

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

UNIVERSITÉ DE BLIDA -1-



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**

**Mémoire de Fin d'Etudes En vue de l'obtention du diplôme de
Master en Sciences Biologiques
Option : Génie Biologique**

THEME

**Valorisation de la Fraction Aromatique de la
Lavande en Dermopharmacie**

Présenté le : 24/09/2017

Par :

- **BENKEBAILLI Fatma**
- **HOUCHE Aicha**

Devant le jury :

Mme GUESSAIBIA	MC	Université Blida 1	Présidente
Mme SAADI F.	Professeur	Université Blida 1	Examinatrice
M. BOUKHATEM M.N.	MC	Université Blida 1	Promoteur

∞ Année Universitaire : 2016-2017 ∞

RESUME

L'objectif assigné à notre travail consiste à valoriser la fraction aromatique d'une plante médicinale, la lavande en aromathérapie anti-infectieuse.

L'extraction de l'essence aromatique de la partie aérienne fraîche de la plante a été effectuée, à l'échelle industrielle, par entraînement à la vapeur d'eau. La détermination de la composition chimique de l'huile essentielle (HE), réalisée par Chromatographie Gazeuse-Spectrométrie de Masse (CG-SM), a révélé la présence de 23 composés.

L'étude de l'activité antimicrobienne de l'HE a été accomplie par deux méthodes complémentaires (aromatogramme et microatmosphère). L'HE a présenté une activité antibactérienne majeure sur les souches de *Staphylococcus aureus* avec des diamètres de zone d'inhibition (DZI) qui varient entre 16 et 31 mm pour la dose de 20 µL.

L'efficacité antifongique de l'HE dans une matrice alimentaire (boisson Orangina) a été concluante pour toutes les doses utilisées avec une inhibition totale et rapide de *S. cerevisiae*.

Le processus de cicatrisation des plaies est rapide, présentant une réduction de processus inflammatoire caractérisé par une apparition faible de cellules inflammatoires et une absence de nécrose.

En somme, les résultats obtenus laissent entrevoir des perspectives d'application pharmaceutiques de l'HE de lavande dans la lutte contre les infections et les pathologies inflammatoires locales.

Mots-clés : Aromatogramme ; Fongicide ; Huile essentielle ; Crème.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the potential use of lavender essential oil as an ingredient in aromatherapy or as a bioactive component.

Lavandula stoechas essential oil (LSEO) was extracted from the fresh aerial part by industrial steam distillation. The chemical composition was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and revealed the presence of 23 compounds.

Antimicrobial activity of LSEO was carried out by two complementary methods (disc diffusion and vapor diffusion methods) against a broad spectrum of microbial strains. LSEO exhibited a promising antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* with diameter of inhibitory zone (DZI) ranging from 16 to 31 mm at 20 μ L.

Animals treated with LSEO dermal cream showed highest rate of wound retraction. Else, the process of wound healing is rapid, exhibiting a reduction in inflammatory process characterized by a weak appearance of inflammatory cells and absence of necrosis.

Finally, our findings suggest the potential use of LSEO for the pharmaceutical purposes in the prevention or treatment of microbial infections and local inflammatory pathologies.

Keywords: Disc diffusion method ; Fungicidal effect ; Essential oil; Anti-inflammatory activity; Cream.

Table des Matières

Résumé

Abstract

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des Abréviations

Introduction 1

Chapitre 1. Synthèse Bibliographique

1.1. Le genre <i>Lavandula</i>	3
1.1.1. Condensé historique	3
1.1.2. Synonymes	4
1.1.3. Etymologie	5
1.1.4. Taxonomie	5
1.2. Monographie de la plante étudiée : <i>Lavandula stoechas</i>	6
1.2.1. Données botaniques	7
1.2.2. Domaines d'utilisation	7
1.2.3. Toxicité de l'huile essentielle	12
1.2.4. Intérêt commercial	12
1.2.7. Production de l'huile essentielle	13

Chapitre 2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel	14
2.1.1. Matériel végétal et huile essentielle	14
2.1.2. Matériel animal	15
2.1.3. Souches microbiennes	15
2.1.4. Milieux de cultures et agents chimiques	16
2.2. Méthodes	16
2.2.1. Elaboration des profils chromatographiques	16
2.2.2. Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle	17
2.2.2.1. Méthode des aromatogrammes = Technique en milieu solide	17
2.2.2.2. Microatmosphère = méthode en phase vapeur	18
2.2.2.3. Détermination des CMI par dilution en milieu gélosé	19

2.2.3. Activité antifongique dans une matrice alimentaire (Boisson Orangina)	20
--	----

Chapitre 3. Résultats et Discussion

3.1. Etude analytique de l'huile essentielle	26
3.1.1. Caractéristiques organoleptiques	26
3.1.2. Détermination du profil chromatographique	26
3.2. Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle <i>in vitro</i>	31
3.2.1. Activité antimicrobienne en aromatogramme	31
3.2.2. Activité antimicrobienne en microatmosphère	38
3.2.3. Etude comparative : aromatogramme vs microatmosphère	40
3.2.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice	41
3.3. Activité antifongique de l'huile essentielle dans une matrice alimentaire	43

Conclusion	60
-------------------	----

Références Bibliographiques	62
------------------------------------	----

Annexes	
----------------	--

Liste des Figures

Figure 1.1. Distribution géographique de <i>Lavandula stoechas</i> en bassin méditerranéen	6
Figure 1.2. Aspects morphologiques et botaniques de la lavande (<i>Lavandula stoechas</i> L.)	9
Figure 2.1. Illustration de la méthode de l'aromatogramme.	19
Figure 2.2. Illustration de la méthode de Microatmosphère.	19
Figure 2.3. Filtration sur membrane pour l'analyse microbiologique du Jus Orangina.	20
Figure 2.4. Plaie circulaire dans la région dorso-cervicale des rats.	24
Figure 3.1. Profil chromatographique de l'essence aromatique de <i>Lavandula stoechas</i> .	27
Figure 3.2. Structure chimique des composés détectés dans l'essence de <i>L. stoechas</i> .	28
Figure 3.3. Pouvoir antibactérien de l'huile essentielle en aromatogramme.	34
Figure 3.4. Pouvoir antifongique de l'huile essentielle en aromatogramme.	35
Figure 3.5. Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle en microatmosphère.	39
Figure 3.6. Etude comparative : Aromatogramme vs Microatmosphère	41
Figure 3.7. Détermination des CMI des bactéries par dilution en milieu gélosé.	42

Liste des Tableaux

Tableau 1.1. Taxonomie de La lavande à toupet.	7
Tableau 1.2. Rendements en huiles essentielles des lavandes.	13
Tableau 2.1. Souches bactériennes utilisées dans le screening antibactérien <i>in vitro</i> .	15
Tableau 2.2. Souches mycéliennes utilisées dans le screening antifongique <i>in vitro</i> .	15
Tableau 2.3. Composition de la crème dermique.	23
Tableau 3.1. Propriétés organoleptiques de l'essence de <i>Lavandula stoechas</i> .	26
Tableau 3.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Lavandula stoechas</i> distillée, à échelle industrielle, par entraînement à la vapeur sous pression.	27
Tableau 3.3. Composés chimiques majoritaires détectés dans l'essence aromatiques des lavandes papillons provenant de différentes localisations géographiques.	29

Liste des Abréviations

®	Marque enregistrée
AINS	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
AIS	Anti-Inflammatoire Stéroïdien
AMX	Amoxicilline
ATB	Antibiotique
ATCC	American Type Collection Culture
CG-SM	Chromatographie gazeuse- Spectrométrie de masse
CH	Centre Hospitalo-Universitaire
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CN	Gentamicine
COX	Cyclo-Oxygénase
DMSO	Diméthyl Sulfoxide
DPP	Différence du Poids des Pattes
DZI	Diamètre de la Zone d'Inhibition
ECBU	Examen Cytobactériologique des urines
EM	Ecart-Moyen
EPH	Etablissement Public Hospitalier
EPSP	Etablissement de Proximité de la Santé Publique
EVA	Echelle de Visualisation Analogique
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized As Safe
HE	Huile Essentielle
H-E	Hématoxyline-Eosine
HEX	Héxomidine
IK	Indices de Kovats
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
MH	gélose Mueller-Hinton
NA	Acide Nalidixique
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NMRI	Naval Medical Research Institute

OD Oreille Droite
OFX Ofloxacin
OG Oreille Gauche
ONAB Office Nationale de l'Alimentation du Bétail
PAM Plante Aromatique et Médicinale
PNN Polynucléaires Neutrophiles
PPD Patte Postérieure Droite
PPG Patte Postérieure Gauche
S Surface
SAB Sabouraud chloramphénicol
SIN202 Sorbate de potassium
SIN211 Benzoate de sodium
TE Tétracycline
TEA Triéthanolamine
UF Unité Formant Colonie
UI Unité Internationale

Remerciement

Nous adressons nos sincères remerciements:

A Madame « Kebbas S. », MC-B au département de Biologie et physiologie cellulaire, de l'université Blida 1, pour avoir accepté de présider le jury. Sensible à l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail, nous vous prie de croire en notre éternel respect et notre sincère gratitude.

A Madame « Saidi F. », Professeur à la faculté des sciences de nature et de vie de l'université Blida 1, pour m'avoir honoré d'examiner ce travail, nous vous sommes très reconnaissantes de votre présence, et nous vous adressons nos vifs remerciements.

A Monsieur, « Boukhatem MN » MC-A au département de Biologie et physiologie cellulaire, de l'université de Blida 1, pour avoir encadré ce travail, un grand merci pour la gentillesse, la sympathie, la disponibilité et la patience que vous avez manifestées à notre égard tout au long de la réalisation de ce travail. Nous vous prie de croire en notre éternel respect et notre sincère gratitude.

Veillez trouver l'expression de notre sincère gratitude et nos très vifs remerciement

Merci a tous

INTRODUCTION

La thérapeutique des pathologies infectieuses ou inflammatoires se base principalement sur l'usage des médicaments de synthèse (antibiotiques, antifongiques et anti-inflammatoires). La prescription, à grande échelle et parfois inappropriée, de ces agents a entraîné l'émergence de souches résistantes ou encore l'apparition de certains effets indésirables et de contre-indications limitant l'usage de ses médicaments, d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers des végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouvelles thérapeutiques (**Kaloustian & Hadji-Minaglou, 2013**).

Par ailleurs, l'étude de ces essences aromatiques est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels de domaines tels que la pharmacognosie et la microbiologie. Cela tient principalement au fait que le règne végétal est une source présumée inépuisable d'une immense variété de médicaments potentiels, tout en étant accessible, y compris dans les pays en voie de développement. De plus, cette science évolue et s'affine sans cesse avec l'amélioration des instruments d'investigation et de l'accès à l'information scientifique. Cette dernière perspective permet d'élargir le champ de valorisation des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM), autrefois restreint du point de vue économique, à l'extraction de molécules olfactives, par l'exploitation des nombreuses et diverses activités biologiques, substantiellement évoquées par la médecine traditionnelle et corrélées à certains types de structures chimiques (**Bruneton, 1999 ; Chebaibi *et al.*, 2011**).

L'Algérie, de part sa situation géographique, jouit de plusieurs facteurs de pédogénèse et de grandes variations climatiques offrant ainsi une végétation riche et diverse. L'intérêt porté aux PAM n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Un grand nombre de cette flore y pousse spontanément.

Cependant et malgré cet engouement suscité par les vertus thérapeutique ou préventive de la lavande à toupet, rares sont les travaux qui lui ont été consacrés à l'échelle nationale pour cerner ces potentiels applications dans l'industrie pharmaceutique ou alimentaire. De ce fait, notre travail vise à valoriser l'essence végétale de cette plante à parfum en aromathérapie anti-infectieuse ou comme ingrédient nutraceutique. L'objectif assigné à notre travail consiste à étudier la composition chimique de l'essence de la lavande, extraite à échelle industrielle par entraînement à la vapeur, par

Chromatographie Gazeuse-Spectrométrie de Masse (CG-SM). En outre, l'évaluation des propriétés antimicrobienne de cette essence a été déterminée, *in vitro*, sur de nombreuses souches bactérienne et fongique, en utilisant trois méthodes complémentaires (aromatogramme, microatmosphère et macrodilution) et avec plusieurs concentration croissantes, et ce en comparaison avec des antibiotiques ou antiseptique utilisés comme contrôle positif.

Chapitre 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. LE GENRE *LAVANDULA*

Le genre *Lavandula* est l'un des plus importants genres de la famille des Lamiacées (Labiées). Ces dernières constituent une large famille de plantes dicotylédones qui comprend environ 7200 espèces et près de 236 genres répartis en 8 sous-familles. Ce sont le plus souvent des plantes herbacées, des arbustes et très rarement des arbres, largement répandus autour du monde mais particulièrement dans les régions tempérées et méditerranéennes. De nombreuses espèces de cette famille sont des plantes aromatiques source d'HE très utiles pour l'aromathérapie, la parfumerie et l'industrie des cosmétiques. On y rencontre aussi beaucoup d'espèces mellifères et également des espèces cultivées comme plantes condimentaires et ornementales (**Lis-Balchin, 2002 ; Benabdelkader, 2012**).

1.1.1. Condensé historique

Le mot « lavandière » vient du fait qu'on ajoutait de la lavande à l'eau de lessive afin de parfumer les vêtements. Au Moyen Âge, ses pouvoirs désinfectants étaient reconnus et on en faisait des fumigations et des emplâtres destinés à combattre la peste. Mais ce n'est qu'au Moyen Age que l'on voit apparaître le terme "lavande", selon le verbe latin « lavare » qui signifie laver. Son utilisation était liée à la lutte contre les maladies infectieuses ; le parfum est associé à l'aspect thérapeutique, on a longtemps cru que les mauvaises odeurs propageaient les maladies. A cette époque, on trouvait la lavande dans les jardins de monastères où, associée à d'autres plantes aromatiques et médicinales (PAM), elle était utilisée à but curative. Les plantes étaient d'ailleurs les seuls éléments de la pharmacopée. Quant à la cueillette de la lavande, elle apparaît dès le XIV^{ème} siècle dans des textes relatifs à l'herboristerie. En 1371, la culture de la lavande existait déjà en Bourgogne (France) et on la retrouve dans tous les "jardins de simples" où les "bonnes herbes" étaient réunies en une sorte d'armoire à pharmacie naturelle (**Benabdelkader, 2002**).

Le développement, au XIII^{ème} siècle, des Facultés de Marseille et Montpellier (France) a joué un rôle important dans la connaissance des bienfaits des plantes locales et les recherches des universitaires s'appliquaient aux moyens d'en extraire les principes actifs (PA). On la retrouve citée dans de nombreux textes. Elle était utilisée à but thérapeutique sous forme d'essence, tant à usage interne qu'externe, notamment suite aux épidémies de peste en Provence.

