].

Le BHT, le tocophérol et l'acide ascorbique ont été pris comme des témoins positifs.

Les résultats du pouvoir réducteur des extraits étudiés et des témoins positifs (BHT, Tocophérol et l'acide ascorbique) exprimés par l'absorbance à 700 nm, sont résumés dans la figure 3.19.

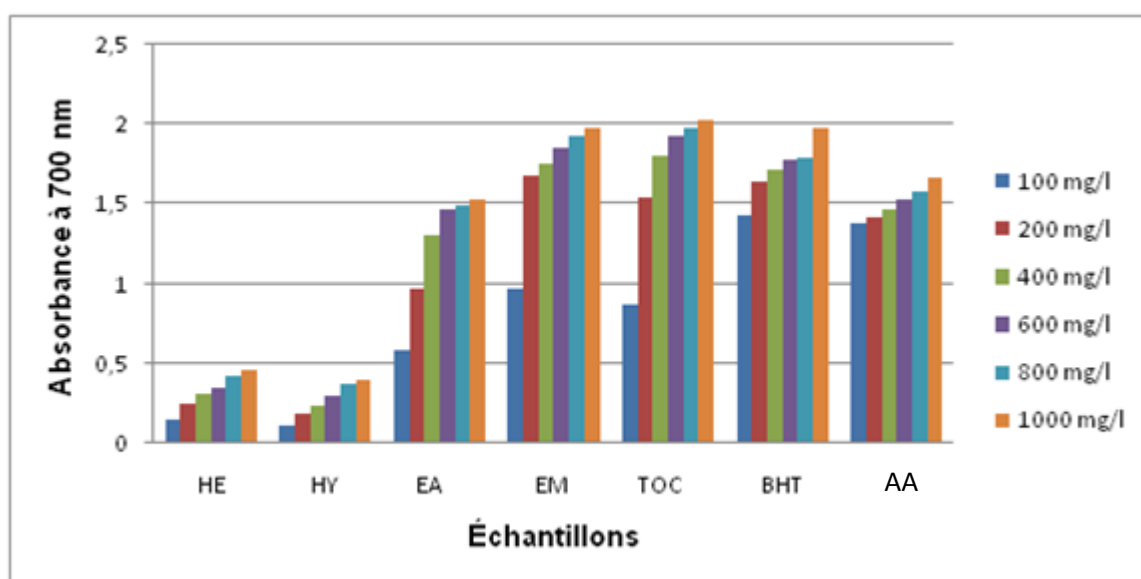


Figure 3. 19 : Test du pouvoir réducteur des extraits de *Laurus nobilis* (HE, HY, EA et EM) et des témoins positifs (BHT, Tocophérol et Acide ascorbique)

Nous remarquons que l'extrait méthanolique a un bon pouvoir réducteur qui augmente avec la concentration (Figure 3. 19). L'EM testé exerce un pouvoir réducteur comparable à ceux du BHT.

L'analyse statistique (Appendice G.3) montre que l'interaction des variables étudiées (la nature de l'antioxydant et la concentration) ont un effet significatif sur le pouvoir réducteur. Le test Newman Keuls nous a permis de classer ces variables selon leurs pouvoirs réducteurs comme suit :

- Nature des antioxydants Tocophérol > BHT = EM >Acide ascorbique>EA> HE>HY ;
- Les concentrations 1000 >800> 600> 400 >200> 100 mg/l.

Les variations de l'activité réductrice des radicaux libres, sont directement liées aux taux de composés phénoliques présents dans la plante récoltée [285] [286].

3.5.3. Test de blanchissement du β -carotène

Les activités inhibitrices de peroxydation des lipides par les extraits de *Laurus nobilis* ont été évaluées par l'essai du blanchiment du β -carotène, celui-ci est obtenu par sur la perte de la couleur jaune de β -carotène due à sa réaction aux radicaux qui sont constitués par oxydation de l'acide linoléique dans une émulsion. La présence de différents antioxydants peut gêner l'ampleur du blanchiment du β -carotène en neutralisant le radical libre de linoléate et d'autres radicaux libres formés dans le système [287]. Cette méthode est employée couramment parce que le β -carotène est un composé physiologique important qui montre une activité biologique forte [287].

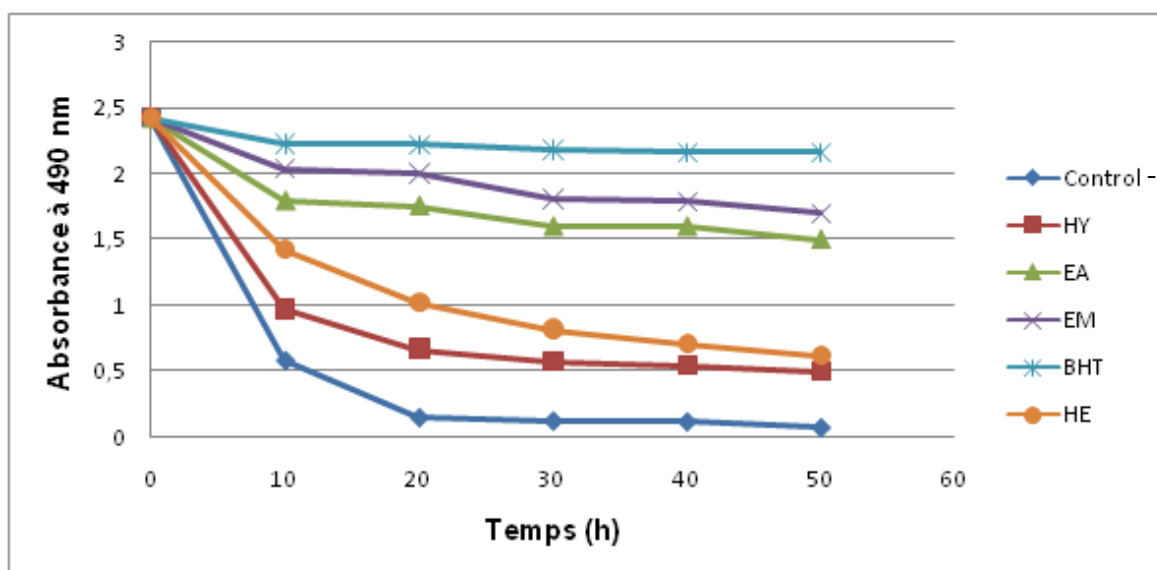
Une des réactions les plus importantes de la peroxydation lipidique est l'auto-oxydation des acides gras insaturés, incriminée dans de nombreuses atteintes cellulaires [269]. Selon plusieurs auteurs, le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du β -carotène, paraît très utile comme modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques [69].

En outre, le β -carotène est utilisé comme agent de coloration en boissons et sa décoloration réduit nettement la qualité de ces produits [283]. De ce fait, il est employé dans l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Laurus nobilis*.

La cinétique de la décoloration du β -carotène, en présence des extraits de *Laurus nobilis* et du témoin positif (BHT), ainsi que le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique (AAR) sont regroupés dans la figure 3.20 et le tableau 3.12.

Tableau 3.12: Pouvoir anti-radicalaire des extraits de *Laurus nobilis*

Extraits	AAR%
Huile essentielle	28,66
Hydrolat	23,08
Extrait aqueux	69,17
Extrait méthanolique	78,43

Figure 3.20: Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits et du témoin positif (BHT)

Les courbes de cinétique de blanchissement du β -carotène obtenues montrent que le BHT (témoin positif) et tous les extraits testés inhibent d'une manière significative l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β carotène par rapport au contrôle négatif (l'extrait est remplacé par le méthanol) qui représente 100% de la peroxydation (Figure 3.20 et Appendice G.3).

Selon les résultats, l'extrait méthanolique de *Laurus nobilis* a manifesté la plus forte aptitude à inhiber la formation des radicaux par l'acide linoléique avec un pourcentage d'inhibition égal à 78,43%, suivi de l'extrait aqueux dont le taux est de 69,17%. L'HE du *Laurus nobilis* a manifesté une activité antioxydante modeste par rapport aux deux autres extraits (EM et EAQ) testés avec un taux de 28,66%, suivi par l'HY qui représente 23,08 % d'activité inhibitrice.

Nos résultats sont en accord avec ceux de PUKALSKAS et *al.*, qui rapportent une corrélation positive entre tout le contenu phénolique et l'activité antioxydante [288]. L'activité antioxydante dépend de plusieurs facteurs, tels que : la concentration des extraits, la méthode d'évaluation, la sensibilité des antioxydants à la température de l'essai et la nature hydrosoluble ou liposoluble de l'antioxydant [287][288].

OZCAN et ses collaborateurs [289], ont montré que le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* était de 64,28%, nettement supérieur à celui de l'huile essentielle obtenu au cours de notre expérimentation qui ne présente qu'une valeur de 28,66%.

L'activité antioxydante est attribuée à la composition chimique des huiles essentielles. Cependant, elle peut être due à l'un des constituants majoritaires ou à d'autres constituants minoritaires ou également à une synergie entre eux [238].

Les huiles avec une prédominance monoterpénique ont montré une activité assez modeste [290]. Au contraire, les travaux de ROGINSKY et *al.*, [160], montrent une grande activité antioxydante des huiles essentielles contenant des monoterpènes et / ou des sesquiterpènes oxygénés. Ainsi une corrélation existe entre l'activité antioxydante des essences et la teneur de monoterpènes oxygénés [291].

Concernant l'HE de *L. nobilis*, RUBERTO et BARATA [267], ont attribué son modeste potentiel antioxydant à la présence de monoterpènes oxygénés dont le 1,8-cinéole. Ce dernier a été considéré comme un faible antioxydant avec un IC50 assez élevé d'une valeur de 9,360 mg/ml.

Par contre le linalol, a un pouvoir antioxydant appréciable [292]. Toute fois, selon RUBERTO et BARATA [267], le linalol n'a pas d'activité. Néanmoins, il peut être considéré comme un pro-oxydant.

Selon LIYANA-PATHRIANA [293], un extrait qui inhibe ou retarde le blanchissement du β carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire.

3.6. Étude de la toxicité aiguë des extraits de feuilles

3.6.1. Observations cliniques et de survie

Les signes cliniques et de mortalité apparus chez les souris mâles et femelles de chaque lot ont été suivis continuellement pendant deux heures après l'administration orale des extraits de *Laurus nobilis*. Ces observations concernent la durée de l'expérimentation de la toxicité aiguë (14 jours). Le lot témoin (0 mg/kg), contenant les souris gavées par l'eau physiologique, n'a montré aucun signe de toxicité immédiat ou de mortalité.

Les différents lots de souris mâles et femelles ayant reçu chacun les extraits suivant : l'hydrolat, l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique de *Laurus nobilis* à des doses comprise entre 50 et 5000 mg/kg ont retrouvé un comportement normal comparable à celui des témoins.

Cependant, la prise des différentes doses de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*, par voie orale, a provoquée des changements plus ou moins graves dans l'activité physique et le comportement des souris mâles et femelles qui peuvent aller jusqu'à la mort. Le tableau 3.13 résume l'ensemble des troubles enregistrés au cours de cette expérience.

Les souris mâles et femelles traitées par les deux doses 50 et 100 mg/kg de l'HE, présentent un comportement normal comparable à celui des témoins. De même, peu de signes de toxicité ont été enregistrés chez les souris mâles et femelles traitées avec les doses de 200 et de 500 mg/kg de l'HE.

Par contre, dès l'administration des doses 1000, 2000 et 5000 mg/kg de l'HE, nous avons enregistré des troubles et des signes de toxicité graves qui conduisent jusqu'à la mort de la totalité des souris du lot.

Les souris mâles et femelles présentent surtout des convulsions avec de fortes agitations, une accélération de rythme cardiaque avec des difficultés respiratoires, puis un coma profond jusqu'à la mort.

Tableau 3.13: Comportement et signes de toxicité aigue de l'HE

Dose de l'HE (mg/kg)	Temoins 0	50	100	200	500	1000	2000	5000
Mortalité: Mâles/ souris Femelles	0/5 0/5	0/5 0/5	1/5 0/5	1/5 1/5	2/5 1/5	3/5 4/5	5/5 5/5	5/5 5/5
Comportement normal	+	+	+	-	-	-	-	-
Démarche anormale	-	-	-	+	+	+	+	+
Activité réduite	-	-	-	+	+	+	+	+
Difficulté de respiration	-	-	-	-	-	+	+	+
Convulsion	-	-	-	-	-	-	+	+
Diarrhée	-	-	-	-	-	+	+	+
Coma	-	-	-	-	-	+	+	+
Contraction abdominale	-	-	-	-	-	+	+	+
Œdème musculaire	-	-	-	-	+	+	+	+

La méthode de KARBBER et BEHRENS, mentionne que la DL50 est de 747,5mg/kg et elle est de 750 mg/kg selon la méthode de DRAGSTEDT et LANG. Nous pouvons déduire que la DL50 moyenne de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* testée est de $748,75 \pm 1,25$ mg/kg. Cette DL50 a permis de classer l'huile essentielle testée dans la catégorie des substances faiblement toxiques, selon la classification de HODGE et STERNER [172].

Nos résultats sont en accord avec ceux de ZERKAK et ZETOUT, qui rapportent que l'huile essentielle de *laurus nobilis* originaire de Bejaia présente une DL50 orale ≥ 2000 mg/kg. Ce qui signifie que l'HE est légèrement toxique [294].

3.7. Étude de l'activité antidiabétique

Les rats mâles *Wistar Albinos* sont rendus diabétiques à l'aide de streptozotocine, un antibiotique isolé à partir de *Streptomyces achromogenes* [295]. La STZ est un analogue du glucose pour le récepteur GLUT2 qui abondamment exprimé dans les cellules B pancréatiques des rongeurs [296]. Cette substance pénètre dans les cellules pancréatiques à travers un transporteur du glucose et détruit massivement les cellules Béta des ilots de Langerhans avec

formations des radicaux libres qui transforment l'ADN [297][298]. Elle correspond à une fragmentation de l'ADN conduisant à l'activation de poly ADP-ribose synthétase avec déplétion du taux du NAD⁺ cellulaire [299].

Après l'installation du diabète, le traitement des différents lots peut commencer. Durant les premiers jours du traitement, un état de polyurie a été noté chez tous les rats diabétiques par rapport aux rats témoins sains avec une polydipsie et une polyphagie. Ces signes, observés chez les rats mâles, confirment l'installation du diabète. Les variations de la glycémie, du poids et les paramètres biochimiques sériques des rats mâles des différents lots sont notées dès la première semaine.

3.7.1. Évolution du poids des rats

Le poids corporel des rats mâles (exprimé en grammes) des sept lots (TS, TDNT, TDTM, DHE, DHY, DEM, DEA) et les résultats sont présentées dans la figure 3.21.

La variation du poids des rats mâles constitue un paramètre très important. La figure 3.21 mentionne le suivi régulier des rats mâles. Les résultats montrent, une différence de croissance entre les rats diabétiques non traités (témoins négatif : TDNT), celle des rats diabétiques traités par métformine (témoins positif), celle des rats témoins sains et ceux traités par les extraits de la plante (EM, EA, HE et HY). On note une augmentation significative du poids corporel chez les rats témoins sains et les rats diabétiques traités avec métformine (témoin positif), l'EM et l'EA. Cette évolution n'est pas appréciée chez les rats diabétiques non traités (témoins négatif : TDNT) et les rats diabétiques traités avec l'HE et l'HY, où on note une diminution significative du poids à partir de la première semaine du traitement jusqu'à la fin de l'expérience (Appendice G.4).

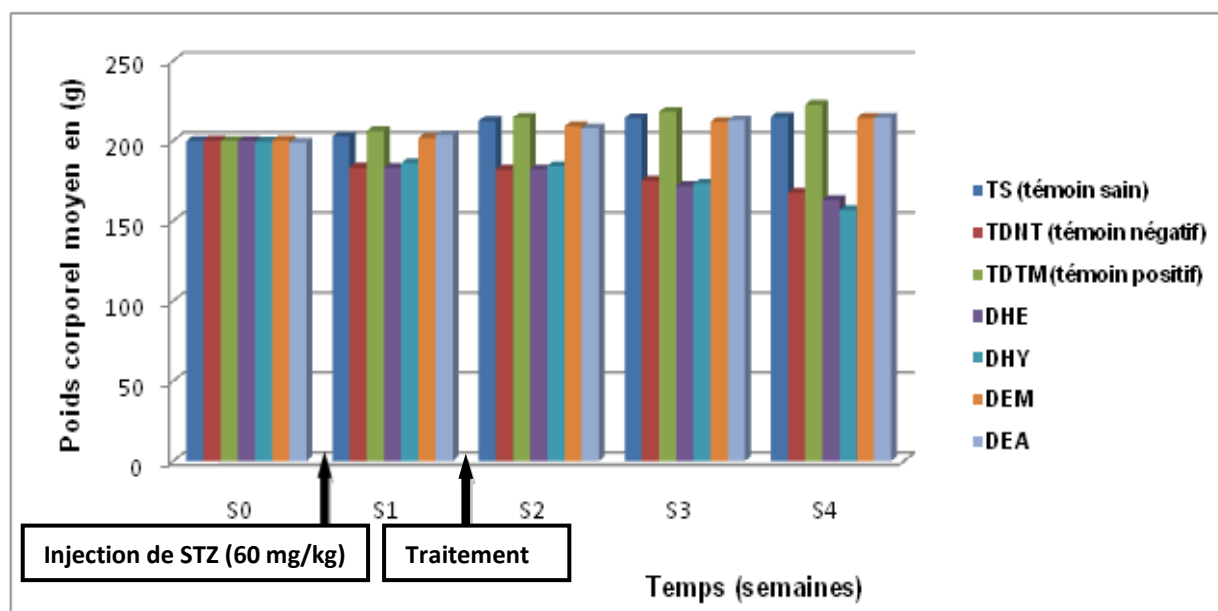


Figure 3.21 : Variation du poids corporel chez les rats témoins sains, diabétiques non traités (TDNT) et traités (TDTM, DEM, DEA, DHY et DHE) en fonction du temps

Cette perte de poids des rats diabétiques est due au catabolisme, plus particulièrement celui des lipides par lipolyse des tissus adipeux suite à l'insulino-déficience [300][301]. Cependant chez tous les lots diabétiques traités respectivement par l'extrait aqueux (250 mg/kg), l'extrait méthanolique (250 mg/kg) de la plante et le médicament metformine (500 mg/kg), on observe à la fin un gain de poids. L'amélioration des poids corporels des deux lots traités par les deux extraits (EM et EA) de la plante pourrait être expliquée par le pouvoir de la plante à restaurer le stock en triglycérides, grâce à l'amélioration de l'insulino-sécrétion et de la glycémie observée [302][303].

3.7.2. Évolution de la glycémie

La glycémie des rats mâles des lots a été suivie tout au long de l'expérimentation pendant trois semaines. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.22.

Le traitement des rats diabétiques a été initié à partir du premier jour après installation du diabète par gavage intra-gastrique journalier à dose de 500 mg/kg de metformine, de 250 mg/kg de l'EA, de 250 mg/Kg de l'EM, de 250 mg/Kg de l'HY et de 50 mg/Kg de l'HE. Après l'analyse statistique de ces résultats, nous

constatons que la glycémie des rats témoins sains n'a pas subi de variation significative ($p < 0.05$) au cours de l'expérimentation (Appendice G.4). Tandis que l'injection intrapéritonéale de STZ aux rats des lots diabétiques (traités par métformine, l'extrait aqueux, l'extrait méthanolique, l'hydrolat et l'huile essentielle) à conduit à une augmentation significative ($p < 0.05$) de leurs glycémies (Appendice G.4). Cette augmentation a atteint respectivement 3.31, 3.56, 3.45, 3.88 et 4.02 g/l.

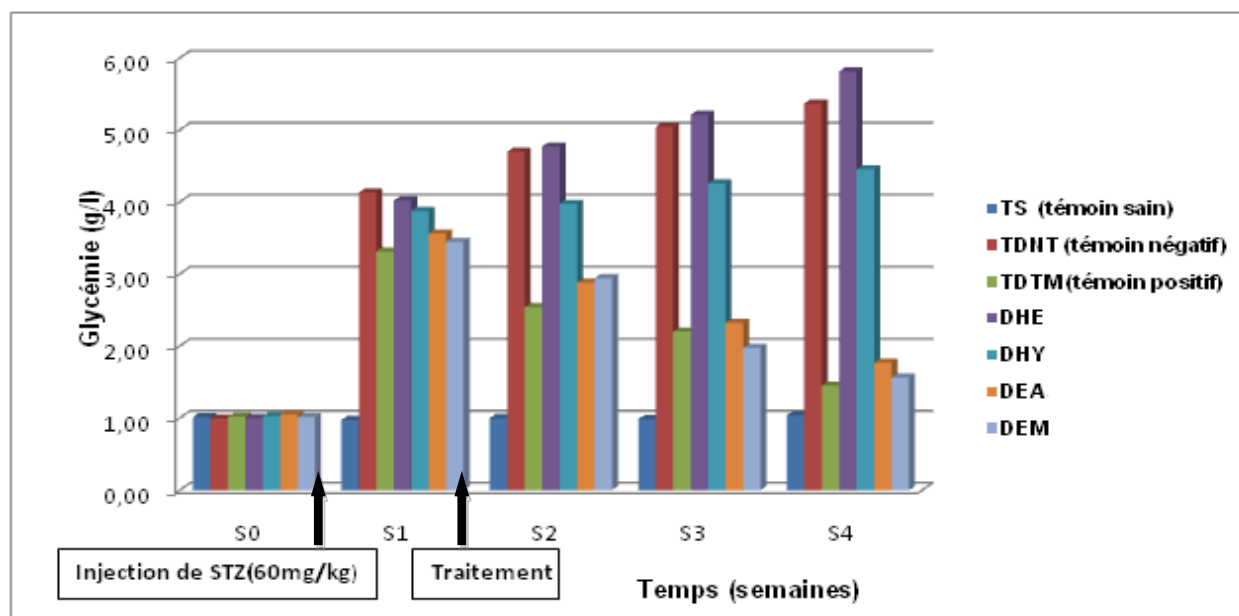


Figure 3.22 : Variation de la glycémie chez les rats témoins sains, diabétiques non traités (TDNT) et traités (TDTM, DEM, DEA, DHY et DHE) en fonction du temps

Pour les lots diabétiques traités, on note une diminution significative ($p < 0.05$) de la glycémie chez les rats diabétiques traités avec le métformine (témoin positif), l'EM et EA (Appendice G.4). Cette diminution débute dès la première semaine du traitement. A la fin du traitement la glycémie devient normale. L'effet de l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux de *Laurus nobilis* sur la réduction de la glycémie des rats soumis à une hyperglycémie permanente pourrait être lié à la présence des flavonoïdes comme il a été souligné par certains auteurs [304][305]. Les polyphénols agissent en effet en améliorant la sensibilité des cellules de l'organisme à l'insuline, ce qui permet de réduire l'incidence du diabète de type 2 [306][307][308][309]. Dans les extraits de *Laurus nobilis* en plus des flavonoïdes, on a noté la présence des saponines. Toute fois une seule étude a montré l'effet antihyperglycémiant des saponines [310].

Les sulfamides hypoglycémiantes comme le métformine se lient à un récepteur spécifique, sur la membrane des cellules β pancréatiques au voisinage du canal potassique ATP dépendant et provoquent la fermeture de ce dernier. Ceci va entraîner une dépolarisation membranaire des cellules β avec ouverture des canaux calciques voltage dépendant et un influx de Ca^{2+} déclenchant ainsi par exocytose l'extrusion des granules de sécrétion d'insuline [311]. Il serait difficile de rapprocher le mode d'action des extraits méthanolique et aqueux à celui du métformine à cause du mélange de composés pouvant interférer ou avoir une action synergique dans ces extraits.

3.7.3. Évaluation des paramètres lipidiques

Les paramètres biochimiques sériques des rats mâles des différents lots sont notés à la fin du traitement (Tableau 3.14).

Tableau 3.14 : Évaluation des paramètres sériques

Lots	Dose	Cholestérols totale (g/l)	Triglycérides (g/l)
TS	10 ml/kg NaCl 9%	0,6800 \pm 0,01871	0,6240 \pm 0,02702
TDNT (témoin négatif)	10 ml/kg NaCl 9%	1,5360 \pm 0,02074	1,8100 \pm 0,03674
TDTM (témoin positif)	500 ml/kg	0,9540 \pm 0,00894	1,2960 \pm 0,00894
DHE	50 ml/kg	1,2660 \pm 0,02702	1,4360 \pm 0,01517
DHY	250 ml/kg	1,3280 \pm 0,00837	1,4060 \pm 0,01342
DEA	250 ml/kg	1,0160 \pm 0,00548	1,3260 \pm 0,00548
DEM	250 ml/kg	0,9280 \pm 0,13882	1,3000 \pm 0,01581
Les valeurs exprimées en moyenne \pm SEM, *p < 0,05.			

Les résultats accordés au tableau 3.14 montrent une diminution significative de cholestérol entre les rats des lots diabétiques traités par le métformine, l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique par rapport aux rats du lot diabétique non traité. Les résultats montrent une augmentation significative ($p < 0,05$) entre les rats diabétiques non traités par rapport aux rats du lot témoin sain. La diminution du cholestérol peut résulter de la modification du métabolisme des lipoprotéines en

augmentant l'activité de la lécithine cholestérol acyl transférase ou en augmentant l'absorption des LDL par augmentation de leurs récepteurs [312]. Au contraire KRITCHEVESKY pense que la diminution des lipides plasmatiques est la conséquence de la diminution de l'absorption intestinale du cholestérol qui se lie aux acides biliaires et l'augmentation de la sécrétion biliaire [313].

La variation des triglycérides a montré qu'il existe une augmentation significative entre les rats diabétiques non traités par rapport aux rats du lot témoin sain (TDNT:1,81 g/l vs TS:0,62 g/l). L'étude statistique a montré une baisse significative ($p < 0,05$) (Appendice G) du taux de triglycérides entre les rats des lots diabétiques traités par le métformine, l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique par rapport aux lots des rats diabétiques non traités (TDTM: 1,29 g/l ; DEM: 1,300 g/l et DEA: 1.32 g/l vs TDNT: 1.81 g/l). L'existence des flavonoïdes dans les extraits de *Laurus nobilis* semble être un facteur contribuant à l'amélioration du taux lipidique chez les rats diabétiques. Cette suggestion est supposée par PALSAMY et ses collaborateurs qui ont montré le même effet chez des rats diabétiques traités par un flavonoïde qui est le resveratrole [314]. De plus la baisse du taux des lipides pendant le diabète diminue par conséquence le risque des complications cardiovasculaires [315].

