

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB BLIDA-1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

THESE DE DOCTORAT 3^{ème} CYCLE (LMD)

En BIOLOGIE

Spécialité : Biologie et Santé

**EXTRACTION, IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE
QUELQUES METABOLITES SECONDAIRES DE *Lavandula stoechas*
L. ET EFFETS BIOLOGIQUES**

Présentée par

LOUKHAOUKHA Rahma

G TAIL	Professeur	USD Blida-1	Présidente
N SMAIL SAADOUN	Professeur	UMM Tizi Ouzou	Examinatrice
F HAMAI DI CHERGUI	MCA	USD Blida-1	Examinatrice
A ROUIBI	MCA	USD Blida-1	Examineur
F SAIDI	Professeur	USD Blida-1	Directeur de thèse

Blida, 2019

Dédicaces

Je dédie ce travail :

À mes **TRÈS CHERS PARENTS**, vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'ont pas cessé de m'encourager. Vos prières et bénédictions m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études et surtout mon doctorat. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente. Que Dieu, le tout puissant, vous préserve et vous accorde santé et longue vie.

À mon mari qui a tant sacrifié, merci à toi, **ABDEREZAK**, pour ton soutien moral, ta patience, ta gentillesse et ta présence à mes côtés dans les moments les plus durs. Je ne sais pas si j'aurais pu mener à terme ma thèse sans ton aide. Qu'Allah réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance.

À la prunelle de mes yeux : **NOUR** qui est venu à la vie durant de cette thèse ; merci de m'avoir fait découvrir la plus belle chose qui soit à mes yeux : la maternité.

À ma chère et unique sœur **SARA** chez qui j'ai toujours trouvé la force d'aller de l'avant surtout pendant les moments les plus difficiles de ma vie, qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude et ma reconnaissance. À mes chers frères **KHALED** et **BILLEL**, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. À ma belle-sœur **WISSAM** qui m'a beaucoup aidé pour la finalisation de cette thèse, je te remercie du fond du Cœur.

À ma très chère **CHEÏMAA** ma seconde sœur : en témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection si sincère que je porte pour vous. Que le Bon Dieu vous accorde le courage pour accomplir votre thèse.

Tous les membres de ma famille et de ma belle-famille, veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

Remerciements

La première personne à qui je souhaite adresser mes chaleureux remerciements est : Madame le Professeur SAIDI F., Directrice du laboratoire de recherche de Biotechnologies, environnement et Santé et ma Directrice de ma thèse qui a guidé, suivi le déroulement et l'exécution du travail de cette thèse en me prodiguant toute aide possible, et en me consacrant son temps précieux. Merci de m'avoir accordé votre confiance durant toutes ses années.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères aux honorables membres du jury :

Madame le Professeur TAIL G., Professeur à l'université de Blida— 1, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

L'expression de mes vifs remerciements et de mon profond respect s'adresse à Docteur HAMAIDI — CHERGUI F., Docteur ROUIBI A de l'université de Blida-1, Professeur SMAIL SAADOUNE N. de l'université Mouloud Maamari de Tizi-Ouzou, qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Particulièrement je remercie amplement, Dr LAZZAR M ; pour sa gentillesse, son aide précieuse, ses encouragements ainsi à l'ensemble du personnel de l'institut National de Protection des végétaux à Alger. Grand merci à Mme LETIFI, Mme HAMDI, Billel, wissal et Leila.

Ma profonde gratitude à Dr JULLIEN F. et Dr BENABDELKADER T., qui m'ont été d'une aide très précieuse et considérable. Leur gentillesse et disponibilité constantes ont participé au bon déroulement de la publication.

Mes remerciements vont aussi à tout le personnel du CRD Saidal — Alger et le personnel du groupe « ANTIBIOTICAL » — Médea

Un chaleureux remerciement à Dr BESSAD et Dr Benhalal, vos conseils et collaborations ne m'ont jamais fait défaut.

Je remercie ma belle-sœur Dr ABDELLAH W. Pour son aide précieuse dans l'interprétation résultats des coupes histologiques.

Mes chaleureux remerciements à ma collègue Rym, qui m'a été d'une aide très précieuse et considérable.

Mes sincères remerciements vont également à tout le personnel du laboratoire d'hygiène et de référence de la Wilaya de Blida pour leurs aides. Un remerciement particulier a Dr BENAMARA, maitre assistante au CHU FRANTZ FANON, qui a mis à ma disposition la batterie de souches microbienne.

Une pensée très particulière à Cheimâa, avec qui j'ai partagé mes joies, mes déceptions et mes longues années d'étude doctorale.

En fin, pour tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, veuillez trouver l'expression de mes sentiments et de ma reconnaissance.

RESUME

La lavande présente une large aire de distribution avec des régions bioclimatiques différentes. Un nombre d'espèces limité ayant des caractéristiques morphologiques et écologiques variées. *Lavandula stoechas* L. communément appelée EL-HALHAL est une plante médicinale et aromatique appartenant à la famille des Lamiacées. En régions nord-centre de l'Algérie, cette plante est utilisée sous forme de couscous appelé : EL-HAMAMA.

Dans le but d'exploiter, de valoriser et de développer les productions des espèces végétales d'intérêt économique et/ou pharmaceutiques, nous avons évalué la composition chimique et les activités biologiques de l'huile essentielles extraite des fleurs sèches de *Lavandula stoechas* L. sauvages. Cette dernière a été récoltée à la station de Beni- Ali sur la majestueuse montagne de Chréa à la wilaya de Blida en Algérie.

L'extraction de l'huile essentielle à partir des fleurs sèche de *L. stoechas* a été accomplie par hydrodistillation. Le rendement moyen en huile essentielle est de $1,13 \pm 0,14$ %. L'utilisation de techniques fines telles que la chromatographie gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse nous a permis de connaître la composition chimique de la fraction volatile Fenchone (40,78%), camphre (9,76%), l'acétate de myrtényle (8,94%) et l'acétate de bornyle (5,10%).

Les résultats de la toxicité aigüe (Teste de la dose limite 2000 mg/Kg du poids corporel) rejoignent ceux de la littérature, l'huile essentielle de *L. stoechas* ne présente aucune toxicité même après deux semaines d'observation sur les souris.

Des activités antimicrobiennes variables avec l'HE de *L. stoechas* se sont révélées sur les 09 bactéries de pathologies humaines, 02 levures, 02 bactéries phytopathogènes et 04 champignons. Ainsi, les résultats obtenus montrent une forte action inhibitrice sur les bactéries à Gram positif et les levures. Seule, la souche *Pseudomonas aeruginosa* était résistante.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire révèlent que l'HE de *L. stoechas* à la concentration de 800mg/kg et 600mg/kg a provoqué une activité anti-inflammatoire d'intensité similaire à celui du diclofénac.

In vitro l'HE de *L. stoechas* a présenté une faible de propriétés de piègeage du radical libre DPPH. Les valeurs de la IC 50 sont égale à $11,95 \pm 0,03$ mg/ml et de $0,058 \pm 0$ mg/ml pour l'HE de *L. stoechas* et le BHT respectivement.

Mots- clés : *Lavandula stoechas* L., huile essentielle, CG/MS, pouvoir antimicrobien, pouvoir anti-inflammatoire, DPPH, pouvoir antioxydant.

ABSTRACT

Lavender has a wide range of distribution with different bioclimatic regions. It has a limited number of species with varied morphological and ecological characteristics. *Lavandula stoechas* L. commonly known as EL-HALHAL is a medicinal and aromatic plant belonging to the Lamiaceae family. In the north-central regions of Algeria, this plant is used in form of couscous called: EL-HAMAMA.

In order to exploit, enhance and develop the production of plant species of economic and / or pharmaceuticals interest, we have evaluated the chemical composition and biological activities of the essential oil extracted from the dry flowers of *Lavandula stoechas* L. wild. The latter was harvested at the Ben Ali station on the majestic Chrea mountain in Blida - Algeria.

Extraction of the essential oil from the dry aerial part of *L. stoechas* was accomplished by hydrodistillation. The average yield of essential oil is $1.13 \pm 0.14\%$. The use of fine techniques such as gas chromatography coupled with mass spectrophotometry (GC-MS) allowed us to know the chemical composition of the volatile fraction (Fenchone (40.78%), camphor (9.76%), myrtenyl (8.94%) and bornyl acetate (5.10%)).