La cueillette de la lavande va devenir un facteur important de frein à l'exode rural qu'ont connu beaucoup de territoires ruraux similaires. Le développement des villes et de la consommation de parfums vont accroître la demande des parfumeurs en lavande. Le nombre des cueilleurs et les quantités récoltées augmentent et les communes instaurent des adjudications pour les collines à lavande.

Peu à peu, les paysans parviennent à s'équiper d'alambics mobiles et à distiller eux-mêmes sur les zones de cueillette. Puis des alambics fixes sont développés par des familles de cueilleurs. Les Grassois, en France, installent sur place des distilleries de type industriel dès 1907. L'HE pouvant être stockée pour être vendue aux meilleurs cours, la spéculation se développe rapidement et les revenus appréciables des bonnes années permettent la modernisation des exploitations. Les courtiers auront un rôle prépondérant dans le commerce entre l'arrière pays et Grasse.

Dans les années 1920/1930, la cueillette de la lavande fine atteint une importance maximum. Une amélioration du rendement est rendue possible grâce à l'entretien des terrains : épierrement, labourage, passage des troupeaux de moutons qui nettoient et fertilisent les terrains. Si les premiers essais de mise en culture datent de 1905 par une simple transplantation des plus beaux plants des collines dans les champs proches des villages, il faut attendre l'après-guerre de 1914-1918 pour voir se développer cette pratique. Entre 1925 et 1930, la technique de bouturage s'impose pour le lavandin, avec des sélections pour la recherche des plants offrant un meilleur rendement en essence et une meilleure résistance et adaptation aux terrains. C'est également à cette période que sont concentrés les efforts sur la mécanisation et la modernisation de la culture.

1.1.2. Synonymes

Le genre *Lavandula* L., est composé d'environ 39 espèces, de nombreux hybrides et près de 400 cultivars enregistrés (**Upson & Andrews, 2004**). Comme beaucoup de Lamiacées, les lavandes sont connues pour leurs HE riches en terpènes. Les espèces les plus connues et valorisées économiquement sont, sans conteste, *L. angustifolia*, *L. stoechas*, *L. latifolia* et l'hybride *Lavandula x intermedia*.

1.1.3. Taxonomie

Une des premières classifications modernes majeures du genre *Lavandula* se trouve dans "A Taxonomic Study of the Genus *Lavandula*" de **Chaytor (1937)**. Sa révision reconnaît 28 espèces ainsi que de nombreux taxons infra-spécifiques répartis en 5 sections, *Stoechas*, *Spica*, *Subnuda*, *Pterostoechas* et *Chaetostachys*. Cependant, toutes les principales formes cultivées et commercialisées résident dans les sections *Stoechas* et *Spica*. La classification phylogénétique du

genre *Lavandula* a été réexaminée par **Upson et Andrews (2004)**. Cette étude a conduit à reconnaître 39 espèces réparties en 3 sous-genres *Fabricia*, *Sabaudia* et *Lavandula* qui sont également divisés en sections qui se répartissent en différentes espèces. Par exemple, *Lavandula* comprend les sections *Lavandula*, *Dentatae* et *Stoechas* ; *L. angustifolia*, *L. latifolia* et *L. lanata* représentent les différentes espèces. Cette organisation taxonomique a été réalisée sur la base de plus de 40 critères anatomiques mais aussi par une analyse phylogénétique basée sur la comparaison de séquences nucléaires

Si les noms latins des lavandes ne posent plus guère de problèmes, il n'en va pas de même avec les noms courants (**Small & Deutsch, 2001 ; Dupin & Festy, 2012**). On distingue quatre espèces principales :

- *Lavandula angustifolia*, ou lavande vraie, lavande des Alpes, lavande fine. C'est la meilleure des lavandes pour la qualité de son HE. À l'état sauvage, elle pousse naturellement surtout au-dessus de 700 à 800 mètres d'altitude. Robuste, elle résiste aux contraintes climatiques des montagnes sèches. C'est un arbrisseau buissonnant. Les feuilles, linéaires et de couleur gris-vert, ont une longueur variant entre 3 et 5 cm. Lors de la floraison (juillet-août), la plante développe de longs pédoncules non ramifiés terminés par des épis dont la couleur varie du mauve pâle au violet.
- *Lavandula latifolia*, ou lavande aspic. Par rapport à la précédente, ses feuilles sont plus larges (elliptiques) et très odorantes. La floraison est plus précoce (juin), et les fleurs ont une odeur très camphrée. Elles poussent à l'extrémité de tiges ramifiées, ce qui est le moyen le plus sûr de la différencier de la lavande vraie. Elle est beaucoup moins appréciée en parfumerie.
- *Lavandula* × *intermedia*, ou lavandin, hybride naturel entre *L. angustifolia* et *L. latifolia*. Découvert un peu par hasard, il a été cultivé à partir des années 1930. Le lavandin est aujourd'hui l'espèce la plus cultivée, car sa fleur est plus productive en HE que la lavande vraie. Son essence, de bonne qualité olfactive, est plus camphrée que celle de la lavande ; elle est très utilisée dans la parfumerie industrielle. Plusieurs variétés de cet hybride ont été sélectionnées et reproduites par bouturage.

1.2. MONOGRAPHIE DE LA PLANTE ETUDIEE : *Lavandula stoechas* L.

Lavandula stoechas est communément appelée « lavande française », « lavande des stoechades », « lavande maritime », « lavande papillon » ou « lavande à toupet ». Elle a été historiquement la première lavande à être formellement décrite et dont le territoire géographique est le plus vaste. Elle est répandue dans tout le bassin méditerranéen (Europe méridionale, l'Afrique du Nord et le Moyen Orient) avec une petite disjonction sur la frontière Libye-Egypte (**Figure 1.1**). Actuellement, elle a été introduite et est cultivée en Bretagne (France), Nouvelle Zélande et en Australie. De la famille des lamiacées, cette lavande est aromatique mais peu utilisée en parfumerie parce qu'elle dégage

une odeur camphrée. C'est une remarquable plante d'agrément, aux fleurs originales, et dont la floraison, avec un petit entretien, peut durer jusqu'à l'automne. De nombreuses variétés ont vu le jour en horticulture, apportant des formes plus compactes, plus florifères ou de couleur différente (Lis-Balchin, 2002 ; Lim, 2014).

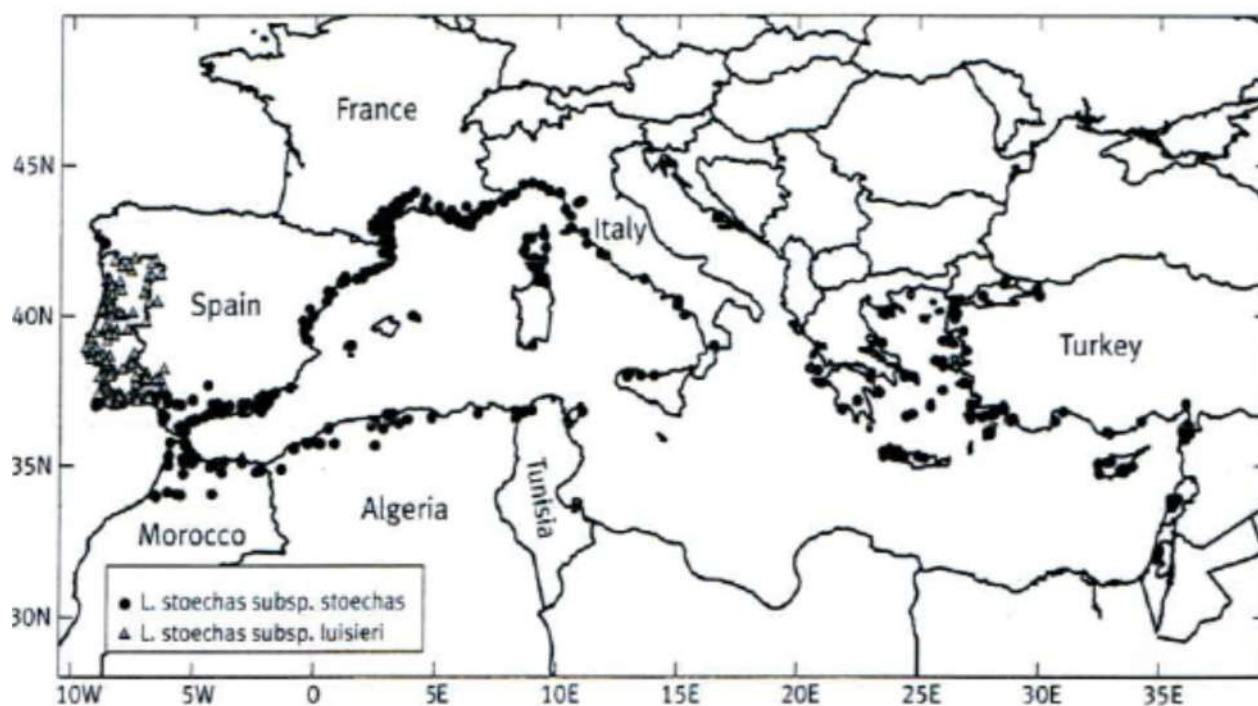


Figure 1.1. Distribution géographique de *Lavandula stoechas* en bassin méditerranéen (Upson & Andrews, 2004).

1.2.1. Données botaniques

Lavandula stoechas se présente sous la forme d'un arbrisseau ou d'un buisson très aromatique et très ramifié pouvant atteindre un mètre de haut avec une lourde odeur semblable à celle du pin. Les feuilles opposées de 2-4 cm de long sont sessiles, tomenteuses, oblongues, lancéolées, linéaires, étroites et recourbées sur les bords et sont souvent grises. Les inflorescences de coupe carrée sont sessiles, compactes et surmontées d'une couronne de bractées florales violettes, élargies, stériles, obovales ou spatulées de 1 à 2 cm de longueur. Les bractées fertiles sont largement ovales, membraneuses, veinées et plus courtes que le calice. Le Calice est sessile, à treize nervures avec des lobes moyens modifiés en un appendice. La Corolle est de couleur violet foncée ou mauve (Figure 1.2). Les fruits sont sans intérêt économique comme tous ceux de la famille. Ils permettent cependant la production de graines.

Tableau 1.1. Taxonomie de La lavande à toupet (Quezel & Santa, 1963)

Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Sous-famille	Nepetoideae
Genre	<i>Lavandula</i>
Espèce	<i>Lavandula stoechas</i> L.

1.2.2. Domaines d'utilisation

Les lavandes sont parmi les plantes médicinales les plus utilisées. Des preuves documentées de l'utilisation des lavandes comme agent thérapeutique remontent jusqu'aux anciens Romains, Grecs et Arabes (Lis-Balchin, 2002 ; Dupin & Festy, 2012 ; Lim, 2014).

1.2.2.1. Parfumerie

L'essence de lavande contient des composants différents selon les espèces. On l'obtient par distillation des sommités florales. C'est bien sûr la parfumerie qui fait le plus gros usage de la lavande. On peut tout parfumer avec elle, depuis les savonnettes jusqu'aux détergents et au papier hygiénique. Dans les parfums proprement dits, la lavande est surtout réservée aux hommes, soit en soliflore dans les eaux de toilette, soit en note de cœur dans les eaux de Cologne.

Bien que *L. stoechas* fût la première lavande à être utilisée en parfumerie, son HE est aujourd'hui délaissée en raison de son odeur fortement camphrée et de la concurrence importante des autres lavandes qui se prêtent mieux à la culture intensive et dont l'odeur est plus agréable. La forte teneur en camphre généralement observée limite ses applications en cosmétologie (De Gingins-Lassaraz, 1827 ; Monge, 2013).



A) Pédoncules de *L. stoechas* surmontées d'une couronne de bractées florales violettes et élargies.



B) Plantes avec sommités fleuries de *Lavandula stoechas* L. cultivées dans un pot.



C) Feuilles (*L. stoechas*) allongées, opposées, linéaires et étroites.

Figure 1.2. Aspects morphologiques et botaniques de la lavande papillon (*Lavandula stoechas* L.)

(www.flickr.com)

1.2.2.2. Propriétés médicinales

Elle était utilisée par les médecins musulmans qui la considéraient comme tonique, résolutive et carminative. Ils la prescrivent pour lutter contre des infections pulmonaires. En Crète, l'infusion des feuilles est utilisée par des thérapeutes traditionnels comme spasmolytique, contre le diabète, les douleurs menstruelles féminines, les calculs rénaux, l'otite, l'hypertension et la matière végétale brute est également utilisée comme insectifuge (**Skoula *et al.*, 1996**). La plante est également utilisée dans la médecine populaire comme antispasmodique dans les douleurs des coliques, expectorant, stimulant (**Giray *et al.*, 2008**) et pour les différentes maladies du système nerveux central, comme l'épilepsie et la migraine.

Elle est appelée 'le balai du cerveau'. Elle est d'ailleurs utilisée sous forme de fumigation pour soigner "le mal des sinus". Cette lavande a aussi des effets positifs sur les plaies, les infections urinaires, les maladies cardiaques et l'eczéma. Finalement, elle possède également des vertus analgésiques, sédatives, antiseptiques et antimicrobiennes (**Cavanagh & Wilkinson, 2002**).

Récemment, l'aromathérapie est devenue de plus en plus populaire. La lavande y est utilisée comme relaxant (**Lis-Balchin & Hart, 1999**). Les aromathérapeutes considèrent l'HE de lavande comme la plus bénéfique, avec des cultivars sauvages cultivés à haute altitude. La preuve scientifique est encore manquante pour un possible effet de détente générale après une inhalation (**Lis-Balchin, 2002**). L'HE de lavande est antiseptique et bactéricide. Appliquée pure sur la peau elle soulagerait les brûlures et les piqûres d'insectes. Appliquée sur les tempes, elle soulagerait les douleurs migraineuses. On attribue à la variété *latifolia* un effet apaisant lors de crises de dermatite atopique (eczéma) (**Rhind & Pirie, 2012**).

Depuis une vingtaine d'années, des chercheurs s'intéressent à certaines substances extraites de la lavande (le limonène et l'alcool périllylique) qui semblent pouvoir combattre plusieurs formes de cancer. Il va sans dire que l'utilisation de ces substances chimiquement isolées de la plante et hautement purifiées nécessite une surveillance médicale.

Dans le domaine clinique, plusieurs recherches ont été menées pour asseoir le bien fondé de l'utilisation de l'essence de lavande dans l'arsenal thérapeutique. Les principales études concernent principalement le système nerveux. En voici quelques exemples de ces études :

1.2.2.3. Utilisation culinaire

On peut faire infuser des fleurs de lavande dans du lait, utilisé ensuite pour la préparation de glace ou de crème à la lavande. Dans certaines régions du Maghreb, *Lavandula stoechas* est utilisée dans quelques préparations culinaires comme le couscous (**Benabdelkader, 2012**).