Certains auteurs, ont rapporté que l'administration par voie orale des feuilles de *Laurus nobilis* chez les patients atteints du diabète type 2, a eu comme conséquence la réduction significative de la concentration du glucose dans le sang. Ainsi que le traitement par les feuilles de *Laurus nobilis* a causé une réduction significative en cholestérol et en triglycérides [316][317].

CONCLUSION

A l'heure actuelle, les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme une source de matières premières essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments.

Le présent travail a porté sur l'étude des extraits volatiles (HE, HY), des extraits organiques (EM) et des extraits aqueux (EA) de feuilles de *Laurus nobilis*, et nous avons tenté de contribuer à sa valorisation en Algérie en établissant une relation entre sa composition chimique et ses activités biologiques.

L'extraction de l'HE de feuilles de *Laurus nobilis*, est effectuée par hydrodistillation. La détermination du rendement en huile essentielle a montré une rentabilité égale à 0,82%. Le rendement en hydrolat est de 0,46 % ce qui est très intéressant à l'échelle industrielle.

Les analyses physico-chimiques réalisées sur l'HE montrent que les paramètres étudiés sont conforme aux normes établies par les différentes pharmacopées et proches de certains travaux antérieurs.

Le profil chromatographique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. a permis d'identifier 12 composés en l'occurrence, le 1,8-cinéol et le linalol apparaissent comme les constituants majoritaires de l'HE avec respectivement, 24,658% et 18.563%, suivi de α -terpineol (9.875%), de Methyl eugenol (9.871%), d'Eugenol (9.478%) et de L-4-terpineol (9.382%).

La fraction volatile de l'hydrolat est composée principalement par le 1.8 cineol (15.204%), accompagné par d'autres constituants dont les teneurs sont relativement faibles : linalol (8.456%), terpinylacetate (7,237%) et sabinène (6.352%).

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

L'étude microscopique au niveau du limbe et du pétiole de feuilles de *Laurus nobilis* a mis en évidence la présence de grosses poches entourées de cellules sécrétrices.

La détermination des rendements en extraits bruts a montré une rentabilité importante en extraits polaires (EM et EA) chez la plantes avec des valeurs respectivement de 20.45 % et de 18.57 %.

Le criblage phytochimique avec des tests spécifiques a permis de caractériser les flavonoïdes, les tanins, les proanthocyanidols, les alcaloïdes, les saponosides, les senosides, les mucilages, les coumarines, les caroténoïdes, les stéroïdes, les stérols et les terpènes. Ces métabolites secondaires ont de grandes valeurs thérapeutiques.

L'évaluation du contenu en polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-ciocalteu indique que, les deux extraits méthanolique et aqueux sont riches en composés phénoliques mais avec des valeurs variables en fonction des solvants d'extraction. Les teneurs les plus élevées ont été détectés dans l'extrait méthanolique de *Laurus nobilis* ($179,09 \pm 4,55 \mu\text{g EAG/mg d'extract}$) tandis que, les plus basses sont enregistrées dans l'extrait aqueux ($132,63 \pm 2,14 \mu\text{g EAG/mg d'extract}$).

De même, la détermination du contenu en flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 nous mène à conclure que, les teneurs en flavonoïdes varient d'un extrait à l'autre, selon les méthodes et les solvants utilisés pour l'extraction. Des teneurs maximales sont constatées dans l'extrait méthanolique de *Laurus nobilis* ($9,68 \pm 1,64 \mu\text{g EQ/mg d'extract}$), tandis que, des teneurs minimales sont enregistrées dans l'extrait aqueux ($2,85 \pm 1,97 \mu\text{g EQ/mg d'extract}$).

L'évaluation du pouvoir antimicrobérien de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* par la méthode de diffusion en milieu solide a révélé que l'HE possède un large spectre d'action vis-à-vis de tous les microorganismes testés.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI), les concentrations minimales bactéricides (CMB) et les concentrations minimales fongicides (CMF) ont été déterminées par la méthode de dilution sur gélose. Certains, microorganismes ont été sensibles aux huiles essentielles avec des valeurs de CMB et CMF comprises entre 2 % et 0.03 %. Ces résultats sont prometteurs et favorisent son ajout dans les produits pharmaceutiques.

L'estimation de l'activité antioxydante des différents extraits de *Laurus nobilis* a été évaluée par l'étude de leur pouvoir à piéger 50 % du radical DPPH (IC₅₀), réduction du fer (FRAP) et par le test de β -carotène/acide linoléique. Les résultats indiquent que l'extrait méthanolique de *Laurus nobilis* présente la meilleure activité antioxydante pour les trois méthodes. Ceci nous a permis de déduire que l'activité antioxydante de *Laurus nobilis* est en relation avec la quantité de polyphénols et de flavonoïdes présents dans la plante.

Les résultats de la toxicité aiguë de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. chez les souris femelles et mâles ont permis de la classer parmi les huiles légèrement toxiques par voie orale, la DL₅₀ étant de 748,75±1,25 mg/kg. Tandis que l'extrait aqueux, l'extrait méthanolique et l'hydrolat de *Laurus nobilis* ne présente aucune toxicité aiguë même après deux semaines d'observation.

L'injection intrapéritonéale de streptozotocine à une dose de 60 mg/kg de poids corporel chez les rats mâles a induit des perturbations métaboliques glucidique, lipidique et des variations du poids corporel. Au contraire, le traitement des rats diabétiques par l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux de *Laurus nobilis* corrige ces perturbations et améliorent la résistance contre le diabète.

En perspectives, nos travaux sont une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies incluant:

- Extraction et isolement des produits du métabolisme secondaires avec un degré de pureté suffisant pour les constituants de chaque famille;
- Et il serait également intéressant, de tester les différentes familles ou molécules isolées, in vivo sur différents modèles biologiques, afin de trouver une application thérapeutique des molécules actives isolées.

APPENDICE A

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

AA	: Acide ascorbique
AFNOR	: Association Française de normalisation
ATCC	: American Type Culture Collection
AAR	: Activité antioxydante relative
BHT	: Hydroxytoluène butylé
CG/MS	: Chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
CMB	: Concentration minimale bactéricide
CMF	: Concentration minimale fongicide
d^{20}	: Densité relative à 20 °C
DL50	: Dose létale
DL100	: La première dose qui entraîne la mort de 100% de l'effectif des souris du lot
DO	: Densité optique
DPPH	: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil
DHE	: Groupe diabétique traité par l'huile essentielle
DHY	: Groupe diabétique traité par l'hydrolat
DEM	: Groupe diabétique traité par l'extrait méthanolique
DEA	: Groupe diabétique traité par l'extrait aqueux
EDTA	: Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EM	: Extrait méthanolique
EA	: Extrait aqueux
FRAP	: Ferric Reducing Antioxidant Power
HY	: Hydrolat
HE	: Huile essentielle
HNMN	: Muséum national d'Histoire naturelle
IA	: Indice d'acide
IC50	: Concentration inhibitrice à 50%
IE	: Indice d'este
IR	: Indice de réfraction
MVF	: Masse végétale fraîche
MVS	: Masse végétale sèche
MH	: Muller-Hinton
PDA	: Potato-Dextrose-Agar
PI	: pourcentage d'inhibition (PI)
Ptp	: Poids de tube plein
Ptv	: Poids de tube vide
PPM	: Partie par million
pH	: potentiel d'hydrogène
R	: rendement
SAB	: Sabouraud
STZ	: Streptozotocine
TH	: Taux d'humidité
T	: Témoin
TOC	: Tocophérol

TS : Groupe control sain témoin
TDNT : Groupe diabétique non traité (control négatif)
TDTM : Groupe diabétique traité par metformine (control positif)
Trs : Tours

APPENDICE B MATÉRIELS UTILISÉS

- Appareil DEAN et STARK
- Agitateur magnétique (HANNA)
- Ampoule à décanter 500 ml
- Appareil d'hydrodistillation type Cleavenger
- Anse de platine
- Bain marie (nuve nb 20)
- Bec benzène
- Balance (Kern Kb)
- Balance de précision (Kern ALS 220-4N)
- Ballon 250, 500, 1000 ml
- Bécher 100 ml ,250 ml et 500 ml.
- Ballon à fond plat à col rodé
- Bistouri
- Boîtes de pétri
- Burette 20 ml
- Broyeur électrique
- Centrifugeuse (nuve NF 200)
- Chauffe ballon
- Chromatographe (HP-6890 sériell) couplé à un spectromètre de masse (5973 N MS)
- Ciseau
- Creuset en platine
- Cage pour souris
- Cage pour rats
- Distributeur de la paraffine
- Disques d'antibiogramme stériles
- Entonnoir en verre
- Erlen Mayer 100, 500 ml
- Etuve d'incubation (nuve EN 50)
- Etuve de stérilisation (nuve FN 400)
- Four à moufle
- Loupe binoculaire (CARL ZEISS)
- Loupe binoculaire à camera (Motic ST-30)
- Lame en verre et lamelles
- Micro pipette 100 μ l
- Micro pipette 1000 μ l
- Micro pipette 50 μ l
- Micro pipette 25 μ l
- Microscope photonique à camera (Motic BA 200)
- Microscope photonique binoculaire (Motic)
- Microtome manuel (LEICA RM 2125 RT)
- papier aluminium
- Papier filtre
- pH mètre (HANNA pH 211)

- Pince
- Pipettes graduées de 1, 5, 10, 20 et 50 ml
- Pipettes pasteurs
- Plaque chauffante (Stuart CB162)
- Portoir
- Réfrigérant à eau
- Rota vapeur (Stuart RE300)
- Pinces
- Portoirs
- Plaque refroidissante
- Pycnomètre
- Polarimètre automatique de type SCHMIDT HAENSCH
- Plaque chauffante
- Pied-colis
- Sonde de gavage pour souris
- Sonde de gavage pour rats
- Spatule inox
- Spectrophotomètre UV-VIS (WPA Lightwavell)
- Soxhlet
- Scalpels
- Seringues (1 ml ,5 ml, 10 ml et 20 ml)
- Tube à essai
- tube capillaire verre
- Vortex

APPENDICE C RÉACTIFS UTILISÉS

- 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil
- Ammoniaque
- Alcool iso amylique
- Acétate de sodium
- Acide acétique
- Acide ascorbique
- Acide chloridrique
- Acide Galique
- Acide chlorhydrique
- Acide sulfurique
- Acide linoléique
- Acide trichloracétique
- Ammoniaque
- Anhydride acétique
- β -carotène
- Bicarbonate de Sodium
- Butanol
- Baume de Canada
- Carbonate de sodium
- Chlorhydrate de naftifine
- Chloroforme
- Carmin aluné
- Copeaux de magnésium
- Chlorure de sodium
- Chlorure de fer
- Chlorure d'aluminium
- Chlorure de mercure
- Dichlorométhane
- Eau distillée
- Eau physiologique
- Éther de pétrole
- Éther diéthylique
- Éthanol 100%, 95% et 70%
- Folin Ciocaltheu
- Ferricyanure de potassium
- Formol
- Gélose nutritive
- Hypochlorite de sodium
- Hydroxyde de potassium
- Hydroxytoluène butylé
- Iodure de potassium
- Méthanol

- Milieu Muller Hinton
- Milieu Sabouraud
- Milieu PDA
- Nitrate de bismuth
- Paraffine
- phosphomolybdique
- phosphotungstique
- Quercetine
- Rouge Congo
- Rutine
- Réactif de dragendroff
- Sulfate de sodium anhydre
- Streptozotocine
- Trichlorure d'antimoine
- Trichloride d'aluminium
- Tween 40
- Tween 80
- Toluène
- Vert de méthyle
- α tocophérol

APPENDICE D PROTOCOLES UTILISÉS

1. Technique histologique (coupe au microtome)

La technique nécessite 3 étapes fondamentales :

1.1. Fixation des organes

Pour la fixation de nos organes (feuilles et pétioles), nous avons utilisé le mélange formol alcool, acide acétique (FAA : 8v/1v/1v).

Un passage sous vide dans le dessiccateur 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 du tissu, en l'occurrence de l'organe végétal, et éviter ainsi une désorganisation des structures.

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

Après la fixation, les organes sont trempés dans l'éthanol 70°. Cette opération assure une bonne conservation des organes pendant plusieurs mois [111].

1.2. 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.

1.2.1. Déshydratation

C'est le traitement par l'éthanol de concentration progressivement croissante, utilisée pour amorcer l'extraction de l'eau ou autres produits [111].

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

- Éthanol 95° pendant 1 heure ;
- Éthanol 95° pendant 1 heure ;
- Éthanol 100 ° pendant 1heure ;
- Éthanol 100° pendant 1heure ;

- Éthanol 100° pendant 1 nuit.

1.2.2. 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 [111].

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

- Toluène + alcool (1V /1V) pendant 30 mn ;
- Toluène pur pendant 1heure ;
- 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 de 58 °C à 60 °C.

1.2.3. Inclusion à la paraffine

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

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.

Nous obtenons à la fin des blocs où les fragments sont parfaitement inclus. Le passage à l'étape suivante nécessite une heure d'attente au minimum [111].

1.3. Confection des coupes et coloration

Les organes inclus dans la paraffine sont débités en coupes séries d'une épaisseur de 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 % puis séchées à l'aide d'un papier hygiénique, numérotées avec un diamant puis étalées par une eau gélatineuse préparée par 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 [111].

1.3.1. 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 [111].

1.3.2. 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 [111].

1.3.3. 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 ;
- Les coupes sont disposées dans l'alcool 90 % pour y subir 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 [112].

2. Cinétique d'extraction

- Mode opératoire

On introduit 100 g de feuille fraîche 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 12°C à 13°C. Ainsi, la vapeur se condense en gouttelettes qui seront récupérées dans des Erlenmeyers à cols rodés durant 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. Dans l'ampoule on observe deux phases distinctes non miscibles : L'une des phases étant aqueuse et plus dense, elle occupe la partie inférieure tandis que l'autre, moins dense, 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 (Ptv). Après l'évaporation totale du solvant, les tubes sont à nouveau pesés pour avoir le poids des tubes pleins (Ptp).

La différence entre (Ptv) et (Ptp) nous donnera le poids de l'huile essentielle, pour le calcul du rendement.

3. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne (aromatogramme)

- Protocole expérimental

- Préparation de l'inoculum

Les suspensions microbiennes sont effectuées en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées et identiques de chaque jeune culture 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 à l'exception de *Staphylococcus aureus* dont la longueur d'onde se situe 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 boîtes 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.

4. Détermination des CMI

- 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 (Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures) 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 48h 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.

5. Détermination des CMB/CMF

- 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 paillasse;

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 ;

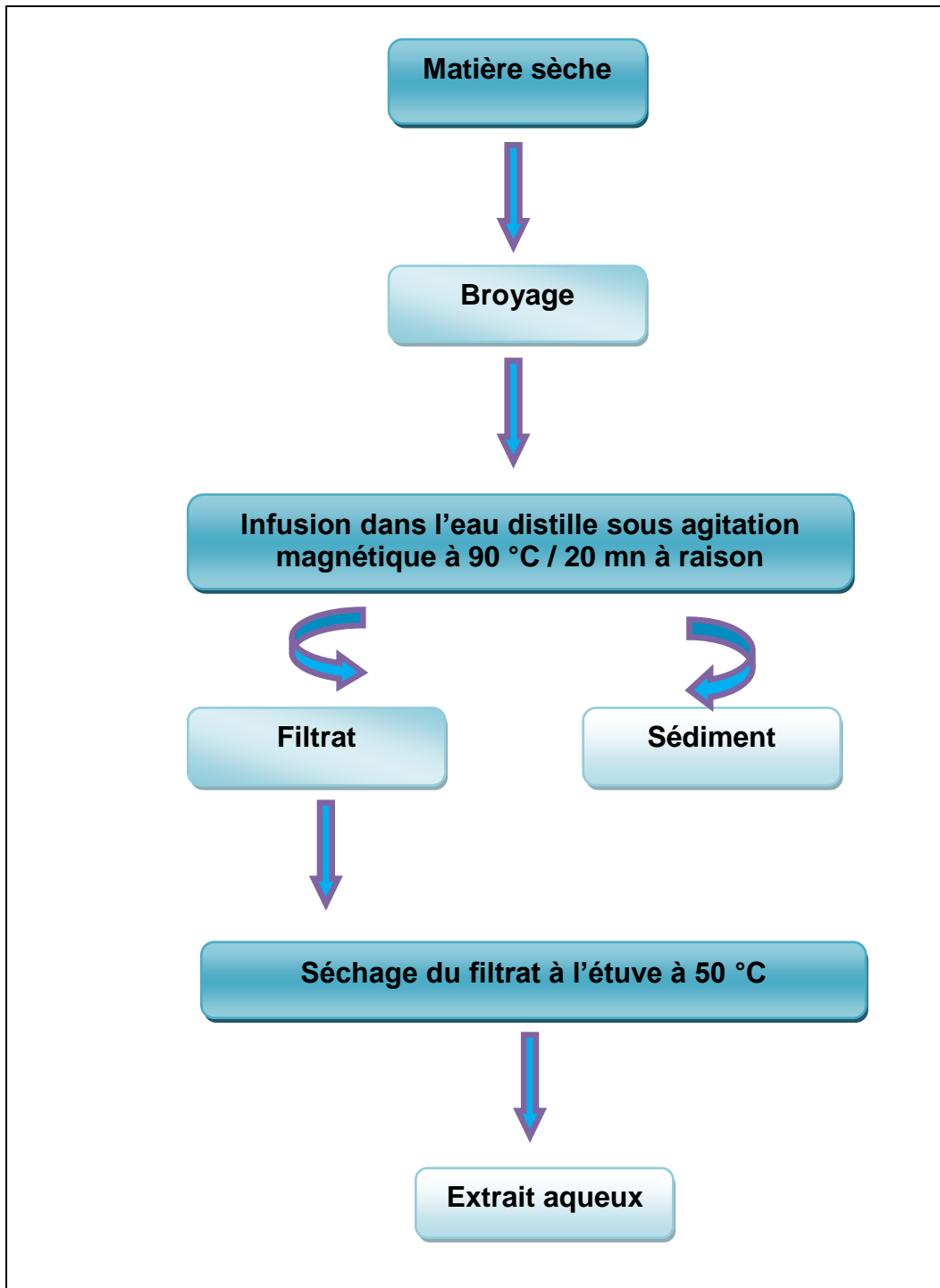
On replace les disques dans des boîtes de Pétri déjà préparées ;

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

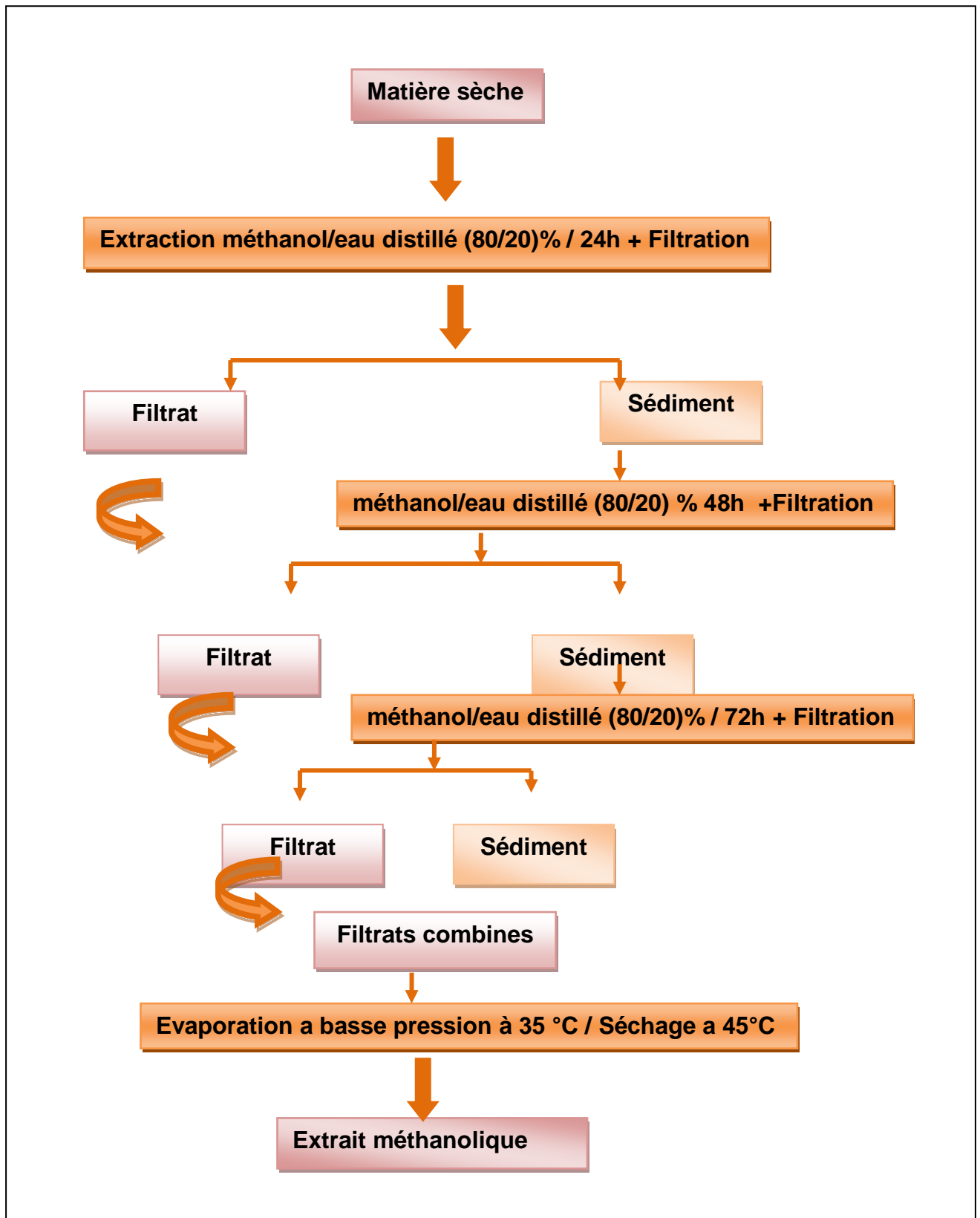
Effectuer une lecture à l'œil nu, la CMB et CMF sera la où aucune subcroissance d'une souche donnée n'est constatée après subculture.