Acute toxicity results (limit test 2000 mg/kg body weight) are similar to those reported in the literature. The essential oil of *L. stoechas* shows no toxicity even after two weeks of observation in mice.

Variable results of antimicrobial activities of *L. stoechas* EO were found variable on: the 09 human pathology bacteria, 02 yeasts, 02 phytopathogenic bacteria and 04 fungi. Thus, the results obtained show a strong inhibitory action on gram-positive bacteria and yeasts. Only, the strain *Pseudomonas aeruginosa* was resistant.

The results of the anti-inflammatory activity reveal that *L. stoechas* EO at the concentration of 800mg / kg and 600mg / kg caused an anti-inflammatory activity of intensity similar to that of diclofenac.

In vitro, *L. stoechas* EO showed a low level of DPPH free radical trapping properties. The values of IC 50 are 11.95 ± 0.03 mg / ml and 0.058 ± 0 mg / ml for *L. stoechas* EO and BHT respectively.

Key words: *Lavandula stoechas* L., Essential Oil, GC/MS, antimicrobial activity, anti-inflammatory activity, DPPH, antioxidant activity.

ملخص

L. stoechas Lavandula لديها مجموعة واسعة من التوزيع مع المناطق بيوكليمايكية المختلفة. عدد محدود من الأنواع ذات الخصائص المورفولوجية والبيئية المتنوعة. لافاندولا ستوشاس ل المعروف باسم إالحال هو نبات الطبية والعطرية التي تنتمي إلى عائلة Lamiacée. في المناطق الشمالية الوسطى من الجزائر، ويستخدم هذا النبات في شكل الكسكس يسمى: الحمامة.

من أجل استغلال، تعزيز وتطوير إنتاج أنواع النباتات ذات الأهمية الاقتصادية و / أو الصيدلانية، قمنا بتقييم التركيب الكيميائي والأنشطة البيولوجية من الزيوت الأساسية المستخرجة من الزهور الجافة البرية *L. stoechas Lavandula*. وقد تم حصاد هذه الأخيرة في محطة بن علي على جبل الشريعة في ولاية البليدة في الجزائر.

لقد تم استخراج الزيوت الأساسية من الزهور الجافة من *stoechas Lavandula* بواسطة هيدروديستيلاتيون. متوسط العائد من الزيت الأساسي هو $1.13 \pm 0.14\%$. وقد سمح لنا استخدام التقنيات الدقيقة مثل CG-MS بمعرفة التركيب الكيميائي للجزء المتقلب (فينشون 40.78%، والكافور 9.76%، ميرتنيل 8.94%، وأسينات البنيليل 5.10%).

نتائج السمية الحادة (اختبار الجرعة الحدية 2000 ملغم / كغم من وزن الجسم) هي مماثلة لتلك التي تم ذكرها في الأدب. الزيت الأساسي *stoechas Lavandula* لا يظهر أي سمية حتى بعد أسبوعين من ملاحظة الفئران.

أنشطة مضادات الميكروبات *stoechas Lavandula* التي تم العثور عليها متغيرة: 09 بكتيريا الأمراض البشرية، 02 خمائر، 02 بكتيريا الممرضة لنباتات، و 04 فطريات. وهكذا، فإن النتائج التي تم الحصول عليها تظهر عمل مثبط قوي على البكتيريا إيجابية Gram والخمائر. فقط *Pseudomonas aeruginosa* كانت مقاومة.

نتائج النشاط المضاد للالتهابات تكشف أن *stoechas Lavandula* هي في تركيز 800mg / كغ و 600 ملغ / كغ تسبب نشاط مضاد للالتهابات من كثافة مماثلة لتلك التي ديكلوفيناك.

في المختبر، *stoechas Lavandula* أظهرت مستوى منخفض من خصائص محاصرة الجذور الحرة DPPH. قيم IC₅₀ هي 11.95 ± 0.03 ملغم / مل و 0.058 ± 0 ملغم / مل *stoechas Lavandula*، BHT على التوالي.

الكلمات المفتاحية: *L. stoechas Lavandula*، الزيوت العطرية، CG-MS، مضادات الميكروبات، المضادة للالتهابات، DPPH، مضادات الأكسدة.

Liste des figures et des tableaux

Figure 1.1 : 1/ Représentation schématique de la plante entière de <i>L. stoechas</i> ; a/ feuille de <i>L. stoechas</i> , b/ inflorescence de <i>L. stoechas</i>	19
Figure 1.2 : Distribution géographique de <i>L. stoechas</i>	22
Figure 1.3 : Cellules sécrétrices, A : tête sécrétrice unicellulaire d'un poil de Basilic (Labiées), B : tête sécrétrice pluricellulaire d'un poil de tomate (Solanacées)	27
Figure 2.1 : <i>Lavandula stoechas</i> : (A) vue générale de la partie aérienne, (B) fleurs (Originale 2015)	39
Figure 2.2 : Carte géographique du site de la récolte de <i>L. stoechas</i>	39
Figure 3.1 : Pourcentage des connaisseurs de la phytothérapie	70
Figure 3.2 : Les différents types de médecines utilisées	71
Figure 3.3 : La connaissance de la phytothérapie en fonction du niveau académique	72
Figure 3.4 : Pourcentage de connaissance de la lavande	72
Figure 3.5 : Pourcentage des sources de connaissance de la lavande	73
Figure 3.6 : Les domaines d'utilisation de la lavande	73
Figure 3.7 : Fleur de <i>L. stoechas</i> (Loupe G : 10× 0,8) (Originale 2014)	76
Figure 3.8 : Corolle pubescente de <i>L. stoechas</i> (loupe G : 10× 2,5) a- corolle pubescente ; b- fleurs hermaphrodites (Originale 2014)	77
Figure 3.9 : Calice de <i>L. stoechas</i> (loupe G : 10× 2,5); a- Poils épidermiques tecteurs ; b- Poils épidermiques sécréteurs (Originale 2014)	77

Figure 3.10 : Androcée de <i>L. stoechas</i> (Loupe G : 10× 2,5) (Originale 2014)	77
Figure 3.11 : Gynécée de <i>L. stoechas</i> (Loupe G : 10× 2,5) (Originale 2014)	78
Figure 3.12 : Trichomes de <i>L. stoechas</i> sous microscope électronique à Balayage A/ trichomes glandulaire capitaté ; B/ taille des têtes de trichomes (1) trichome pelté (2). (Originale 2018)	79
Figure 3.13 : Résultat de la teneur en eau	79
Figure 3.14 : Chromatogramme des cations	81
Figure 3.15 : Chromatogramme des anions	82
Figure 3.16 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Lavandula stoechas</i>	87
Figure 3.17 : Prise de poids des souris durant l'étude de la toxicité aigue	94
Figure 3.18 : Résultats de la consommation hydrique chez les souris mâles	98
Figure 3.19 : Résultats de la consommation hydrique chez les souris femelles	100
Figure 3.20 : Résultats de l'évolution pondérale chez les souris mâles	101
Figure 3.21 : Résultats de l'évolution pondérale chez les souris femelles	102
Figure 3.22 A : Histologie du rein des souris femelles témoins et traitées	115
Figure 3.22 B: Histologie du rein des souris mâles témoins et traitées	116
Figure 3.23 A: Histologie du foie des souris mâles témoins et traitées	117
Figure 3.23 B: Histologie du foie des souris femelles témoins et traitées	118

Figure 3.24 : Diamètre moyen des zones d'inhibition des bactéries Gram positifs	120
Figure 3.25 : diamètre moyen des zones d'inhibition des bactéries Gram négatifs	120
Figure 3.26 : Diamètre moyen des zones d'inhibition des levures	121
Figure 3.27 : Diamètre d'inhibition de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp <i>carotovorum</i>	124
Figure 3.28 : Diamètre moyen des zones d'inhibition d' <i>Erwinia amylovora</i>	125
Figure 3.29 : Pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i>	140
Figure 3.30 : Pourcentage d'inhibition du BHT	140
Figure 3.31 : Les valeurs de l'IC50	141
Figure 3.32 : Pouvoir réducteur de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i>	144
Tableau 2.1 : Caractéristiques des souches de souris utilisées	40
Tableau 2.2 : Les conditions de l'analyse par chromatographie ionique	43
Tableau 2.3 : Protocole expérimental des dérivés anthracéniques	45
Tableau 2.4 : Protocole expérimental de la mise en évidence des flavonoïdes	47
Tableau 2.5 : Protocole expérimental de la mise en évidence des tanins	48
Tableau 2.6 : Souches microbiennes étudiées	59
Tableau 2.7 : Les valeurs des diamètres d'inhibition et leurs interprétations	63
Tableau 3.1 : Résultats de l'enquête ethnobotanique de <i>Lavandula stoechas</i>	75
Tableau 3.2 : Cations détectés dans les cendres par chromatographie ionique	80