1.2.3. Toxicité de l'huile essentielle

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

1.2.4. Intérêt commercial

En 2009, les surfaces cultivées en France étaient de près de 15 000 ha pour le lavandin et 4000 ha pour la lavande. En Algérie, à un moment donné, des quantités limitées des HE de lavandes ont été produites. La production était d'environ 10 tonnes pendant le début des années 1980. *L.stoechas*, est de moindre importance comme source d'HE, mais avec ses hybrides, cette espèce est de plus en plus populaire en tant que plante ornementale (**Upson & Andrews, 2004**). Des quantités limitées (moins de 1 tonne) de *L. stoechas* sont produites en Espagne à partir de plantes sauvages. L'HE, riche en fenchone, est principalement utilisée en aromathérapie.

La Bulgarie avec une production de 45 tonnes en 2010 et entre 55 à 60 tonnes en 2011 est devenue le premier producteur mondial de lavande avec 45 tonnes devant la France produisant de 25 à 30 tonnes à cette date. Les deux pays fournissent les trois quarts de la production internationale et entre 80% et 90% de l'huile essentielle de lavande bulgare est vendue en France.

Les espèces du genre *Lavandula* sont aussi des plantes mellifères qui génèrent des miels de couleurs et odeurs propres à chaque espèce. Les fleurs de la lavande fine constituent des sources majeures de nectar pour les abeilles (**Guyot-Declerck, 2002**). De nombreuses plantes de lavande sont également vendues comme plantes ornementales pour les jardins populaires. Enfin, il a été mentionné que certaines lavandes sont aussi utiles dans l'agriculture biologique comme bio-insecticides. Elles constituent des cultures de choix dans les terres arides (**González-Coloma et al., 2006**).

1.2.5. Production de l'huile essentielle

Les rendements en HE de lavande sont très variables (**Tableau 1.2**) selon les régions, le climat, l'année, l'âge de la plantation et la variété : ils sont d'environ 15 kg par hectare, 25 à 50 kg pour les lavandes clonales, 80 kg pour le lavandin en zone de montagne sèche, près du double en plaine (jusqu'à 180 kg).

Tableau 1.2. Rendements en huiles essentielles des lavandes (**Lis-Balchin, 2002**).

Espèce de lavande	Rendement (%) (m/m)
Lavandes fines	0,5
Lavande aspic	0,8 à 1,0
Lavandins	1,0 à 1,8
<i>Lavandula stoechas</i> L.	0,3 à 0,8
<i>Lavandula pedunculata</i> L.	0,15
<i>Lavandula luisieri</i>	0,2

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

Chapitre 2 :
MATERIEL ET METHODES

Chapitre 2 :

MATERIEL ET METHODES

Par ailleurs, l'objectif assigné à cette étude consistait à tester, *in vitro*, le pouvoir antibactérien et antifongique de l'HE de *Lavandula* sur plusieurs souches, de référence ou isolées cliniquement, à travers l'application de plusieurs méthodes microbiologiques. En outre, la composition chimique de l'essence de la plante a été déterminée par Chromatographie Gazeuse-Spectrométrie de Masse afin d'établir le profil chromatographique et le chémotype de l'essence de cette plante à parfum.

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel végétal et huile essentielle

L'huile essentielle du lavande papillon (*Lavandula stoechas* L.) a été fournie par la société « Extral-Bio » de production des huiles essentielles, sise à Chiffa (Blida). L'HE a été extraite à partir de la partie aérienne fraîche de la plante (tige et feuilles) récoltée dans la région de Cherchell (Tipaza) et ce au mois de Juin 2016. En outre, l'identification botanique de la plante a été faite antérieurement au niveau du conservatoire du Jardin d'Essais d'El-Hama (Alger). Le procédé d'extraction utilisé est l'entraînement à la vapeur d'eau conduit à échelle industrielle (alambic de 2 m³) sous pression. Aussi, l'HE n'a pas été mélangée à aucun solvant organique durant la phase de production. Elle a été conservée dans des flacons stériles teintés à 4°C et à l'abri de l'air et de la lumière, pendant toute la durée de notre travail, pour éviter d'éventuels phénomènes d'oxydation, d'altération chimique ou de contamination microbienne.

2.1.2. Matériel animal

Concernant le screening pharmacologique (activité anti-inflammatoire et cicatrisante) *in vivo*, un total de 55 Souris (NMRI) et 6 rats (Wistar) de sexe mâle et femelle, dont le poids varie entre 25-28 g et 160-200 g, respectivement, ont été utilisées.

Tous ces animaux de laboratoire ont été stabulés dans des cages en plastique, à une température ambiante, un taux d'humidité et un éclairage avec un régime alimentaire de granulés d'origine ONAB, de l'eau de manière *ad-libitum*. L'expérimentation a porté sur des souris et des rats sains et adultes.

2.1.3. Souches microbiennes

Tableau 2.1. Souches bactériennes utilisées dans le screening antibactérien *in vitro*.

Souches bactériennes	Origine	Famille
Bactéries à Gram -		
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Enterobacteriaceae
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25812	Pseudomonadaceae
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pus d'oreille	Pseudomonadaceae
Bactéries à Gram +		
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Micrococcaceae

ATCC: American Culture Collection; ECBU: Examen Cytobactériologique des urines.

Tableau 2.2. Souches mycéliennes utilisées dans le screening antifongique *in vitro*.

Nom	Origine	Famille
Levures		
<i>Candida albicans</i>	Prélèvement vaginal	Cryptococcaceae
<i>Candida parapsilosis</i>	Prélèvement vaginal	Saccharomycetaceae
Moisissures		
<i>Aspergillus terreus</i>	Alimentaire	Trichocomaceae
<i>Aspergillus niger</i>	Alimentaire	Trichocomaceae
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404	Trichocomaceae

ATCC : souche de référence (ATCC = American Type Culture Collection).

Toutes les souches bactériennes ont été isolées et identifiées, soit au niveau du laboratoire Bactériologie de l'EPH de Blida ou encore celui du Laboratoire d'Hygiène de Blida. Pour les souches fongiques, elles proviennent de la mycothèque du laboratoire Mycologie de l'Institut Pasteur d'Alger. Ces bactéries et champignons ont été conservés et maintenus en vie, par des repiquages continus, sur des milieux de culture adéquats.

2.1.4. Milieux de cultures et agents chimiques

Suivant les méthodes employées et les souches étudiées, nous avons utilisé des milieux de culture solides, en l'occurrence la Gélose Nutritive (GN) ou Muller-Hinton (MH) pour les bactéries et la gélose Sabouraud-Chloramphénicol (SAB) pour les champignons. Aussi, des milieux de culture sélectifs ont été utilisés (gélose Chapman pour les Staphylocoques, gélose Hecktoen pour les Entérobactéries et gélose au sang frais pour les bactéries exigeantes). Tous ces milieux de culture proviennent de la société idéal-Labo, sise à Beni Mered (Blida).

Afin de mener une étude comparative du pouvoir antibactérien entre l'HE et des produits de références, nous avons utilisé des disques Antibiotiques (ATB) comme contrôle positif. Les ATB utilisés sont: Gentamicine (CN, 10 μ g), Tétracycline (TE, 30 μ g), Ofloxacin (OFX, 5 μ g), Amoxicilline (AMX, 25 μ g) et Acide Nalidixique (NA, 30 μ g). Ces ATB proviennent de la société Bio-Rad (France).

Cependant et concernant les souches fongiques, aucune étude comparative n'a été possible pour cause de non disponibilité des disques antifongiques. Cependant, nous avons utilisé une solution antiseptique d'Hexomédine à 0.1% (Biopharm, Alger) comme contrôle positif.

Le solvant Tween 80 a été utilisé pour la dilution de l'HE dans un milieu gélosé afin de déterminer la CMI. Ce solvant est pur chimiquement et provient de Sigma-Aldrich (Allemagne).

2.2. Méthodes

2.2.1. Elaboration des profils chromatographiques (NF ISO 11024-1 : 1999)

Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse, à régulation électronique de pression, de type Hewlett Packard (série HP 6890, Palo Alto, Californie, USA), équipé d'une colonne capillaire HP-5 (30 m x 0.25 mm) avec une épaisseur de film de 0.25 μ m, d'un détecteur FID réglé à 280 °C et un injecteur *split-splitless* réglé à 250 °C. Le mode d'injection est *split*. Le gaz utilisé est l'azote avec un débit de 1.7 mL/min. La température de la colonne est programmée de 45 à 240 °C à raison d'une montée de 2 °C/min. L'appareil est piloté par un système informatique de type « *HP Chem Station* », gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.

L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leurs Indices de Kovats (IK) et sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Cette dernière est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett-Packard (série HP 6890) couplé avec un spectromètre de masse (série HP 5973). La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0.25 mm), l'épaisseur du film est de 0.25 μ m. La température de la colonne est programmée de 45 à 240 °C à raison de 2 °C/min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1.2 mL/min. Le mode d'injection est *split* (rapport de fuite : 1/70).

L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse (Wiley7, NIST 2002). L'identification des constituants est basée sur la comparaison de leurs spectres de masse (CG/SM) respectifs avec les spectres de la bibliothèque et de la bibliographie (Adams, 2007) et sur la base de calcul des Indices de Kovats (IK). L'indice de rétention ou l'IK d'un composé A

est indépendant du débit, de la longueur de la colonne et de la quantité injectée. L'IK d'un composé A dépend de la phase stationnaire et de la température. Les IK sont calculés comme suit :

$$IK = 100n + \left[\frac{TR_c - TR_n}{TR_{(n+1)} - TR_n} \right] \times 100$$

n : Nombre d'atomes de carbone de l'alcane élué avant le composé ;

TR_c : Temps de rétention du composé ;

TR_n : Temps de rétention de l'alcane à n atomes de carbone élué avant le composé ;

TR_(n+1) : Temps de rétention de l'alcane à n+1 atomes de carbone élué après le composé.

2.2.2. Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle

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

2.2.2.1. Méthode des aromatogrammes = Technique en milieu solide

Cette méthode utilisée par certains auteurs (**Carson et Riley, 1994, Tyagi et al., 2013**) est la technique que nous avons utilisée pour évaluer, dans un premier temps, l'activité antimicrobienne de l'HE. Elle est basée sur une technique utilisée en bactériologie, l'antibiogramme (**Satrani, 2007**).

Dans cette méthode (**Figure 2.1**), nous avons utilisé des disques de 9 mm de diamètre (Antibiotica-Testblattchen, Schleicher & Schuell, D-3354, Dassel, Allemagne) que nous avons imprégnés d'une certaine quantité d'HE. Le disque sera déposé au centre d'une boîte Pétri contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche microbienne. L'étude du pouvoir antibactérien et antifongique par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme. La seule différence réside dans le remplacement des disques d'ATB par des extraits aromatiques.

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

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

2.2.2.2. Microatmosphère = méthode en phase vapeur

Nous avons utilisé cette méthode dans le but d'apprécier les propriétés inhibitrices de la phase volatile de l'HE. Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés

spécifiquement sur l'activité de la phase gazeuse sont encore peu nombreux (Tyagi et Malik, 2011).

La différence entre cette technique et les aromatochromes réside principalement dans la position du disque imprégné (Figure 2.2). Cette méthode permet de mettre en évidence la diffusion des composants volatils des HE à l'intérieur d'une boîte Pétri.

Une boîte de contrôle, réalisée pour chaque expérience, est une boîte ensemencée dont le disque déposé au centre de la gélose n'est pas imbibé d'HE. Une autre boîte témoin est ensemencée dans les conditions de l'expérience, sans disque. Elle nous renseigne sur l'homogénéité du tapis microbien. A noter que dans ce test, aucun témoin positif n'a été utilisé car les ATB ne sont en aucun cas volatils.

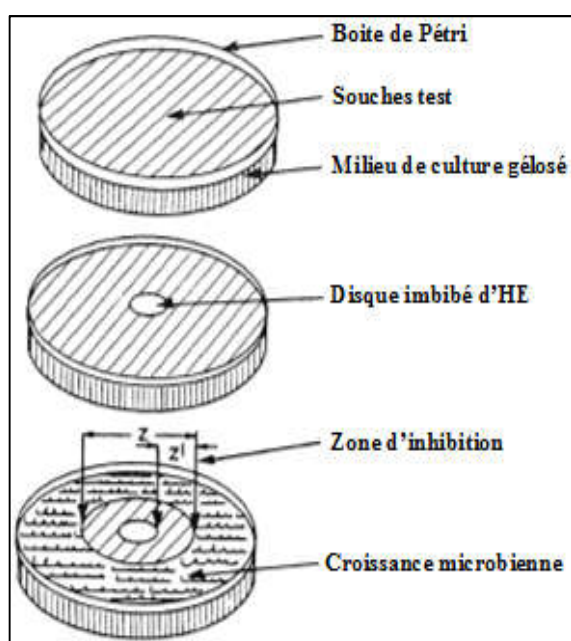


Figure 2.1. Illustration de la méthode de l'aromatogramme (Zaika, 1988).

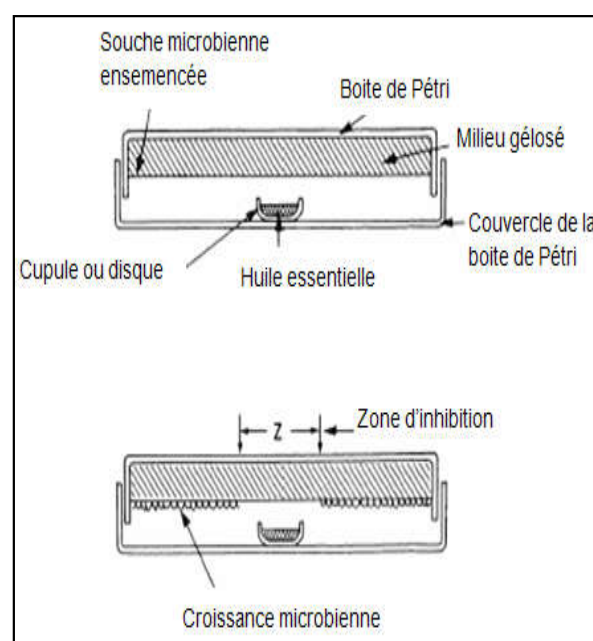


Figure 2.2. Illustration de la méthode de Microatmosphère (Zaika, 1988).

2.2.2.3. Détermination des CMI par dilution en milieu gélosé

La technique de dilution en milieu solide est recommandée par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000) pour évaluer la sensibilité des bactéries micro-aérophiles aux agents antibactériens. Elle consiste à ensemencer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en HE dispersée de façon homogène et stable dans le milieu de culture. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la CMI, qui correspond à la plus faible concentration en HE capable d'inhiber la croissance bactérienne.

Cette technique, très fiable et reproductible pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, pose un problème de diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les HE qui ont une très faible solubilité

dans les milieux de culture aqueux. Ce problème a été résolu en partie par l'utilisation d'un agent dispersant et solubilisant inerte, en l'occurrence le Tween 80.

La lecture des résultats se fait visuellement en observant s'il y a l'apparition d'une éventuelle colonie microbienne, en comparaison avec une boîte témoin (exempte d'HE). La CMI se définit comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu. Le résultat sera exprimé en % (v/v).