APPENDICE E

1. Protocole de préparation de l'extrait aqueux



2. Protocole de préparation de l'extrait méthanolique



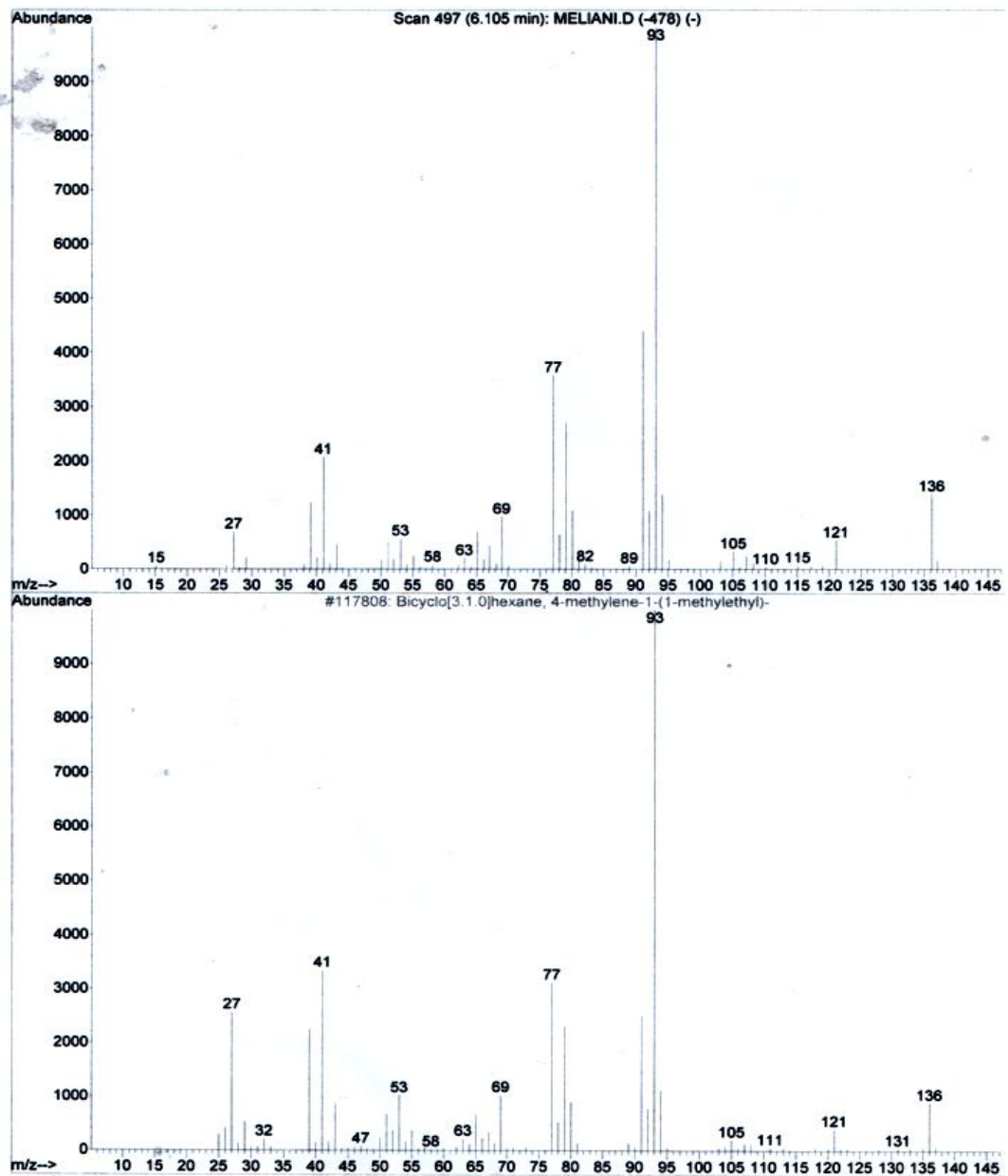
APPENDICE F

1. Chromatogramme de l'HE de *Laurus nobilis* L. extraite par hydro distillation et analysée par CG-MS

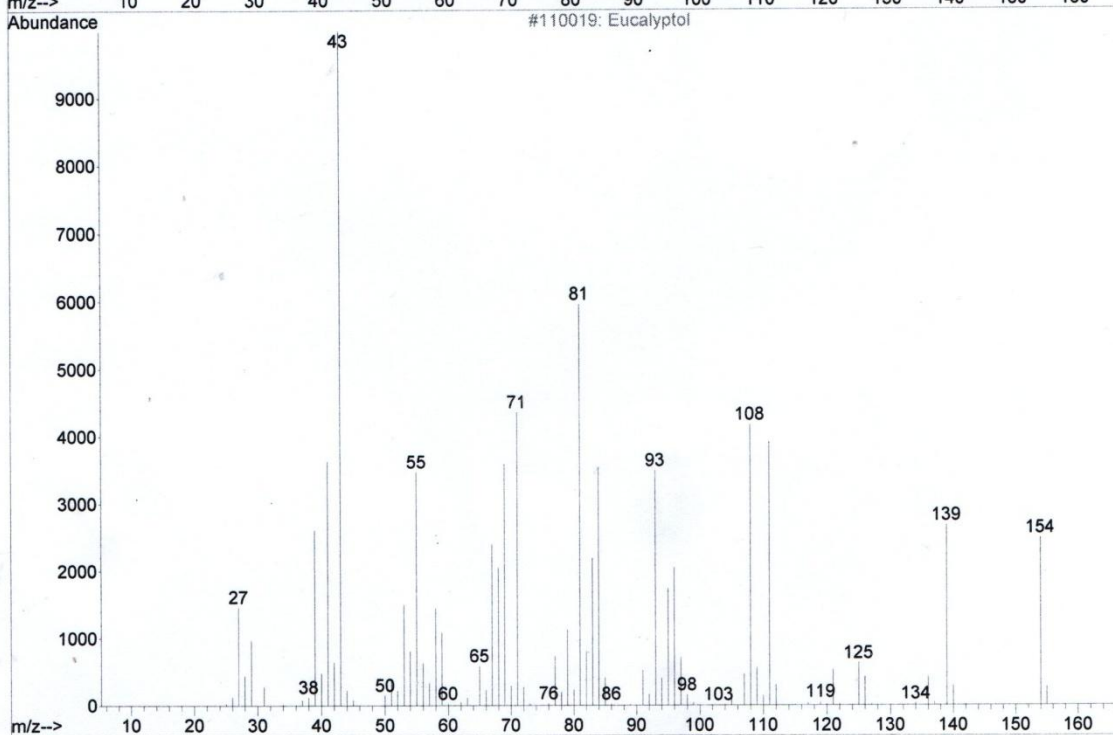
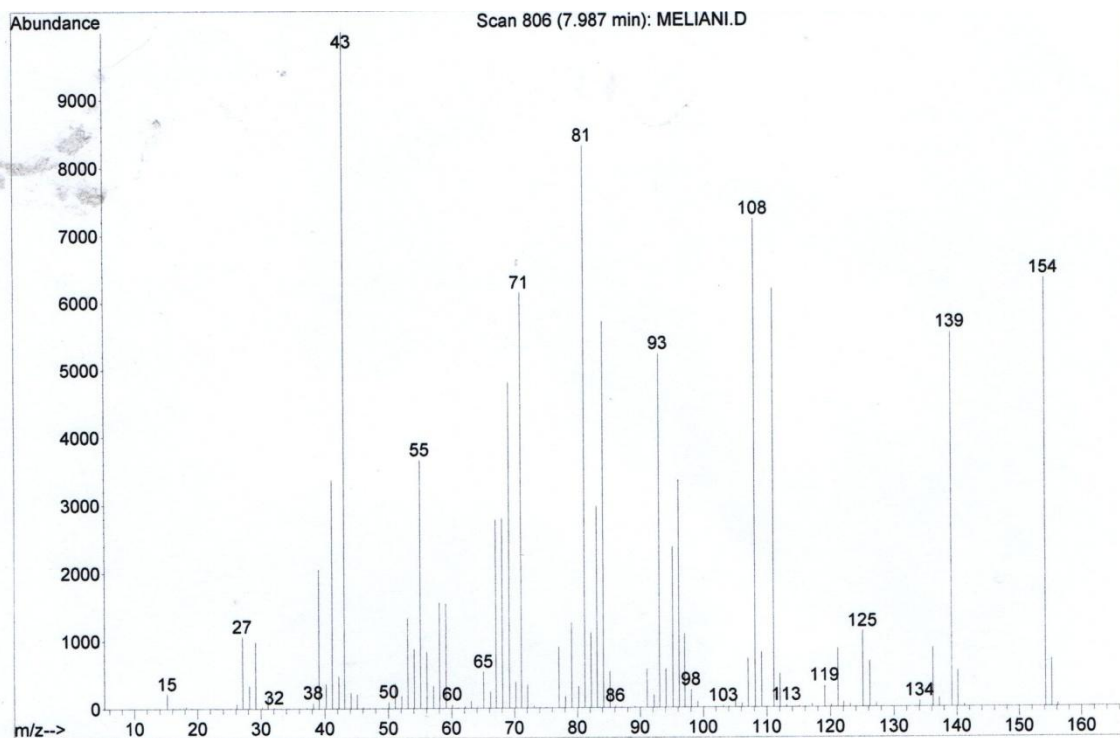
1.1. Interprétation du chromatogramme:

Chaque pic a été soumis à une analyse par spectrophotométrie de masse permettant ainsi d'identifier chaque molécule.

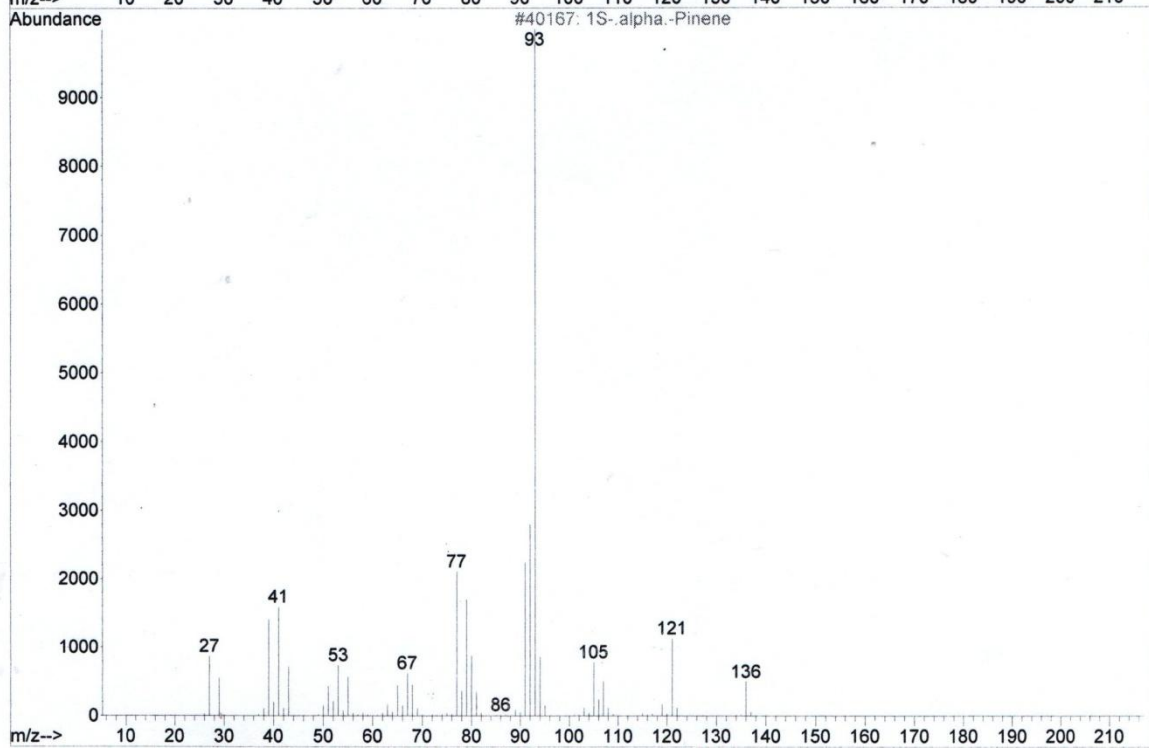
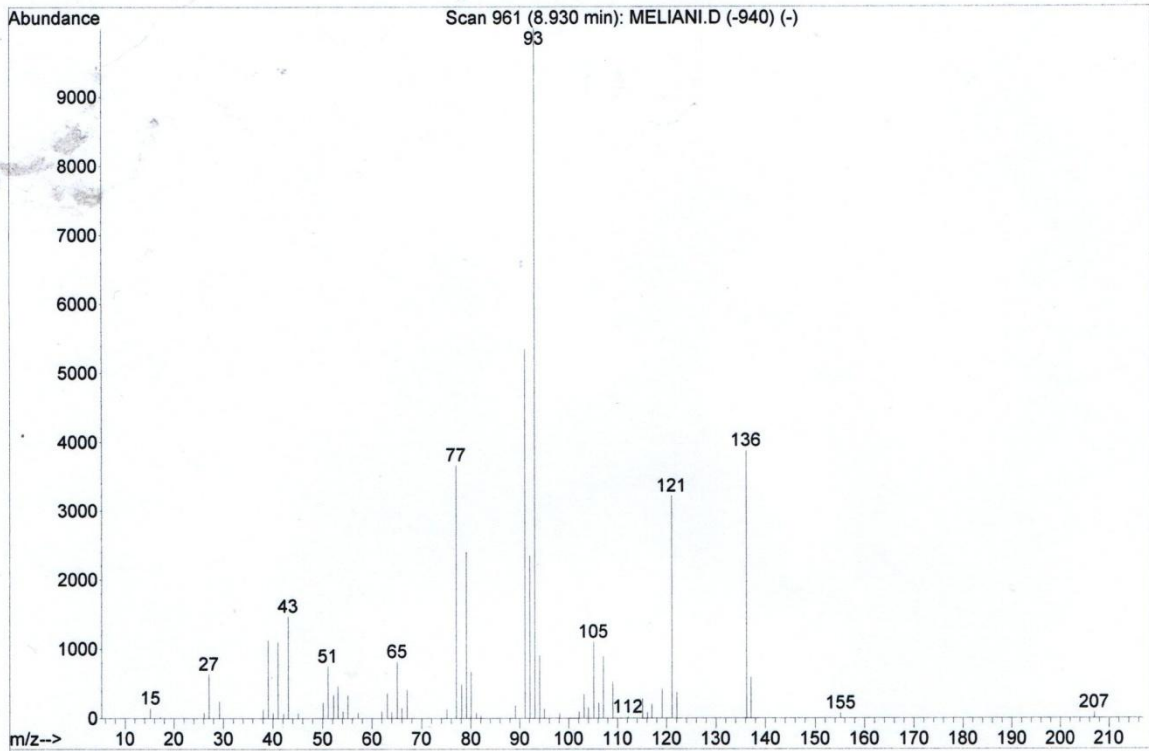
➤ t= 6.105 min
Spectre de masse