Tableau 3.3 : Anions détectés dans les cendres par chromatographie ionique	81
Tableau 3.4 : Identification colorimétrique de quelques métabolites secondaires de <i>L. stoechas</i>	84
Tableau 3.5 : Caractères organoleptiques de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i>	85
Tableau 3.6 : Compositions chimiques de l'huile essentielle des fleurs sèches de <i>L. stoechas</i>	88
Tableau 3.7 : Effets de l'huile essentielle de <i>Lavandula stoechas</i> sur quelques paramètres physiologiques chez les souris	94
Tableau 3.8 : Consommation alimentaire des souris mâles et femelles	97
Tableau 3.9 : Consommation hydrique des souris mâles et femelles	99
Tableau 3.10 : Résultats du gain de poids relatif chez les souris mâles et femelles	103
Tableau 3.11 : Résultats du poids absolu des organes des souris mâles et femelles	104
Tableau 3.12 : Résultats du poids relatif des organes de souris mâles et femelles	105
Tableau 3.13 : Résultats du bilan hématologiques des souris mâles et femelles des lots traités et témoin	110
Tableau 3.14 : Résultats du bilan biochimique des souris mâles et femelles des lots traités et témoin	112
Tableau 3.15 : Interprétation des diamètres d'inhibition	119
Tableau 3.16 : Résultats des diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques	123
Tableau 3.17 : Résultats des valeurs de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide de l'HE de <i>L. stoechas</i>	128

Tableau 3.18 : Résultats des travaux antérieur de différents pays	130
Tableau 3.19 : Résultats de l'activité antifongique de l'HE de <i>L. stoechas</i> et de ses composants majoritaires	133
Tableau 3.20 : Résultats de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i>	138

Table des matières

Dédicaces

Remerciements

Résumé

Abstract

ملخص

Listes des figures et des tableaux

Table des matières

INTRODUCTION.....	18
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	18
1.1 Description de <i>Lavandula</i>	18
1.1.1 Étude botanique de <i>Lavandula stoechas</i>	19
1.1.2 Etymologie.....	20
1.1.3 Systématique.....	20
1.1.4 Distribution géographique	21
1.1.5 Composition chimique de <i>Lavandula stoechas</i>	22
1.1.6 Domaine d'utilisation et vertus thérapeutiques de <i>Lavandula stoechas</i>	23
1.1.7 Contre-indication et effets indésirables de <i>Lavandula</i>	24
1.2 Huiles essentielles et métabolites secondaires des plantes médicinales	25
1.2.1 Les plantes médicinales	25
1.2.2 La phytothérapie.....	25
1.2.3 L'aromathérapie	26
1.2.4 Les huiles essentielles	26

1.2.5	Les métabolites secondaires des plantes médicinales	31
1.3	Activités biologiques des huiles essentielles	34
1.3.1	Activité antimicrobienne	34
1.3.2	Activité antioxydante	35
1.3.3	Activité anti-inflammatoire	36
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES.....		38
2.1	Matériel.....	38
2.1.1	Matériel non biologique	38
2.1.2	Matériel biologique	38
2.2	Méthodes.....	41
2.2.1	Étude ethnobotanique	41
2.2.2	Observation microscopique de la fleur de <i>L. stoechas</i>	41
2.2.3	Détermination de la teneur en eau et en matière minérale.....	41
2.2.4	Chromatographie ionique	42
2.2.5	Caractérisation de certains métabolites secondaires de <i>L. stoechas</i>	44
2.2.6	Extraction des huiles essentielles.....	50
2.2.7	Mesure des grandeurs physiques de l'HE de <i>L. stoechas</i>	51
2.2.8	Analyse chromatographique de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i>	52
2.2.9	Études des activités biologiques de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> ...	53
2.2.9.1	Étude de la toxicité aiguë	53
2.2.9.2	Étude de la toxicité subaiguë	54

2.2.9.3	Évaluation de l'activité antimicrobienne	58
2.2.9.4	Évaluation de l'activité des phytopathogènes	62
2.2.9.5	Étude de l'activité anti-inflammatoire.....	65
2.2.9.6	Étude de l'activité antioxydante par DPPH.....	67
2.2.9.7	Réduction du fer : Méthode de FRAP	68
2.2.10	Analyses statistiques.....	69
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.....		70
3.1	Résultats de l'étude ethnobotanique.....	70
3.2	Résultats de l'étude microscopique de <i>L. stoechas</i>	76
3.3	Résultats de la teneur en eau et en matière minérale	79
3.4	Résultats du screening phytochimique	82
3.5	Extraction et rendement en huile essentielle	85
3.6	Résultats de la composition chimique de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i>	86
3.7	Résultats des Indices physiques.....	92
3.8	Résultats des activités biologiques de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i>	93
3.8.1	Résultats de la toxicité aiguë.....	93
3.8.2	Résultats de la toxicité subaiguë.....	95
3.8.3	Résultats de l'activité antimicrobienne	119
3.8.4	Résultats de l'activité anti-inflammatoire	138
3.8.5	Résultats de l'activité antioxydante	139
CONCLUSION		139

INTRODUCTION

Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que les plantes ont toujours occupé une place prépondérante en médecine traditionnelle [1]. L'histoire des plantes médicinales est associée à l'évolution des civilisations [2]. Depuis l'origine des temps, l'homme s'est tourné vers les végétaux pour y trouver l'essentiel de sa nourriture, de sa médication et de sa survie [3]. Les plantes médicinales constituent une source immense de molécules chimiques complexes exploitées par l'homme dans plusieurs domaines. La diversité de ces molécules naturelles qui ne sont pas essentielles à la viabilité des plantes reste une énigme pour les biologistes qui essaient de décrypter leur rôle dans la nature. De même, l'élucidation des voies de biosynthèse conduisant à des produits naturels originaux est un champ d'investigation inépuisable pour les scientifiques.

De nos jours, un certain nombre de plantes aromatiques et médicinales (PAM) sont encore utilisées sous diverses formes. Elles sont exploitées dans plusieurs domaines tels que : l'industrie cosmétique, agroalimentaire et pharmaceutique. Le recours aux PAM représente une source inépuisable des substances et composés naturels bioactifs. En effet, grâce aux métabolites secondaires, cette voie alternative devient importante à explorer afin de découvrir des médicaments efficaces à moindres effets indésirables [4].

L'OMS estime que la médecine traditionnelle couvre 80 % des soins de santé primaire de la population mondiale. Ce phénomène n'est pas seulement limité aux pays en développement. Une analyse des prescriptions médicales menée a montré que 25 % d'entre elles contenaient un principe issu du règne végétal, tandis que près de 60 % des prescriptions en Europe de l'Est proviennent directement ou indirectement de plantes [5].

Actuellement, une augmentation de l'utilisation de composés d'origine naturelle est observée, justifiant l'accroissement de la production de certaines PAM. Parmi ces PAM, de nombreuses Lamiacées méditerranéennes telles que « *Lavandula stoechas* » sont utilisées pour les propriétés de leurs huiles essentielles (HEs). Ces HEs sont le résultat de la synthèse et de l'accumulation des composés

organiques volatils qui, *in planta*, agissent dans les interactions de la plante avec son environnement biotique (attraction de pollinisateurs, défense contre des pathogènes) et abiotique (protection contre les UV). Selon Elaerts, même si ces molécules sont naturelles, elles ne sont pas dénuées de danger et leurs mésusages aboutissent à des intoxications graves, voire mortelles, nécessitant une vigilance continue [6]. Ceci a conduit l’OMS de prendre l’initiative en développant des stratégies pour un monitoring international [7].