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

2.2.3. Activité antifongique dans une matrice alimentaire (Boisson Orangina)

L'évaluation de l'activité antifongique de l'HE dans un modèle alimentaire a été réalisée selon la méthode décrite par **Tyagi *et al.* (2013)**. Nous avons opté pour une boisson gazeuse sucrée et fruitée, type Orangina® (unité Djuaguén, Blida). De par son pH acide et la présence de deux conservateurs alimentaires (SIN202 : Sorbate de potassium et SIN211 : Benzoate de sodium), ce type de boissons constitue un milieu défavorable pour la croissance bactérienne. Cependant, leur qualité organoleptique peut être altérée du fait de la possibilité d'une croissance fongique, apte à résister aux conditions d'osmophilie et d'acidophilie. C'est la raison pour laquelle nous avons inoculé cette boisson par une souche levuriforme (*Saccharomyces cerevisiae*) afin de provoquer une contamination fongique et apprécier ainsi sa cinétique de croissance en présence des conservateurs de synthèse, de l'HE seule ou en combinaison avec un traitement thermique.

Les membranes filtrantes seront déposées sur gélose SAB et incubées, par la suite, à 25°C pendant 48-72h. La lecture des résultats se résume à dénombrer toute colonie levuriforme. Cette analyse correspond alors à J-0. La même démarche opératoire sera répétée à J-2, à J-4, à J-6 et J-9 pour les différentes boissons, conservés entre temps dans un réfrigérateur (4°C), et ce afin d'apprécier la cinétique de croissance fongique.

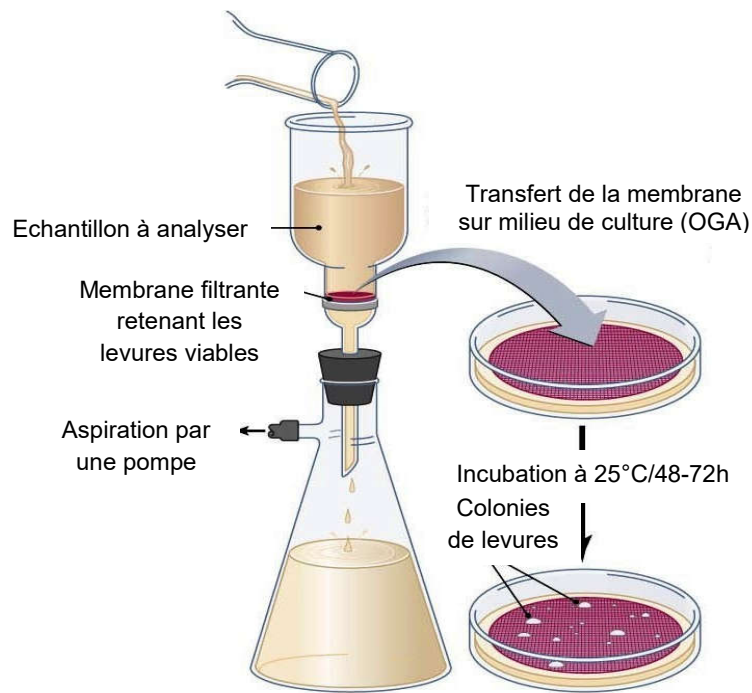


Figure 2.3. Illustration de la filtration sur membrane pour l'analyse microbiologique Jus Orangina®.

2.2.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire aigue *in vivo*

2.2.4.1. Objectifs et Principe

Il s'agit d'évaluer l'HE dans un test discriminatoire anti-inflammatoire pour une éventuelle utilisation en thérapeutique. Ce test est très utilisé pour évaluer un nouvel anti-inflammatoire en première intention. Il a été décrit par **Winter *et al.* (1962)**.

Le principe du test consiste à provoquer un gonflement aigue dans la patte d'une souris. Il est réalisé par une injection d'une substance inflammatoire sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche. Ceci provoque une réaction qui peut être réduite par des substances anti-inflammatoires. Cette réaction se traduit par un œdème d'installation rapide et persistant. La mesure est effectuée en mesurant, à la fin de l'expérience (après 4 h), le poids (en grammes) des pattes des souris (gauche et droite) des différents lots.

2.2.4.3. Etude statistique

Les résultats sont exprimés en la moyenne de différence du des pattes (DPP) \pm Ecart-Moyen (EM). La signification statistique a été déterminée au moyen du test d'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivie par le test *post-hoc* de Fisher LSD pour comparaison par paires. $P < 0.05$ a été considérée comme différence significative. L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel XLStat (Addinsoft, Paris, France).

2.2.6.1. Préparation d'une émulsion à usage topique (Crème dermique hydrophile)

L'objectif assigné à cette étude est la mise au point d'une formule galénique topique adaptée à l'extrait aromatique de lavande afin d'asseoir son pouvoir cicatrisant *in vivo*. La forme pharmaceutique choisie est celle d'une émulsion hydrophile largement utilisée pour le traitement local des pathologies cutanées.

Notre formule d'émulsion est de type Lipophile/Hydrophile (L/H). Ce choix a été orienté par la meilleure disponibilité des principes actifs qu'offre cette forme.

Le protocole de fabrication est celui d'une émulsion classique selon le mode opératoire suivant :

- Préparation de la phase huileuse : déposer dans un béccher la quantité appropriée d'huile d'amande douce, d'acide stéarique, de cire blanche et des tensioactifs (alcool cétylique et alcool céto-stéarylique).
- Préparation de la phase aqueuse : mélanger l'eau distillée avec la glycérine et le TEA.
- Nous portons les 2 bécchers au bain-marie à 80°C jusqu'à fusion complète des composés. Ces derniers sont mélangés sous une agitation manuelle rapide.
- La phase aqueuse sera versée dans la phase grasse par petites fractions en mélangeant entre chaque adjonction jusqu'au refroidissement.
- A température ambiante, nous ajoutons, sous une homogénéisation continue, l'HE de lavande avec pour obtenir une concentration finale de 0.5%

Nous avons opté pour un conservateur dérivé d'isothiazoline, le Kathon CG[®] (izothiazoline) à 0,005%. Le conditionnement se fait en pot. Les ingrédients utilisés sont mentionnés selon la nomenclature INCI par ordre de concentration décroissante.

Chapitre 3
RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Etude analytique de l'huile essentielle

3.1.1. Caractéristiques organoleptiques

Les propriétés organoleptiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE. Les paramètres organoleptiques de notre échantillon d'HE de *Lavandula stoechas* (**Tableau 3.1**) sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes **AFNOR (2000)**.

Tableau 3.1. Propriétés organoleptiques de l'essence aromatique de *Lavandula stoechas*.

Caractéristiques organoleptiques	Notre étude (2017)	AFNOR (2000)
Aspect	Liquide mobile	Liquide mobile, limpide
Couleur	Jaune	jaune clair
Odeur	Caractéristique, agréable, rappelant l'odeur des sommités fleuries, légèrement camphrée	Odeur caractéristique de lavande, très légèrement camphrée

3.1.2. Détermination du profil chromatographique

Notre étude s'est axée sur la détermination des composés volatiles majoritaires de l'HE alors que les molécules ayant des fragments de masse inférieure à 0.05% n'ont pas été rapportées.

L'huile essentielle de *Lavandula stoechas*, obtenue à échelle industrielle par entraînement à la vapeur d'eau sous pression, a été d'abord analysée par Chromatographie Gazeuse avec un Détecteur d'Ionisation à Flamme (GC-FID) sur une colonne capillaire apolaire HP5-MS (**Figure 3.1**). Pour une identification plus exhaustive des composés aromatiques, l'essence aromatique a été analysée, par la suite, avec Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC/MS) sur une colonne capillaire apolaire (HP5-MS). Les conditions opératoires sont détaillées dans la partie expérimentale. Le **Tableau 3.2** donne, dans l'ordre d'élution, les compositions, qualitative et quantitative, de l'essence de lavande papillon distillée et regroupées selon les familles terpéniques. Au total, vingt-trois (23) composés ont été détectés. Pour l'identification, nous avons d'abord calculé leurs IR ; ensuite nous les avons comparés à ceux de la littérature. Nous avons, par la suite, procédé au dépouillement de leurs spectres de masse en se référant à ceux donnés dans les différentes bibliothèques (NIST et Wiley).

D'un point de vue biochimique, la famille des monoterpènes oxygénés, représentée par les alcools et leurs esters, est la plus abondante avec un taux supérieur à 90%. Un seul sesquiterpène a été détecté dans l'essence de lavande, en l'occurrence le caryophyllène, mais qui demeure quasi-inexistant (0.12%).

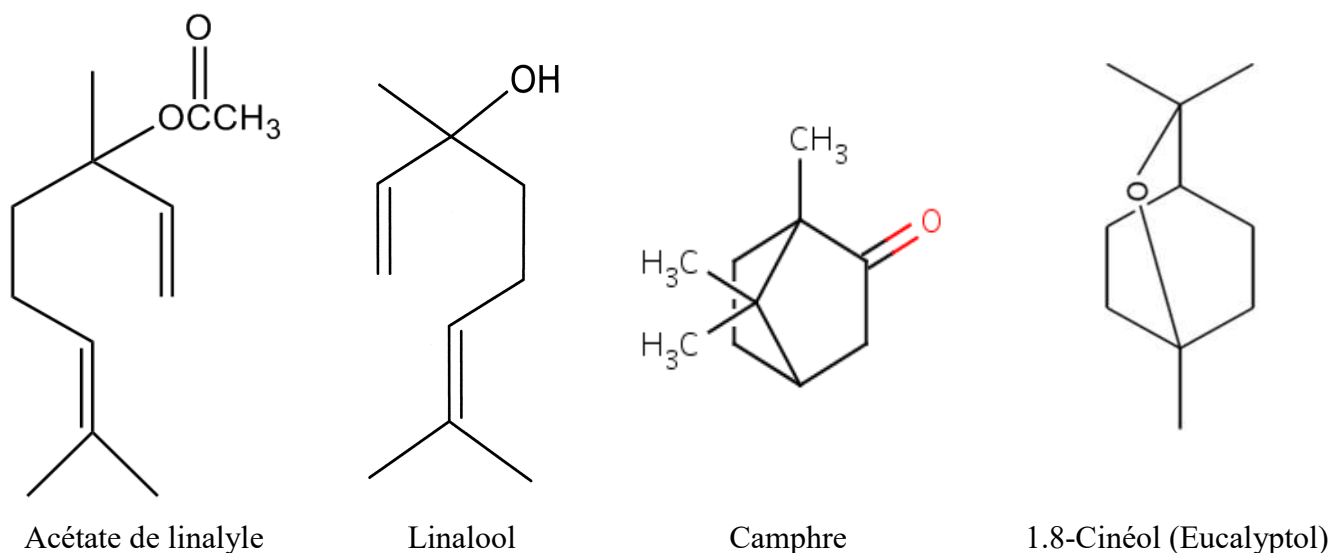


Figure 3.2. Structure chimique des composés majoritaires détectés dans l'essence aromatique de *Lavandula stoechas*.

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

Tableau 3.3. Composés chimiques majoritaires détectés dans l'essence aromatiques des lavandes papillons (*Lavandula stoechas*) provenant de différentes localisations géographiques.

Espèce	Origine	Organe	Composés majoritaires (%)	Auteurs
<i>L. stoechas</i> ssp. <i>stoechas</i>	Rabat (Maroc)	Partie aérienne fleurie	Fenchone = 30 Camphre = 18 1.8-cinéol = 8	Valentini et al. (1993)
	Chypre	Partie aérienne fleurie	Fenchone = 28-51 Camphre = 4-39	
<i>L. stoechas</i>	Crète	Feuilles et fleurs	Fenchone = 44-48 1.8-cinéol = 5-16 Camphre = 4-6 Acétate de myrtényle = 2-9	Skoula et al. (1996)
<i>L. stoechas</i>	Corse (France)	Non spécifié	Fenchone = 14-75 Camphre = 2-56 1.8-cinéol = 3-14 Acétate de myrtényle = 1-4	Ristorcelli et al. (1998)
<i>L. stoechas</i>	Australie	Fleurs	Camphre = 48 Fenchone = 22 1.8-cinéole = 9 Linalool = 2	Cavanagh & Wilkinson (2006)
<i>L. stoechas</i>	Cagliari (Italie)	Fleurs, feuilles et tiges	Fenchone = 59-72 Camphre = 9-15 Acétate de myrtényle = 3-5	Angioni et al., (2006)
<i>L. stoechas</i>	Australie	Non spécifié	Camphre = 48 Fenchone = 21 1.8-cinéol = 9	Moon et al. (2007)
<i>L. stoechas</i>	Chalkidiki (Grèce)	Feuilles et fleurs	Fenchone = 45 1,8-cinéole = 16 Camphre = 10 p-cymène = 5	Hassiotis (2010)

A la lecture des résultats comparatifs rapportés dans le **Tableau 3.3.**, il apparait que *L. stoechas* a été étudiée dans différents pays méditerranéens (Crète, Espagne, Corse, Chypre, Grèce, Turquie, Maroc, Algérie et Tunisie) avec des résultats variables. Ces variations sont soit qualitatives (composés différents) soit quantitatives (proportions différentes de certains composés). Ces variations peuvent parfois être dues à des différences climatiques, géographiques ou saisonnières ou simplement à la quantité d'arrosage ou la fertilisation utilisée. Elles peuvent également avoir une

origine génétique ; ceci a été observé quand des plantes d'origines géographiques différentes sont cultivées à proximité l'une de l'autre. Finalement, ces variations peuvent être également attribuées aux méthodes d'extraction des HE et, dans le cas des essences commerciales, au degré de mélange et de falsification (**Lis-Balchin, 2002**).

Dans une autre étude réalisée sur quatre populations sauvages de *L. stoechas* de la Crète, **Skoula et al. (1996)** ont montré que les principaux constituants des HE sont alternativement, ou en combinaison le fenchone, le camphre, le 1,8-cinéol, l' α -pinène et l'acétate de myrtényle. Ainsi, alors que le fenchone était un élément majeur de l'HE de toutes les quatre populations, trois étaient également riches en camphre et la quatrième en 1,8-cinéol. Pour notre échantillon, l'essence analysée de la lavande à toupet paraît être de chémotype acétate de linalyle, avec la présence d'un 2^{ème} composé majoritaire, le linalool. Ces deux composés, à eux seuls, représentent un taux de 70%. Un autre monoterpène oxygéné, le 1.8-cinéol, a été retrouvé dans notre échantillon d'essence mais avec un taux très faible (5%). Ceci paraît être en totale contradiction avec d'autres travaux qui révèlent que des populations ayant un taux élevé de 1,8-cinéol, peuvent également être trouvées dans le nord de l'Afrique (**Tableau 3.3**). En revanche, tous les chémotypes consignés dans le Tableau 3.3 diffèrent complètement de celui publié par **Gören et al. (2002)** dont l'HE d'une *L. stoechas*, originaire de Turquie, se caractérisait plutôt par un profil jamais retrouvé et ayant une forte teneur en pulégone (40.4 %), menthol (18.1 %) et menthone (12.6 %), en parallèle avec une absence totale de fenchone et de camphre.