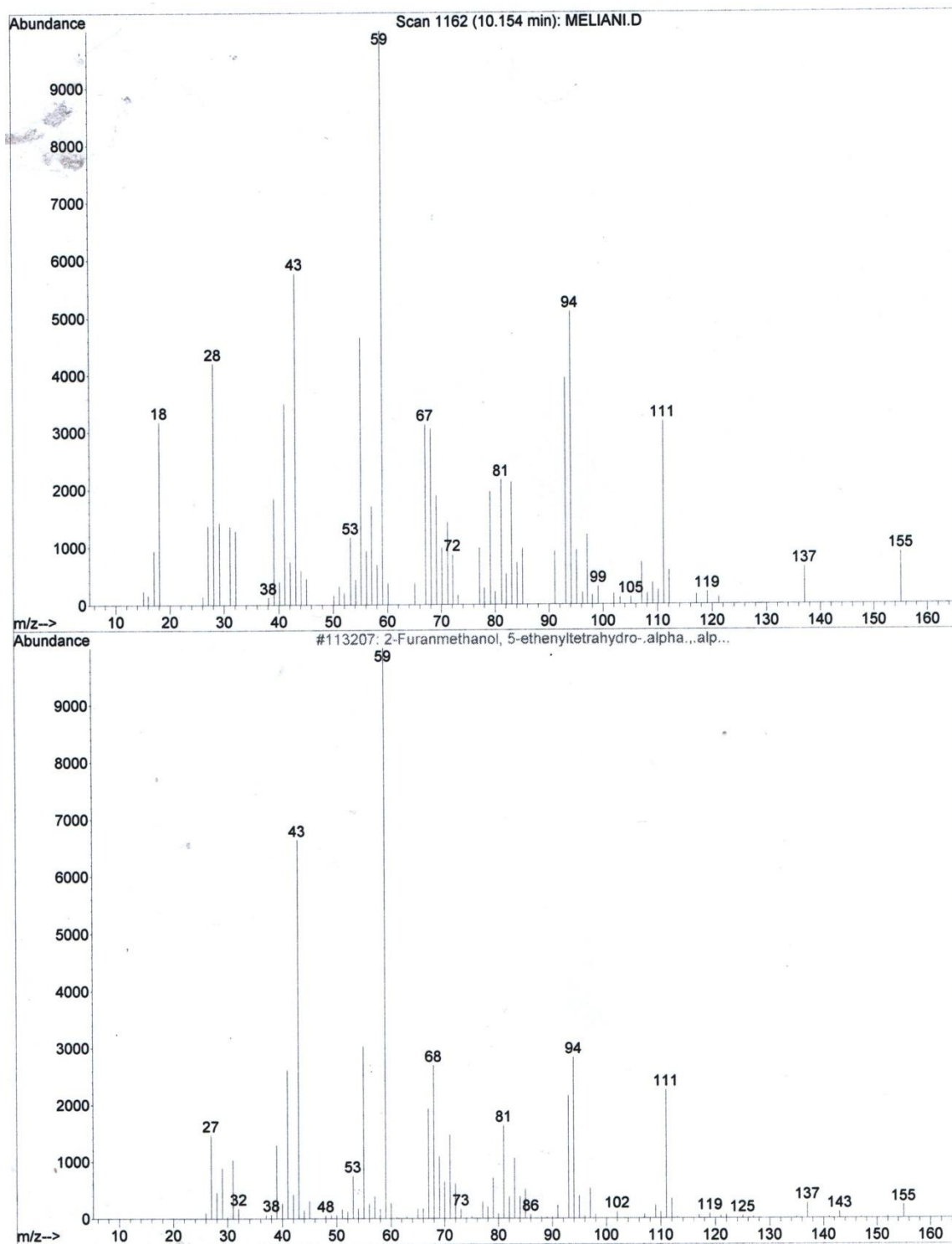
➤ t= 7.987 min
Spectre de masse



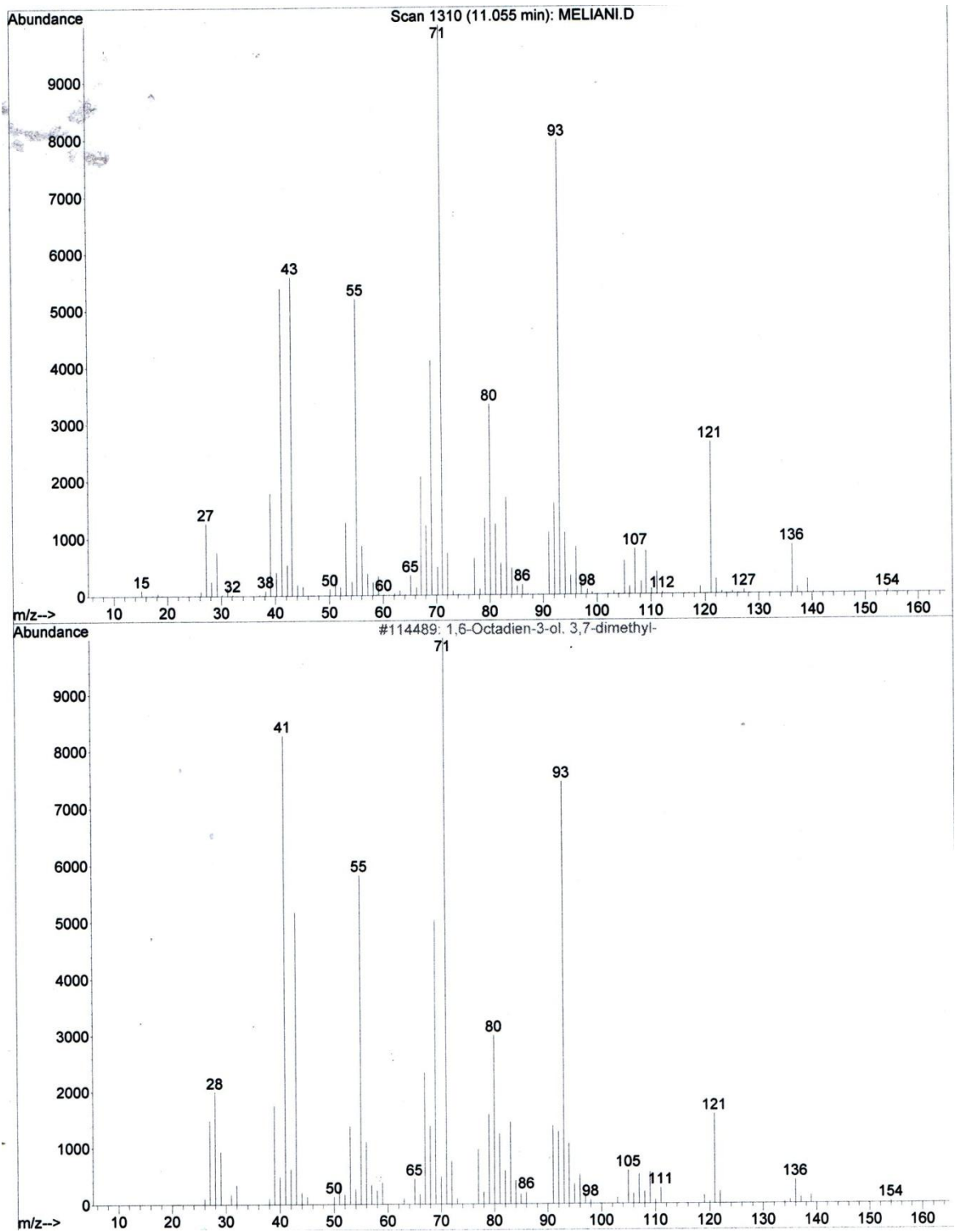
➤ t= 8.930 min
Spectre de masse



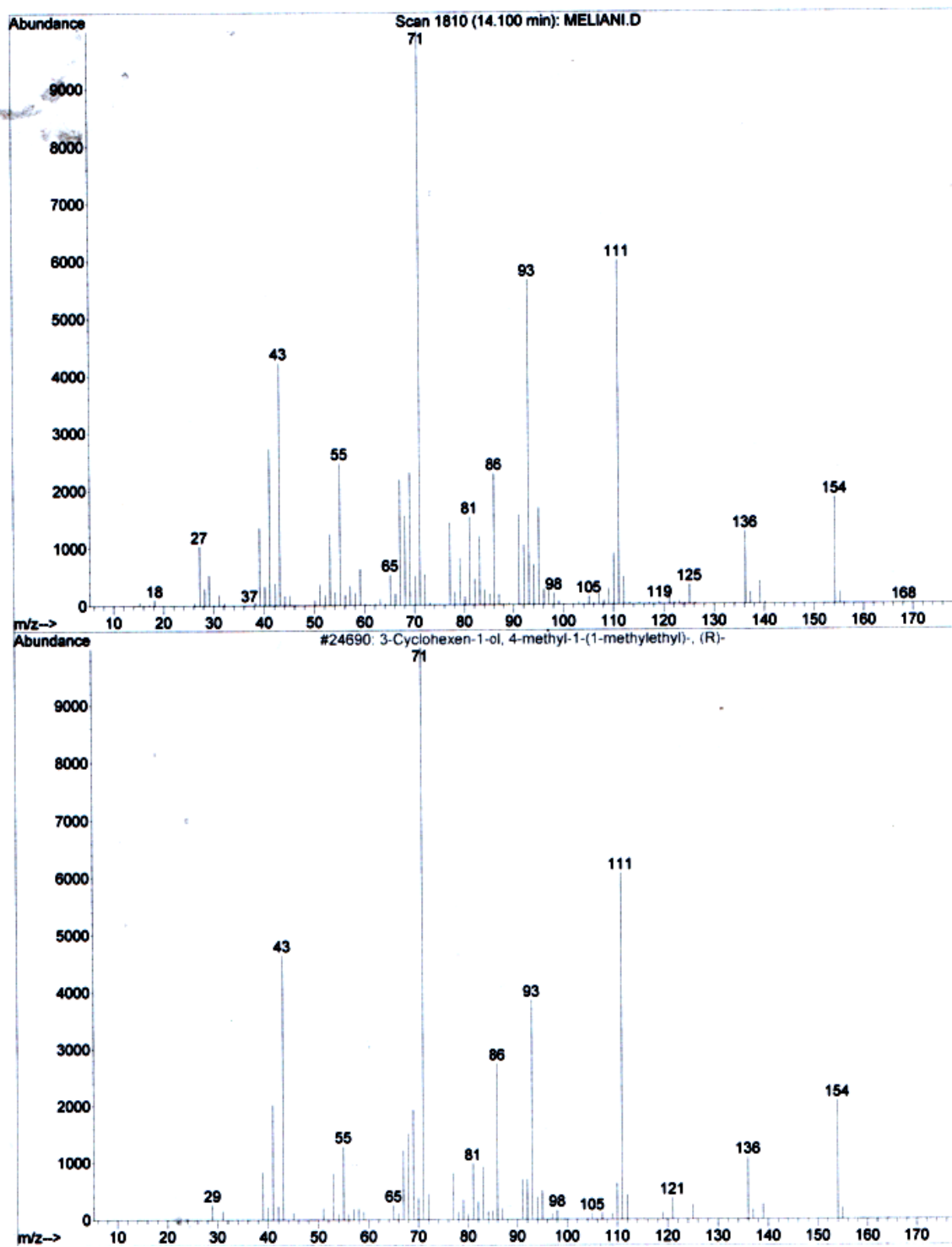
➤ t= 10.154 min
Spectre de masse



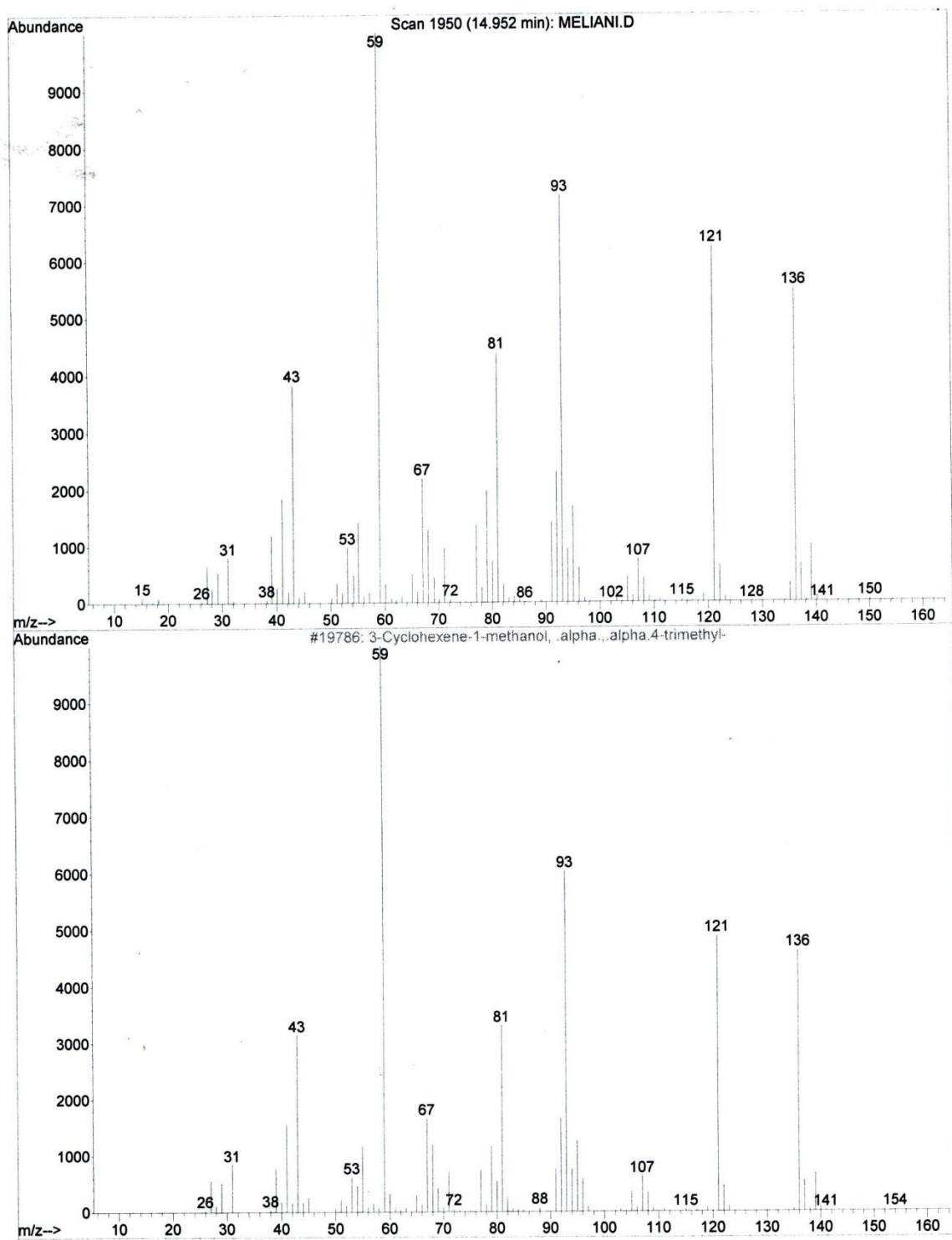
➤ t= 11.055 min
Spectre de masse



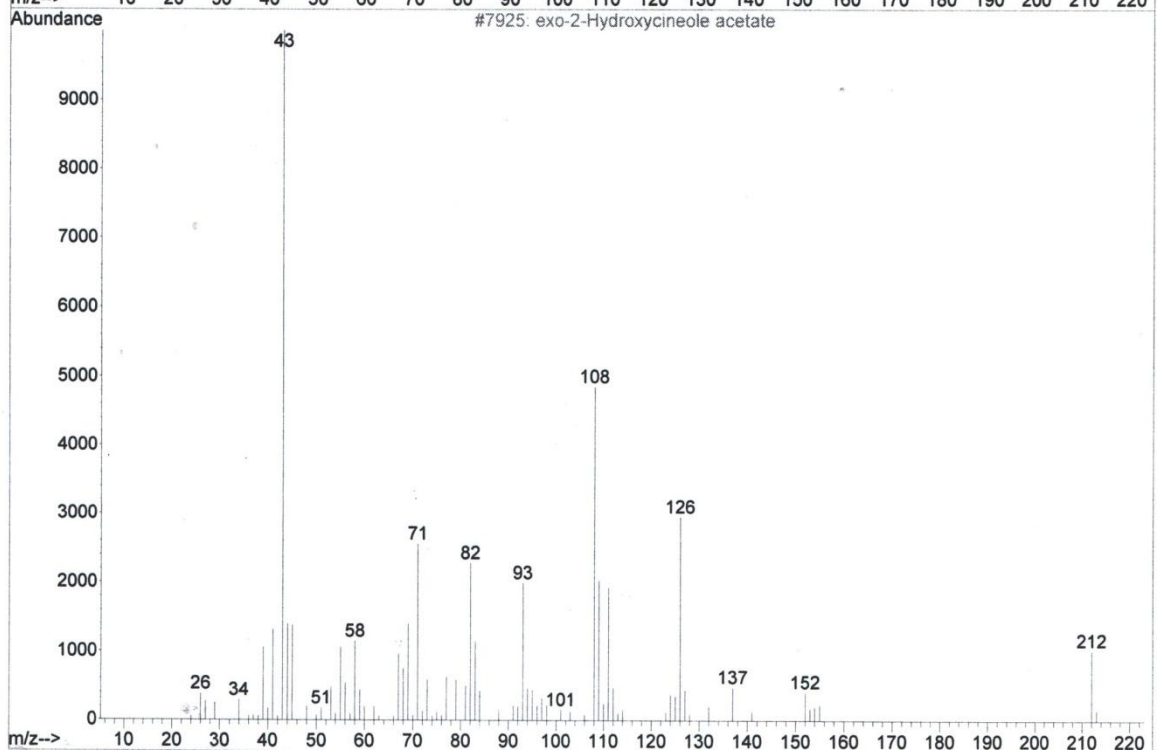
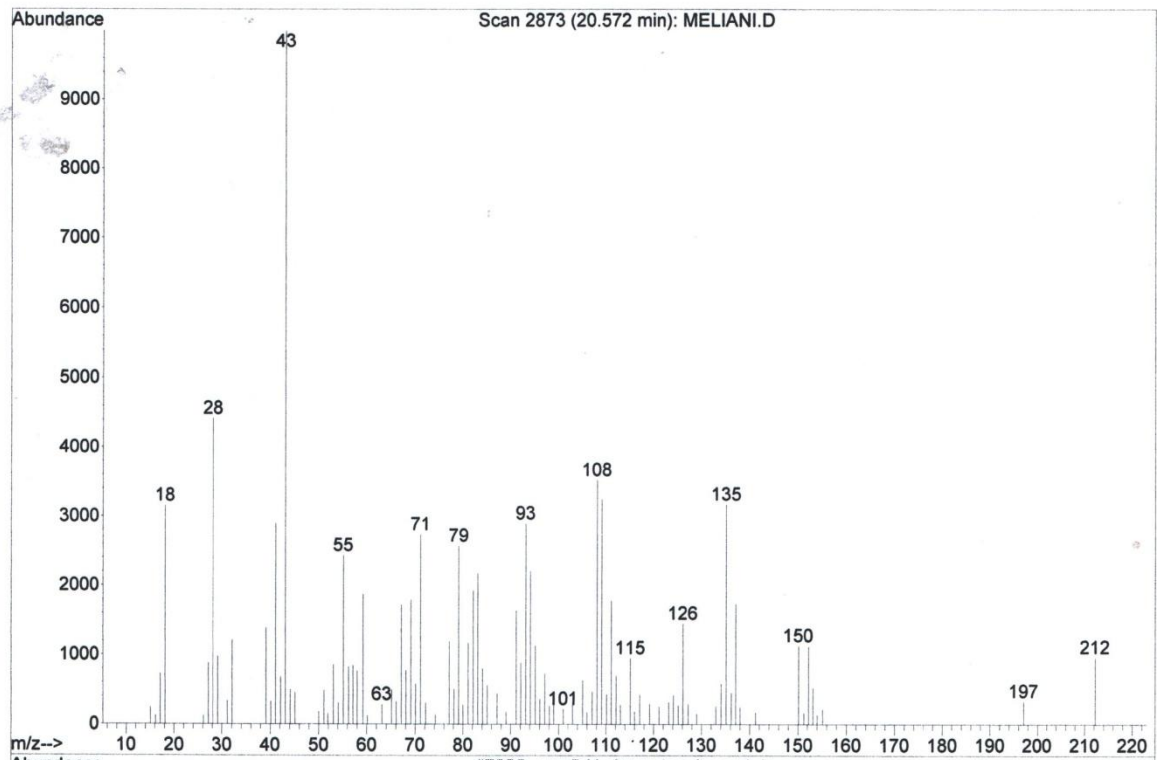
➤ t= 14.100 min
Spectre de masse



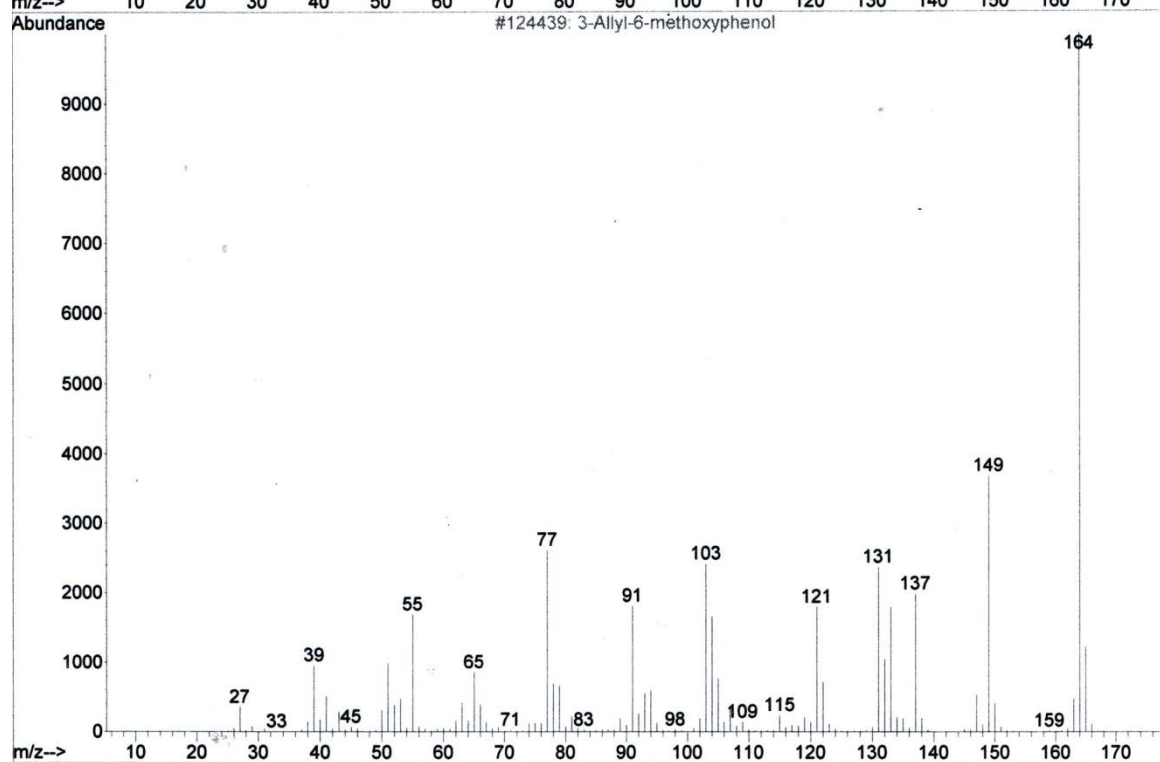
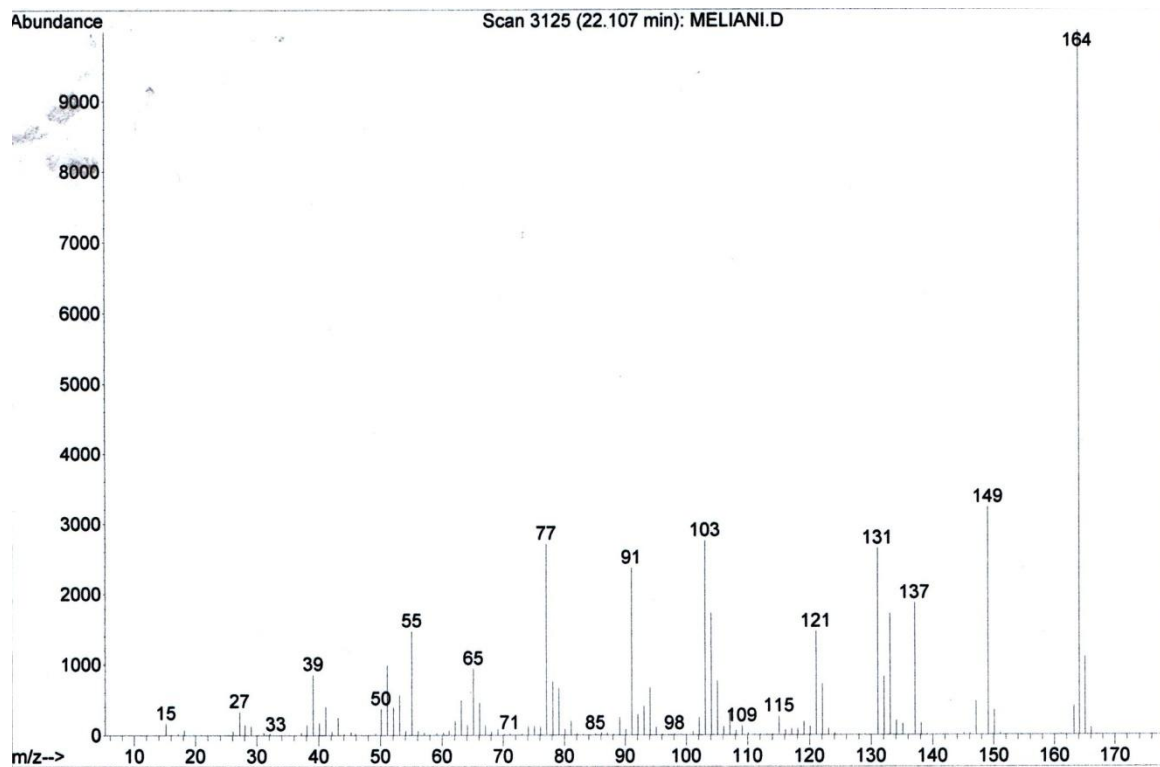
➤ t= 14.952 min
Spectre de masse



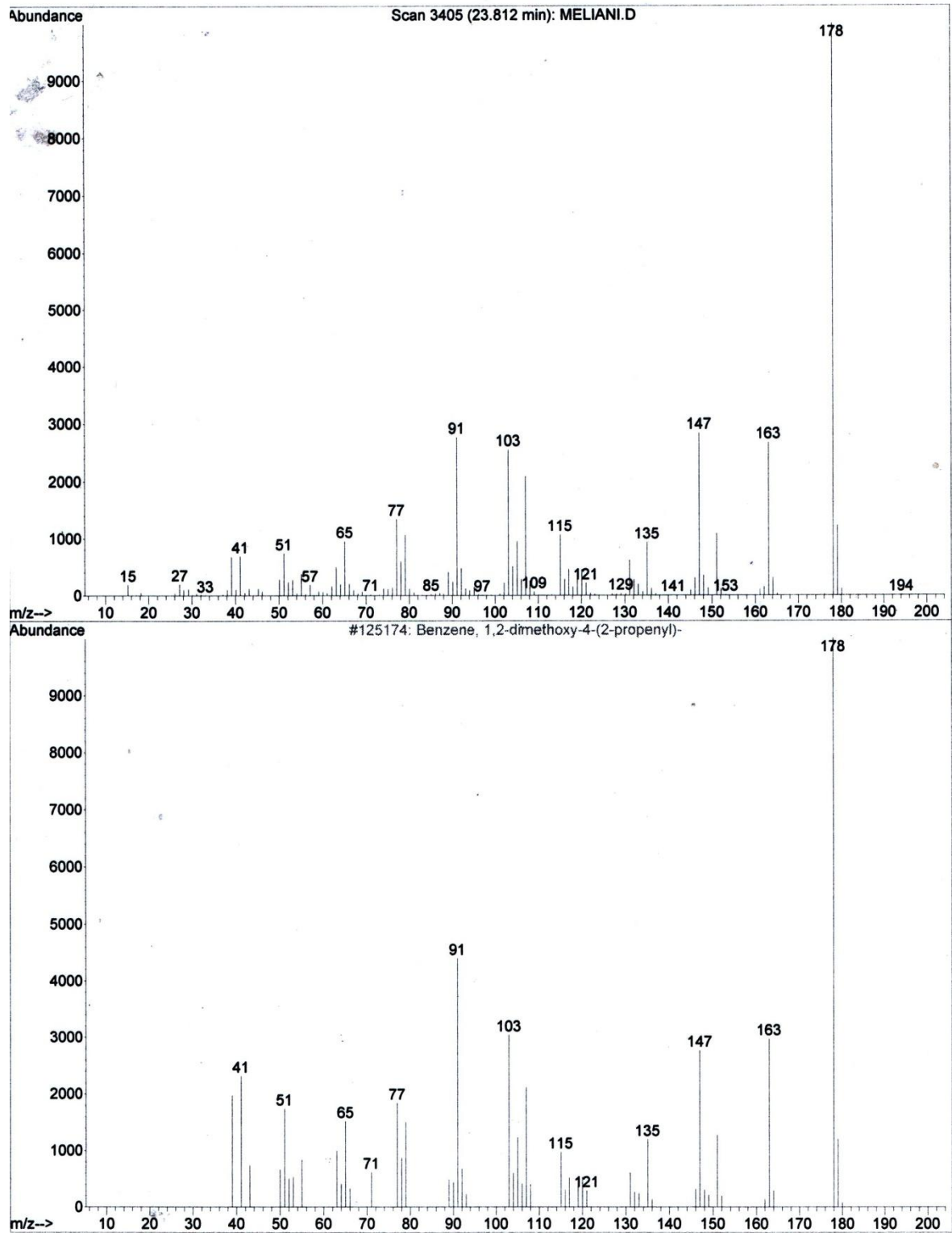
➤ t= 20.572 min
Spectre de masse



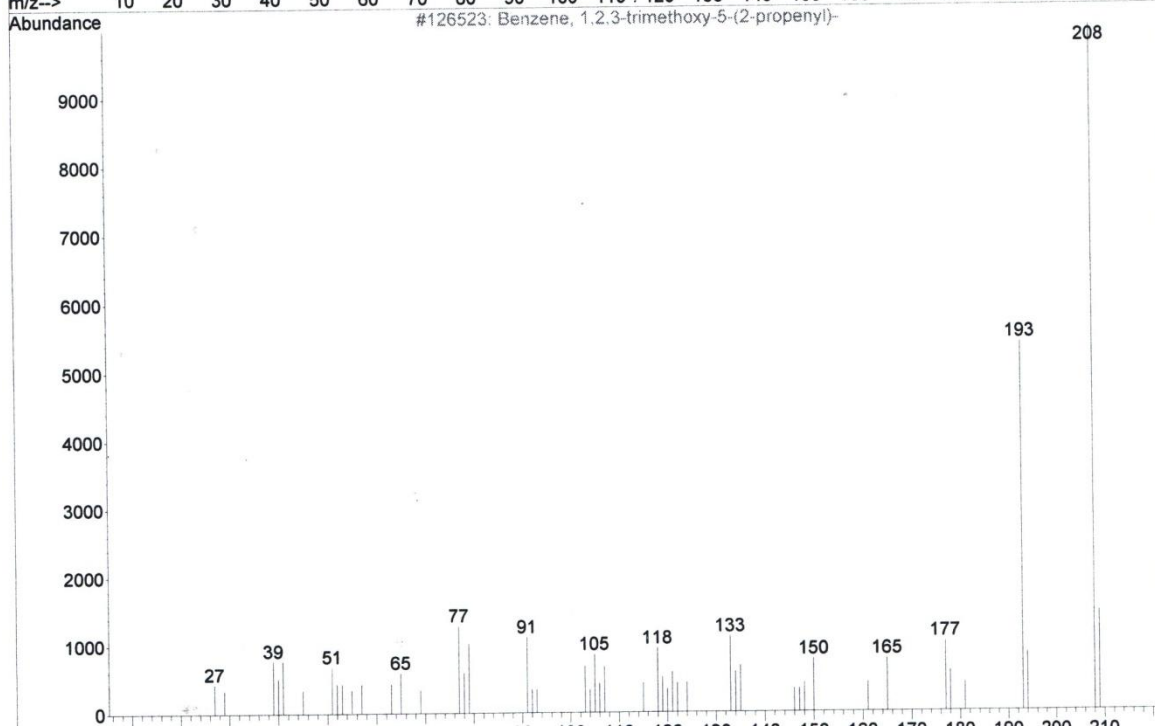
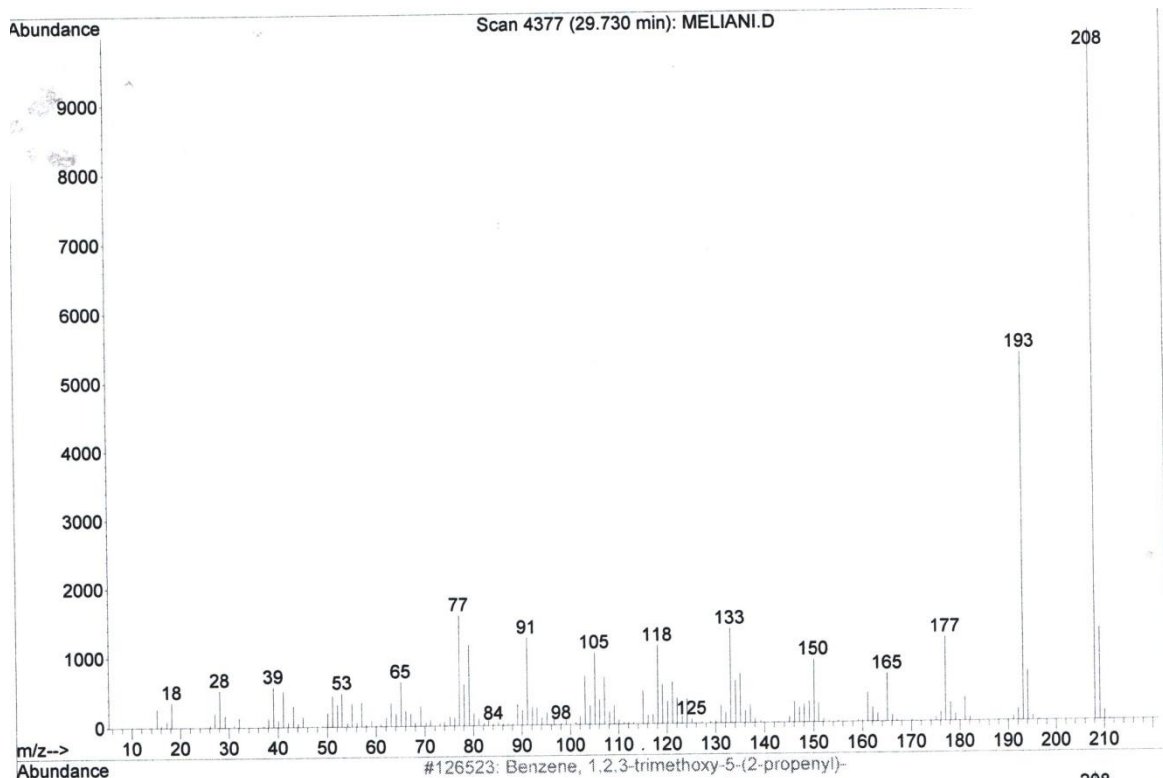
➤ t= 22.107 min
Spectre de masse



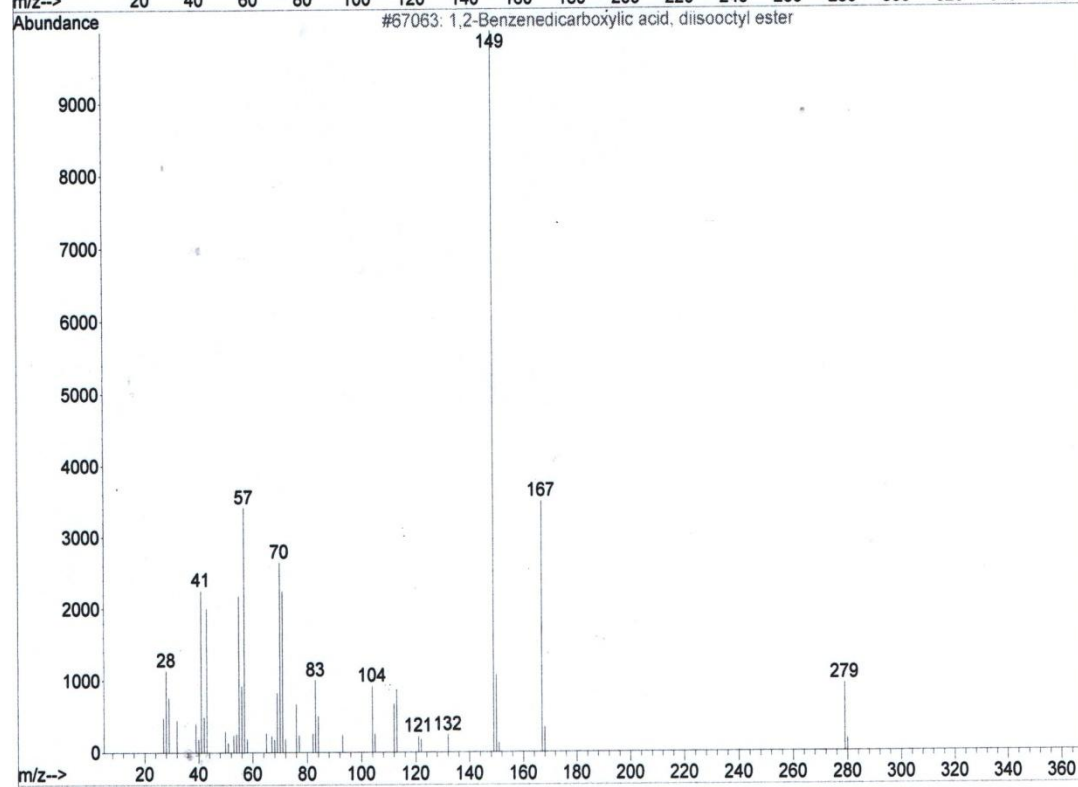
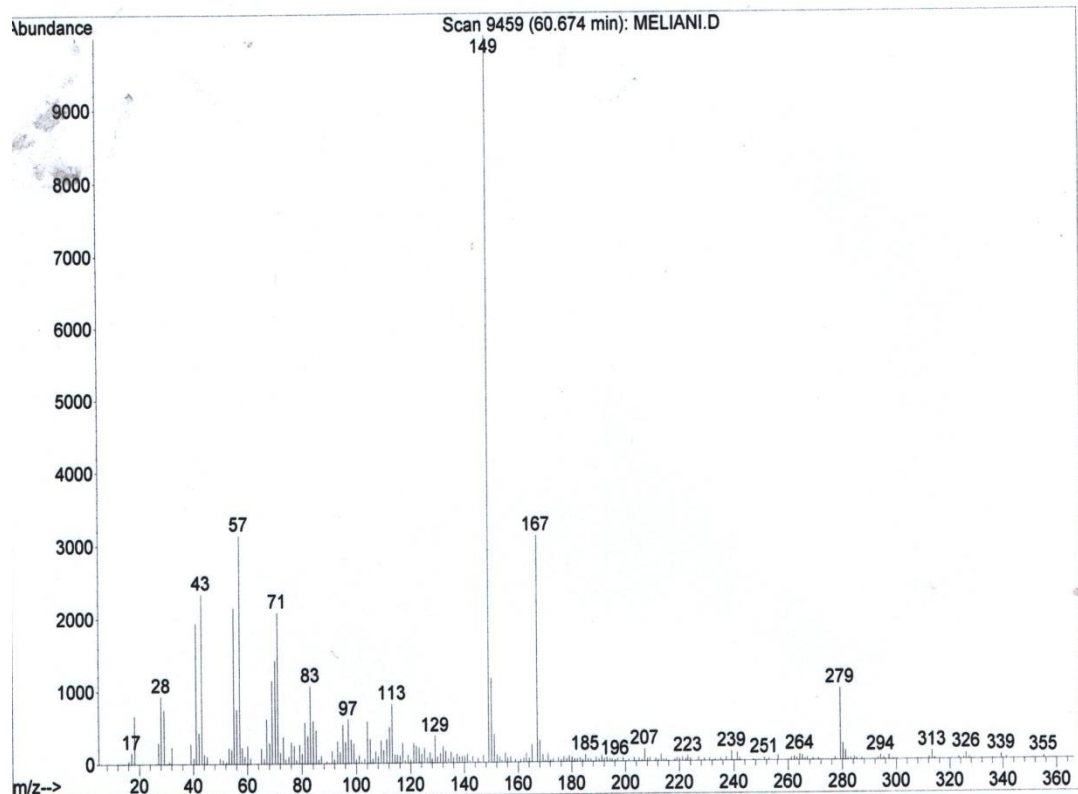
➤ t= 23.812 min
Spectre de masse