Ces dernières années, l’attention s’est portée sur la résistance aux antibiotiques qui atteignent le point de crise dans le monde ; la synthèse des antioxydants en raison du rôle qu’ils jouent dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l’hypertension et la maladie d’Alzheimer en combattant le stress oxydant. L’exploitation économique des espèces du genre *Lavandula* a augmenté en raison de l’utilisation de leurs HEs ; ainsi, la valorisation des effets thérapeutiques de l’HE des fleurs de *L. stoechas* nous a conduits à réaliser ce travail. Une partie de nos travaux ont été réalisés dans le laboratoire de recherche de biotechnologies, environnement et santé à l’université de Blida-1.

Les objectifs de ce travail de thèse sont :

- Le volet Ethnobotanique, qui permet de vulgariser la connaissance de *Lavandula stoechas* L. son utilisation par les spécialistes et l’étendue de son impact sur une petite partie de la population algérienne, en effectuant des enquêtes sur terrain.
- Le volet phytochimique, par l’identification et la caractérisation des métabolites secondaires, ainsi que la détermination de la composition chimique de l’huile essentielle par Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG-SM).
- Étude préliminaire sur la pharmacologie — toxicologie de l’huile essentielle de *L. stoechas* : toxicité aiguë et Subaiguë.
- Évaluation de l’activité antimicrobienne de l’HE de *L. stoechas* sur des souches de pathologie humaine et phytopathogènes.
 - Étude de l’activité anti-inflammatoire.
 - Étude de l’activité antioxydante.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

1.1 Description de Lavandula

Pendant longtemps, la lavande ne fut qu'une plante sauvage, presque une mauvaise herbe, qui faisait partie du paysage et à laquelle personne ne s'intéressait. Avant la fin du XX^e siècle, rares sont les témoignages écrits, bien que la plante fût connue par certains médecins et naturalistes depuis l'antiquité. Ce n'est que dans les années 1870 que commence réellement son utilisation auprès des populations [8].

La lavande appartient à la famille des Lamiaceae. Cette dernière renferme beaucoup de plantes odoriférantes. Elle constitue une large famille des plantes dicotylédones qui comprend environ 236 genres et 7200 espèces [9].

Le genre *Lavandula* L. est composé de 3 sous genres d'environ 39 espèces, de nombreux hybrides et près de 400 cultivars. Les espèces les plus connues et valorisées économiquement sont sans conteste *L. angustifolia*, *L. stoechas*, *L. latifolia* et l'hybride *L x intermedia*. Il est important de noter qu'il existe également des hybrides intra et intersection, qui émanent du croisement naturel ou artificiel de deux espèces différentes en l'occurrence *L. pedunculata* subsp. *pedunculata* x *L. stoechas* subsp. *stoechas* [10].

Les lavandes sont distinguées des autres lamiacées par la morphologie de leurs fleurs. Leur épi terminal est compact. Il est porté par un long pédoncule (tige florale). L'épi de fleurs est constitué de cymes. L'inflorescence est déterminée et ramifiée avec une fleur à la fin de chaque rameau, soit dans un arrangement décusse opposé. L'épi de fleurs est sous-tendu par des bractées [11].

Les lavandes varient d'arbustes ligneux jusqu'à un mètre de hauteur, à arbustes à base de bois vivaces ou d'herbes annuelles. Les feuilles peuvent être entièrement ou profondément disséquées [11, 12].

1.1.1 Étude botanique de *Lavandula stoechas*

Les lavandes sont un symbole incontournable du Jardin botanique méditerranéen : par leurs feuillages persistants et aromatiques, leurs floraisons estivales parfumées et leurs résistances à la sécheresse [13].

Lavandula stoechas est un sous-arbrisseau annuel, tendre héliophile, sa hauteur varie de 60 à 100 cm. Elle préfère les endroits ensoleillés, les sols siliceux ou sur sol à pH acide. Elle supporte la mi-ombre et tolère le froid jusqu'à -5 °C. L'indumentum de la plante entière est court, blanc et plus ou moins dense. Les tiges de *L. stoechas* sont étroites et quadrangulaires [14], [15], [16], [17].

L. stoechas possède des feuilles supérieures lancéolées elliptiques, opposées et persistantes. Leur couleur tend à être plus verte que grise. Le pédoncule est court, généralement de 1 à 2 cm et peut atteindre 3,5 cm [14].

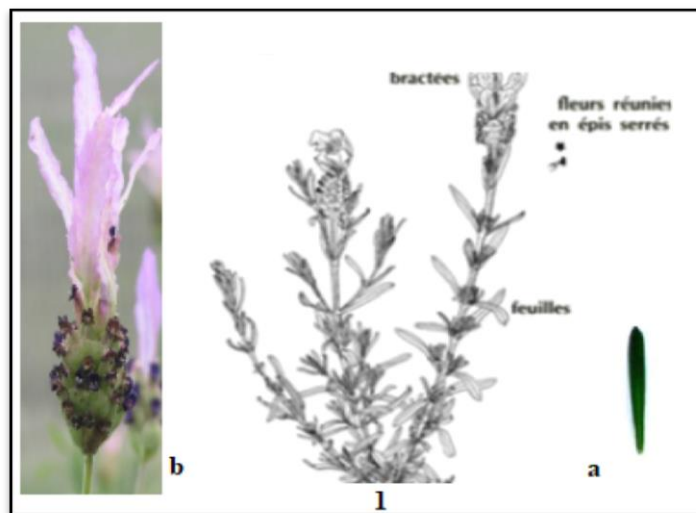


Figure 1.1 : 1/ Représentation schématique de la plante entière de *L. stoechas* [17] ;
a/ feuille de *L. stoechas*, b/ inflorescence de *L. stoechas* [18].

Les fleurs, avec pédicelle, sont disposées en verticilles. Elles sont tenues en grappes de cymes cylindriques ou quadrangulaires, à l'extrémité des tiges rarement feuillées. Les fleurs de *L. stoechas* sont hermaphrodites de couleur bleu-violet. L'inflorescence principale composée ressemble à un épi. Elle est plus ou moins lâche contrairement à l'inflorescence secondaire qui est une cyme bipare et scorpioïde. Les inflorescences de *L. stoechas* se terminent par un toupet de longues bractées stériles de couleur violette pourpre (Figure 1.1). Les cymes de *L. stoechas* portent plusieurs fleurs, ceci leur donne un aspect cylindrique aux thyrses

(Inflorescence en grappe fusiforme). Les bractées stériles sont largement ovales, , obovales, apiculés et très développés. Ils dépassent de 1 à 2 cm les bractées fertiles. Les bractéoles sont absentes. Le calice est ovale au stade de la floraison. Ce dernier s'étend du mois de mars au mois de mai. L'ensemble de la plante est très aromatique, il correspond aux fleurs et aux feuilles [13], [14], [16]

Les lavandes présentent des fruits secs indéhiscent de type akène et plus exactement appelés : nucule. Certains types d'akènes peuvent être facilement identifiés et ont une valeur taxonomique au sein du genre *Lavandula* au niveau sectionnel. Les akènes de *L. stoechas* sont secs. Ils possèdent une seule graine et le péricarpe est ligneux. Les akènes brun-rouge sont largement elliptiques ou circulaires, ne portent qu'une petite cicatrice basale et produisent tous du mucilage [14].

1.1.2 Etymologie

Le mot *lavande* provient du verbe laver. Il peut être issu de l'italien *lavendo* (action de laver) ou du latin *lavare* qui signifie laver, se baigner. Les Romains utilisaient les lavandes pour parfumer leurs bains [19], [20]. Cette étymologie laisse à penser que très tôt la lavande a été utilisée pour parfumer le linge fraîchement lavé.

Anciennement, les fleurs séchées de lavande sont placées dans des sachets dans les armoires pour éloigner les mites. Il est également possible que *Lavandula* et lavande soient tirés du latin *livere* (qui signifie « pour être livide ou bleuâtre ») qui en latin médiéval a donné le terme *lavindula*. La relation entre la lavande et le lavage qui n'est clairement explicité qu'en 1586 serait alors suppositions [21]

1.1.3 Systematique

Les espèces du genre *Lavandula* appartiennent à la famille des Lamiaceae et à la sous-famille des Nepetoideae du fait du caractère hexaperturé des grains de pollen. Cette sous-famille est divisée en 3 tribus, dont celle des Ocimeae dans laquelle sont placées les lavandes. Le genre *Lavandula* a été rattaché à cette tribu suite à une étude phylogénétique sur le polymorphisme de séquences d'ADN chloroplastique [22].