En définitive, la différence de composition constatée entre l'essence de lavande analysée, lors de notre travail, et celle des autres populations à travers le bassin méditerranéen est vraisemblablement liée à une régulation différentielle des divers constituants de l'HE par des facteurs abiotiques et biotiques. De nombreux facteurs externes peuvent influencer la composition chimique de ces métabolites aromatiques. La température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol sont autant de facteurs d'ordre environnemental susceptibles d'induire des modifications chimiques (**Lis-Balchin, 2002**). L'influence du procédé d'extraction sur la labilité des constituants des HE explique que la composition du produit obtenu par hydrodistillation soit, le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal. Le chauffage prolongé et puissant engendre en effet la dégradation de certaines de molécules aromatiques (**Bruneton, 1999**).

3.2. Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle *in vitro*

3.2.1. Activité antimicrobienne en aromatogramme

Le screening antibactérien et antifongique de l'essence aromatique de *Lavandula stoechas* a été réalisé, *in vitro*, sur plusieurs souches microbiennes isolées cliniquement. Au total, 9 bactéries ont été utilisées (3 bactéries à Gram + et 6 à Gram-) ainsi que 11 champignons (5 levures et 6 champignon filamenteux (moisissure)). Les résultats de cette étude antimicrobienne sont rapportés dans les **Tableaux 3.4** et **3.5**. A noter que le diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans le calcul de la zone d'inhibition.

Notant également que d'autres souches, à l'exemple de *K. pneumoniae*, *E. coli* et *S. typhi* ont manifesté une grande sensibilité au pouvoir inhibiteur de l'essence avec des DZI de l'ordre de 49, 38 et 68 mm, respectivement (**Figure 3.3**).

Dans tous les cas, il faut noter que les DZI obtenus en HE sont largement supérieurs à ceux de l'antibiogramme où des résultats mitigés ont été notés. A titre d'exemple, *A. baumannii*, un germe impliqué souvent dans les infections nosocomiales, a manifesté une résistance totale à tous les ATB utilisés, y compris ceux à grand spectre comme les tétracyclines et gentamycine, alors qu'il a été inhibé quasi-totalement (81 mm) en utilisant une quantité de 60 µL/disque d'HE de lavande.

Ces résultats sont très encourageants pour une éventuelle application des essences de la lavande papillon comme antibactérien naturel dans les infections liés aux soins hospitalisés.

Concernant les souches fongiques, l'activité antimicrobienne est plus marquée pour les espèces mycéliennes (moisissures) avec des DZI qui s'échelonnent entre 12 et 85 mm avec 20 µL/disque d'HE. En outre, une inhibition totale (>85 mm) a été constatée pour les souches *A. terreus*, *A. niger*, *Verticillium* sp. et *Penicillium* sp. Les levures ont manifesté une certaine sensibilité vis-à-vis du pouvoir inhibiteur de l'HE avec des DZI de l'ordre de 11 à 18 mm pour la dose la plus faible. *C.albicans* est l'espèce la plus sensible à forte dose avec un DZI égal à 54 mm. Une étude comparative avec le contrôle négatif (antiseptique Héxoméline) permet de révéler que l'essence est plus active sur les souches mycéliennes en comparaison avec l'Hexomedine où les DZI étaient inférieurs et ne dépassant pas, dans les meilleurs des cas, 45 mm à forte dose. De plus, il a été remarqué que l'antiseptique serait sans effet sur les levures de bière (*S. cerevisiae*) et le *Penicillium* sp.

Dans le même sillage, nous avons remarqué qu'il existe une certaine différence de sensibilité entre les bactéries à Gram+ et à Gram-. Ceci est en totale adéquation avec la majorité des travaux antérieurs (**Tepe et al., 2005 ; Gilles et al., 2010**). Ces derniers confirment que les Gram+ sont plus sensibles à l'action antimicrobienne de l'HE que les Gram-. En fait, les Gram- possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi. L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (ATB, métaux lourds, HE,...). La résistance des bactéries à Gram- aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules de franchir la membrane externe (**Burt, 2004**).

Les résultats de notre screening antimicrobien semblent être en accord avec d'autres travaux indiquant que les HE de populations non-algériennes de *L. stoechas* possèdent également des activités antiseptiques. Il a été rapporté que l'huile volatile de plantes en provenance de Tunisie a une activité antibactérienne envers *Staphylococcus aureus* (Bouzouita *et al.*, 2005). De même, des activités antibactériennes ont été signalées pour l'HE de *L. stoechas* sauvage de Turquie (Gören *et al.*, 2002), d'Italie (Angioni *et al.*, 2006) ou à partir de plantes cultivées en Australie (Moon *et al.*, 2007).

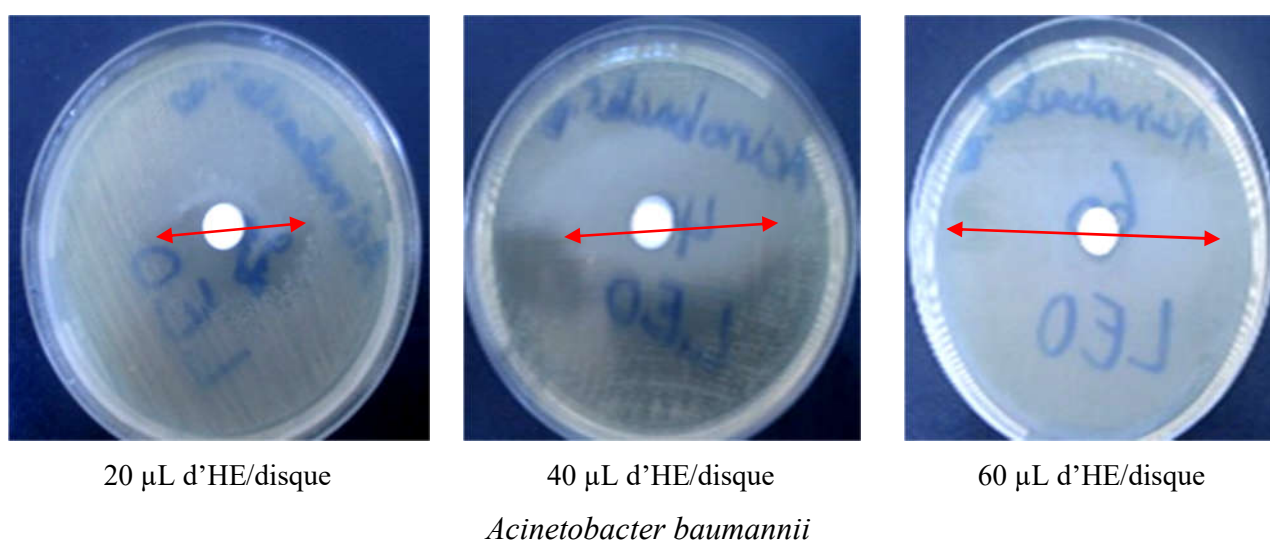


Figure 3.3. Pouvoir antibactérien de l'huile essentielle en aromatoگرامme.

Plusieurs publications scientifiques ont mis en exergue les propriétés inhibitrices de plusieurs espèces du genre *Lavandula*, en particulier vis-à-vis des souches *Aspergillus nidulans* et *Trichophyton mentagrophytes* (Moon *et al.*, 2007). Cependant, la comparaison de l'efficacité des extraits aromatiques, ou des constituants individuels, à travers les différentes publications, reste difficile à établir. Cette difficulté réside dans le fait que les paramètres expérimentaux (méthodes employées, conditions physiologiques des germes, dose utilisée) diffèrent entre les études.

Par ailleurs, les souches fongiques demeurent les plus sensibles à l'action inhibitrice de l'essence aromatique *in vitro*. Excepté *Candida parapsilosis*, toutes les autres espèces mycéliennes ont été totalement fortement à la dose la plus élevée (**Figure 3.4**). A noter aussi que ce pouvoir antifongique de l'essence est largement supérieur à celui de l'Hexomédine, une solution antiseptique à usage locale, prise comme contrôle +. Ces résultats, très encourageants, laissent entrevoir des possibilités d'une éventuelle utilisation de la fraction aromatique de cette lavande comme alternative aux antifongiques de synthèse, non dénués de nombreux effets indésirables.

Beaucoup de chercheurs ont confirmé la présence de l'activité antifongique des métabolites terpéniques des lavandes. Nos résultats sont en concordance avec ceux de plusieurs travaux antérieurs (**Lis-Balchin, 2002 ; Zuzarte et al., 2013**). Le mécanisme d'action des extraits aromatiques sur les souches fongiques n'a pas été totalement élucidé. Cependant, certaines études soulignent que l'action antifongique de ces substances terpéniques est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci, entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (**Cox et al., 2000**). La lyse des cellules de levure a été montrée par la libération de substances absorbant à 260 nm (**Chami et al., 2005**).

En plus des activités antibactériennes, la lavande possède également des propriétés antifongiques. Une corrélation entre la composition chimique et l'activité antimycotique n'a pas été encore éclairée. Dans le test avec les micro-organismes, *Aspergillus niger*, *A. ochraceus* et *Fusarium culmorum*, ceci réagissent différemment aux huiles; le phytopathogène *F. culmorum* est moins infecté, à l'exception des deux *Aspergilli*. L'espèce *A. niger* a été plus inhibée dans sa croissance par rapport au mycotoxigène *A. ochraceus* (**Moon et al., 2007**).

Dans une première publication, **Yap et al. (2014)** ont voulu démontrer l'efficacité antibactérienne de l'essence aromatique de lavande officinale, en synergie avec un antibiotique, sur une souche multirésistante : *Escherichia coli*. Cette bactérie fait partie de notre flore intestinale, mais peut induire des pathologies (gastro-entérites, infections urinaires, etc.) La souche *E. coli* était ici résistante à la pipéracilline. Après exposition à l'HE de lavande officinale, les bactéries ont été décimées. L'huile a agi en altérant les membranes externes des bactéries, et par le biais du quorum sensing des bactéries. Le quorum sensing est la capacité de bactéries à communiquer avec leurs congénères via des signaux moléculaires. L'étude a donc permis de comprendre le mécanisme d'action antibactérien de l'HE de lavande officinale, qui comprend une altération de la membrane externe des bactéries, ainsi qu'une inhibition de leur détection du quorum

Un second essai a porté sur une autre bactérie, *Acinetobacter* sp., responsable de maladies nosocomiales (**Sienkiewicz et al., 2016**). Elle pose de nombreux problèmes en milieu hospitalier du fait de sa résistance à certains antibiotiques, son aptitude de production d'un biofilm et sa capacité de survie sur une surface neutre. L'HE de lavande officinale a été testée en comparaison avec celles de cannellier et de géranium. Elle s'avère moins efficace que les deux autres huiles étudiées, mais cette étude permet de montrer que ces extraits aromatiques pourraient être utilisés en milieu hospitalier pour la désinfection et l'hygiène.

Dans une autre étude, l'HE de lavande officinale est associée à deux autres huiles, le giroflier et le géranium odorant (**Panahi et al., 2014**). Les effets de ce mélange de ces huiles ont été comparés à ceux de la ciprofloxacine (antibiotique de la famille des fluoroquinolones). Soixante-dix patients sont divisés en deux groupes : le groupe « contrôle » reçoit des gouttes de ciprofloxacine tandis que le groupe « essai » bénéficie des gouttes du mélange d'HE. Les gouttes sont appliquées deux fois par jour, pendant une semaine. Les résultats sont étudiés par rapport à l'évaluation de la douleur et l'observation de l'évolution des symptômes de l'otite externe (gonflement, œdème, démangeaisons). Il n'y a pas de différence significative entre les résultats des deux groupes, ce qui montre que le mélange d'HE est aussi efficace que l'antibiotique dans le traitement d'une otite externe. Cependant l'essence de lavande ne peut être administrée qu'à des enfants de plus de 36 mois, à cause du camphre qu'elle contient.

Les propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle ont été mises en évidence par plusieurs études qui ont montré comment les différents composants peuvent être employés comme bactéricide potentiellement efficace contre les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline et *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine. En outre, l'huile essentielle de lavande - en

particulier le linalool qu'il contient - a été démontré qu'ils possèdent également des propriétés fongicides *in vitro* (**Kaloustian & Hadji Minaglou, 2012**).

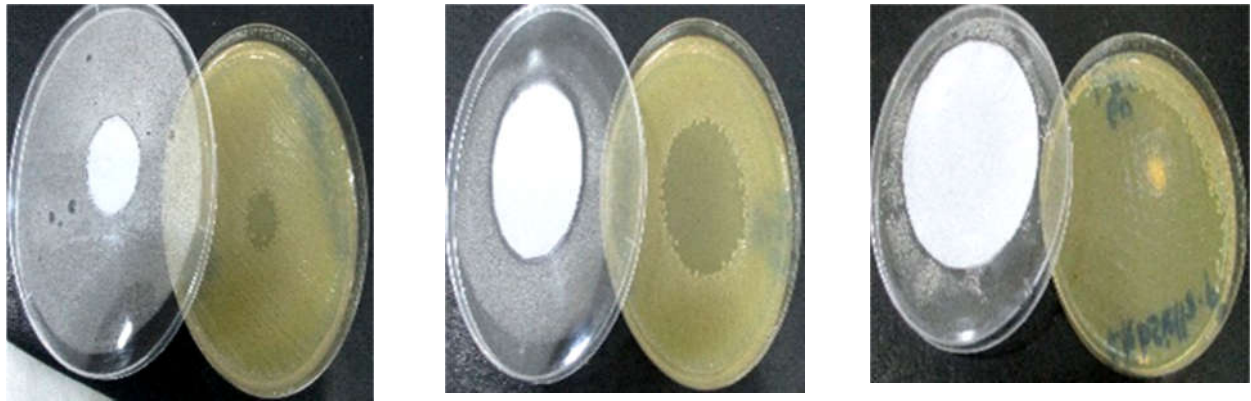
Dans le travail mené par **Dorman et Deans (2000)**, les alcools terpénoïdes ont montré une activité contre les germes testés, en agissant comme des agents dénaturant les protéines ou des agents déshydratants.

Dans une autre étude, c'est le linalool qui s'est montré le plus efficace avec l'inhibition de 17 bactéries. Il était suivi par le cinéole et le géraniol (chacun d'eux inhibant 16 bactéries), puis par le menthol et le citral qui ont inhibé respectivement 15 et 14 bactéries (**Pattnaik et al., 1997**). De ce fait, le pouvoir antimicrobien de l'essence de la lavande pourra être relié, sans doute, à son profil biochimique caractérisé par la prédominance des composés oxygénés (90%) (**Cavanagh & Wilkinson, 2002**).

Cependant, ces composés ne peuvent être responsables des effets générés par l'HE sur les germes microbiens. **Viljoen et al. (2003)** ont démontré que l'effet synergique peut être actif dans une association entre le 1,8-cinéol et le camphre. Ces deux composés ont été également détectés à faible taux dans notre échantillon aromatique. Cela démontre, sans contestation possible, que la différence d'activité antiseptique des HE ne peut pas s'expliquer par la présence d'un principe actif et, encore moins, par sa seule concentration. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de façon synergique.