➤ t= 29.730 min
Spectre de masse



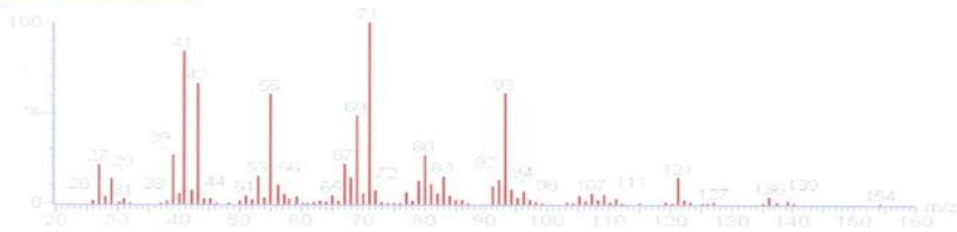
➤ t= 60.674 min
Spectre de masse



2. Chromatogramme de l'HY de *Laurus nobilis* L. analysée par CG-MS

t=11.13 min

Spectre de masses

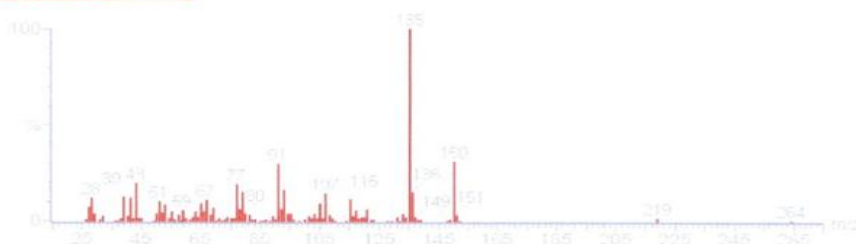


Recherche Bibliographique

REV	for	Compound Name	M.W.	Formula	Library
996	988	LINALOOL \$\$ 1,6-OCTADIEN-3-OL, 3,7-DIMETHYL- (CAS) \$\$ LINALOL \$\$ BETA	154	C10H18O	WILEY
990	979	L-LINALOOL	154	C10H18O	WILEY
987	975	LINALOOL L	154	C10H18O	WILEY
987	984	ALPHA-TERPINOLENE \$\$ CYCLOHEXENE, 1-METHYL-4-(1-METHYLETHYLID	136	C10H16	WILEY
982	957	LINALOOL \$\$ 1,6-OCTADIEN-3-OL, 3,7-DIMETHYL- (CAS) \$\$ LINALOL \$\$ BETA	154	C10H18O	WILEY

t=17.88 min

Spectre de masses

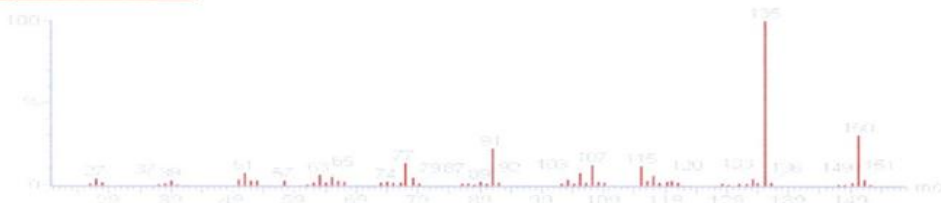


Recherche Bibliographique

REV	for	Compound Name	M.W.	Formula	Library
933	782	PHENOL, 2-METHYL-5-(1-METHYLETHYL)- (CAS) \$\$ CARVACROL \$\$ 2-HYDRO	150	C10H14O	WILEY
929	694	PHENOL, 5-METHYL-2-(1-METHYLETHYL)- (CAS) \$\$ THYMOL \$\$ M-THYMOL \$\$	150	C10H14O	WILEY
924	667	1-VINYL-2,6,6-TRIMETHYLCYCLOHEX-1-ENE \$\$ CYCLOHEXENE, 2-ETHENYL-	150	C11H18	WILEY
918	787	PHENOL, 2-METHYL-5-(1-METHYLETHYL)- (CAS) \$\$ CARVACROL \$\$ 2-HYDRO	150	C10H14O	WILEY
916	747	PHENOL, 5-METHYL-2-(1-METHYLETHYL)- (CAS) \$\$ THYMOL \$\$ M-THYMOL \$\$	150	C10H14O	WILEY
914	769	Promecarb-M/artifact P597 Univ Homburg/Saar	150	C10H14O	Pfleger

t=17.89 min

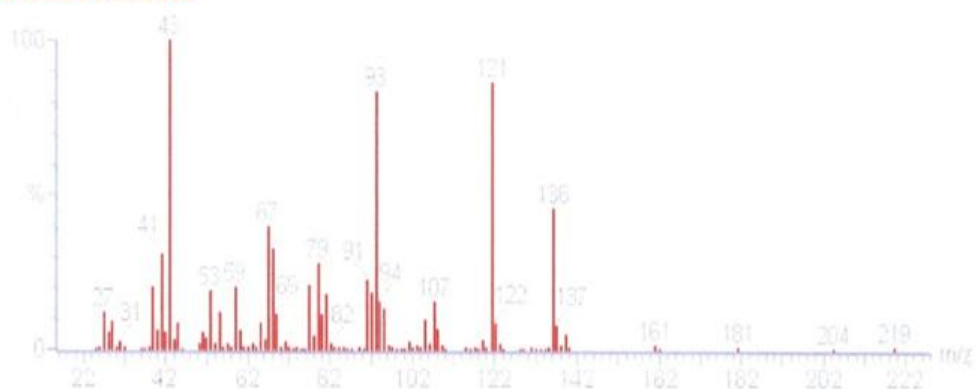
Spectre de masses



Recherche Bibliographique

REV	for	Compound Name	M.W.	Formula	Library
929	905	THYMOL	150	C10H14O	AAFSDRUG
929	904	THYMOL	150	C10H14O	AAFSDRUG
925	882	PHENOL, 5-METHYL-2-(1-METHYLETHYL)- (CAS) \$\$ THYMOL \$\$ M-THYMOL \$\$	150	C10H14O	WILEY
922	829	PHENOL, 5-METHYL-2-(1-METHYLETHYL)- (CAS) \$\$ THYMOL \$\$ M-THYMOL \$\$	150	C10H14O	WILEY
919	885	PHENOL, 2-METHYL-5-(1-METHYLETHYL)- (CAS) \$\$ CARVACROL \$\$ 2-HYDRO	150	C10H14O	WILEY
919	887	PHENOL, 5-METHYL-2-(1-METHYLETHYL)- (CAS) \$\$ THYMOL \$\$ M-THYMOL \$\$	150	C10H14O	WILEY

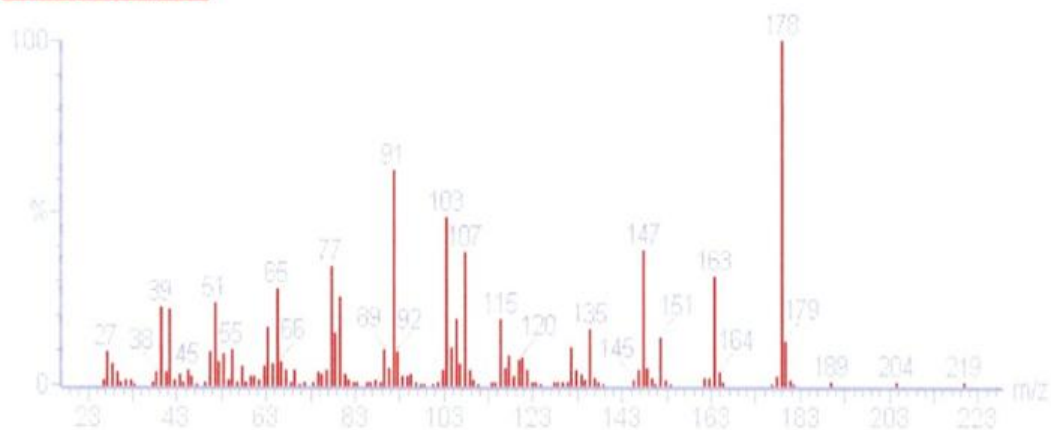
t=19.34 min
Spectre de masses



Recherche Bibliographique

REV	for	Compound Name	M.W.	Formula	Library
968	630	TERPINYL ACETATE (CAS) \$\$ TERPINEOL, ACETATE (CAS)	196	C12H20O2	WILEY
968	946	1-P-MENTHEN-8-YL ACETATE \$\$ 3-CYCLOHEXENE-1-METHANOL, ALPHA,AL	196	C12H20O2	WILEY
968	946	3-CYCLOHEXENE-1-METHANOL, ALPHA,ALPHA,4-TRIMETHYL-, ACETATE	196	C12H20O2	Nist
955	922	.ALPHA-TERPINENYL ACETATE	196	C12H20O2	WILEY
946	603	Z-BETA-TERPINYL ACETATE	196	C12H20O2	WILEY

t=21.11 min
Spectre de masses



Recherche Bibliographique

REV	for	Compound Name	M.W.	Formula	Library
978	952	BENZENE, 1,2-DIMETHOXY-4-(2-PROPENYL)- (CAS) \$\$ METHYLEUGENOL \$\$	178	C11H14O2	WILEY
973	933	BENZENE, 1,2-DIMETHOXY-4-(2-PROPENYL)-	178	C11H14O2	NBS
970	680	1-CYCLOPROPYL-3,4-DIMETHYLOXYEUGENOL	178	C11H14O2	WILEY
969	937	BENZENE, 1,2-DIMETHOXY-4-(2-PROPENYL)- (CAS) \$\$ METHYLEUGENOL \$\$	178	C11H14O2	WILEY
966	940	BENZENE, 1,2-DIMETHOXY-4-(2-PROPENYL)- (CAS) \$\$ METHYLEUGENOL \$\$	178	C11H14O2	WILEY

APPENDICE G

1. Étude statistique de l'évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Laurus nobilis*

Tableau G1 : Statistique descriptives

	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum
					Borne inférieure	Borne supérieure		
1	3	32.233	.8737	.5044	31.063	35.404	32.5	34.2
2	3	22.267	.6429	.3712	20.670	23.864	21.8	23.0
3	3	14.700	.6245	.3606	13.149	16.251	14.0	15.2
4	3	67.233	.6807	.3930	65.542	68.924	66.7	68.0
5	3	48.633	1.3650	.7881	45.242	52.024	47.7	50.2
6	3	15.500	.6245	.3606	13.949	17.051	15.0	16.2
7	3	18.100	.2646	.1528	17.443	18.757	17.9	18.4
8	3	16.200	.4359	.2517	15.117	17.283	15.9	16.7
9	3	14.967	.5033	.2906	13.716	16.217	14.5	15.5
10	3	22.300	.7550	.4359	20.425	24.175	21.5	23.0
11	3	33.500	1.3454	.7767	30.158	36.842	32.4	35.0
12	3	20.100	.8544	.4933	17.978	22.222	19.3	21.0
13	3	18.667	.5859	.3383	17.211	20.122	18.0	19.1
14	3	16.033	.2517	.1453	15.408	16.658	15.8	16.3
15	3	17.700	1.0440	.6028	15.106	20.294	17.0	18.9
16	3	20.667	.5774	.3333	19.232	22.101	20.0	21.0
17	3	17.600	.6000	.3464	16.110	19.090	17.0	18.2
18	3	16.397	.5514	.3183	15.027	17.766	15.9	17.0
19	3	24.573	.5605	.3236	23.181	25.966	24.1	25.2
20	3	15.010	.0361	.0208	14.920	15.100	15.0	15.1
21	3	23.273	.4456	.2573	22.166	24.380	22.8	23.6
22	3	16.470	.6883	.3974	14.760	18.180	16.0	17.3
23	3	22.000	.3606	.2082	21.104	22.896	21.7	22.4
24	3	14.000	.5568	.3215	12.617	15.383	13.5	14.6
25	3	19.300	.4359	.2517	18.217	20.383	18.8	19.6
26	3	.000	.0000	.0000	.000	.000	.0	.0
27	3	.000	.0000	.0000	.000	.000	.0	.0
Total	81	21.053	12.9034	1.4337	18.200	23.906	.0	68.0

Tableau G₂ : Analyse de la variance (Test ANOVA 1 facteur)

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	13295.817	26	511.378	1148.841	.000
Intragroupes	24.037	54	.445		
Total	13319.854	80			

Tableau G₃ : Test d'homogénéité intergroupe (Test Student-Newman-Keuls)

S	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
26	3	.000													
27	3	.000													
24	3		14.000												
3	3		14.700	14.700											
9	3		14.967	14.967	14.967										
20	3		15.010	15.010	15.010										
6	3		15.500	15.500	15.500										
14	3			16.033	16.033										
8	3			16.200	16.200	16.200									
18	3				16.397	16.397									
22	3				16.470	16.470									
17	3					17.600	17.600								
15	3					17.700	17.700								
7	3						18.100	18.100							
13	3						18.667	18.667							
25	3							19.300	19.300						
12	3								20.100	20.100					
16	3									20.667					
23	3										22.000				
2	3										22.267				
10	3										22.300				
21	3										23.273				
19	3											24.573			
1	3												33.233		
11	3												33.500		
5	3													48.633	
	3														67.233
4															

- | | | | |
|------|---|------|--|
| 1 : | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC9372 | 15 : | <i>Citrobacter freundii</i> |
| 2 : | <i>Escherichia coli</i> ATCC4157 | 16 : | <i>Enterobacter</i> sp |
| 3 : | <i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC4617 | 17 : | <i>Klebsiella oxytoca</i> |
| 4 : | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538 | 18 : | <i>Providencia alcalifaciens</i> |
| 5 : | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC4352 | 19 : | <i>Salmonella</i> sp |
| 6 : | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | 20 : | <i>Serratia marcescens</i> |
| 7 : | <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC1 | 21 : | <i>Shigella</i> sp |
| 8 : | <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 49452 | 22 : | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| 9 : | <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 | 23 : | <i>Salmonella typhimurium</i> |
| 10 : | <i>Enterococcus faecium</i> ATCC6569 | 24 : | <i>Candida albicans</i> ATCC2443 |
| 11 : | <i>Staphylococcus aureus</i> | 25 : | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC2601 |
| 12 : | <i>Escherichia coli</i> | 26 : | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 |
| 13 : | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 27 : | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 |
| 14 : | <i>Lactobacillus</i> sp. | | |

2. Étude statistique de l'activité antifongique de l'HE de *Laurus nobilis*

Tableau G4 : Statistiques descriptives

Souche	Concentration	Moyenne	Ecart-type
Fm	T	62,9500	,07071
	0,03%	61,4000	,14142
	0,625%	60,2500	,07071
	0,125%	49,7500	,07071
	0,25%	39,1000	,14142
	0,5%	38,3000	,14142
	1%	27,2500	,07071
	2%	,0000	,00000
	Total	42,3750	20,69127
Fs	T	84,1000	,14142
	0,03%	83,4000	,14142
	0,625%	82,0500	,07071
	0,125%	79,9000	,14142
	0,25%	53,0500	,07071
	0,5%	35,9500	,07071
	1%	17,0500	,07071
	2%	,0000	,00000
	Total	54,4375	32,32027
Fo	T	88,1500	,07071
	0,03%	67,2500	,07071
	0,625%	64,5000	,28284
	0,125%	42,0500	,07071
	0,25%	27,1000	.
	0,5%	15,0000	7,16194
	1%	,0000	,00000
	2%	,0000	,00000
	Total	38,0250	31,87874
Ap	T	64,5500	,21213
	0,03%	62,4000	,14142
	0,625%	61,9500	,21213
	0,125%	61,5500	,07071
	0,25%	61,0000	,14142
	0,5%	60,2500	,07071
	1%	25,1500	,07071
	2%	23,5500	,07071
	Total	52,5500	16,86381
Af	T	90,1000	,14142
	0,03%	87,4000	,14142
	0,625%	54,6000	,14142
	0,125%	29,0500	,35355
	0,25%	22,4500	,07071
	0,5%	19,6000	,28284
	1%	11,1500	,21213
	2%	,0000	,00000
	Total	39,2938	33,15114
An	T	52,4000	8,34800
	0,03%	51,5000	,28284
	0,625%	49,6000	,56569
	0,125%	41,2500	,07071
	0,25%	39,4500	,21213
	0,5%	26,0500	,07071
1%	,0000	,00000	

	2%	,0000	,00000
	Total	36,3444	22,68882
Pd	T	66,8500	,07071
	0,03%	55,0000	,14142
	0,625%	48,8500	,21213
	0,125%	38,7500	,35355
	0,25%	18,2000	,42426
	0,5%	,0000	,00000
	1%	,0000	,00000
	2%	,0000	,00000
	Total	22,9714	23,37159
	Pe	T	52,0500
0,03%		49,8500	,21213
0,625%		44,9500	,49497
0,125%		31,9500	,63640
0,25%		20,7000	,14142
0,5%		19,4500	,35355
1%		,0000	,00000
2%		,0000	,00000
Total		27,3688	20,16716

Fm : *Fusarium moniliforme* ATCC 52539
Fs : *Fusarium sporotrichoides* VTT D-72014
Fo : *Fusarium oxysporum* MNHN 963917
Pd : *Penicillium digitatum* PHI26

Ap : *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992
An : *Aspergillus niger* ATCC 16404
Af : *Aspergillus flavus* MNHN 994294
Pe : *Penicillium expansum* ATCC 24692

Tableau G₅ : Analyse de la variance (Test ANOVA 2 facteurs)

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Souche	11543,912	7	1649,130	37965,590	,000
Concentration	69881,935	7	9983,134	229827,534	,000
Souche * Concentration	11429,340	49	233,252	5369,827	,000
Erreur	2,780	64	,043		
Total corrigé	92857,967	127			

3. Étude statistique de l'activité Antioxydante

3.1. Effet scavenger du radical DPPH

3.1.1. Effet scavenger du radical DPPH des extraits volatiles

Tableau G₇ : Analyse de la variance (Test ANOVA 2 facteurs)

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Concentration	11284,510	5	2256,902	8968,351	,000
Antioxydant	6060,387	2	3030,194	12041,213	,000
Antioxydant * Concentration	1384,003	10	138,400	549,967	,000
Erreur	9,059	36	,252		
Total corrigé	18737,960	53			

a. R deux = 1,000 (R deux ajusté = ,999)

Tableau G₈ : Test d'homogénéité intergroupe (Test de Newman –Keuls)

A - Facteur ' Nature de l'antioxydant '

Antioxydant	N	Sous-ensemble		
		1	2	3
HY	18	20,1833		
HE	18		33,2028	
RU	18			46,1328

B- Facteur 'Concentration '

Concentration	N	Sous-ensemble					
		1	2	3	4	5	6
100 mg/l	24	27,9021					
200 mg/l	24		47,1175				
400 mg/l	24			49,8983			
600 mg/l	24				55,6504		
800 mg/l	24					61,3692	
1000 mg/l	24						74,5725

HY : hydrolat ; HE : huile essentielle ; RU : rutine.

3.1.2. Effet scavenger du radical DPPH des extraits polaires

Tableau G₉ : Analyse de la variance (Test ANOVA 2 facteurs)

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Concentration	29188,799	5	5837,760	26943,248	,000
Antioxydant	61985,290	7	8855,041	40869,029	,000
Antioxydant * Concentration	6549,995	35	187,143	863,727	,000
Erreur	20,800	96	,217		
Total corrigé	97744,884	143			

a. R deux = 1,000 (R deux ajusté = 1,000)

Tableau G₁₀: Test d'homogénéité intergroupe (Test de Newman –Keuls)

A- Facteur ' Nature de l'antioxydant '

Antioxydant	N	Sous-ensemble					
		1	2	3	4	5	6
EAQ	15	38,5489					
TOCH	15		44 ,8550	53,4189			
BHT	15				73,9800		
EM	15					77,4233	
QUER	15						79,1233

B- Facteur 'Concentration '

Concentration	N	Sous-ensemble					
		1	2	3	4	5	6
2,5 mg/l	9	13,6156					
5 mg/l	9		23,0911				
10 mg/l	9			27,7411			
25 mg/l	9				35,0867		
50 mg/l	9					40,0867	
100 mg/l	9						59,4167

EAQ : extrait aqueux , TOCH : tocophérol , BHT : hydroxytoluène butylé , EM : extrait méthanolique , QUER : quercitine.

3.2. Réduction du fer : (FRAP Ferric Reducing Antioxidant Power)

Tableau G₁₁ : Analyse de la variance (Test ANOVA 2 facteurs)

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Antioxydant	45,329	6	7,555	100967,201	,000
Concentration	5,551	5	1,110	14836,851	,000
Antioxydant * Concentration	4,258	30	,142	1896,657	,000
Erreur	,006	84	7,483E-005		
Total corrigé	55,144	125			

a. R deux = 1,000 (R deux ajusté = 1,000)

Tableau G₁₂ : Test d'homogénéité intergroupe (Test de Newman –Keuls)

A- Facteur ' Nature de l'antioxydant '

Antioxydant	N	Sous-ensemble					
		1	2	3	4	5	6
HY	18	,26711					
HE	18		,32206				
EAQ	18			1,02961			
AC	18				1,50650		
BHT	18					1,69139	
EM	18					1,69339	
TOCHO	18						1,72283

B- Facteur 'Concentration '

Concentration	N	Sous-ensemble					
		1	2	3	4	5	6
100 mg/l	21	,78567					
200 mg/l	21		1,09557				
400 mg/l	21			1,14795			
600 mg/l	21				1,22914		
800 mg/l	21					1,36576	
1000 mg/l	21						1,43267

3.3. Test de blanchissement du β -carotène

Tableau G₁₃ : Analyse de la variance (Test ANOVA 2 facteurs)

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Temps	22,501	5	4,445	479,573	,000
Antioxydant	32,286	5	6,457	696,596	,000
Temps * Antioxydant	7,193	25	,288	31,038	,000
Erreur	,667	72	,009		
Total corrigé	62,373	107			

a. R deux = ,989 (R deux ajusté = ,984)

Tableau G₁₄ : Test d'homogénéité intergroupe (Test de Newmen –Keuls)

A- Facteur ' Nature de l'antioxydant'

Antioxydant	N	Sous-ensemble					
		1	2	3	4	5	6
Control négatif	18	,68239					
HY	18		,94722				
HE	18			1,17128			
EAQ	18				1,78044		
EM	18					1,96228	
BHT	18						2,18183

B- Facteur 'Temps'

Temps (h)	N	Sous-ensemble				
		1	2	3	4	5
50	18	1,09539				
40	18	1,13289				
30	18		1,22011			
20	18			1,33928		
10	18				1,51050	
0	18					2,42728

4. Étude statistique de l'effet antidiabétique

4.1. Evolution du poids des rats

Tableau G₁₅ : Analyse de la variance (Test ANOVA 2 facteurs)

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Semaines	955,351	4	238,838	249,680	,000
Echantillons	35109,797	6	5851,633	6117,266	,000
Semaines * Echantillons	15073,615	24	628,067	656,578	,000
Erreur	133,921	140	,957		
Total corrigé	51272,684	174			

Tableau G₁₆ : Test d'homogénéité intergroupe (Test de Newman –Keuls)

A- Facteur ' Semaines '

Semaines	N	Sous-ensemble				
		1	2	3	4	5
S4	35	193,4020				
S1	35		195,1709			
S3	35			196,6891		
S2	35				198,8506	
S0	35					199,7800

B- Facteur 'Echantillons'

Echantillons	N	Sous-ensemble				
		1	2	3	4	5
DHY	25	179,9248				
DHE	25	179,9888				
TDNT	25		181,6556			
DEM	25			207,3896		
DEAQ	25			207,5188		
TS	25				208,7528	
TDTM	25					212,2192

4.3. Evolution des paramètres lipidiques

4.3.1. Triglycérides

Tableau G₁₉ : Analyse de la variance (Test ANOVA 1facteur)

	Somme des carré	ddl	Carrémoyen	F	Sig.
Inter-groupes	2.373	6	.396	1434.618	.000
Intragroupes	.008	28	.000		
Total	2.381	34			

Tableau G₂₀ : Test de Newmen –Keuls

Groupes	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
TS	5	.6240					
TDTM	5		1.2960				
DEM	5		1.3000				
DEAQ	5			1.3260			
TDNT	5				1.3660		
DHY	5					1.4060	
DHE	5						1.4360

4.3.2. Cholestérols

Tableau G₂₁ : Analyse de la variance (Test ANOVA 1 facteur)

	Somme des carré	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	2.520	6	.420	140.262	.000
Intragroupes	.084	28	.003		
Total	2.604	34			

Tableau G₂₂ : Test de Newmen –Keuls

Groupe s	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
TS	5	.6800				
DEM	5		.9280			
TDTM	5		.9540	.9540		
DEAQ	5			1.0160		
DHE	5				1.2660	
DHY	5				1.3280	
TDNT	5					1.5360

RÉFÉRENCES

1. Houdret, J.C., « Bien se soigner par les plantes », Editions Solar, Paris, (2004) ,287P.
2. Boustia, D., Ennabili, A., «L'Institut national des plantes médicinales et aromatiques au service du développement de la phytothérapie au Maroc», Phytothérapie, (2011), V.9, 297-303.
3. Kasperek, M., Al-Janabi, S., Uebelhör, K., « Plantes médicinales, la diversité biologique au service de la santé », Fiche thématique, Turkey, mars (2008).
4. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. et Gontier., E.,« Production of plant secondary metabolites: a historical perspective »,Plant Science, 161, (2001), 839-851.
5. Kar, A., « Pharmacognosy and Pharmabiotechnologie », Ed 2: New Age International Publishers, New delhi,(2007),pp:1-30.
6. Schawenberg, P. et Paris, F., « Guide des plantes médicinales : analyse, description et utilisation de 400 plantes», Delachaux et Niestlé, 3ème édition, Paris, (1997), 396 p.
7. Ramawat, K.G. et Merillon, J-M. « Bioactive Molecules and Medicinal Plants», Springer-Verlag Berlin Heidelberg, German, (2008), 379 p.
8. Teuscher, E., Anton, R. et Lobstein A., « Les plantes aromatiques : Epices, aromates condiments et huiles essentielles », Lavoisier, technique et documentation,(2005), pp:3 , 480.
9. Willem, J.P., « Aroma famille : 100 petits maux de la vie quotidienne traités par les huiles essentielles», Albin Michel, Paris, (2005), 13p.
10. Luc Sallé, J., « Le totum en phytothérapie», Frisson –Roche, Paris, (1991), pp: 35-43.
11. Rubin, M. et Messalin, J-P., « Guide pratique de phytothérapie et d'Homéopathie», Ellipes marketing, (1990).
12. Volack, J., Stotola, J. et Severa, F., «Plantes médicinales », Gründ, Paris, (1983), pp: 35-43.
13. Scimeca, D. et Tétou, M., « Votre santé par les plantes : le guide phyto utile pour toute la famille », Edition Alpen, Monaco, (2005) ,pp: 9-16.
14. Festy, D., «Ma bible des huiles essentielles », Leuc. S, Paris, (2007), pp:17-18.