L'histoire taxonomique du genre *Lavandula* a été particulièrement bien décrite dans « The genus *Lavandula* » [10]. Brièvement, dès la renaissance déjà 5 espèces de lavande étaient reconnues. Le nombre d'espèces décrites n'a cessé d'augmenter au fil des explorations botaniques dans le Maghreb et l'Asie. Ces études ont conduit à reconnaître actuellement 39 espèces différentes réparties en trois sous-genres *Fabricia*, *Sabaudia* et *Lavandula* et huit sections.

L'espèce *L. stoechas* comporte des noms vernaculaires partout dans le monde et qui sont les suivants :

- En français : Lavande à toupet, lavande stéchade, lavande papillon, lavande des maures, Lavande maritime, Lavande des îles d'Hyères, stéchas d'Arabie, Lavande française, Lavande italienne, Lavande espagnole.
- En arabe : El-kehila, El halhal, el khouzzama.
- En anglais : French lavender.
- En berbère : amezir

Récemment, la classification du genre *Lavandula* a été réexaminée [10], ainsi la classification de *Lavandula stoechas* est la suivante :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Gamopétales

Famille : Lamiaceae

Sous-famille : Nepetoideae

Genre : *Lavandula*

Section : *Stoechas*

Espèce : *Lavandula stoechas* L.

1.1.4 Distribution géographique

La répartition géographique du genre est limitée aux régions tempérées et tropicales du monde (Figure 1.2). La plupart des espèces de lavande sont indigènes aux pays du bassin méditerranéen. Elle pousse spontanément en Algérie [11, 23, 24, 17].

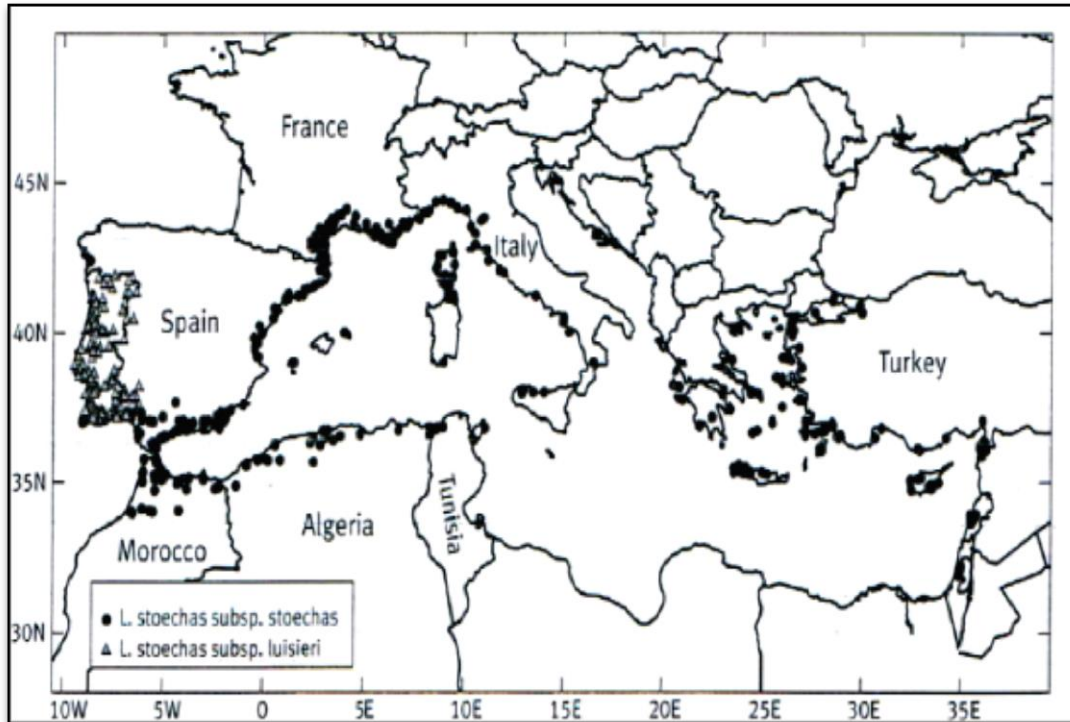


Figure 1.2 : Distribution géographique de *L. stoechas* dans le monde [10]

Des espèces de lavande autochtones ont également été observées dans le nord de l'Afrique, le sud-ouest de l'Asie, la Micronésie, la péninsule arabique, la Bulgarie et la Russie. Aujourd'hui, la lavande est cultivée dans le monde où les conditions climatiques sont favorables pour son développement. Les zones de cultures commerciales majeures sont situées en France, Portugal, Bulgarie, Russie, Italie, Espagne, Angleterre, la Nouvelle-Zélande, Australie et en Amérique du Nord. La lavande est cultivée comme une culture de rente dans l'État de Washington, Nouveau-Mexique et au Texas [25, 19, 26, 27].

1.1.5 Composition chimique de *Lavandula stoechas*

Toutes les espèces du genre *Lavandula* sont des plantes très aromatiques qui produisent des mélanges complexes d'HE. Ces HEs sont produites et stockées dans des glandes sur la surface des fleurs et des feuilles [11]. Les HEs de cette espèce sont parmi les 20 HEs les plus importées par les États-Unis depuis 1985 [28, 29]. Il n'est donc pas surprenant que les connaissances phytochimiques sur les lavandes soient centrées sur leurs HEs.

La composition chimique de l'HE de la lavande dépend du processus d'extraction, de la culture, des conditions de croissance et de la saison de la récolte

[30]. Les chimistes ont pu isoler 200 composants de la lavande qui sont répertoriés dans la famille de monoterpène suivante [31, 32] :

- La moitié des composants chimiques sont des esters (acétate de linalyle, acétate de lavandulyle, acétate de géranyle, acétate de terpényle et acétate d'hexényle).
- On trouve les terpènes suivants en petites quantités (pinène, mycène, carène, limonène, bêta — ocymène).
- Des alcools terpéniques (linalol, alphaterpinéol, géraniol, terpinol-1-ol-4).
- Des aldéhydes (benzaldéhyde, hexanal, citral, aldéhyde de cumin).
- Des cétones (hepténon de méthyle, camphre).

Les constituants chimiques potentiellement actifs de *L. stoechas* sont : alpha-pinène, bêta-pinène, bêta-santalène, bornéol, camphre, caryophyllène, géraniol, limonène, linalol, luteoline, 1,8 — cineole, acide rosmarinique et acide ursolique [33, 34,35]. Les études sur la composition chimique des HEs de *Lavandula stoechas* montrent qu'elles sont plus riches en monoterpènes qu'en sesquiterpènes. Ainsi, ces deux groupes de molécules constituent la majeure partie des HEs de cette espèce [10, 11].

1.1.6 Domaine d'utilisation et vertus thérapeutiques de *Lavandula stoechas*

L'utilisation des plantes pour guérir les maladies « phytothérapie » a été connue depuis l'antiquité. Le recours à la thérapeutique des plantes est aussi vieux que l'humanité : la Mésopotamie, l'Égypte ancienne, les Hébreux, la Chine, l'Inde et l'Amérique du Sud, se sont transmis ce savoir [36].

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 [37].

Lavandula stoechas étaient la première lavande à être utilisée en parfumerie. Actuellement, son utilisation en cosmétologie est abandonnée à cause de : son odeur fortement camphrée et de la concurrence importante des autres lavandes dont l'odeur est plus agréable [38].

Les feuilles et les fleurs de la lavande s'utilisent sèches ou fraîches. Ses nombreux composants ainsi que sa teneur en HE lui confèrent une grande polyvalence en phytothérapie. *Lavandula stoechas* est utilisée en phytothérapie pour traiter certains troubles [39, 40, 41, 42, 43, 44, 45] :

- Elle soulage les migraines et diminue les vertiges. Elle possède une action calmante, antispasmodique, anti-inflammatoire, antimicrobienne, diurétique, hypotensive et analgésique. Elle peut combattre le stress et les états dépressifs et facilite les digestions lentes. Certains médecins la prescrivent pour lutter contre les infections pulmonaires.
- Elle renferme des propriétés antiseptiques, bactéricides, cicatrisantes, insecticides et antiparasitaires. La plante est également utilisée dans la médecine populaire comme antispasmodique.
- L'HE de *L. stoechas* et l'infusion des feuilles sont utilisées par des thérapeutes traditionnels comme spasmolytiques, contre le diabète, les douleurs menstruelles féminines, les calculs rénaux. Cette espèce de lavande a aussi des effets positifs sur les infections urinaires, les maladies cardiaques, l'eczéma et les différentes maladies du système nerveux central.
- La matière végétale brute est également utilisée comme insectifuge. Elle peut combattre l'asthme, la sinusite et l'otite. Elle atténue les douleurs des entorses, des muscles et du rhumatisme.
- Les bains de bouche à base de lavande purifient l'haleine.
- Les chasseurs peuvent sauver leurs chiens piqués par une vipère en frottant immédiatement la piqûre avec des fleurs de lavande fraîches froissées.