3.2.2. Activité antimicrobienne en microatmosphère

Par ailleurs, l'action inhibitrice de la phase vapeur a été particulièrement importante avec la dose de 60 µL/disque d'HE où une inhibition totale a été enregistrée pour la majorité des souches aspergillaires et *S. cerevisiae* (Sc1). En plus, des DZI importants, variant entre 49 et 64 mm et largement supérieurs à ceux de l'antiseptique utilisé comme contrôle positif, ont été constatés pour *Candida albicans*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis*.



Klebsiella pneumoniae

En thérapie, l'essence de lavande pourra trouver une place comme désinfectant atmosphérique en milieu hospitalier afin de lutter contre les infections nosocomiales et les contaminations aéroportées, ainsi que pour le contrôle de l'hygiène de l'air.

In vivo, l'incidence croissante des infections fongiques, plus particulièrement celles provoquées par les levures du genre *Candida*, pousse à rechercher de nouveaux agents antifongiques qui ne soient pas fongistatiques, toxiques et générateurs de résistance comme ceux déjà utilisés. La recherche d'une alternative thérapeutique s'avère donc nécessaire. D'où l'intérêt d'essayer de transposer ces résultats de l'action fongicide *in vitro* sur des modèles *in vivo*. Le mode d'action fongicide des HE a été abordé par quelques études qui sont arrivées à la conclusion que ce mécanisme se manifeste par une altération de la membrane plasmique de la cellule fongique (Cox *et al.*, 2001).

3.2.3. Etude comparative : aromatoigramme vs microatmosphère

Une étude comparative entre l'aromatoigramme et la microatmosphère a été réalisée afin de vérifier l'efficacité de l'action antimicrobienne de la phase vapeur de l'essence. Hélas, cette étude n'a pas été validée sur le plan statistique car aucune répétition n'a été faite.

A la lecture de la littérature scientifique, il apparaît que la microatmosphère est très peu documentée. En effet, rares sont les travaux scientifiques qui ont déjà traité cette méthode.

Les études réalisées par **Tyagi et Malik (2010, 2011)** ont mis en exergue l'efficacité de la phase vapeur sur l'inhibition de la croissance des germes par rapport à la phase liquide. Ceci a été confirmé, lors de notre étude, notamment sur les bactéries à Gram+.

Il faut cependant considérer ces données avec prudence car ce sont des résultats obtenus en laboratoire et l'application en conditions réelles soulèvent de nombreuses interrogations. De plus, l'étude de **Pibiri (2006)** montre que l'efficacité microbicide est limitée dans le temps. Les dispositifs d'évaporation sont également susceptibles d'entraîner la formation de composés potentiellement toxiques pour l'Homme. Il est donc nécessaire d'obtenir plus de données sur ces différents aspects toxicologiques.

En somme et en se basant sur les résultats de ces deux techniques, l'activité antimicrobienne de l'HE de lavande papillon pourrait être due à l'effet combinatoire de ses phases vapeur et liquide. Dans tous les cas, cette action inhibitrice de la croissance fongique paraît supérieure à celles de toutes les espèces bactériennes.

3.2.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)



Figure 3.7. Détermination des CMI des bactéries par dilution en milieu gélosé.

Certaines critiques ont été soulevées concernant l'interaction entre les agents émulsifiants et les constituants des HE. L'utilisation de ces agents tensio-actifs n'a pas résolu le problème : on sait en effet qu'ils interfèrent avec l'activité antibactérienne des dérivés phénoliques, au point d'être communément cités comme neutralisants dans les essais de bactéricidie.

La plupart des méthodes microbiologiques utilisées ont été critiquées par plusieurs auteurs. Ces critiques ont été basées sur la discordance observée dans les résultats obtenus concernant l'étude de la zone d'inhibition et l'étude de l'inhibition de la croissance à différentes concentrations d'HE. Les notions de CMI et CMB ne sont pas définies de façon précise et universelle et plusieurs auteurs ont exprimé les résultats avec différentes unités. Ces concentrations peuvent être exprimées en $\mu\text{g/mL}$ (Oussou *et al.*, 2008), en $\mu\text{L/mL}$ (De Billerbeck *et al.*, 2002) ou en % (v/v) (Hammer *et al.*, 1999), ce qui rend la comparaison des résultats entre eux difficile.

3.3. Activité antifongique de l'huile essentielle dans une matrice alimentaire

L'efficacité de l'HE de la lavande a été vérifiée en l'incorporant dans une matrice alimentaire (boisson gazeuse sucrée et fruitée Orangina®). A cet effet, l'essence a été ajoutée au jus pour l'obtention, au final, de plusieurs concentrations de (1, 2 et 4 mL/L). Et pour étudier la cinétique de la croissance fongique, nous avons inoculé chaque échantillon par une charge de *Saccharomyces cerevisiae*. En outre, l'essence a été supplémentée seule ou en association avec un traitement thermique (80°C pendant 2 min).

A J-0 et à la lecture des résultats obtenus, une croissance fongique est notée pour tous les échantillons traités avec l'HE seule où les valeurs de Log UFC/mL obtenus varient entre 2.3 et 3.4 pour les jus ayant subi une combinaison HE-Traitement thermique et entre 4.2 et 4.5 pour les lots traités uniquement avec HE (**Figure 3.8**). Cependant et à J-2, une inhibition totale de la croissance levuriforme a été notée pour les lots ayant subit un traitement thermique (**Figure 3.9**) en comparaison avec le jus conservés avec des produits de synthèse (benzoate de sodium et sorbate de potassium) où l'inhibition totale n'a été obtenue qu'au 9^{ème} jour de l'expérience. Avec les boissons supplémentées par l'HE seule, l'inhibition de la cinétique fongique a été obtenue au 2^{ème} jour pour la dose la plus forte (4 mL/L), et au 6^{ème} jour pour 2 mL/L, alors qu'avec la plus faible concentration (1 mL/L), la croissance fongique s'est maintenue à une valeur de 3.9 Log UFC/mL.

En définitif, l'association HE-traitement thermique est la meilleure combinaison pour inhiber rapidement et totalement la croissance levuriforme dans une matrice alimentaire (jus Orangina), en comparaison avec l'HE seule où l'inhibition n'est possible qu'à forte dose, ce qui pourrait être préjudiciable pour les qualités organoleptique et sensorielle des denrées alimentaires.

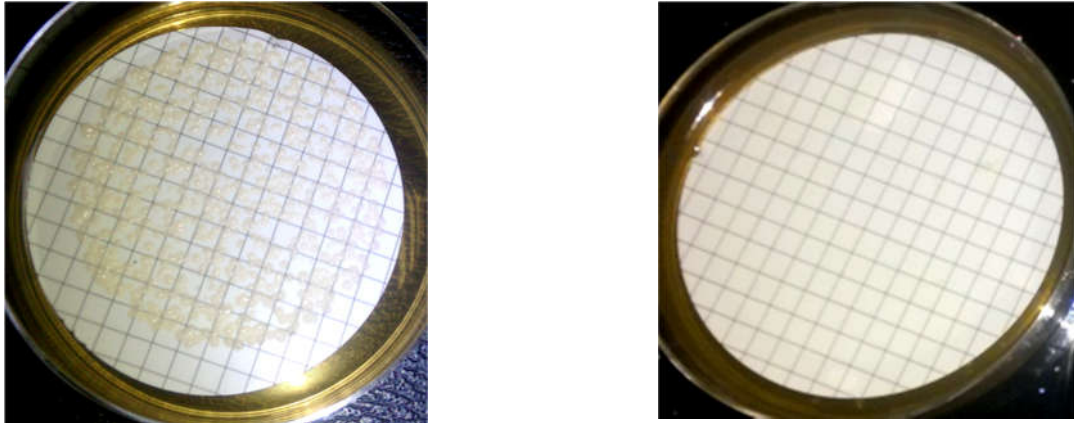


Figure 3.9. Membrane filtrante après analyse d'une boisson Orangina traitée avec HE-Ttraitement thermique à J-0 (à gauche) et à J-2 (droite).

Les tendances actuelles des consommateurs sont orientées vers des produits frais, plus naturels, moins synthétiques et exempts d'additifs chimiques. Par ailleurs, des études semblent montrer l'intérêt dans la biopréservation de molécules issues de végétaux. Parmi ces antimicrobiens « naturels », se trouvent les composés aromatiques d'huiles essentielles.

La formule de la boisson Orangina[®] a été inventée en 1936 par un pharmacien à la foire de Marseille (France). L'idée consiste à mélanger un concentré de jus d'orange à de l'eau gazéifiée, le tout étant conditionné dans une bouteille granuleuse et ventrue avec, en guise de bouchon, une fiole renfermant des HE, principalement celles des agrumes mais aussi de la lavande et du géranium.

Ces huiles ont servi pour un long temps comme des agents d'odeur et de saveur dans cette boisson fruitée. Ce n'est qu'après la vulgarisation de l'aromathérapie anti-infectieuse que ces arômes ont été reconnus comme antimicrobiens naturels, pouvant contribuer à la préservation du jus.

A nos jours, rares sont les travaux qui ont été consacré à l'étude de l'efficacité antimicrobienne des HE dans une matrice alimentaire (**Burt, 2004 ; Tyagi et al., 2013**). La majorité des études sont basées sur l'évaluation de cette activité *in vitro*. Dans notre travail et au vu des résultats obtenus, l'essence de lavande pourra être recommandée comme antimicrobien naturel, en substitution aux aditifs alimentaires chimiques non dénués d'effet indésirables.

Cette approche est intéressante d'autant plus que cette essence est classée dans la liste des produits « généralement reconnus comme sains » (Generally Recognized As Safe, GRAS), et approuvée comme aditif alimentaire par la FDA (Food and Drug Administration). Ils n'ont, par

conséquent, pas besoins d'autorisation d'emploi. Certains travaux ont confirmé la possibilité d'utiliser les HE pour prolonger la durée de la conservation des aliments.

Un autre travail récent (Tyagi *et al.*, 2013), publié dans « Food Chemistry », a rapporté que l'incorporation de l'essence de menthe verte, dans les jus de fruit de pomme préparés d'une façon artisanale, était capable réduire la cinétique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* et que cette réduction serait totale en combinaison avec un traitement thermique de courte durée.

3.4. Pouvoir Anti-inflammatoire de l'huile essentielle *in vivo*

3.4.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire aigue *in vivo*

En premier temps, l'activité anti-inflammatoire de l'essence de lavande papillon a été effectuée, *in vivo*, par la méthode de l'œdème des pattes induit par la carraghénine. Les résultats de ce screening anti-inflammatoire, à travers la mesure du poids des pattes gauche et droite pour chaque souris sacrifiée des différents lots étudiés, sont présentés dans le **Tableau 3.7** et **Figure 3.10**.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire, rapportés dans le Tableau 3.7, montrent les variations du pourcentage de réduction de l'œdème (PPG des souris) des différents essais (AINS et HE administrée à différentes doses), par rapport au contrôle négatif. Les médicaments anti-inflammatoires interviennent en général en s'opposant à l'effet de ces médiateurs chimiques : histamine, sérotonine, kinines et prostaglandines (Kaloustian & Hadji Minaglou, 2012).

L'étude statistique a confirmé cette tendance en indiquant qu'il n'existe aucune différence significative ($p > 0.05\%$) entre les lots Contrôle positif - HE (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) - HE (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) au test de Fisher LSD de comparaison par paires. Ceci nous ramène à conclure que l'efficacité anti-inflammatoire de l'essence de lavande est avérée uniquement à forte dose avec un possible effet « dose-dépendant ». Cette constatation est à prendre avec précaution car elle doit être superposée aux données toxicologiques. Le naturel ne rime pas toujours avec innocuité. C'est pourquoi des études, tant pharmacologique que toxicologique, demeurent encore nécessaires.

Les HE contiennent des composés actifs dont certains sont anti inflammatoires. Elles peuvent donc être utilisées dans de nombreux cas comme les douleurs musculaires ou articulaires, l'arthrite, l'arthrose ou encore les rhumatismes. D'après Peana *et al.* (2002), l'huile essentielle de lavande tire ses propriétés analgésique et anti-inflammatoire de deux de ses composants : le linalol et l'acétate de linalyle. Ces deux composants ont été testés à l'aide d'un inducteur d'un œdème sur des rats, la carraghénine. Après administration systémique, une diminution de l'œdème a pu être observée chez les rats. Le linalol donne des effets plus retardés et prolongés.

De plus, l'énantiomère pure, à une concentration de 25 mg/kg, provoque un effet plus prolongé, alors que la forme racémate induit une réduction significative de l'œdème, uniquement après une heure de l'administration de la carraghénine. A des doses élevées, aucune différence n'a été observée entre l'énantiomère (-) et le racémate ; une élévation plus poussée de la dose des deux formes ne provoque aucune augmentation de l'effet.

Les mesures ont été effectuées avec l'Echelle de Visualisation Analogique (EVA) de douleur (pas de douleur, douleur modérée, ou douleur intense). Au bout de dix et trente minutes, l'EVA est nettement diminuée dans les deux groupes, plus fortement dans le groupe qui utilise la lavande. Précisément l'EVA est plus diminuée chez les femmes que chez les hommes. Dans tous les cas, l'HE de lavande peut servir d'auxiliaire à la prise en charge de la douleur aiguë, en parallèle avec une prise d'anti-inflammatoire dans le cas des coliques néphrétiques (très douloureuses).

3.4.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire topique

Après avoir effectué le test à la carraghénine pour estimer l'action anti-inflammatoire aiguë de l'essence de lavande, il nous a semblé nécessaire d'évaluer cette activité par d'autres méthodes. De ce fait et au vu que la majorité des HE sont administrées localement (voie cutanée), nous avons orienté notre travail sur l'étude de cette activité par la méthode d'induction de l'inflammation par le xylène au niveau des oreilles des souris. L'application d'un agent irritant comme le xylène a provoqué des dommages aux cellules et des gonflements au niveau des oreilles gauches des souris et un œdème dans ces derniers et ce dans tous les lots.

De nombreux végétaux sont connus pour leur activité anti-inflammatoire, c'est le cas en particulier de géranium rosat. Bien que les vertus thérapeutiques de l'essence de la lavande des stoechas soient connues, très peu sont les publications scientifiques qui mettent en exergue cette activité.

L'activité anti-inflammatoire a été comparée avec celle de la dexaméthasone. Dans le modèle avec la carraghénine, l'anti-inflammatoire demeure plus efficace, alors que dans le modèle d'œdème auriculaire, les deux produits ont une action similaire sur l'œdème.

Cette étude montre l'intérêt d'utilisation de l'essence de lavande dans l'antalgie et l'inflammation. Elle pourrait être utilisée en complément des antalgiques dans la prise en charge de la douleur, pour diminuer la prise de ces médicaments.