15. Bosson, L. et Dietz, G., « L'hydrolathérapie : Thérapie des eaux florales », Amyris SPRL, Bruxelles, (2005), pp:10-22,154.
16. Sommerad, J.C., « Parfums de confidences l'aromathérapie sensorielle », Terre D'homme, France,(2008), pp : 44-45,56.
17. Boumamer, A., Bellaghit, M.et Moulay, O., «Etude comparative entre les huiles essentielles de la menthe verte (*Mentha spicata* L) et de la menthe poivrée (*Mentha piperita* L) dans la région d'Ouargla». Etude supérieures en biologie université de Kasdi Merbah, Ouargla, (2005), p41.
18. Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A. et Stevens, P., «Botanique Systématique: une perspective phylogénétique», Ed 1: Deboeck, (2002), 84-336.
19. Nowitz, T. et Bottet, J.,« Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation,soins »,Edition Larousse,(2000).
20. Crozier, A., Clifford, M.N. et Ashihara, H., «Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet », Blackwell Publishing Ltd, USA, (2006), 1-163.
21. Wichtl, M. et Anton, R., « plantes thérapeutiques. Traditions, pratique officinale, science et thérapeutiques », Lavoisier (Tec et Doc) & Médicales internationales (EM inter), 2ème édition, Paris Cedex, (2003), p:18-31.
22. Bruneton, J.,« Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales »,Ed Tec et Doc, 3^{ème} édition, Paris,(1999).
23. Iserin, P., Masson, M., Restellini, J-P., Ybert, E., de La Roque. R., Vican. P. et Ybert. E., «Larousse. Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation et soins », 2ème Edition, Edition Larousse, Paris, (2001).
24. Daayf, F.et Lattanzio, V.,«Recent Advances in Polyphenol Research »,Blackwell Publishing Ltd, United Kingdom and USA, V.1, (2008), 1- 2.
25. Pousset, J.L.,« Plantes médicinales africaines », Edition Ellipses,(1989).
26. Murphy Cowan, M., «Plant products as antimicrobial agents », Clinical Microbiology Reviews, American Society for microbiology, V.12 (4), (1999), 564-582.
27. Delille, L., « Les plantes médicinales d'Alger », BERTI, Alger, (2007), pp : 14-216.
28. Arnal-Schnebelen, B., Goetz, P. et Paris, M., «Santé référence : Phytothérapie : La santé par les plantes », Selection du reader's Digest.Vidal, Canada, (2007), pp: 215, 428.

29. Ghestem, A., Seguin, E., Paris, A. et Orecchioni, A-M., « Le préparateur en pharmacie: Botanique-Pharmacognosie-Phytothérapie-Homéopathie. Dossier 2 », Tech & Doc, paris, (2001), pp: 100-194.
30. William, G.Hopkins., «Physiologie végétale », De Boek Université,Bruxelles, (2003), 273-276.
31. Hagerman, Ann.E., «Tannin Chemistry », Department of Chemistry and Biochemistry, Miami, (2002).
32. Domart, A. et Bourneuf, J., « Nouveau Larousse des plantes médicinales », Librairie Larousse, Paris, (1988).
33. Thurzova, L., «Les plantes – santé qui poussent autour de nous », Edition Bordas, (1981), imprimé en Mars 1985, 268 p.
34. Bruneton, J., « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales », Tec et doc édition Lavoisier, Paris, 3ème édition, (1999), 1120p.
35. Iserin, P., «Encyclopédie des plantes médicinales », Edition Larousse, (2001), p.10-17 & p.132.
36. Barnes, J., Anderson, L.A. et Phillipson, J.D., «Herbal Medicines», Pharmaceutical Press (Ph .P), Third édition, London, Chicago USA, (2007), pp: 16-576.
37. Grundwald, J. et Janicke, C., « Guide de la phytothérapie » Edition Marabout, (2004), 341-342.
38. Bruneton, J., « Plantes toxiques – Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux », Edition Lavoisier, 3^eédition, (2005), 618 p.
39. Fluck, H., «Petit guide panoramique des herbes médicinales : Description simple avec des indications sur leurs principes actifs, leur action, leur emploi, leur récolte et leur culture », Edition Delachaux et Niestlé S.A., Neuchâtel, Paris, 3ème édition, (1977), 165p.
40. Verdrager, J., « Les plantes médicinales dans les traitements modernes », Edition Maloine S.A., Paris, (1978), 233 p.
41. Krief, S., «Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées», Sciences du Vivant, Museum national d'histoire naturelle - MNHN Paris, (2003).
42. Vetvicka, V. et Matousova, V., « Arbres et Arbustes: 256 illustrations en couleurs ». Ed Gründ, (1991) ,112p.

43. Pariente, L., « Dictionnaire des sciences pharmaceutiques et biologiques», 2ème Ed Académie nationale de pharmacie, Paris, (2001) ,1643p.
44. Zhiri, A., Baudoux, D. et Breda, M.L., «Huile essentielles chémotypées et leurs synergies», Ed Inspir développement,(2005), 46p.
45. Quezel, P. et Santa, S., «Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales», Edition C.N.R.S, Paris, (1963), 977p.
46. Ballabio, R. et Goetz, P., « Huile de graine/fruit de laurier *Laurus nobilis* L., *Laurus azorica* (seub.)Franco, *Laurus novocanaensis* Rivas Mart., Lous ã, Fern. prieto, E. Dias, j.c. Costa et C.A guiar », *Phytothérapie*, V.8, (2010) ,141-144.
47. Anton, R. et Lobstein, A., «Plantes aromatiques.Epice, aromates, condiments et huiles essentielles», Tec & Doc, Paris (France), (2005).
48. Demir, V., Guhan, T., Yagcioglu, AK. and Ddegirmencioglu, A., « Mathematical modeling and the determination of some quality parameters of air-dried bay leaves », *Biosystems Engineering*, (2004), 88(3):325-335.
49. Raghavan, S., «Handbook of spices, seasonings, and flavorings», Second edition, Taylor & Francis, CRC press, (2007), pp.73-77.
50. Arroyo Garicial, R., Martinez-zapater, J.M., Fernández prieto, J.A. et Álvarez- Arbesu, R., «AFLP evaluation of genetic similarity among laurel populations (*Laurus nobilis* L.) », *Euphytica*, Spain, V.12, Spain. (2001), 155-164.
51. Hamrouni, I.,Aidiwannes, W., Bettaib, I., Berrima, S. et Chahed, T., «Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods», *Food Chemistry*, Tunisia ,V.126,(2011),691-697.
52. Kilic, A. et Altuntas, E., «Wood and bark volatile compounds of *laurus nobilis* L. », *Holz als Roh und Werkstoff*, Turkey, V.64, (2006), 317-320.
53. Sedat H, Beis. and Nurhan, T. Dunford.,«Supercritical fluid extraction of Daphne (*Laurus nobilis* L.) seed oil », *Journal of the American Oil Chemists' Society* , V.83 (11), Turkey, (2006).
54. Derwich, E., Benziane, Z. et Boukir, A., « Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *laurus nobilis* from morocco », *Australien journal of basic and applied sciences*, Morocco, V.3 (4),(2009) ,3818-3824.

55. Regnault Roger, C., « The potential of botanical essential oils for insect pest control », *Integrated pest management Reviews*, France, V.2, (1997), 25-34.
56. De Marino, S., Iorizzi M. et Zollo, F., « Antioxidant activity and biological properties of phytochemicals in vegetables and spices (*Capsicum*, *Laurus*, *Foeniculum*) », *Ejeafche*, Italy, V.7 (10), (2008), 3174-3177.
57. Villupanoor, A., Bhageerathy, C. et John, Z., « chemistry of spices », CAB International, India, (2008).
58. Sangun, M., Aydin, E., Timur, M., Karadeniz, H., Caliskan, M. et Ozkan, A., « Comparison of chemical composition of the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves and fruits from different regions of Hatay, Turkey », *Journal of Environmental Biology*, Turkey, V. 28(4), (2007), 731-733.
59. Bärtels, A., «A guide to Mediterranean plants», Eugen Ulmer, Paris, (1998), 38p.
60. Emam, A., Mohamed, M., Diab, Y. et Megally, N., « Isolation and structure elucidation of antioxidant compounds from leaves of *Laurus nobilis* and *Emex spinosus* », *Drug Discoveries & Therapeutics*, Egypt, V.4 (3), (2010), 202-207.
61. Beloued, A., «Plantes médicinales d'Algérie », 5ème édition, Ben Aknoun (Alger), (2005), pp:124-125.
62. Deysson, G., « General Botany course, Fourth section: organization and classification of vascular plants, second part systematic», CDU et SEDES, Paris, (1979), 262p.
63. Marzouki, H. et al., «Biological activity evaluation of Tunisia and Algeria extracted by supercritical carbon dioxide», *Natural Product Research*, 23, (2009), 230-237.
64. Yahya, F., Lu, T., Santos, R., Fryer, P. et Bakalis, S., « Supercritical carbon dioxide and solvent extraction of 2-acetyl-1-pyrroline From pandan leaf: The effect of pre-treatment », *The journal of supercritical fluids*, (2008).
65. Santoyo, S., Loria, R., Jaime, L. et Ibanez, E., « Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis* L. Chemical and functional characterization », *Eur Food Res Technol*, Vol.222, (2006), 565-571.
66. Nayak, S., Nalabothu, P., Sandiford, S., Bhogadi, V. et Adogwa, A., « Evaluation of wound healing activity of *Allamanda Cathartica* L. and *Laurus nobilis* L. extracts on rats », *BMC complementary and Alternative Medicine*, Vol. 6(12), (2006).

67. Boullard, B., «Plantes médicinales du monde : réalités et croyances»,ESTEM, Paris, (2001), 306p.
68. Brunton, J., « Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales», Tec et Doc, Paris,(2009), pp:483-560.
69. Depoërs, P., Ledoux, F. et Meurin, P., «De la lumière à la guérison : La phytothérapie entre science et tradition», Amyris, Bruxelles, (2008), pp:181-182.
70. Kivçak, B. et Mert, T., «Preliminary evaluation of cytotoxic properties of *Laurus nobilis* leaf extracts», Fitoterapia, (2002), V. 73, 242-243.
71. Gómez-Coronado, D.J.M., Ibañez, E., Rupérez, F.J. et Barbas, C.,«Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin », Journal of Chromatography A, V.1045, (2004), 227-233.
72. Ochikh, O., Chahed, S., Ksouri, R., Taarit. M., Faleh, H., Abdelly, C., Kchouk, M. et Marzouk, B., «The effects of extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of *L. nobilis* vegetative organs», Journal of food composition and analysis, Tunisia, Vol.24,(2011),103-110.
73. 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 sub sp. Piperitum* (Ucria) coutinho seeds», Biol.Pharm.Bull, Italy ,V.29(10),(2006),2056-2064.
74. Celikel, N. et Kavas, G., « Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms », Czech J. Food Sci, Turkey, V.26 (3), (2008), 174-181.
75. Aljamel, A., « Effects of bay leaves on blood glucose and lipid profiles on the patients with type1 diabetes », World Academy of science, Engineering and technology, Jordan, V.70, (2010), 211-214.
76. Simić, M., Kundaković, T.etKovačević, N., «Preliminary assay on the antioxidant activity *Laurus nobilis* extracts », Fitoterapia, V.74, (2003), 613- 616.
77. 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.
78. Gürbüz, İ., Üstün, O., Yeşilada, E., Sezik, E. et Akyürek, N., «In vivo gastro protective effects of five Turkish folk remedies against ethanolinduced lesions», Journal of Ethnopharmacology , V.83, (2002), 241-244.

79. 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.
80. 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.
81. 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.
82. Sayyah, M., Saroukhani, G., Peirovi, A. et Kamalinejad, M., «Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* Linn. », *Phytotherapy Research*, V.17 (7), Iran, (2003), 733-736.
83. 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.
84. 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.
85. Barla, A., Topçu, G., Öksüz, S., Tümen, G. et Kingsto D.G.I., «Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis*», *International Food chemistry*, v.104, (2007), 1487-1484.
86. 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 Ethnopharmacology*, V.113, (2007), 510-516.
87. 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.
88. 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.
89. Erler, F., Ulug, I. et Yalan Kaya, B., «Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*», *Fitoterapia*, V.77, (2006), 491-494.

90. 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.
91. 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.
92. Bardeau, F., «La mémoire par les fleurs », Robert Laffont, Paris, (1976), 310p.
93. Isbilir, S., Ozcan, H. et Yagar, H., «Some Biochemical properties of lipase from Bay Laurel (*Laurus nobilis* L.) Seeds », *J Am oil Chem Soc.* V.85, (2008), 227-233.
94. Ivanovic, J., Ristic, M., Pesic, O., Zizovic, I. et Skala, D., « Chemical composition of the supercritical CO₂ extract and essential oil of bay (*Laurus nobilis* L.)», Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade and Ristic M., Institute for Medical Plant Research, Belgrade (Serbia) ,9th International Symposium on Supercritical Fluids 2009, New Trends in Supercritical Fluids: Energy, Materials, Processing, Arachon (France), May, 2009, Full text: Topic: Reactivity: p166 (6 pages) N° ISBN: 978-2-9511591-7-4.
95. Kilic, A., Hafizoglu, H., Kollmannsberger, H. et Nitz, S., «Volatile constituents and key odorants in leaves, buds, flowers and fruits of *laurus nobilis* L. »*J Agric. Food Chem*, Turkey V.52, (2004), 1601-1606.
96. Castilho, P. et Docéu costa, M., « Characterization of triacylglycerols in Madeira laurel oil by HPLC -Atmospherique pressure chemical ionization-MS», *JAOCs*, Portugal, V.81, (10), (2004), 913-919.
97. Verdian-rizi, M., « Phenological variation of laurus nobilis essential oil from Iran », *EJEAFChe*, Iran, Vol.7 (11), (2008), 3321-3325.
98. 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.
99. 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 ElemRes*, 24(3), (1990), 183-8.
100. Khan, A., Zaman, G. et Anderson, R., « Bay leaves improve glucose and lipid profile of people with type 2 diabetes », *J Clin Biochem Nutr*, Pakistan ,V.44(1),(2009),52-56.

101. Franchomme, P., «L'aromatologie à visée anti infectieuse », *Phytomédecine*, V.1, (1981), 25-47.
102. Atanda, O.O., Akpan, I.O. et luwafemi, 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.
103. 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.
104. 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.
105. Aqili Khorasani, M.S., «Collection of drugs », Educational Organization, Tahrán, (1992),pp: 624-630.
106. Van, A.R., «Medicinal plants of the word: Chemical constituents, Traditional and Modern uses» , Humana Press Inc, New Jersey, (2001), 262p.
107. Cabaret, J., «Plante pour soigner les animaux», *Poins Vétérinaire*, Paris, (1967), 192p.
108. 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.Appl.Pyrolysis*, V. 88, (2010), 22-29.
109. Di Leo Lira, P., Retta, D., Tkacik, E., Ringuelet, 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.
110. Gérault, G. et Mary, R., «Le guide de l'aromathérapie», Albin Michel, Paris, (2009), pp : 1, 114,139.
111. Gabe, M., « Technique histologique», Laboratoire d'évolution, Faculté des sciences, Edition Masson et Cie, Paris, (1968), 113p.
112. Perrier, R., Auffret Van der Kemp, T. et Zonzain, F., « Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques », Edition Doin, Paris, (1997), 476p.
113. Chiej, R., «Encyclopaedia of Medicinal Plants», Mac Donald.ISBN 0-356-10541- 5, Little, Brown, (2001).

114. Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R. and Bessiere, J.M., « Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation », *Flavour Fragr. J.*, (2003), 18: 481-484.
115. Afnor. Association Française de Normalisation, « Les huiles essentielles.Mographie relatives aux huiles essentielles», Afnor, Paris, (2000), 661-663.
116. Paris, R.R. et Moyes, H., «Précis de matière médicale », Tome 1, édition Masson, Paris, (1976).
117. Ljubuncic, P., Hui Song, A., Uri Cogan, B., Hassan Azaizeh, C. et Arieih, B.,« The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease», *Journal of Ethnopharmacology*,(2005),100:198–204.
118. Boussahel, Soulef.,« Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif», Université Ferhat Abbes, Sétif Faculté des Sciences, Département de Biologie, Sétif, Mémoire de Magister, (2011),pp:25 - 26.
119. Carrée, P., «Précis de technologie et de chimie industrielle»,Ed Ballière, Paris, (1953),475p.
120. Négué Diarra, M., « Etude phytochimique d'une plante antipaludique utilisée au Mali : *Spilanthes oleracea* Jacq. (Asteraceae)», Université de Bamako, Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie, Mali, Thèse de Doctorat d'état en Pharmacie, (2003), pp: 42- 48 ,78.
121. Niare, A., « Etude de la phytochimie et des activités pharmacologiques de *syzygium guineense* willd. (Myrtaceae)», thèse de doctorat. Université de Bamako, Mali, (2006).
122. Ousman mamadou, A., «Etude phytochimique et de l'activité antipaludique in vivo et in vitro de *Momordica balsamina* Linn. (Cucurbitaceae) », thèse de doctorat. Université de Bamako, Mali, (2005).
123. Souley amadou, B.,« Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Combretum glutinosum* Perr. Ex DC (Combretaceae)», thèse de doctorat. Université de Bamako, Mali, (2005).
124. Mouellet, M., « Screening phytochimique de deux espèces de plantes : *crotalia retusa* L (Papilionaceae) et *hallea ciliata* Aubrev & Pellegr. (Rubiaceae) récoltées au Gabon», thèse de doctorat. Université de Bamako, Mali, (2005).
125. Senhaji, O., Faid, M., Elyachioui, M. et Dehhaoui, M., « Étude de l'activité antifongique de divers extraits de cannelle», *Journal de Mycologie Médicale*, Vol.15, Maroc,(2005),220–229.

126. Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J. et Kowalska, T., «Thin Layer Chromatography in Phytochemistry », Taylor & Francis Group, LLC, CRC Press, Boca Raton London New York, (2008),185- 200.
127. Rizk, A.M., « Constituents of plants growing Qatar », *Fitoterapia*, V.52, n° 2,(1982), 35 -42.
128. Debeté Judith, M., « Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpiniaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad », Thèse de Doctorat d'état en Pharmacie, Université de Bamako, Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie, Mali, (2005), pp:135- 140.
129. Diallo, A., « Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense Willd.* », Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako, Mali, (2005),99p.
130. Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen F. et Jiang Y., « Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2007), 102: 771-776.
131. Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K. et Kujala, T.S., « Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n° 47, (1999), 3954-3962.
132. Mohd-Esa, N., Hern, F.S, Ismail, A, et Yee C.L., « Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds », *Food Chemistry*, n° 122, (2010), 1055-1060.
133. Georgé, S., Brat, P., Alter, P. et Amiot J.M., «Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2005), 53: 1370-1373.
134. Dehpour, A.A., Ibrahimzadeh, M. A., Seyed Fazel, N. et Seyed Mohammad, N.,« Antioxydant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition », *Grasas Y Aceites*, V.60, (2009), 405-412.
135. Kumaran, A .et Karunakaran, J., « In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India », *LWT*, n° 40, (2006), 344-352.
136. Abdel-Hameed, E-S.S., « Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples », *Food Chemistry*, n°114, (2009), 1271-1277.
137. Davis, J., «Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes», *Science*, (1994), 246:375 – 382.

138. Fauchère, J.L. and Avril, J.L., «General and medical bacteriology ».Ellipses Editions, Paris, (2002), 365p.
139. Dean, S.G. et Ritchie, G., «Antibacterial properties of plant essential oils», International Journal Food Microbiology, V. 5, (1987), 165-180.
140. Zaika, L.L.,« Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination », J. Food Safety, V.9, (1988), 97-118.
141. Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Kole, C.R. et al,« Antibacterial activity of essential oils from Cymbopogon: inter-and intraspecific différences», Microbios,V.84,(1995), 239-245.
142. 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.
143. 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.
144. 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.
145. 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.
146. Okogun, G.R.A., Bethran, E.B., Anthony, N., Okere Jude, C. et Anegebe, C.,«Epidemiological Implications of Preferences of Breeding Sitesof Mosquito species in Midwestern Nigeria», Ann. Agric. Environ. Med, V.10, (2003), 217-222.
147. 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.
148. Marino, M., Bersani, C. and Comi, G., «Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae », Int J Food Microbiol, (2001), 67(3):187-95.
149. Smânia, A., Monache, F.D., Smânia, E.F., Gil, M.L., Benchetrit, L.C. and Cruz, F.S., « Antibacterial activity of substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. », J Ethnopharmacol. 45(3):177-81.

150. Rhayour, K., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., Sendide, K. and Remmal, A., «The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*», J. Essent. Oil Res, (2003), 15: 286-292.
151. Satrani, B., Farah, A., Fechtal, M., Blaghen, M. et Chaouch, A., « Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja calamintha* et *Satureja alpina* du maroc», Ann. Fals. Exp. Chim,(2001), 94(956) :241-250.
152. Fandohan, P., Gbenou, J.D., Gnonlonfin, B., Hell, K., Marasas, W.F. and Wingfield, M.J.,« Effect of Essential Oils on the Growth of *Fusarium verticilloides* and Fumonisin Contamination in Corn», JAgric Food Chem,(2004), 52 :6824-6829.
153. López-Meneses, A.K., Plascencia-Jatomea, M., Lizardi - Mendoza, J., Rosas-Burgos , E.C., , Luque- Alcaraz, A.G. et Cortez - Rocha M.O., « Antifungal and antimycotoxigenic activity of essential oils from *Eucalyptus globulus*, *Thymus capitatus* and *Schinus molle* », Food Sci. Technol,(2015), 35(4): 664-671.
154. Alilou, H., « Étude phytochimique et antifongique de deux plantes du Sud du Maroc : *Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* (Schousb.) Greuter et *Asteriscus imbricatus* (Cav.) DC.», Thèse de Doctorat, Spécialité : Biotechnologies végétales, Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr, Agadir, (2012), pp: 135-145.
155. Li, W.R ., Shi, Q.S., Ouyang, Y.S., Chen, Y.B. and Duan, S.S., «Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404 », Appl Microbiol Biotechnol, (2013),97(16):7483-92.
156. Laghchimi, A., Znini, M., Majidi, L., Renucci,F., El Harrak, A. et Costa, J., «Composition chimique et effet des phases liquide et vapeur de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* sur la croissance mycélienne des moisissures responsables de la pourriture de la pomme », J. Mater. Environ. Sci, (2014), 5 (6): 1770-1780.
157. Sanchez-Moreno C., «Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems», International Journal of Food Science and Technology, (2002), 8: 121-137.
158. Gulcin I., Mshvildadze V., Gepdiremen A. and Elias R., «Antioxidant activityof saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F », Planta Med, (2003), 70: 561-563.
159. Molyneux, P., «The use of the stable free radical diphenyl (DPPH) for estimating antioxidant activity», Journal of science technology, (20004), 26(2): 211-219.

160. Roginsky, V. and Lissi, E.A., «Review of method to determine chain-breaking antioxidant activity in food », *Food chemistry*, (2005), 92: 235-254.
161. Burits, M. and Bucar, F., «Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil », *Phytotherapy Research*, 14, (2000), 323–328.
162. Cuendet, M., Hostettmann, K et Potterat, O., « Iridoid glycosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*», *Helvetica chimica acta*, (1997), V. 80(4), 1144- 1152.
163. Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M. and Khoshnoodi, M., «In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss », *Food Control*, 18,(2007),800-805.
164. Torres, R., Faini, F., Modak, B., Urbina, F., Labbé, C.et Guerrero, J., «Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudates of *Haplopappus multifolius* » ,*Phytochemistry*,(2006), 67(10): 984-987.
165. Oyaizu, M., «Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine», *Japanese Journal of Nutrition*, 44,(1986), 307–315.
166. Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B.D., Polissiou, M. et Sokmen, A.,« Investigation of the antioxydant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure », *Food Chemistry*, (2007),100:584-589.
167. Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., Polissiou, M. and Sokmen, A., « Antibacterial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* p (Vahl) », *Food Chemistry*, (2004), 84: 519-525.
168. Hobou, D.R.A.D., Fofié, N.B.Y., N'guessan, K. and Koné, D., « Évaluation de la toxicité de *stachytarpheta indica* chez la souris », *J.sci. pharm. Biol*, V.12, n°1, (2011) ,6-12.
169. Kone, M., Bleyere, N.M., Yapo, A.P., Vangah, M.O., et Ehile, E.E., «Évaluation de la toxicité d'un extrait aqueux de *Sacoglottis gabonensis* (Baille) Urban (Humiriaceae) chez les rongeurs, une plante utilisée dans le traitement de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire »,*Int. J. Biol. Chem. Sci*, (2009), 3(6): 1286-1296.
170. Behrens, B. and Karber, C., «Wie sind Reihenversuche für biologische Auswertungen am Zweckmässigsten Anzuordnen »*Arch. Exp. Path. Pharm*, 177(1935): 379- 388.

171. Dragstedt, A. and Lang, B., « Etude de la toxicité par administration unique d'un nouveau médicament », Annales Pharmaceutiques français, (1957), 11p.
172. Hodge, H.C. and Sterner J.H., « Determination of substance acute toxicity by LD50. American Industrial Hygien Association, (1943), 10: 93.
173. Sedaghat, R., Roghani, M., Ahmadi, M. et Ahmadi, F., « Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effect of *Rumex patientia* seed preparation in streptozotocin-diabetic rats », Pathophysiology, 18, (2010), 111-115.
174. Chandra, A., Mahdi, A.A., ahmed, S. and singh R.K., « Indian herbs result in hypoglycemic responses in STZ induced diabetic rats », Nutrition research, 27, (2007), 161-168.
175. Singh, N., Kamath, V. and Rajin, i P.S., « Attenuation of hyperglycemia and associated biochemical parameter in STZ induced diabetic rats by dietary supplementation of potato peel powder », Clinica chemical Acta, 353, (2005), 165-175.
176. Kalaivanan, K. et Pugalendi, K.V., « Antihyperglycemic effect of the alcoholic seed extract of *Swietenia macrophylla* on streptozotocin-diabetic rats », Pharmacognosy Res, 3(1), (2011), 67–71.
177. Arokiyaraj, S., Balamurugan, R., and Augustian, P., « Antihyperglycemic effect of *Hypericum perforatum* ethyl acetate extract on streptozotocin-induced diabetic rats », Asian Pac J Trop Biomed , 1(5), (2011), 386–390.
178. Dimo, T., Rakotonirina, S.V., Tan, P.V., Azay, J., Dongo, E., Kamtchouing, P. et Cros, G., « Effect of *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) stem bark methylene chloride/methanol extract on streptozotocin-diabetic rats », Journal of Ethno-pharmacology, 110, (2007), 434-438.
179. Serebrynaya, F.K., Nasuhova, N.M. et Konovalov, D.A., « Morphological and Anatomical Study of the leaves of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae), growing in the Introduction of the Northern Caucasus region (Russia) », Pharmacogn J, 9(4), (2017), 519-22.
180. Taleb – Toudert, K., « Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabyle (Nord Algerien). Evaluation de leurs effets sur la bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae) », Faculté Des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Département de Biologie Animale et Vegetale, Université Mouloud Mammeri, Tizi- Ouzou , (2015).