1.1.7 Contre-indication et effets indésirables de *Lavandula*

L'huile essentielle de lavande ne présente pas de risque particulier ; comme la plupart des HEs, elle présente peu de contre-indication, mais il ne faut pas l'utiliser pure. En effet, elle doit être diluée dans de l'huile végétale, car elle est irritante et allergène [46].

Chez la femme enceinte et allaitante, les enfants de bas âge, les sujets épileptiques et les sujets atteints de sclérose multiple, son utilisation est à éviter. Il est à noter qu'elle est neurotoxique à cause de la forte présence de cétone et elle a tendance à lyser les gaines de myéline des axones et dendrites neuronaux [47, 48].

1.2 Huiles essentielles et métabolites secondaires des plantes médicinales

1.2.1 Les plantes médicinales

Selon Bonnafous, 2013 Elles ont été ainsi définies : « une plante présentant des propriétés médicamenteuses, sans avoir, ni ne pouvant avoir aucune utilisation alimentaire, condimentaire et hygiénique », mais la plupart des végétaux n'entrent pas dans cette définition [49].

Une plante médicinale est un végétal, dont un ou plusieurs organes sont doués d'un effet thérapeutique sur l'organisme sans être toxique à des doses recommandées par la pharmacopée européenne [50, 51].

Ces végétaux poussent dans le monde entier et certains d'entre eux interviennent dans la préparation des médicaments, car ils contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie. Ces dernières années, le traitement à base de plante revient au premier plan ; ceci est dû au fait que les bactéries se sont peu à peu adaptés aux médicaments et ont acquis une résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques [52].

Les plantes médicinales fabriquent des hydrates de carbone et émettent l'oxygène par la photosynthèse, créant au fil de ce processus des voies métaboliques fournissant les substances nécessaires à la production d'une pléthore de composants. Au niveau des plantes médicinales et à ce jour, il existe plus de 10 000 métabolites secondaires, cela inclut les minéraux, les vitamines, les oligoéléments et un large assortissement de substance. Ces substances sont appelées principes actifs, car ils exercent bien souvent une action thérapeutique spécifique dans le corps [53, 54].

1.2.2 La phytothérapie

Du grec PHUTON et THERAPEUIEN est l'art de soigner par les plantes médicinales [55]. C'est une discipline allopathique qui utilise les plantes médicinales à des fins thérapeutiques. Elle est destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques [56]. La

phytothérapie utilise les plantes sous forme de préparations dites galéniques [50, 57].

1.2.3 L'aromathérapie

Vient du grec aroma = odeur, therapia = soin, elle est considérée comme une médecine complémentaire ou alternative. Étymologiquement, c'est l'utilisation à but de traitement médical (curatif ou préventif) des extraits de plantes aromatiques [58].

L'aromathérapie est une discipline qui utilise des huiles essentielles naturelles. Les essences et les hydrolats aromatiques présentent des effets thérapeutiques aussi bien sur les conditions physiologiques que psychologiques à des concentrations infinitésimales [49].

1.2.4 Les huiles essentielles

1.2.4.1 Définition

Les huiles essentielles (HEs) sont des extraits purs, naturels et totaux, de composition assez complexe. Elles renferment des principes volatiles contenus dans les différentes parties sécrétrices de la plante. Les huiles essentielles résultent de la distillation par entraînement à la vapeur d'eau de la partie odoriférante des plantes aromatiques. Les produits obtenus par extraction avec d'autres procédés ne sont pas repris dans la définition des huiles essentielles donnée par l'AFNOR. Ce sont des composés hydrophobes, miscibles uniquement dans l'alcool [58, 59, 60].

Les HEs ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec les pressoirs. Il s'agit de la sécrétion naturelle, élaborée par le végétal et contenue dans les cellules de la plante soit dans : les fruits, les fleurs, les sommités fleuries, les feuilles, l'écorce, les racines et les graines. Les HEs sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante [61].

1.2.4.2 Rôle physiologique des huiles essentielles

Il existe beaucoup de plantes qui produisent des HEs en tant que métabolites secondaires, mais le rôle exact dans le processus de la vie de la plante reste inexpliqué [62]. Toutefois, les HEs émises jouent un rôle attractif sur les insectes pollinisateurs. Elles ont un effet anti-appétent, affectant ainsi la croissance, la mue, la fécondité et le développement des insectes et des acariens [63]. Elles pourraient

servir aussi d'agent de dissuasion vis-à-vis les herbivores et d'agent défensif contre les microorganismes [64].

Le rôle physiologique des HEs est aujourd'hui démontré et n'est plus remis en question. Les HEs ont des propriétés médicinales nombreuses et variées. Chaque HE ne possède pas qu'une action unique, mais peut avoir de multiples propriétés : antiseptique, diurétique, tonique, antispasmodique, antirhumatismal, antitussive et autre et ceci du fait de ses éléments chimiques variés [65].

Les activités de l'HE dépendent donc de sa composition chimique et c'est d'ailleurs ce qui la distingue d'un médicament « classique », lequel se résume souvent qu'à une molécule pour traiter une pathologie [66]. Les molécules aromatiques agissent à différents niveaux et de manières directes ou indirectes. Le composé principal de l'HE agit sur un trouble, mais les éléments secondaires interviennent en synergie ou simplement sur l'état de santé général du patient tel que le stress, la fatigue [66].

1.2.4.3 Localisation et lieu de synthèse des huiles essentielles

La synthèse et l'accumulation des HEs dans les plantes aromatiques sont associées à la présence de structures histologiques spécialisées (Figure 1.3). Ces dernières sont généralement localisées à proximité de la surface de la plante (sous l'épiderme). Ces structures glandulaires sont des cellules sécrétrices [49, 58, 67].

Les poils glandulaires épidermiques produisent les essences dites superficielles rencontrées souvent chez les Lamiacées : *Lavandula*.

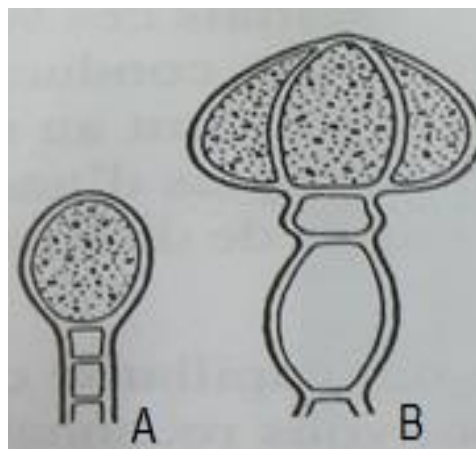


Figure 1.3 : Cellules sécrétrices [68].

A : tête sécrétrice unicellulaire, B : tête sécrétrice pluricellulaire

1.2.4.4 Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont généralement obtenues par hydrodistillation c'est-à-dire par entraînement à la vapeur d'eau dont le but est d'extraire les substances volatiles présentes dans les cellules des végétaux.

Hydrodistillation : c'est la méthode la plus ancienne et la plus utilisée. Dans ce processus, la matière végétale est immergée dans un bain d'eau, puis l'ensemble est porté à ébullition sous pression atmosphérique. La montée de la chaleur permet l'éclatement des molécules odorantes contenant dans les cellules végétales. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées avant d'être séparées en une phase aqueuse et une phase organique (HE) dans l'essencier et ceci selon leurs différences de densité [49].

1.2.4.5 Propriétés des huiles essentielles

➤ Propriétés physiques

Les propriétés physiques des HEs sont définies comme suit [69, 70]:

À température ambiante, les HEs sont liquides, rarement visqueuses ou cristallisées. À plus faible température, dix degrés (10 °C) certaines HEs cristallisent sans aucune altération chimique et indiquent une très bonne qualité du produit.

Elles sont volatiles ce qui explique leur caractère odorant et permet leur entraînement à la vapeur d'eau.