Les chercheurs ont induit une réaction allergique inflammatoire chez les animaux, avec une injection d'ovalbumine pendant deux semaines. Les souris du groupe expérimental inhalaient de l'HE de lavande pendant deux semaines après les injections du produit. Les résultats montrent que

l'HE inhibe la réaction inflammatoire allergique et l'hyperplasie des cellules muqueuses. Elle pourrait donc être utilisée comme alternative dans le traitement de l'asthme.

L'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux et éthanoliques de la partie aérienne de *Lavandula multifida* utilisée dans la médecine traditionnelle marocaine, a été étudié sur l'inhibition de l'œdème de l'oreille des souris induite par l'huile de croton. Cet essai biologique a révélé une activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique, contrairement à l'extrait aqueux qui est moins actif. Le fractionnement de l'extrait éthanolique a permis d'identifier quatre acides triterpéniques des séries oléanane, quatre pimarane et un diterpène iso-pimarane, ainsi qu'un monoterpène phénolique, le carvacrol et sa forme glucoside. Quelques uns de ces composés ont révélé une activité anti-inflammatoire comparable à celle de l'indométacine (Sosaa *et al.*, 2005).

3.4.3. Etude histopathologique

Afin de confirmer à l'échelle cellulaire, l'activité anti-inflammatoire topique induite par le xylène, des coupes histologiques ont été réalisées au niveau des oreilles gauches de toutes les souris par la technique de coloration Hématoxyline-Eosine, en comparaison avec le contrôle négatif non traité.

A ce jour et d'après la littérature scientifique, il n'existe aucun rapport ou publication scientifique rapportant l'action anti-inflammatoire topique de l'essence de *Lavandula stoechas*. De ce fait, notre travail reste le premier à mettre en évidence cette activité thérapeutique *in vivo*.

De plus, il a été trouvé que la réduction d'œdème était de 51 et 53% pour les deux dilutions d'HE utilisées. Il apparaît que, d'après la littérature scientifique, la voie cutanée reste la plus adéquate pour un effet significatif (**Su *et al.*, 2010**).

On recherche depuis de nombreuses années, dans l'industrie pharmaceutique, des substances permettant de traiter l'inflammation. A cet égard, nombreuses sont celles qui ont déjà été décrites, connue dans la littérature sous les appellations d'Anti-Inflammatoires Stéroïdiens ou Non-Stéroïdiens (AIS ou AINS). Outre que les anti-inflammatoires connus présentent souvent des effets secondaires non négligeables, il demeure intéressant de disposer de nouveaux produits à activité anti-inflammatoire, notamment pour des affections cutanées mineures. L'essence de lavande papillon pourra faire partie intégrante de l'arsenal thérapeutique dans la lutte-prévention contre les pathologies inflammatoires.

CONCLUSION

CONCLUSION

Actuellement, la lavande possède un atout considérable grâce à la découverte progressive de ces applications dans les soins de santé, ainsi que ses utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique. Ses nombreux usages font qu'elle connaît une demande de plus en plus forte sur les marchés mondiaux. Cependant, ces utilisations devraient être basées sur des connaissances fiables et suffisantes apportées par la recherche scientifique bien menée. Il est donc indispensable de connaître ses nombreux principes actifs afin d'en étudier l'efficacité, le mode d'action et, bien évidemment, les effets secondaires. En aromathérapie scientifique, il s'agit de mettre en valeur les propriétés biologiques en s'appuyant sur leur composition chimique.

Notre deuxième objectif était d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile sur différents germes pathogènes, *in vitro* et dans une matrice alimentaire. L'essence de lavande peut être considérée comme un antibactérien car elle présente une bonne action inhibitrice sur plusieurs souches bactériennes comme les staphylocoques pathogènes ou certaines entérobactéries (coliformes). Cette essence pourra être cataloguée aussi comme un antifongique puissant car elle présente un large spectre d'action sur les levures et les moisissures avec des zones d'inhibition très importantes. Ces résultats laissent entrevoir la possibilité d'une éventuelle utilisation dans la désinfection de l'air dans les hôpitaux ou encore dans la lutte contre les infections nosocomiales. En outre, son efficacité antifongique a été confirmée dans une boisson gazeuse sucrée et fruitée (Orangina), seule ou en combinaison avec un traitement thermique.

Comme perspectives, il serait intéressant d'apprécier l'action antimicrobienne de cette huile aromatique, en comparaison avec les composés terpéniques isolés, afin de dégager des conclusions sur les possibles effets synergiques entre différents constituants, majoritaire et minoritaire.

En outre, il nous paraît utile de tester l'action antimicrobienne des huiles de cette plante à parfum sur une large gamme de micro-organismes, en particulier des germes multirésistants ou impliqués dans différentes infections, des bactéries responsables d'altération de la qualité hygiénique et sensorielle des denrées alimentaires et des germes phytopathogènes.

Le mode d'action des huiles au niveau cellulaire a été rarement abordé. De même que la cinétique d'inhibition au cours de la croissance microbienne. Pour améliorer la compréhension des altérations cellulaires observées, un travail plus approfondi, impliquant les molécules actives des huiles devra

être entrepris. L'observation des effets produits sur l'ultra-structure bactérienne devra être réalisée en microscopie électronique à transmission.

La cytotoxicité de ces molécules devra également être explorée sur cultures cellulaires, avant d'être évaluée *in vivo*. Après ces nombreux tests, les molécules bioactives de l'essence de lavande pourront servir de base au développement de nouveaux ingrédients nutraceutiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abad, M. J., Ansuategui, M., & Bermejo, P. (2007). Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc*, 7(11), 6-145.
2. Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, 4^{ème} édition, Pennsylvanie, USA.
3. AFNOR. (2000). Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles. AFNOR, Paris, France.
4. Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., & Cabras, P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4364-4370.
5. Baccaglioni, L. (2013). There is limited evidence that topical lavender oil is effective for palliative treatment of recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Evidence Based Dental Practice*, 13(2), 47-49.
6. Baldovini, N., Muselli, A., Ristorcelli, D., Tomi, F., & Casanova, J. (1998). Variabilité Chimique De *Lavandula Stoechas* de Corse. *Rivista Italiana Eppos*, 9, 773-780.
7. Baldovini, N., Lavoine-Hanneguelle, S., Ferrando, G., Dusart, G., & Lizzani-Cuvelier, L. (2005). Necrodane monoterpenoids from *Lavandula luisieri*. *Phytochemistry*, 66(14), 1651-1655.
8. Benabdelkader, T. (2012). Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés terpéniques volatils des *lavandes ailées*, *Lavandula stoechas sensu lato*, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique. Thèse de Doctorat en Science, Filière de Biologie. Université Jean Monnet-Saint-Etienne (France) en co-tutelle avec l'Ecole Normale Supérieure de Kouba (Alger, Algérie).
9. Bensegueni, A., Belkhiri, A., Boulebda, N., & Keck, G. (2007). Evaluation de l'activité cicatrisante d'un onguent traditionnel de la région de Constantine sur les plaies d'excision chez le rat. *Sciences & Technologie C*, (26), 83-87.
10. Bouzouita, N., Kachouri, F., Hamdi, M., Chaabouni, M. M., Aissa, R. B., Zgoulli, S., & Lognay, G. C. (2005). Volatile constituents and antimicrobial activity of *Lavandula stoechas* L. oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 17(5), 584-586.
11. Braden, R., Reichow, S., & Halm, M. A. (2009). The use of the essential oil lavandin to reduce preoperative anxiety in surgical patients. *Journal of Perianesthesia Nursing*, 24(6), 348-355.

12. Bradley, B. F., Brown, S. L., Chu, S., & Lea, R. W. (2009). Effects of orally administered lavender essential oil on responses to anxiety-provoking film clips. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 24(4), 319-330.
13. Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. Editions Tec & Doc, Paris, France.
14. Buckle, J. (1992). Aromatherapy. *Nursing Times*, 89(20), 32-35.
15. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
16. Carrasco, A., Ortiz-Ruiz, V., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., & Tudela, J. (2015). *Lavandula stoechas* essential oil from Spain: Aromatic profile determined by gas chromatography–mass spectrometry, antioxidant and lipoxygenase inhibitory bioactivities. *Industrial Crops and Products*, 73, 16-27.
17. Carson, C. F., & Riley, T. V. (1994). Susceptibility of *Propionibacterium acnes* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Letters in Applied Microbiology*, 19(1), 24-25.
18. Cassé, C. (2013). La mémoire de l'exploitation de la lavande dans le pays barrêmois.
19. Cassella S., Cassella J.P., Smith I. 2002. Synergistic antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and lavender (*lavandula angustifolia*) essential oil against dermatophyte infection. *The International Journal of Aromathérapie*, vol 12, 2-5.
20. Chaytor, D. A. (1937). A taxonomic study of the genus *Lavandula*. *Journal of the Linnean Society of London, Botany*, 51(338), 153-204.
21. Chebaibi, A., Filali, F. R., Amine, A., & Zerhouni, M. (2011). Effet bactéricide (*in vitro*) des extraits aqueux des feuilles du grenadier marocain (*Punica granatum* L.) sur des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 9(3), 158-164.
22. Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P. B., Almeida, C., Nogueira, J. M., & Romano, A. (2013). Metabolic profile and biological activities of *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica* (Chaytor) Franco: Studies on the essential oil and polar extracts. *Food Chemistry*, 141(3), 2501-2506.
23. Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 170-175.
24. Dapkevicius, A., van Beek, T. A., Lelyveld, G. P., van Veldhuizen, A., de Groot, A., Linssen, J. P., & Venskutonis, R. (2002). Isolation and Structure Elucidation of Radical Scavengers from *Thymus vulgaris* Leaves. *Journal of Natural Products*, 65(6), 892-896.
25. De Billerbeck, V. G., Roques, C., Vanière, P., & Marquier, P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes*, 3, 248-51.

26. De Gingins-Lassaraz, F. (1827). Histoire naturelle des lavandes.
27. Deans, S. G., & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5(2), 165-180.
28. Dob, T., Dahmane, D., Agli, M., & Chelghoum, C. (2006). Essential oil composition of *Lavandula stoechas*. from Algeria. *Pharmaceutical Biology*, 44(1), 60-64.
29. Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
30. Dupin C, Festy D. (2012). La lavande, c'est malin: Huile essentielle, fraîche ou séchée, découvrez les incroyables vertus de cette fleur pour la beauté, la santé, la maison. Leduc Éditions, France.
31. Duraffourd, C., & Lapraz, J. C. (2002). *Traité de phytothérapie clinique*. Elsevier Masson.
32. Field, T., Field, T., Cullen, C., Largie, S., & Kuhn, C. (2008). Lavender bath oil reduces stress and crying and enhances sleep in very young infants. *Early Human Development*, 84(6), 399-401.
33. Field, T., Field, T., Cullen, C., Largie, S., Diego, M., Schanberg, S., & Kuhn, C. (2008). Lavender bath oil reduces stress and crying and enhances sleep in very young infants. *Early Human Development*, 84(6), 399-401.
34. Flores, G., Blanch, G. P., Ruiz del Castillo, M. L., & Herraiz, M. (2005). Enantiomeric composition studies in *Lavandula* species using supercritical fluids. *Journal of Separation Science*, 28(17), 2333-2338.
35. Garcia-Vallejo, M. C., Garcia-Vallejo, I., & Velasco-Negueruela, A. (1990). Essential oils of genus *Lavandula* L. in Spain. In *Proceedings of the 11th International Congress of essential oils, fragrances and flavours*. New Delhi, India, 12-16 November, 1989.
36. Ghelardini, C., Galeotti, N., Salvatore, G., & Mazzanti, G. (1999). Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. *Planta Medica*, 65(8), 700-703.
37. Gilles, M., Zhao, J., An, M., & Agboola, S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry*, 119(2), 731-737.
38. Giordani, R., Hadeif, Y., & Kaloustian, J. (2008). Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, 79(3), 199-203.
39. Giovannini, D., Gismondi, A., Basso, A., Canuti, L., Braglia, R., Canini, A., & Cappelli, G. (2016). *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil exerts antibacterial and anti-inflammatory effect in macrophage mediated immune response to *Staphylococcus aureus*. *Immunological investigations*, 45(1), 11-28.

40. Giray, E. S., Kırıcı, S., Kaya, D. A., Türk, M., Sönmez, Ö., & Inan, M. (2008). Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*. *Talanta*, 74(4), 930-935.
41. Goel, N., Kim, H., & Lao, R. P. (2005). Gender differences in polysomnographic sleep in young healthy sleepers. *Chronobiology International*, 22(5), 905-915.
42. Goetz, P. (2007). *Abrégé de matière médicale en phytocosmétologie. La phytocosmétologie thérapeutique*, 77-115.
43. Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). *Phytothérapie anti-infectieuse*. Springer-Verlag, Paris, France.
44. Gontard, M. (1940). La culture de la lavande en France. *Les Études rhodaniennes*, 16(1), 43-60.
45. González-Coloma, A., Martín-Benito, D., Mohamed, N., García-Vallejo, M. C., & Soria, A. C. (2006). Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(8), 609-616.
46. Gören, A. C., Topçu, G., Bilsel, G., Bilsel, M., Aydoğmuş, Z., & Pezzuto, J. M. (2002). The chemical constituents and biological activity of essential oil of *Lavandula stoechas* ssp. *stoechas*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(9-10), 797-800.
47. Graham, P. H., Browne, L., Cox, H., & Graham, J. (2003). Inhalation aromatherapy during radiotherapy results of a placebo-controlled double-blind randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*, 21(12), 2372-2376.
48. Gray, S. G., & Clair, A. A. (2002). Influence of aromatherapy on medication administration to residential-care residents with dementia and behavioral challenges. *American Journal of Alzheimer's Disease and other Dementias*, 17(3), 169-174.
49. Gülçin, İ., Şat, İ. G., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2004). Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry*, 87(3), 393-400.
50. Guyot-Declercq, C., Renson, S., Bouseta, A., & Collin, S. (2002). Floral quality and discrimination of *Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia*, and *Lavandula angustifolia* × *latifolia* honeys. *Food Chemistry*, 79(4), 453-459.
51. Habbu, P. V., Joshi, H., & Patil, B. S. (2007). Potential wound healers from plant origin. *Pharmacognosy Reviews*, 1(2), 271.
52. Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-990.
53. Hassiotis, C. N. (2010). Chemical compounds and essential oil release through decomposition process from *Lavandula stoechas* in Mediterranean region. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(4), 493-501.