181. 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), pp:15-21.
182. 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, (2006).
183. 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.
184. Guedouari, R., « Etude comparative de la pharmacognosie des différentes parties du *Laurus nobilis* L. essais de formulations thérapeutiques », Mémoire de Magister (Option : Industrie Pharmaceutique), Faculté des Hydrocarbures et de la Chimie, Université M'hamed Bougara, Boumerdes, (2012).
185. Lis-balchin, M., « Geranium and pelargonium: the genera *Geranium* and *Pelargonium* », CRC Press, Taylor & Francis, London, (2002) , pp: 116-131, 147-165, 184-217.
186. Saxenaa, G., Rahmanb, L., Vermac, P.C., Banerjeed, S. and Kumara, S., « Field performance of somaclones of rose scented geranium (*Pelargonium graveolens*) for evaluation of their essential oil yield and composition », *Industrial crops and products*, 27, (2008), 86-90.
187. Rodolfo, J., Korocho, A., Simon, J. and Hitimana N., « Quality of geranium oils: case studies in southern and eastern Africa », *Journal of essential oil research (JEOR)*, (2006), 12.
188. Rajeswara rao, B.R., « Biomass yield, essential oil yield and essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) as influenced by row spacings and intercropping with cornmint (*Mentha arvensis* L.f.) », *Industrial Crops and Products*, 16,(2002),133-144.
189. Chabanne, A., boye,r J., michellon, R. and seguy, L., « Impacts des couvertures végétales sur la production de *Pelargonium x Asperum* et sur la biologie du sol (macrofaune) à l'île de La Réunion », *World Congress on Conservation Agriculture Madrid*, 1-5 October, (2001),35p.
190. Demarne, F.E., « influence du mode de récolte sur la distillation du géranium rosat », *Agronomie tropicale*, France, (1992), V.46, n° 2, 161-165.
191. Gomes, P.B., Mata. V.G. and Rodrigues, A.E., « Characterization of Portuguese grown geranium oil (*Pelargonium* sp.) ». *J. Essent. Oil Res*, 16, (2004), 490-495.

192. Gomes, P.B., Mata, V.G. and Rodrigues, A.E., « Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction », *J. of Supercritical Fluids*, 41, (2007), 50–60.
193. Kahouli, I., «Effet antioxidant d'extraits de plantes (*Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Oléa europea* L.) dans l'huile de canola chauffée», Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître es sciences (M.Sc.), Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'alimentation, Université Laval, Quebec, (2010).
194. Demarne, F.E., « Le géranium rosat », *Parfums, Cosmétiques et Arômes*, n°62, (1985).
195. Gilly, G., « Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse », *Harmattan, Paris*,(1997), pp : 11-19.
196. Kpoviessi, D.S.S., Accrombessi, G.C., Kossouoh, C., Soumanou, M.M. et Moudachirou, M., «Propriétés physico-chimiques et composition de l'huile non conventionnelle de pourghère (*Jatropha curcas*) de différentes régions du Bénin », *Comptes rendus. Chimie*, (2004), 7, 1007- 1012.
197. Kongo, C., Swalihou, B.E-H., Kone, S., Koukou, G. et N'Guessan, Y.T., «Étude des propriétés physicochimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus* », *Comptes Rendus Chimie*, (2004), 7,1039-1042.
198. Boukhatem, M.N., Hamaidi, M.S., Saidi, F. et Hakim Y., « Extraction, composition, et propriétés physico-chimique de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de mitidja (Algérie) », *Nature Et Technologie*, n°03, (juin 2010), 37-45.
199. Politeo, O., Jukić, M. and Miloš, M., «Chemical composition and antioxidant activity of free volatile aglycones from bay (*Laurus nobilis* L.) compared to its essential oil », *Croatia Chem. Acta*, 80,(2007),121-126.
200. Perry, N.B., Anderson, R.E., Brennan, N.J., Douglas, M.H., Heaney, A.J., McGimpsey, J.A. and Smallfield, B.M., « Essential oils from dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts, seasons, and sites», *J Agric Food Chem*, 47(5), (1999), 2048-54.
201. Hussain, A.I, et al., «Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations », *J Food Chem*,108,(2008),86-995.
202. Anwar, F. et al., « Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. *Flavour and Fragrance*», *Journal* 24, (2009), 170-176.

203. Ouibrahim, A., Tlili-Ait-Kaki, Y., Bennadja, S., Amrouni, S., Djahoudi, A.G. et Djebar M.R, «Evaluation of antibacterial activity of *Laurus nobilis* L.,*Rosmarinus officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L.from Northeast of Algeria »,Global Science Research Journals, (2013), 1(1):065-070.
204. Mediouni Ben Jemâa,et al., «Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition »,Journal of Stored Products Research,48,(2012),97-104.
205. Ozcan, M. et Chalchat, J., « Effect of different locations on the chemical composition of essential oils of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves growing wild in Turkey ». Journal of Medicinal Food, (2005), 8:408-411.
206. Piochon, M., « Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse», Mémoire de maîtrise (ressources renouvelables), Université du Québec à Chicoutimi, Aout (2008), pp : 12-30.
207. Rose, J., « 375 essential oils and hydrosols », Frog edition, New York, (1999), pp: 83-85.
208. Rajeswara rao, B.R., kaul, P.N., Syamasundar, K.V. et Ramesh, S., « Water soluble fractions of rose-scented geranium essential oil », Bioresource Technology, 84, (2002), 243-246.
209. Bosson, L. and Dietz, G., « L'hydrolathérapie : Thérapie des eaux florales », Coll. Douce Alternative - Ed Amyris, Bruxelles, (2005), 3ème trimestre, pp : 3-20.
210. Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J. et Lee, C. Y.,« Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine», J. Agric. Food Chem, (2003), 51 : 7292-7295.
211. Nicholas, V., «The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent », Indian J Biol Chem, (1956), 220: 583-93.
212. 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).
213. Meziti,A., « Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa*. L'étude *in vitro* et *in vivo* », Mémoire de Magister en Biochimie Appliquée, Université Ferhat Abbas, Sétif, (2009), pp: 60-62.
214. Rapisarda, P., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Bonina, F., De Pasquale, A. et Saija, A., « Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices », Food Chem, (1999), 47:471- 4723.

215. Fratianni, F., Tucci, M., De Palma, M., Pepe, R. et Nazzaro, F., « Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori) », *Food Chem*, (2007), 104:1282–1286.
216. Yakhlef, Gh., «Étude de l'activte biologiques des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L. »Thèse de Magister en Biochimie Appliquée, Université El Hadj Lakhdar, Batna, (2010),pp:58-60.
217. Mann, C.M., Cox, S.D. et Markham, J.L.,« The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)», *J.Appl Microboil*, (2000), 30(4):294-7.
218. Djeddi, S., Bouchenah, N., Settar, I. et Skaltsa, H.D., «Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria», *Chem. Natural Comp*, (2007), 43(4):487-490.
219. Dorman, H.J.D. et Deans, S.G., «Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils», *J. Appl. Microbiol*, (2000), 88:308-316.
220. Duke, J.A. et Ayensu, E.S.,« Medicinal Plants of China». Reference Publications. Inc.: ISBN 0-917256-20-4. Reference Publications, Algonac, MI (USA),(1985).
221. Elharas, K., Daagare, A., Mesfioui, A. et Ouhsine, M., «Activité antibactérienne de l'huile essentielle des inflorescences de *Laurus nobilis* et *Lavandula angustifolia* », *Afrique Science*, (2013), 09(2): 134-141.
222. Kheyer, N., Meridja, D. et Belhamel, K., « Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia », *Algerian Journal of Natural Products*, (2014), 2(1): 18-26.
223. Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Matos, O., Serrano, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Nunes, M.L. et Marques, M., « Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay leave *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal », *Natural Product Research*, (2012), 6: 518-529.
224. Moghtader, M. et Farahmand, A., «Evaluation of the antibacterial effects of essentialoil from the leaves of *Laurus nobilis* L. in Kerman Province ». *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, (2013), 5(2): 13-17.
225. Moghaddam, A.M.D., Shayegh, J., Mikaili, P. et Sharaf, J.D., «Antimicrobial activity of essential oil extract of *Ocimum basilicum* L. leaves on a variety of pathogenic bacteria », *Journal of Medicinal Plants Research*, (2011), 5(15): 3453-3456.

226. Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi F., Chessa, M., Cerri, R. et Casanova, J., «Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica », *Flavour and Fragrance Journal*, (2002), 17: 15-19.
227. Wilkinson, J.M., Hipwell, M., Ryan, T., and Cavanagh, H.M.A., «Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2003), 51:76-81.
228. Pibiri, M.C., « Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles », thèse de Doctorat, École Polytechnique Fédérale Lausanne, Suisse, (2006), 177p.
229. Kivanc, M. et Akgul, A., « Antibacterial activities of essential oils from Turkish spices and citrus », *Flavour Fragrance. Journal*, (1986), 1(4):175-179.
230. 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*, (2006), 73:413-421.
231. Inouye, S., Takazawa, T. and Yamaguchi, H., «Antimicrobial activity of the essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact », *Journal of Antibacterial Chemotherapy*, (2001), 47: 565-573.
232. Lopez, P., Sanchez C., Batlle, R. et Nerin C., «Solid and vapor phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected food borne bacterial and fungal strains » *J. Agric. Food Chem*, (2005),53: 6939- 6946.
233. Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N. et Anackov, G., « Characterization of the volatile composition of essential oil of some lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils », *J. Agric. Food Chem*, (2006), 54: 1822-1828.
234. Billerbeck, V.G., Roques, C., Vaniere, P. et Marquier, P., «Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles», *Revue Hygienes*, (2002), volume X, n° 3, pp: 248 – 251.
235. Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T. et Arsenakis, M., « Antimicrobial activity of mint essential oils », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1995), 43: 2384 – 2388.
236. Nikaido, H., «Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited», *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, (2003), 67(4): 593-656.

237. Perscott, L M., Harley, J.P. et Klein, D.A., «Microbiologie», Edition de Boeck and Larcier, s.a, (2003), Bruxelles, 1137p.
238. Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G. and Fu, Y.J., «Antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis* L oil compared to its main compounds», Food chemistry, (2008), 108 (3): 1019-1022.
239. Haddouchi, F. et Benmansour, A., «Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application a deux plantes aromatiques », Les Technologies de Laboratoire, (2008), N° 8, pp : 20-27.
240. Cosge, B., Turker, A., Ipek, A. and Gurbuz, B., « Chemical Compositions and Antibacterial Activities of the Essential Oils from Aerial Parts and Corollas of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) letswart, an Endemic Species to Turkey », Molecules, (2009), 14(5):1702-1712.
241. Hammer, K.A., Carson, .CF. et Riley, T.V., «Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts », J. Appl. Microbiol, (1999), 86: 985–990.
242. Burt, S., «Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review», Int. J. Food Microbiol, (2004), 94: 223-253 .
243. Kalemba, D. and Kunicka, A., «Antibacterial and antifungal properties of essential oil », Current Medicinal Chemistry, (2003), 10(10):813-829.
244. Guinoiseau, E., «Molécules, antibactérienne issues d’huiles essentielles : séparation, identification et mode d’action», Thèse de Doctorat de l’Université de Corse, option : Biochimie- Biologie moléculaire, France, (2010) ,50p.
245. Wendakoon, C.N. et Sakaguchi, M., « Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices», J. of Food Protection, (1995), 58: 280– 283.
246. Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka,T. et Linuma, M., «Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* », J.Ethnopharmacol, (1996), 50: 27-34.
247. Daroui-Mokaddem, H., « Étude phytochimique et biologique des especes: *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniololus* (*Apiaceae*), *Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum trifurcatum* (*Asterarceae*) », Thèse de Doctorat. Option: Biochimie appliqué, Université Badji-Mokhtar, Annaba, (2011).
248. Mason, T.L. and Wasserman, B.P., «Inactivation of red beet beta-glucan synthesis by native and oxidized phenolic compounds», Phytochemistry, (1987), 26: 2197-2202.

249. Kurita, N. et Koike, S., «Synergetic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components», *Agric. Bil. Chem*, (1982), 46: 159-165.
250. Knobloch, K.A., Pauli, B., Iberl, H., Weigand, N. and Weis., «Antibacterial and antifungal properties of essential oil components», *J. of Ess. Oil Res*, (1989), 1: 119-123.
251. Johansen, C., Verheul Gram, L. et Abee, T., « Protamine-induced permeabilization of cell envelopes of Gram-positive and Gram- negative Bacteria», *App. Env. Micobio*, (1997), 63: 1155- 1159.
252. Celiktas, O.Y., Kocabas, E.E.H., Bedir, E., Sukan, .FV., Ozek, T. and Baser, K.H.C.,« Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations », *Food Chemistry*, (2007),100: 553–559.
253. Van Vuuren, S.F., Suliman, S. et Viljoen, A.M., «The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials», *Lett.Appl.Microbiol*, (2009), 48: 440 - 446.
254. Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T. et Arsenakis, M., « Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil », *J. Agric. Food Chem*, (1997), 45: 3197-3201.
255. Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y. et Efferth, T., «Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main component», *Molecules*, (2012), 17:2704-271.
256. Valnet, J., «L'aromathérapie», Ed. Maloine S.A. ISBN : 2-253-03564-5. (2005).
257. Abdellah, F., Satrani, B., Fechtal, M., Chaouch, A., et Talbie,M.,«Composition chimique et activites antibacterienne et antifongique des huiles essentielles extraites des feuilles d' Eucalyptus camaldulensis et de son hybride naturel (clone 583) », *Acta Bot. Gallica*, (2001), 148 (3), 183-190.
258. Franchomme, P.,« L'aromatologie a visée anti infectieuse. Phytomedecine», (1981), pp : 1-2, 25-47.
259. Gueldner, R.C., Wilson, D.M. and Heidt, A., «Volatile compounds inhibiting a flavors», *J. Agric. Food. Chim*, (1985), 33, 413-441.
260. Wilson, C.L., Solar, J.M., El Ghaouth, A. and Wisniewski, M.E., «Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*», *Plant Disease*, (2003), 81 (2), 204-10.

261. Sari, H., «Contribution à l'étude de la dégradation de l'huile essentielle du *Laurus nobilis* « Laurier noble » de la région de Tlemcen en fonction de la température. Etude de son pouvoir antimicrobien», Mémoire d'ingénieur d'état, CQA, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen, (2003).
262. Haddouchi, F., «Contribution a l'étude des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* (Zaâteur) de la région de Mostaganem et de *Laurus nobilis* (Rend) de la région de Tlemcen (Nedroma). Activités antibactériennes et antifongiques en fonction de leur conservation», Mémoire de Magister en Biologie, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université Abou Baker Belkaid, Tlemcen, (2007).
263. Houicher, A., Hechachna, H., Teldji, H. and Ozogul, F., «In Vitro Study of the Antifungal Activity of Essential Oils Obtained from *Mentha spicata*, *Thymus vulgaris*, and *Laurus nobilis*», Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture, (2016), 8(2):99-106.
264. Yi, Z., Yu, Y., Liang, Y. et Zeng, B., « In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids », LWT Food Sci. Technol, (2008), 41:597–603.
265. Maisuthisakul, P., Suttajit, M. et Pongsawatmanit, R., «Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants », Food Chem, (2007), 100:1409-1418.
266. Villano, D., Fernandez-Pachon, M.S., Moya, M.L., Troncoso, A.M. and Garcia-Parrilla, M.C., « Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical », Talanta, 71 (2007): 230– 235.
267. Ruberto, G. and Barrata, M.T., «Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems », Food Chem, (2000), 69: 167–74.
268. Vardar-Ünlü, G., Candan, F., Sökmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, M., Dönmez, E. et Tepe, B., «Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey var *pectinatus* (Lamiaceae). J Agric Food Chem, (2003), 51: 63–7.
269. 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.
270. Klervi, L.L., «Connaissance chimiotaxonomique du genre *Turbinaria* et étude des composés de défense de différents espèces de Sargassacées des Iles Salmon (Pacific sud)», (2005), 210p.

271. Panovska, T.K., «*In vitro* antioxydant activity of some *Tencrium* species (Lamiaceae) », *Acta Pharm*, (2005), 55:207-214.
272. Sokol-Letowska, A., Oszmiansk, J. et wojdylo, A., « Antioxydant activity of the phenolic compounds of Hawthorn, pine and skullcap », *Food chemistry*, (2007), 103:853-859.
273. Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D. et Trinajstic, N., «Structure – radical scavenging activity relationships of flavonoids », *Croatica Chemical Acta*, (2003), 76: 55-61.
274. Marfak, A., « Radiolyse Gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides », Thèse de doctorat, Ecole Doctorale Sciences Biologie Santé, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges MOGES, (2003) ,220p.
275. Shahidi, F. et Naczk, M., «Extraction and analysis of phenolics in food », *Journal of Chromatography A*, (2004), 1054(1-2): 95-111.
276. Pratt, D.E. et Hudson, B.J.F., «Natural antioxidants not exploited commercially in Food Antioxidants», Ed: Elsevier Applied Science, London, (1990), pp: 171–192.
277. Ladaniya, M., « Citrus Fruit: biology, technology and evaluation», Ed 1: Academic Press, Elsevier, USA, (2008), pp: 157-165.
278. Heighen, C.G.M., Haenon, G.R.M.M., Vekemans, J.A.J.M. et BAST, A., « Peroxy nitrite scavenging of flavonoids: structure activity relationship», *Environ. Toxicol. Pharmacol*, (2001), 10:199-206.
279. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., et Bobilya, D.J., « Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship », *Journal. Nutr. Biochem*, (2002), 13: 572-584.
280. Uri, N., «Mechanism of antioxidation», Ed: Science Publishers, New York; (1961), pp: 133-169.
281. Prakash, D., Singh, B.N. and Upadhyay, G. «Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*) », *Food Chemistry*, (2007), 102: 1389-1393.
282. 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*, (1995) ,61 : 549-554.
283. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. et Paganga, G., «Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids», *Free Radic. Biol. Med*, (1996), 20: 933-956.

284. Jovanovic, S.V., Steenken, S., Simic, M.G. et Hara, Y., «Antioxidant properties of flavonoids», *Ahdieq Journal*, (1998), 7: 137-161.
285. Yeşilyurt, V., Halfon, B., Öwtürk, M. et Topçu, G. « Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella* », *Food chemistry*, (2008), 108: 31-39.
286. Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A. et Serry, M.M., «Plant flavonoïds, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using in vitro oxidation model for heart disease», *J. Agricultural and food chemistry*, (1995), 43:2800-2802.
287. Kadri, A., Zarai, A., Békir, A, et *al.*, «Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia », *Afr J Biotechnol*, . (2011), 10: 3908 - 3914.
288. Pukalskas, A., Venskutonis, P.R., Salido, S. *et al.*, «Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania », *Food Chem* , (2012), 130: 695–701.
829. Ozcan, B., Esen, M., Sangun, M.K., Coleri, A. and Caliskan, M., «Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil», *Journal of Environmental Biology*, (2010), 31: 637-641.
290. Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A. and Rasooli, I., «Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils». *Food Chemistry*, (2007), 102: 898-904.
291. Miladi, H., Ben Slama, R., Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A. and Ammar, E., «Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against food borne pathogens», *Natural Science*, (2013), 5(6): 729-739.
292. Aazza, S., Lyoussi, B. and Miguel, M.G., « Antioxidant and Antiacetyl cholinesterase Activities of Some Commercial Essential Oils and Their Major Compounds», *Molecules*, (2011), 16: 7672-7690.
293. Liyana-Pathriana, C.M. and Shahidi F., « Antioxydant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (2006), 86:477-485.
294. Zerkak, H. et Zetout, E.H., «Etude de la toxicité et de l'activité antioxydants des extraits de trois plantes médicinales», *Mémoire de Magister en Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biologie Physico-Chimique, Université Abderrahmane Mira, Béjaia*, (2017).

295. Vavra, J.J., Deboer, C., Dietz, A., Hanka, L.J. et Sokolski, W.T., « Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic», *Antibiotics Annual*, (1959), 7:5-230.
296. Brentjens, R. et Saltz, L., « Islet cell tumors of the pancreas: The medical oncologist's perspective », *Surgical Clinics of North America*, (2001), 81:527–42.
297. Akbarzadeh, A., Norouziyan, D., Mehrabim, R., Jamshidi, Sh., Farhangi, A., Allah Verdi, A., Mofidiant, S.M.A. and Lame Rad, B., «Induction of diabetes by streptozotocin in rats», *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, (2007),22(2):60-64.
298. Bedoya, F.J., Solano, F. et Luas, M., «N-monomethyl argenin and nicotinamid prevent STZ induced double strand DNA break formation in pancreatic rats islets», *Experiantus*, (1996), 4:52-344.
299. Yamamoto, J.K., Spargere Ho, E.W., Andersen, P.R., Oconnor, T.P., Mandell, C.P., Lowenstine, L., Munn, R. et Pedersen N.C., «The pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus (FIV) infection in cats », *American Journal of Veterinary Research*, (1988), 49:1246-1258.
300. Vats, V., Yadav, S.P. and Grover, J.K., « Ethanolic extract of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates streptozotocin-induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats», *J Ethnopharmacol*, (2004),90:155-160.
301. Oliveira, H.C., Dos-Santos, M.P., Grigulo, R., Lima, L.L., Martins, D.T.O., Lima, J.C.S., Stoppiglia, L.F., Lopes, C.F. and Kawashita, N.H.,« Antidiabetic activity of *valairea macrocarpa* extract in rats », *Journal of Ethnopharmacology*, (2008), 111: 515-519.
302. Farnier, M., «Dyslipidemies du diabétique», Ed. Jhon Libbey, Paris, (2002),pp: 21, 22.
302. Babu, P.S., Prabuseenivansan, S. et Ignacimuthus, S., « Cinnamaldehyde – a potential antidiabetic agent», *Phytomedicine*, (2007), 14: 15-22.
304. N'diaye, M., Diatta, W., Sy, G. Y., Fall, A. D., Faye, B. and Bassene, E., « Activité Antihyperglycemiante de L'extrait ethanolique de feuilles d'*Icacina Senegalensis* Juss (Icacinaceae)», *Medecine D'afrique Noire*,(2008),55 : 441- 445.
305. Olagbende-Dada, S.O., Ogonnia, S.O., Coker, H. A. B. and Ukpo, G.E., « Blood glucose lowering effect of Aqueous extract Of *Gratophyllum Pictum* (Linn) Griff on alloxan induced diabetic rats and its acute toxicity in mice», *African Journal Of Biotechnology*, (2011), 10 (6):1039-1043.

306. Lean, Me., Moroozu, M., Kelly, I., Burns, J., Taluar, D., Sattar, N. and Crozier, A., « Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA », *Diabetes*, (1999), 48:176-181.
307. Ford, Es., Will, Jr., Bowman, Ba. and Narayan, Km., « Diabetes mellitus and serum carotenoids: findings from the third national health and nutrition examination survey », *American Journal Epidemiology*, (1999), 149:168-176.
308. Anderson, R.A., « Chromium and polyphenols from cinnamon improve insulin sensitivity », *Proc. Nutr. Soc.*, (2008), 67: 48-53.
309. Broadhurst, C.L., Polansky, M.M. and Anderson, R.A., « Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts *in vitro* », *J. Agric. Food Chem.*, (2000), 48: 849-852.
310. Kambouche, N., Merah, B., Derdour, A., Bellahouel, S., Benziane, M.M., Younos, C., Firkioui, M., Bedouhene, S. and Soulimani, R., « Étude de l'effet antidiabétique des saponines extraites d'*Anabasis articulata* (Forssk) Moq, plante utilisée traditionnellement en Algérie », *J Phytothérapie*, (2009), 7: 197–201.
311. Grimaldi, A., Hartemann-Heurtier, A., Jacqueminet, S., Bosquet, F., Masseboeuf, N., Halbran, M. and Sachon, C., « Guide pratique du diabète », 4e Ed, Masson, Paris, (2009).
312. Slotter, H.R., Pockard, C.J., Bicker, S. et Shepherd, J., « Effects of cholestyramine on receptor mediated plasma clearance and tissue uptake of human LSC in the rabbit », *Journal of Biological Chemistry*, (1980), 255:102-103.
313. Kritchevsky, D., « Fiber, hypercholesteremia and atherosclerosis lipids », *American Journal of Clinical Nutrition*, (1978), 315:65-74.
314. Palsamy, P. and Subramanian, S., « Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats », *Biomedicine and Pharmacotherapy*, (2008), 62:598-605.
315. Eddouks, M., Oualridi, M.L., Farid, O., Moufid, A., khalidi, A. et Lem hadri, A., « L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète en Maroc », *phytothérapie*, (2007), 5:194-203.
316. Aljamal, A., « Effects of Bay Leaves on the Patients with Diabetes Mellitus », *Research Journal of Medicinal Plants*, (2011), 5: 471-476.
317. Khan, A., Zaman, G. and Anderson, R.A., « Bay Leaves Improve Glucose and Lipid Profile of People with Type 2 Diabetes », *J Clin Biochem Nutr.*, (2009), 44(1): 52–56.



Type of the Paper (Article)

Chemical composition and Antimicrobial Activity of the Algerian *Laurus nobilis* Essential oil

MILIANI Asmaa¹, BOUKHATEM Mohamed Nadjib^{2,3,*} and SAIDI Fairouz¹

¹ Laboratoire Biotechnologies, Environnement et Santé, Département de Biologie et Physiologie Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Blida 1, Blida, Algeria

² Département de Biologie et Physiologie Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Blida 1, Blida, Algeria.

³ Laboratoire Ethnobotanique et Substances Naturelles, ENS Kouba, Alger, Algeria.

* Author to whom correspondence should be addressed: mac.boukhatem@yahoo.fr
Tel.: +213559146610.

Received: 13/01/2017

Accepted: 08/12/2017

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.1098323>

Abstract: The aim of this research is to determine the chemical composition and the antimicrobial activity of Algerian *Laurus nobilis* essential oil. The chromatographic analyses (CG/MS) have shown that the major components of *Laurus nobilis* essential oil are the 1.8 cineol (24,658%) and the linalol (18,563%). The *Laurus nobilis* essential oil has shown an antimicrobial activity against all the tested strains except the *Pseudomonas aeruginosa* which shown a strong resistance. The Minimum Inhibitory Concentrations (MIC), Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) and Minimum Fungicidal Concentrations (MFC) have been determined by the agar dilution method, some micro-organisms were susceptible to the essential oils that have the MBC values between 1% and 0.03%. A fungicidal action has been obtained regarding the *Candida albicans*, a fungistatic one regarding the *Saccharomyces cerevisiae*, these results promise to get a scientific validation to the massive use of this species.

Keywords: *Lauris nobilis*; Essential Oil; Antimicrobial Effect; MIC; *Candida albicans*; Gas Chromatography.