Les HEs sont plus légères que l'eau et non miscibles, ceci permet leur séparation dans l'essencier de manière naturelle. Par contre les HEs sont solubles dans les huiles végétales, dans les alcools et les solvants organiques. Elles sont actives sur la lumière polarisée et ont souvent un indice de réfraction élevé.

Elles sont colorées et tout le spectre de l'arc-en-ciel est représenté : le bleu foncé de la Tanaisie et de la Matricaire, le rouge de la Sarriette, le rose de la Gaulthérie, le vert émeraude de l'inule et le vert pâle de la bergamote, le jaune pâle de la Sauge sclarée et le jaune imperceptible pour la plupart des autres HEs (Lavande).

Elles sont dotées d'un pouvoir rotatoire, soit la faculté de dévier la lumière polarisée qui les traverse à droite (dextrogyre) ou à gauche (lévogyre).

Elles sont inflammables et nécessitent de connaître leur point éclair pour leur stockage et leur transport.

➤ Notions de chémotypes — chimiotype

Le chémotype est défini comme étant la carte d'identité d'une espèce végétale. Ces identités chimiques des HEs peuvent varier au sein d'une même espèce.

Les chémotypes sont liés à la notion du terroir et qui sont déterminés par le pourcentage d'ensoleillement et de précipitation, la nature du climat, la constitution du sol et le lieu de croissance (altitude, latitude). La notion de chémotype, conduite à admettre l'existence des races chimiques [49, 67].

➤ Profils chromatographiques et techniques d'analyse

Lorsque les HEs sont extraites, il est impératif de vérifier leurs profils chromatographiques. Ce dernier correspond à la liste des constituants sélectionnés parmi ceux qui sont représentatifs et caractéristiques d'une HE. Il est accompagné, pour chacun d'eux, des limites de concentration et éventuellement des rapports entre concentrations [71].

➤ Mode d'action

Les HEs sont des molécules actives de par leur site fonctionnel, leur configuration spatiale et leur environnement électrique. Cependant, on constate que la biochimie seule n'explique pas la totalité des activités biologiques. On distingue une triple réalité qui permet aux HEs d'agir en synergie [58] :

- Une réalité matérielle : c'est un concentré solaire fait de molécules actives. Cette action intervient pour suppléer à une diminution possible de l'activité photosynthétique en fournissant de l'énergie.

- Une activité énergétique : les HEs ont la capacité de transmettre des charges électroniques, cette action se fait par : apport d'électron (négativation), capture d'électron (positivation) et apport de protons (acidification).

- Une activité informationnelle : ceci représente une énergie circulante importante, les arômes sont des vecteurs d'information répulsive (olfactive) ou attractive.

➤ Pharmacocinétique

Les HEs diffusent rapidement dans tout l'organisme, quelles que soient les voies d'administrations. *In vivo*, les HEs ont un effet à des concentrations très faibles [59, 45].

La métabolisation des constituants des HEs est très rapide et semble se réaliser de manière très importante au niveau du foie. Elle implique des réactions de conjugaison et d'hydroxylation. L'élimination des métabolites formés est essentiellement urinaire.

➤ Toxicité

Tout produit renferme de nombreux principes actifs présents un risque de toxicité. La toxicité des HEs dépend de plusieurs facteurs : la composition biochimique, le taux de molécule toxique qui les renferment, le dosage, la manière de l'application des HEs et la durée de manifestation qui suit l'utilisation en l'occurrence la toxicité aiguë se manifeste dans les minutes par contre, la toxicité chronique se manifeste par des effets mutagène et cancérigène [72, 73, 59].

La toxicité sur un plan général peut se manifester de différentes manières :

- Toxicité selon la composition : Certaines HEs sont classées selon la composition et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent ; dans ce contexte on peut citer : la neurotoxicité (famille des cétones et lactones), l'hépatotoxicité (phénols), la néphrotoxicité (monoterpènes), hormone-like [67].

- La toxicité par ingestion : Les HEs d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible avec des doses létales (DL_{50}) généralement supérieures à 5 g/kg à l'exception de la sarriette et l'origan. De nos jours, de nombreux travaux concernant la DL_{50} mettent en évidence la grande différence existante entre les DL_{50} des souris et des humains. L'exemple spectaculaire et celui d'*Eucalyptus* dont la DL_{50} chez les souris est de 2,5 g/kg de poids de souris par contre la DL_{50} chez l'homme se situe

entre 0,4 et 0,8 g/kg. Ceci montre la nécessité d'abandonner le modèle expérimental animal pour des raisons de sécurité [35, 67].

➤ Les domaines d'application des huiles essentielles

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples en alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale. La recherche trouve chez les plantes de nouvelles molécules actives ou des matières premières pour la semi-synthèse [74].

1.2.5 Les métabolites secondaires des plantes médicinales

1.2.5.1 Les phénols

Ils forment une grande famille de composés chimiques très divers depuis les simples acides phénoliques jusqu'aux grands polymères complexes qui sont : les tanins [64].

Il existe une très grande variété de phénols, tels que l'acide salicylique, molécule qui donne par synthèse de l'aspirine et d'autres composées sont aussi à citer (les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides). Les plantes produisant les phénols pour se prémunir contre les infections et les insectes phytophages [75].

✓ Les coumarines

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales. Elles possèdent des propriétés très diverses. Certaines coumarines contribuent à fluidifier le sang, alors que d'autres soignent les affections cutanées [75, 54].

✓ Les flavonoïdes

Ce sont généralement des composés polyphénoliques très répandus chez les végétaux. Les flavonoïdes sont responsables en particulier de la pigmentation des fleurs (violet et jaune), des fruits et de certaines feuilles. Ils assurent aussi la protection des tissus superficiels contre les effets nocifs des rayonnements ultraviolets. Ils sont abondants chez les plantes supérieures et sont présents dans tous

les organes aériens et surtout les organes jeunes [76]. Ils ont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales. Leurs actions antioxydantes a un effet bénéfique sur la circulation sanguine. Certains flavonoïdes sont anti-inflammatoires, antiviraux, hépato-protecteur et anti tumoraux [54].

✓ Les anthocyanes

Ce sont des composés hydrosolubles. Ils sont issus de l'hydrolyse des anthocyanidines. Ils donnent aux fleurs et aux fruits la teinte bleue, rouge ou pourpre. Ils se trouvent principalement dans le suc vacuolaire, mais dans la nature ils sont présents uniquement sous forme d'hétérosides appelés anthocyanosides. [76]. Ce sont de puissants antioxydants puisqu'ils nettoient l'organisme des radicaux libres, notamment dans la région du cœur, des mains et des yeux [77].

1.2.5.2 Les alcaloïdes

Ils forment un groupe chimiquement hétérogène et très large. Les alcaloïdes possèdent une molécule d'azote (— N) qui les rend pharmacologiquement très actifs [53].

La plupart des alcaloïdes sont toxiques à forte dose, par contre, à faible dose, ils peuvent avoir une valeur thérapeutique. Les alcaloïdes ont été utilisés comme médicaments, relaxants musculaires, analgésiques, tranquillisants et psychotropes [64].

1.2.5.3 Les tanins

Ce sont des substances amères que renferment certains végétaux [75]. Ce sont des composés phénoliques solubles dans l'eau. Selon la nature des assemblages moléculaires, les tanins sont classés en 2 groupes, en l'occurrence, les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Les premiers protègent la peau et les muqueuses de l'irritation, diminuent le gonflement et l'inflammation. Or que, les tanins condensés sont connus pour leurs propriétés antioxydantes [54].

1.2.5.4 Les terpènes

Ils sont très répandus dans les HEs. Ils sont connus pour leurs nombreuses propriétés thérapeutiques. Les terpènes sont généralement des molécules odorantes qui présentent un caractère volatil. Les terpènes sont des molécules composées

uniquement de carbones et d'hydrogènes. Ils sont élaborés par de nombreuses plantes et en particulier par les conifères. On distingue en fonction du nombre d'atomes de carbone qu'elles possèdent, les monoterpènes, les diterpènes, les triterpènes et les sesquiterpènes [78].

1.2.5.5 Les saponines

Ce sont des substances tensioactives faisant mousser l'eau. Elles sont douées de propriétés hémolytiques marquées et précipitent le cholestérol [79]. Les plantes contenant les saponines ont un goût amer. Elles peuvent réduire la paroi des globules rouges et favorisent l'absorption du calcium et du silicium [75]. Les saponines irritent les muqueuses, produisent un relâchement intestinal et accroissent les sécrétions bronchiques. Elles sont utilisées comme diurétiques et désinfectant des voies urinaires [75].