54. Holmes, C., Hopkins, V., Hensford, C., MacLaughlin, V., Wilkinson, D., & Rosenvinge, H. (2002). Lavender oil as a treatment for agitated behaviour in severe dementia: a placebo controlled study. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 17(4), 305-308.
55. Howard, S., & Hughes, B. M. (2008). Expectancies, not aroma, explain impact of lavender aromatherapy on psychophysiological indices of relaxation in young healthy women. *British Journal of Health Psychology*, 13(4), 603-617.
56. Hoya, Y., Matsumura, I., Fujita, T., & Yanaga, K. (2008). The use of non pharmacological interventions to reduce anxiety in patients undergoing gastroscopy in a setting with an optimal soothing environment. *Gastroenterology Nursing*, 31(6), 395-399.
57. Inouye, S., & Abe, S. (2007). Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie*, 5(1), 2-4
58. Irmak Sapmaz, H., Uysal, M., Taş, U., Esen, M., Barut, M., Somuk, B. T., & Ayan, S. (2015). The effect of lavender oil in patients with renal colic: a prospective controlled study using objective and subjective outcome measurements. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 21(10), 617-622.
59. Jeanfils, J., Burlion, N., & Andrien, F. (1991). Antimicrobial activities of essential oils from different plant species. *Revue de l'Agriculture-Landbouwtijdschrift (Belgium)*.
60. Kalembe, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-829.
61. Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2012). *La connaissance des huiles essentielles: Qualitologie et aromathérapie: entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Collection Phytothérapie pratique, Springer-Verlag, Paris, France.*
62. Kane, F. M., Brodie, E. E., Coull, A., Coyne, L., Howd, A., Milne, A., & Robbins, R. (2004). The analgesic effect of odour and music upon dressing change. *British Journal of Nursing*, 13(Sup4), S4-S12.
63. Kasper, S., Gastpar, M., Müller, W. E., Volz, H. P., Möller, H. J., Dienel, A., & Schläfke, S. (2010). Silexan, an orally administered *Lavandula* oil preparation, is effective in the treatment of 'subsyndromal' anxiety disorder: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *International Clinical Psycho-pharmacology*, 25(5), 277-287.
64. Khalid, K. A., Cai, W., & Ahmed, A. M. (2009). Effect of harvesting treatments and distillation methods on the essential oil of Lemon Balm and Apple Geranium plants. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(2), 120-130.
65. Kim, H. M., & Cho, S. H. (1999). Lavender oil inhibits immediate-type allergic reaction in mice and rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(2), 221-226.
66. Laird, K., & Phillips, C. (2012). Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?. *Letters in Applied Microbiology*, 54(3), 169-174.

67. Lavoine-Hanneguelle, S., & Casabianca, H. (2004). New compounds from the essential oil and absolute of *Lavandula luisieri* L. *Journal of Essential Oil Research*, 16(5), 445-448.
68. Lawrence, B. M. (1992). Chemical components of Labiatae oils and their exploitation. *Advances in Labiatae science*, 399-436.
69. Lehrner, J., Marwinski, G., Lehr, S., Jöhren, P., & Deecke, L. (2005). Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. *Physiology & Behavior*, 86(1), 92-95.
70. Lewith, G. T., Godfrey, A. D., & Prescott, P. (2005). A single-blinded, randomized pilot study evaluating the aroma of *Lavandula angustifolia* as a treatment for mild insomnia. *Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 11(4), 631-637.
71. Lim, T. K. (2014). Edible medicinal and non-medicinal plants (pp. 469-472). Springer Netherlands.
72. Lin, P. W. K., Chan, W. C., & Lam, L. C. W. (2007). Efficacy of aromatherapy (*Lavandula angustifolia*) as an intervention for agitated behaviours in Chinese older persons with dementia: a cross-over randomized trial. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 22(5), 405-410.
73. Lis-Balchin, M., Hart, S. L., & Deans, S. G. (2000). Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils (*Melaleuca alternifolia*), originating in Australia and New Zealand. *Phytotherapy Research*, 14(8), 623-629.
74. Lis-Balchin, M. (Ed.). (2002). *Lavender: the genus Lavandula*. CRC press.
75. Martoja, R., Martoja-Pierson, M., & Grassé, P. P. (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale* (Vol. 345). Masson, Paris, France.
76. Mohammadi, Z., & Atik, F. (2012). Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L. *Nature & Technologie*, 35.
77. Monge, R. (2013). Les Routes de la Lavande: au carrefour du développement culturel et de la valorisation de la ressource. *Routes touristiques et itinéraires culturels, entre mémoire et développement* (pp. 139-147).
78. Moon, T., Cavanagh, H. M., & Wilkinson, J. M. (2007). Antifungal activity of Australian grown *Lavandula* spp. essential oils against *Aspergillus nidulans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Leptosphaeria maculans* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Essential Oil Research*, 19(2), 171-175.
79. Nord, D., & Belew, J. (2009). Effectiveness of the essential oils lavender and ginger in promoting children's comfort in a perianesthesia setting. *Journal of PeriAnesthesia Nursing*, 24(5), 307-312.
80. Panahi, Y., Akhavan, A., Sahebkar, A., Hosseini, S. M., Taghizadeh, M., Akbari, H., & Imani, S. (2014). Investigation of the effectiveness of *Syzygium aromaticum*, *Lavandula angustifolia* and *Geranium robertianum* essential oils in the treatment of acute external otitis: A

- comparative trial with ciprofloxacin. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 47(3), 211-216.
81. Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., Bapaji, M., & Kole, C. R. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, (89), 39-46.
 82. Peana, A. T., D'Aquila, P. S., Panin, F., Serra, G., Pippia, P., & Moretti, M. D. L. (2002). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*, (8), 721-726.
 83. Peter Knovel, V. (2004). *Handbook of Herbs and Spices*. Woodhead publishing, Cambridge, Royaume-Uni.
 84. Pibiri, M. C. (2006). *Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles*. Thèse de Doctorat, Federal Polytechnic Institute., Lausanne, Suisse.
 85. Rhind, J. P. (2012). *Essential oils: a handbook for aromatherapy practice*. Singing Dragon, Londres, Royaume-Uni.
 86. Ristorcelli, D., Tomi, F., & Casanova, J. (1998). ¹³C-NMR as a tool for identification and enantiomeric differentiation of major terpenes exemplified by the essential oil of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas*. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(3), 154-158.
 87. Ryu, S. Y., Oak, M. H., Yoon, S. K., Cho, D. I., Yoo, G. S., Kim, T. S., & Kim, K. M. (2000). Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. *Planta Medica*, 66(04), 358-360.
 88. Sakamoto, R., Minoura, K., Usui, A., Ishizuka, Y., & Kanba, S. (2005). Effectiveness of aroma on work efficiency: lavender aroma during recesses prevents deterioration of work performance. *Chemical Senses*, 30(8), 683-691.
 89. Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Bourkhiss, B., & Talbi, M. (2007). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 146, 85-89.
 90. Sheikhan, F., Jahdi, F., Khoei, E. M., Shamsalizadeh, N., Sheikhan, M., & Haghani, H. (2012). Episiotomy pain relief: Use of Lavender oil essence in primiparous Iranian women. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 18(1), 66-70.
 91. Shetty, B. S., Udupa, S. L., & Udupa, A. L. (2008). Biochemical analysis of granulation tissue in steroid and *Centella asiatica* (Linn) treated rats. *Pharmacology online*, 2, 624-632.
 92. Shiina, Y., Funabashi, N., Lee, K., Toyoda, T., Sekine, T., Honjo, S., & Komuro, I. (2008). Relaxation effects of lavender aromatherapy improve coronary flow velocity reserve in healthy men evaluated by transthoracic Doppler echocardiography. *International Journal of Cardiology*, 129(2), 193-197.

93. Shin, B. C., & Lee, M. S. (2007). Effects of aromatherapy acupuncture on hemiplegic shoulder pain and motor power in stroke patients: a pilot study. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 13(2), 247-252.
94. Sienkiewicz, M., Głowacka, A., Kowalczyk, E., Wiktorowska-Owczarek, A., Józwiak-Bębenista, M., & Łysakowska, M. (2014). The biological activities of cinnamon, geranium and lavender essential oils. *Molecules*, 19(12), 20929-20940.
95. Silva, G. L., Luft, C., Lunardelli, A., Amaral, R. H., Donadio, M. V., & Mello, R. O. (2015). Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87(2), 1397-1408.
96. Skoula, M., Abidi, C., & Kokkalou, E. (1996). Essential oil variation of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* growing wild in Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, 24(3), 255-260.
97. Small, E., & Deutsch, G. (2001). *Herbes culinaires pour nos Jardins de Pays Froid*. Ismant Peony Press.
98. Soden, K., Vincent, K., Craske, S., Lucas, C., & Ashley, S. (2004). A randomized controlled trial of aromatherapy massage in a hospice setting. *Palliative Medicine*, 18(2), 87-92.
99. Sosa, S., Altinier, G., Politi, M., Braca, A., Morelli, I., & Della Loggia, R. (2005). Extracts and constituents of *Lavandula multifida* with topical anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*, 12(4), 271-277.
100. Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90(3), 333-340.
101. Vakilian, K., Atarha, M., Bekhradi, R., & Chaman, R. (2011). Healing advantages of lavender essential oil during episiotomy recovery: a clinical trial. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 17(1), 50-53.
102. Valentini, G., Arnold, N., & Bellomaria, B. (1993). Etude chimique comparative des huiles essentielles de quatre populations de *Lavandula stoechas* L. subsp. *stæchas* spontanées de Chypre. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 26(4), 289-299.
103. Voinchet, V., & Giraud-Robert, A. M. (2007). Utilisation de l'huile essentielle d'hélichryse italienne et de l'huile végétale de rose musquée après intervention de chirurgie plastique réparatrice et esthétique. *Phytothérapie*, 5(2), 67-72.
104. Winter, C. A., Risley, E. A., & Nuss, G. W. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Experimental Biology and Medicine*, 111(3), 544-547.

105. Woelk, H., & Schläfke, S. (2010). A multi-center, double-blind, randomised study of the Lavender oil preparation Silexan in comparison to Lorazepam for generalized anxiety disorder. *Phytomedicine*, 17(2), 94-99.
106. Woronuk, G., Demissie, Z., Rheault, M., & Mahmoud, S. (2011). Biosynthesis and therapeutic properties of *Lavandula* essential oil constituents. *Planta Medica*, 77(1), 7.
107. Zaika, L. L. (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9(2), 97-118.
108. Zrira, S., & Benjilali, B. (2003). The constituents of the oils of *Lavandula stoechas* L. ssp. *atlantica* Br.-Bl. and *L. stoechas* ssp. *stoechas* from Morocco. *Journal of Essential Oil Research*, 15(2), 68-69.
109. Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Benzarti, A., Marongiu, B., & Salgueiro, L. (2013). Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 44, 97-103.

Annexe 1

Etapes de la technique de coloration « Hématoxyline-Eosine »

1. Fixation :

- La fixation a pour but la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion dans un grand volume de liquide fixateur (formol).
- La fixation est la plus importante dans les techniques de préparation des échantillons histologiques.

2. Déshydratation et Eclaircissement :

- La déshydratation a pour but de faire sortir l'eau contenue dans les tissus pour les préparer à l'inclusion. On utilise généralement un automate muni (Leica TP 1020, V2.3 Français-03 /2008) de plusieurs bacs contenant par ordre :

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

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

Mode opératoire :

- On met les pièces des oreilles dans des cassettes en plastique (Leica Micro Systems 39 LC – 550-2 J et Routine VI) qui se placent en vrac dans le panier. Chaque cassette porte toutes les indications utiles de Chaque pièce. On met le panier dans l'automate d'infiltration qui va effectuer automatiquement toutes les opérations de traitement des prélèvements tissulaires : fixation, déshydratation, et éclaircissement des spécimens dans les solvants pour finir par l'inclusion dans la paraffine liquide.
- Le panier est transporté d'un poste à l'autre, le déplacement s'effectue dans le sens des aiguilles d'une montre. Un mouvement de va et vient est imprimé au panier immergé. Ce mouvement a pour but de faciliter et d'accélérer l'infiltration.
- Avant de quitter un poste, le panier est maintenu pendant 60 secondes au-dessus du récipient pour laisser au produit le temps de s'égoutter (on réduit ainsi au minimum le risque de contamination de solvants.).
- Enlever le panier et prendre les cassettes pour l'enrobage.

3. L'inclusion :

- L'inclusion a pour but de permettre la réalisation de coupes histologiques fines et régulières.
- Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Le paraplast (Leica Microsystems) est une paraffine synthétique qui imprègne bien les pièces.
- Régler la température du bain de paraffine en fonction de ce point de fusion (45-70°C).
- L'inclusion se fera dans des moules permettant les confections de blocs qui se montent sur le microtome.

Mode opératoire :

- On utilise pour cette étape une station d'enrobage tissu-TEK 111, (Réf.74588), contenant : console thermique, console d'enrobage et console réfrigérante.
 - Placer les moules en Acier inoxydable (tissus-TEK111) dans le bac de préchauffage.
 - Retirer les cassettes de la paraffine liquide à l'aide des pinces préchauffées et les placer sur la plate-forme chaude de travail.
 - Après avoir rempli le moule de paraffine, le placer sur la plate-forme chaude, positionner le tissu au centre et au fond du moule.
 - Déplacer le moule de la «région chaude» à la «région froide». Le refroidissement de la base du moule fait que le tissu est maintenu exactement dans la position choisie.

- La cassette d'enrobage est alors enlevée de la plate-forme de travail chauffée, puis placée au-dessus du moule : la température de la cassette et la paraffine liquide permettent une soudure immédiate. La cassette et le moule sont alors de nouveau placés sous le système de distribution, la paraffine est ajoutée jusqu'à ce que la cassette soit à moitié remplie. Placer la cassette et le moule ainsi remplis sur la grande plaque réfrigérée pour refroidissement définitif.
- Après quelques minutes de refroidissement, les blocs ainsi réalisés, avec précision, peuvent donc être stockés dans le tiroir réfrigéré en attendant d'être coupés.

4. Réalisation des coupes au microtome :

- Les coupes du bloc de paraffine sont réalisées avec un microtome (Leica RM 212SRTS) permettant d'obtenir des sections de 3 à 5 μm d'épaisseur.
- Les rubans obtenus sont étalés sur les lames (CITOGLAS® 217105-1 Super GRADE) et mises à sécher 1h à 60°C. Les indications de l'organe sont préalablement gravées sur la lame correspondante.

5. Coloration :

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

Les différentes étapes de la coloration Hématoxyline-Eosine sont:

- Déparaffinage (Xylène).
- Hydratation(Ethanol).
- Coloration.
- Déshydratation (Ethanol).
- Eclaircissement (Xylène).

L'automate de coloration (Sakura Finetechnical Co., Ltd.) utilisé comprend les bacs suivants :

	Durée (minute)
Xylène	3
Alcool (éthanol 98%)	2
Eau distillé	2
Hématoxyline de Harris	6
Eau courante	3

HCl 1%	2 secondes
Alcool pur (éthanol 98%)	3
Eau lithiné	2
Eau courante	2
Eosine	12
Eau courante	3
Alcool (éthanol 98%)	2
Xylène	3

- Les coupes étant colorées, il faut les protéger contre la dégradation chimique des colorants qui s'oxydent facilement à l'air libre. Cette protection est assurée par une lamelle de verre qu'on colle sur la coupe à l'aide d'une substance appropriée (Eukitt) au colorant utilisé.