I. Introduction

With the appearance of the pathogenic microorganisms that are resistant to the antibiotics, the antimicrobial essential oils have become a real alternative to the medicine of antibiotics against the infectious diseases [1]. Many studies have shown the capacities of the essential oils of getting rid of the most powerful microbes such as *Staphylococcus*, *Mycobacterium tuberculosis* or Typhoid *bacillus* [2]. The antimicrobial activity of the essential oils is due to their composition more specifically to the nature of their main components [3].

The essential oils do not gradually lose their effectiveness through the process of their use, and there is no need to multiply the doses in order to recover.

The wide variety of the essential oils components, prevent the microbes from organizing their resistance [4]. *Laurus nobilis* L, a member of the lauraceae family which contains 32 genera and about 2000-2500 species [5]. *Laurus*, derives its name from latin word of a celtic origin, it means evergreen which refers to the persistent green foliage of the plant all over the year [6].

Laurus nobilis, shrub or aromatic tree with 2 to 10m of height with a right stem, the lauraceae stems have a heterogeneous sclerous pericycle (fibers and sclerous cells) and cell essence [7]. *Laurus nobilis* grows in a shaded and a moist forest near the coasts often planted as an ornamental and aromatic plant [8]. It's common in ravins and humid forests such as those of Algiers and Constantine [9]. It is also cultivated for commercial reasons in turkey, Algeria, France, Greece, Morocco, Central America, Southern United States [10].

The leaves of the *Laurus* are considered as one of the most known flavors throughout the country, they are usually used as a valuable spice in cooking (in soups, stews, sauces) and as a flavor in the alimentary industry.

This plant plays a big role in the traditional medicine moreover it has recently become an interesting scientific research subject [11].

The aim behind this work is to show the characterization of the chemical composition of *Laurus nobilis* essential oil and to study its antimicrobial activity on the bacterial and fungal strains as well.

II. Experimental Section

II.1. Plant material

Lauris nobilis leaves were harvested in march 2014 from BEN ALI (a mountainous region in Blida) , the plants grow in the north west of the mountain slope ,at an altitude of around 750m, they grow in a shaded location they do not receive any special treatment. The identification of the plant was confirmed at the level of the laboratory of vegetal biology and botany of the department of Biology and the department of Agronomy (university of Saad Dahleb, Blida).

II.2. Extraction of essential oil

The isolation of the essential oil was performed by hydrodistillation using the Clevenger-type apparatus (Column alembic), the fresh leaves were collected than put into the alembic and due to the electric heating system , the water vapors which are loaded of the essential oils passed through the vegetal material and migrated to the refrigerant where it arrived to an alembic in which the cold water is continuously circulating due to a closed circuit system with a temperature around 12°C 13°C ,the water vapor which is loaded of the essential oils condenses into liquid [12], at this phase the essential oils separate from the water with a simple decantation. The yield of the essential oil is defined by being the connection between the essential oil mass we got after the extraction and the treated vegetal mass. The essential oil yield was estimated using the following equation:

$$R (\%) = (m /m_o) \times 100$$

Where m: essential oil mass (g), m_o: fresh leaves mass (g), R: essential oil yield (%) [13]. the essential oil is stored in amber glass bottles and kept away from light at a temperature of 4°C .

II.3. Chromatographic analysis

The chromatography analyses were performed using a Gas chromatography coupled with a mass spectrometry through Hewlett Packard 6890N machine coupled with mass spectrometry 5973N equipped with capillary column HP-5MS (30m x0.25mm) with a coating thickness of 0.25µm, the volume of the injected samples is 1µl diluted in the dichloromethane. the fragmentation was performed by an electric impact of 70ev, the column temperature was programmed from 50°C to 250°C at a rate of 4°C mn⁻¹, using the helium as a carrier gas at a consonant flow rate of 1ml/mn .The identification of the components was based on the comparison of their spectrum mass with those of authentic standards found in the literature (database) (NIST 98).

II.4. Antimicrobial activity

II.4.1. Microbial strains

The strains which were tested in order to reveal the antimicrobial activity of *Laurus nobilis* essential oil are the followings: The strains of international collection ATCC (American Type Culture Collection). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Escherichia coli* ATCC 4157, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Proteus mirabilis* ATCC 49452, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Candida albicans* ATCC 24433, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601.

The clinical strains isolated from hospitalized patients at the HOSPITAL OF MOSTAPPHA BASHA, ALGERIA (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Lactobacillus* sp, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp, *Klebsiella oxytoca*, *Providencia alcalifaciens*, *Salmonella* sp, *Serratia marcescens*, *Shigella* sp, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella Typhimurium*) were stored at 80°C in glycerol stocks.

The microbial strains tested were provided by the laboratory of microbiology center of research and Development of El-Harrach.

II.4.2. Culture media

In order to evaluate the antimicrobial activity of the essential oil two culture media were used: the agar Muller- Hinton for studying the sensitivity of the bacteria toward the essential oil.

The agar Sabouraud for studying the isolation of the yeasts and their sensitivity toward the essential oil.

II.4.3. Disk diffusion method

The antimicrobial activity is evaluated by the Disk diffusion method [14].which consists of using absorbent sterilized paper discs (9mm diameter) wet with essential oil, the discs were placed on the surface of the agar. The bacteria were spreaded all over the discs, the spreading of the tested product throughout the disc determined the degree of concentration, the micro-organisms grow all over the surface of the agar except where they encounter a sufficient concentration of the product that would inhibit their growing, after incubation around the discs, we observed a clear circular zone it is the inhibition zone, the effect of essential oil on microbial strains was estimated by the appearance of clear zones around the discs the more this diameter zone is big, the more the strains are sensitive to antibiotics the more is small, the more the bacteria is resistant. The diameter of the halo of growth inhibition was measured by vernier calipers (Mauser) and expressed in mm (including the diameter of the disc of 9 mm) [15]. All assays were performed in triplicate.

This method was taken from the principles of titling the antibiotics (European pharmacopoeia 2002) its application for the essential oils was approved by the microbiology department of CRD Saidal, it was also used by some authors [16-25].

II.4.4. Determination of minimum inhibitory concentration

The minimum inhibitory concentration was determined towards the bacterial strains and yeasts through the agar dilution method [26][27], by placing spots of 3 µl of standardized inoculum with 10⁻⁴ CFU/ml, we also placed cellulose discs soaked with 3 µl of the microbial suspensions of the dilution 10⁻⁴ in order to determine the MBC, MFC.

The range of the concentration of the tested essential oil is the following: 0.007, 0.015, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1.2 %. After incubation at 37° C during 24h for the bacteria and 25°C during 48h for the yeasts. MIC was defined as the lowest concentration of the essential oil that completely inhibited microbial growth after the incubation period [28].

II.4.5. Determination of minimum bactericidal concentration and minimum fungicidal concentration:

After tracking the discs where no growing has taken a place at the time of the determination of MIC, the experimentation continues this time for the determination of MBC and MFC, it consists of determining the lowest concentration of the essential oil where no visible microbial high-growing is shown only after subculture in a unscathed medium of the essential oil at 37°C during 24h for the bacteria and 25°C during 48 h for the yeasts.

III. Results and Discussion

III.1. Essential oil of *Laurus nobilis* yield:

The *Laurus nobilis* fresh leaves yield of essential oil was 0.82% this yield was lower than the one of the same plant in turkey which was 0.86% and higher than the one of Egypt which was 0.68%, the difference of places, and seasons could be the reason behind these fluctuations [29].

III.2. Chemical composition of the essential oil:

The chemical composition of *Lauris nobilis* oil is listed in the table 1.

Table 1: Chemical composition of the *Laurus nobilis* essential oil

Compound	(%)
Sabinène	0.246
1.8cineol	24.658
γ- terpnène	0.196
Cis-linalolxide	0.198
Linalol	18.563
L-4-terpineol	9.382
α -terpineol	9.875
exo-2-Hydroxycineole acetate	0.253
Eugenol	9.478
Methyl eugenol	9.871
Elemicine	1.808
Diisoocty phthalate	0.867
Total	85.395

The results of the GC/MS analysis revealed the presence of 12 terpenes compounds that represent 85.395% of the total isolated components, 1.8 cineol as the main component of the EO (24.66%) followed by linalol (18.56%) α -terpineol (9.815%) methyl eugenol (9,871) eugenol (9,478%) L-4- terpineol (9,382%). The concentrations of the other components are less than 1%. The essential oil content of 1.8 cineol is less than the ones observed in the plants from Egypt (54.9%) Turkey (28%) Italy (45%) [30].

III.3. Antimicrobial activity

The results obtained in the antimicrobial and antifungal activity of the EO of the *Laurus nobilis* are shown in Table 2.

The EO of *Laurus nobilis* has showed an antimicrobial activity on all the tested strains except for *Pseudomonas aeruginosa* that was not affected thanks to its intrinsic resistance to a wide range of antibiotics, this resistance is due to the nature of its outer membrane [31-34]. It was

reported that the responsible components of the antimicrobial activity of EO are linolol, terpineol, eugenol, caryophyllene, nerolidol, α - humulene, viridiflorol [35].

Table 2: Diameter of Inhibition zone, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

Microbial strains	Inhibition zone diameters (mm)	MIC (%)	MBC/MFC (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0,000±,0000	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC9372	32,233±0,9292	0.03	0.25
<i>Escherichia coli</i> ATCC4157	22,267±0,6429	0.25	0.25
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC4617	14,700±0,6245	1	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	67,233±0,6807	0.125	0.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC4352	48,633±1,3650	0.125	0.125
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	15,500±0,6245	0.25	0.5
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC13047	18,100±0,2646	0.25	0.5
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 49452	16,200±0,4359	0.25	0.5
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	14,967±0,5033	0.06	0.25
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC6569	22,300±0,7550	0.5	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	33,500±1,3454	0.25	0.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,000±,0000	-	-
<i>Escherichia coli</i>	20,100±0,8544	0.5	0.5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	18,667±0,5859	0.5	1
<i>Lactobacillus</i> sp.	16,033±0,2517	0.25	0.5
<i>Citrobacter freundii</i>	17,700±1,0440	0.125	0.25
<i>Enterobacter</i> sp.	20,667±0,5774	0.125	0.5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	17,600±0,6000	0.25	0.5
<i>Providencia alcalifaciens</i>	16,397±0,5514	0.25	0.5
<i>Salmonella</i> sp.	24,573±0,5605	0.5	1
<i>Serratia marcescens</i>	15,010±0,0361	0.5	1
<i>Shigella</i> sp.	23,273±0,4456	0.25	0.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16,470±0,6883	0.25	0.5
<i>Salmonella Typhimurium</i>	22,000±0,3606	0.5	1
<i>Candida albicans</i> ATCC2443	14,000±,5568	0.25	0.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC2601	19,300±0,4359	0.125	> 2

Taking the inhibition zone diameters into consideration, the EO is extremely active on *S. aureus*, *K. pneumonia*, *B. subtilis*, *E. faecium*, *Salmonella* sp, *E. coli*, *Enterobacter* sp, *S. Typhimurium*, *Shigella* sp. On the contrary it is moderately active towards *B. bronchiseptica*, *E. faecalis*, *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *L. monocytogenes*, *A. baumannii*, *Lactobacillus* sp, *C. freundii*, *K. oxytoca*, *P. alcalifaciens*, *S. marcescens*, *S. epidermidis*, But totally inactive on *P. aeruginosa*.

The hypersensitivity of the *Staphylococcus aureus* strain could be explained by the probability of sensitivity of bacteria: gram (+) to the external environmental changes in fact; like the temperature, pH, the natural extracts due to the absence of the outer membrane [17] [36], antibacterial substance can easily destroy the bacterial cell wall and cytoplasm membrane, as a result a leakage and coagulation of the cytoplasm occurs [37].

We observe that different studied bacterial strains react differently to the tested EO even in the case of two strains of the same species. For example: *S. aureus* ATCC6538 and *S. aureus* clinical.

The EO practiced a moderate antifungal activity towards *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* with inhibition diameters of 18.33 mm and 13.33 mm, our results accord

with those found by Quibrahim and al [38] .that reported the effectiveness of the oil on the tested microorganisms giving a lower inhibition diameters than ours : it was 13.5mm for *E coli* ATCC25922, 11.1mm for *P. mirabilis* , 12mm for *K. pneumoniae*,11mm for *K. oxytoca*, 12.7mm for *Enterobacter* sp,11.4mm for *P. alcalifaciens* ,16.4mm for *Shigella* sp,12.5mm for *Salmonella* sp , 11.5mm for *S. marcescens* ,8.7mm for *C. freundii* , 9.2mm for *A. baumannii* ,11.3mm for *E. faecalis*,14mm for *S. aureus* ATCC25923,12.7mm for *S. epidermidis* [38].

on the other hand Elharas and al[39].have revealed that the Moroccan *Laurus nobilis* essential Oil practices a big inhibitory activity towards *Staphylococcus aureus* ,*Pseudomonas aeruginosa* with the diameters inhibition zone of 8.5cm and 2.12cm.

The tested bacterial strains and the method used for the antibacterial activity evaluation may be the reasons behind the different results [40].

The values of MIC accord with the ones of inhibition diameters ,the extracts that have caused a significant inhibition zone represent the smallest MIC between the corresponding strains ,this is not the case for *Staphylococcus aureus*, *klebsiella pneumonia* That have showed great zones of inhibition although their MIC is 0.215% .So apparently the *bacillus subtilis* have shown the lowest CIM with a value of 0.03%.The highest MIC was observed in *B. bronchiseptica*.by 1%, a high concentrations are required to inhibit the growing of *Bordedetta bronchiseptica* .

The essential oil of *Laurus* has practiced a bacteriostatic activity on *Escherichia coli* and *klebsiella pneumonia* with MIC values respectively from 0.25% and 0.5%, and practiced fungistatic activity on *S. scerevisiae* and *C. albicans* with MIC values respectively from 0.125% and 0.25%.

IV. Conclusion

This work is devoted to determine the chemical composition, the yield and the antibacterial, antifungal activity of the *Laurus nobilis* essential oil so to give a more attention and valorization to the Algerian flora. The average yield of the essential oil is 82%, the quantitative and the qualitative analyses of the essential oil by GC/MS have identified 12 components: the terpene oxide (1.8 cineole) as a major component with the indicative content of 24.66%.The evaluation of the antimicrobial activity has showed that the essential oil of *Laurus nobilis* has antimicrobial capacities against all the tested microbial strains except the *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Pseudomonas aeruginosa*.

The essential oil has showed a bactericidal action towards the studied strains) those bacteria were unequally sensitive towards EO), a fungicidal action towards *Candida albicans* and a fungistatic action towards *Saccharomyces cerevisiae*.

This work approved that the essential oils have a significant antimicrobial activities and could be a successful alternative to the traditional antibiotics that become powerless in front of the resistant microorganisms.

V. References


- [1] Matsuda H, Kagerura T, Toguchida I, Ueda H (2000) 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 66 (22):2151-2157
- [2] Franchomme P (1981) aromatology with Anti-infectives properties. Phytomedicine 1:25-47
- [3] Lee KH, Huang ES, Pagana JS, Geissman TA (1971)Cytotoxicity of sesquiterpenes lactones. Cancer Reasearch 31:1649-165
- [4] Afnor (2000) Recueil de normes: essential oils.Monography relatives to essential oils. AFNOR Paris 661-663
- [5] Barla A, Topçu G, Öksüz S, Tümen G, Kingsto DGI (2007) Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis*. International Food chemistry 104: 1487-1484
- [6] Pariente L (2001) Biological and pharmaceutical sciences Dictionary National Academy of pharmacy, paris 1643p.
- [7] Deysson G (1979) General Botany course, Fourth section: organization and classification of vascular plants, second part systematic. CDU et SEDES paris 262p.

- [8] Bärtels A (1998) A guide to Mediterranean plants .Eugen Ulmer Paris 38p.
- [9] Quezel, P. and Santa, S., "New Algerian flora of the Southern Desert regions of Algeria", Edition C.N.R.S,Paris, (1963), 977p.
- [10] Demir V, Guhan T, Yagcioglu AK, Ddegirmencioglu A (2004) Mathematical modeling and the determination of some quality parameters of air-dried bay leaves.Biosystems Engineering 88(3):325-335
- [11] Simić M, Kundaković T, Kovačević N (2003) Preliminary assay on the antioxidant activity *Laurus nobilis* extracts. Fitoterapia.4:613-616
- [12] Chiej R (2001) Encyclopaedia of Medicinal Plants .MacDonald.ISBN 0-356-10541-5, Little, Brown.
- [13] Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R., Bessiere, J.M. (2003). Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. Flavour Fragr. J. 18: 481-484
- [14] Davis J(1994). c of antibiotics and the dissemination of resistance genes .Science 246:375-382
- [15] Fauchère JL, Avril JL (2002) General and medical bacteriology.Ellipses Editions Paris 365
- [16] 16-Dean SG, Ritchie G (1987) Antibacterial properties of plant essential oils.International Journal Food Microbiology 5:165-180
- [17] Zaika LL (1988) Spices and Herbs: Their antimicrobial activity and its determination.J. Food Safety 9:97-118
- [18] Pattnaik S, Subramanyam VR, Kole CR, et al. (1995) Antibacterial activity of essential oils from *Cymbopogon*: inter-and intraspecific differences. Microbios 84:239-245
- [19] Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T Arsenakis M (1996) Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44(5):1202-1205
- [20] Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L (1998) Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Letters in Food Microbiology 26:118-122
- [21] Lis-Balchin M, Hart SL, Deans SG (2000) 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 14:623-629
- [22] Burt AS, Reinders RD (2003) Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. Lett. Applied microbial 36:162-167
- [23] Okogun GRA, Bethran EB, Anthony N, Okere Jude C, Anegebe C (2003) Epidemiological Implications of Preferences of Breeding Sites of Mosquito species in Midwestern Nigeria. Ann. Agric. Environ. Med 10:217-222
- [24] Faleiro L, Miguel G, Gomes S, Costa L, Venâncio F, Teixeira A, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG (2005) Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. Journ. Agri. Food Chem 53:8162-8168
- [25] Baghdadi HH, Ahmed SS, Fournier G, Refaat AM (1992) On the Essential oil of *Laurus nobilis* Grown Egypt. Egypt.J.Hort 19:93-97
- [26] Billerbeck VC, Roques C , Vanière P, Marquier P ,2002: Activité antibactérienne et antifongique des produits à bases d'huiles essentielles.Hygiènes Xⁿ 3:248-251
- [27] Marino M, Bersani C, Comi G. (2001) Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. Int J Food Microbiol. 67(3):187-95
- [28] Smânia A, Monache FD, Smânia EF, Gil ML, Benchetrit LC, Cruz FS. (1995) Antibacterial activity of substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. J Ethnopharmacol. 45(3):177-81
- [29] Baghdadi HH, Ahmed SS, Fournier G, Refaat AM (1992) On the Essential oil of *Laurus nobilis* Grown Egypt. Egypt.J.Hort 19:93-97
- [30] Paolini J, Leandri C, Desjobert JM, Barboni T, Costa J (2008) 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 1193:37-49
- [31] Djeddi S, Bouchenah N, Settar I, Skaltsa HD (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. Chem. Natural Comp. 43(4):487-490.
- [32] Dorman HJD, Deans SG (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88:308-316.
- [33] Duke JA, Ayensu ES (1985). Medicinal Plants of China. Reference Publications. Inc. :ISBN 0-917256-20-4. Reference Publications, Algonac, MI (USA)

- [34] Man CM, Cox SD (2000) The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J.Appl Microbiol* 30
- [35] Santoyo S, Lioria R, Jaime L, Ibañez E, Señoráns FJ, Reglero G (2006) Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis* L. Chemical and functional characterization. *Eur Food Res Technol* 222:565-571
- [36] Balentine CW, Crandall PG, O'Bryan CA, Duong DQ, Pohlman, FW (2006) The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science* 73:413-421
- [37] Kalemba D, Kunicka A (2003), Antibacterial and antifungal properties of essential oil *Current Medicinal Chemistry*. 10(10):813-829.
- [38] Ouibrahim A, Tlili-Ait-Kaki Y, Bennadja S, Amrouni S, Djahoudi A.G, Djebar M.R (2013) Evaluation of antibacterial activity of *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L. from Northeast of Algeria. *Global Science Research Journals* 1(1):065-070
- [39] Elharas K, Daagare A, Mesfioui A, Ouhssine M (2013) Activité antibactérienne de l'huile essentielle des inflorescences de *Laurus nobilis* et *Lavandula angustifolia*. *Afrique Science* 09(2): 134-141
- [40] Hammer KA, Carson CF, Riley TV (1999) Antibacterial activity of essential oils and other plant extracts. *J.Appl.Microbiol.*86:985-999

Please cite this Article as:

MILIANI Asmaa, BOUKHATEM Mohamed Nadjib and SAIDI Fairouz, Chemical composition and Antimicrobial Activity of the Algerian *Laurus nobilis* Essential oil, *Algerian J. Nat. Products*, 5:2 (2017) 507-514

Access this article online	
Website: www.univ-bejaia.dz/ajnp	Quick Response Code
DOI: https://doi.org/10.5281/zenodo.1098323	

University TAHRI Mohammed Bechar- ALGERIA
Faculty of Natural Sciences and Life



2 nd SIB-VAZB
2017

CERTIFICATE

OF ATTENDANCE

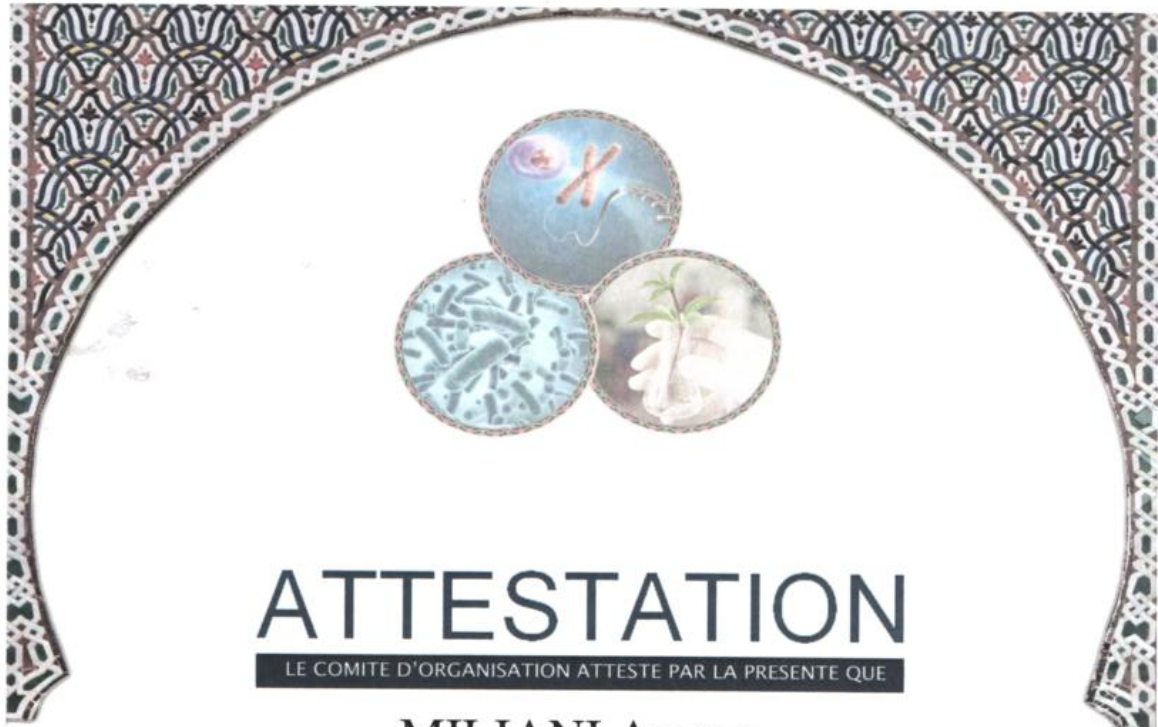
THIS CERTIFICATE IS PRESENTED TO

Miliani Asmaa



This certificate is awarded for participation at
The Second International Seminar of Biology (2 nd SIB-VAZB)
Valorisation of Arid Zone Bioresources
10 -11 December 2017 - University Tahri Mohammed, Bechar - ALGERIA





ATTESTATION

LE COMITE D'ORGANISATION ATTESTE PAR LA PRESENTE QUE

MILIANI Asmaa

a participé au 2ème Congrès international Biotechnologies au Service de la Société "Biotech2017", par une Communication Affichée intitulée :

Effet scavenger du radical DPPH des extraits de *Laurus nobilis* L.

CETTE ATTESTATION EST DÉLIVRÉE À L'INTÉRESSÉ POUR SERVIR ET VALOIR CE QUE DE DROIT.

Pr. Saad Ibsouda Koraichi

Directeur du laboratoire
Biotechnologie Microbienne



Le Président

Saad IBNSOUDA KORAICHI





الجامعة الجزائرية للعلوم الطبيعية والحيوية
MEMBRE ALGERIENNE RECHERCHE ET POUPLAIRE
أحمد عبد الله آبي
MONSIEUR DE L'ENSEIGNEMENT RECHERCHE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
1 Algérie, Saida Saida
UNIVERSITE SAÏD BAHADJ BIDA 1
الجامعة الجزائرية للعلوم الطبيعية والحيوية
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
RECHERCHE ET POUPLAIRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES POPULATIONS DES ORGANISMES
LABORATOIRE DE BIOTECHNOLOGIE, ENVIRONNEMENT ET SANTE



Stipulation de participation

1^{ER} SEMINAIRE NATIONAL « PHYTOTHERAPIE & SANTE »

Bida les 16, 17 et 18 mai 2017



Le comité d'organisation atteste que **Mme MILLIANI Asmaa** a participé aux travaux du séminaire avec une communication affichée intitulée

Evaluation In Vitro De L'effet Antioxydant De Différents Extraits de Feuilles De Laurus Nobilis L.

MILLIANI Asmaa, CHERIF Hamida Saida et SAIDI Fairouz

La Doyenne



La Chef de Département BPO



La Directrice du Laboratoire BES



La présidente du comité d'organisation

Association Tunisienne
de Biotechnologie et
Valorisation des Bio-Ressources
Tunisian Association
of Biotechnology
and Bio-Resources Valorization

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le Président de l'AT-BVBR, atteste que

MILIANI ASMAA

a présenté au ^V¹^eme congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources,
organisé par l'AT-BVBR du 20 au 23 Mars 2018 à Tabarka - Tunisie,
une communication par Affiche intitulée

C.AFFICHE N°:262.

ÉVALUATION IN VITRO DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE LAURUS

NOBILIS L. SUR LA CROISSANCE MYCÉLIENNE D'ASPERGILLUS NIGER ATCC 16404

MILIANI A., SAIDI F.



Président de l'AT-BVBR

Prof. Mohamed Lamri