1.2.5.6 Les anthraquinones

Ils constituent un groupe important de composés bioactifs. Ils sont souvent rouges ou pourpres, plutôt que jaune. La classe des anthraquinones montre de nombreux effets thérapeutiques. Elles renferment d'importants composés laxatifs. Ces derniers inhibent l'acheminement des ions dans les cellules du côlon [80]. Les anthraquinones présentent d'autres effets biologiques comme la diurèse, la vasorelaxation ainsi que des propriétés antioxydantes, antibactériennes et antifongiques [81].

1.3 Activités biologiques des huiles essentielles

1.3.1 Activité antimicrobienne

1.3.1.1 Généralités

Dans son environnement, l'homme est entouré d'un grand nombre de microorganismes. Ces derniers colonisent la peau, les muqueuses, le tube digestif, le système respiratoire, l'appareil urinaire et la nourriture. Ces microorganismes sont représentés par des bactéries, des levures, des champignons, des parasites et des virus. Ils peuvent être saprophytes ou pathogènes et conduire à une infection chez l'hôte [82].

La plupart des bactéries ont un pouvoir pathogène naturel, certaines souches sont résistantes naturellement à certains antibiotiques. D'un autre côté, ils peuvent être la cause de nombreuses maladies végétales et animales et des contaminations alimentaires. Les microbes sont largement utilisés pour étudier les processus cellulaires [83]

Les champignons (Fungi ou mycètes) constituent un groupe d'organismes hétérotrophes ubiquistes [84]. Ils sont caractérisés par un mycélium, formé de filaments nommés hyphes. Ils tirent leur nourriture soit de la matière organique morte, ce sont alors des champignons saprophytes. Ils peuvent aussi s'approvisionner à partir de tissus végétaux vivants, ce sont des parasites [85].

Les levures sont des champignons unicellulaires ubiquistes pour tout ou une partie de leur cycle végétatif. Elles forment un groupe très hétérogène. Elles peuvent coloniser l'air, le sol, l'eau et les végétaux. Les levures des produits alimentaires ne sont pas pathogènes et ne causent pas d'intoxication alimentaire, mais peuvent produire par leur développement des altérations de la qualité marchande de ces aliments [86].

Certaines espèces microbiennes pathogènes sont de moins en moins sensibles aux antiseptiques et développent de multiples résistances. Par conséquent, la nécessité de trouver des solutions est à l'ordre du jour [87], [88].

Les antiseptiques agissent habituellement soit comme bactéricides (ils tuent les bactéries) soit comme bactériostatiques (ils inhibent la croissance bactérienne) [89]. Chaque antiseptique possède un spectre d'action ; il est d'autant plus large, ou étendu, que le nombre des espèces microbiennes sensibles est grand. Le spectre d'action varie d'un antibiotique à un autre [89].

1.3.1.2 Modes d'action des huiles essentielles

Le mécanisme d'action des HEs sur les microorganismes n'a pas été clairement élucidé. Il est probable que l'activité antibactérienne des HEs ne soit pas attribuable à un mécanisme spécifique, mais qu'il y ait plusieurs cibles dans la cellule [90].

Le mode d'action des HEs dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche lipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite des ions (K^+).

Certains composés phénoliques des HEs interfèrent avec les protéines de la membrane des microorganismes, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant de la phosphorylation de l'ADN. Les HEs peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN et de l'ARN des protéines et des polysaccharides. D'autres auteurs pensent que l'activité inhibitrice de ces composés serait due à leur affinité avec les groupements SH impliqués dans la division cellulaire [91, 92, 93,94].

1.3.2 Activité antioxydante

1.3.2.1 Stress oxydatif

Le stress oxydatif réfère à un déséquilibre entre la génération de radicaux libres et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs [95]. Il correspond aussi à une perturbation dans la balance métabolique du statut oxydatif intracellulaire [96]. Dans les systèmes vivants, une production physiologique de radicaux libres se fait de manière continue. Dans des conditions pathologiques ou provoquées par des facteurs exogènes, une surproduction de

ces réactifs est possible. Ce sont les antioxydants qui peuvent empêcher les dégâts cellulaires causés par les radicaux libres de l'oxygène [97].

1.3.2.2 Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules ayant la capacité de neutraliser des radicaux libres qui sont responsables de nombreuses maladies. Les antioxydants sont des composés qui inhibent ou retardent le processus d'oxydation en bloquant l'initiation ou la propagation des chaînes de réactions oxydatives [98].

Les antioxydants naturels ou de synthèses sont utilisés pour prévenir de nombreuses maladies (cardiovasculaires et neurodégénératives, inflammation et diabète) et le vieillissement, dus à la formation exagérée de radicaux libres. Les antioxydants sont également utilisés dans les aliments pour retarder la détérioration, le rancissement ou la décoloration qui est souvent dû à l'oxydation causée par la lumière, la chaleur et certains métaux [99].

Récemment, beaucoup d'études ont porté sur la toxicité élevée des antioxydants de synthèses utilisés dans l'industrie alimentaire tels que, le butylhydroxytoluène (BHT), l'hydroxyanisole butyle (BHA), le tert-butylhydroquinone (TBHQ) [100,101]. Le besoin de réduire l'utilisation des antioxydants de synthèses (maintenant limitée dans plusieurs pays en raison de leurs possibles effets indésirables sur la santé humaine) impose d'orienter le marché vers des antioxydants d'origine naturelle et stimule la recherche dans ce domaine [102]. Toutefois, les plantes représentent une source très importante et renouvelable d'antioxydants naturels [100, 101].

1.3.3 Activité anti-inflammatoire

L'inflammation ou la réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants et vascularisés à une agression dans le but de maintenir son intégrité.

C'est un ensemble de phénomènes réactionnels se produisant au point irrité par un agent pathogène. Les signes cliniques de ce processus sont : chaleur, rougeur, gonflement et douleur, de plus, une altération du fonctionnement de l'organe touché peut survenir [103].

La réaction inflammatoire est un processus habituellement bénéfique, mais parfois elle peut être néfaste à la suite de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, ou encore de régulations anormales du processus inflammatoire [104]. La réaction inflammatoire met en jeu de nombreux systèmes biologiques qui interviennent à des temps et des degrés variables : réactions biochimiques, activation cellulaires, coagulation et fibrinolyse et qui visent à détruire ou à éliminer la substance étrangère [105].

1.3.3.1 Les causes de l'inflammation

Les causes de l'inflammation sont nombreuses et variées. Elles peuvent avoir des origines diverses :

➤ Causes exogènes :

- Agents physiques : traumatisme, radiations, électricité, froid, chaleur, piquûre, coupure ;
- Agents chimiques : acide, base, substances minérales diverses ;
- Agents biologiques : microorganismes pathogènes (virus, bactérie, parasite, champignon) et d'autres agents comme le vin, le pollen et les toxines. [105, 106].

➤ Causes endogènes :

- Causes trophiques : elles sont en rapport avec un défaut de vascularisation,
- Conflits immunitaires : rencontrés dans les maladies inflammatoires chroniques [107].

L'inflammation est classée en deux catégories selon la durée et la cinétique du processus inflammatoire [108, 109, 110, 111] :

- Primaire (ou aiguë) quand elle est de cause immédiate et localisée ;
- Secondaire (ou chronique) lorsqu'elle est plus étendue comme c'est le cas de l'inflammation rhumatismale.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

Notre étude a porté sur une plante médicinale, *Lavandula stoechas*. L'étude expérimentale a duré 34 mois. Elle a été réalisée au niveau du :

- Laboratoire de recherche de biotechnologies, environnement et santé du département de biologie et physiologie cellulaire à l'université de Blida 1.
- Laboratoire d'hygiène et de référence de la Wilaya de Blida.
- Centre de recherche et de développement — Saïdal — El Harrache.
- Groupe antibiotical Saïdal — Médéa.
- Institut national de protection des végétaux - INPV-

2.1 Matériel

2.1.1 Matériel non biologique

Il est représenté par : la verrerie, l'appareillage, les milieux de culture et les réactifs (Appendice B).

2.1.2 Matériel biologique

✓ Matériel végétal

Lavandula stoechas est une plante aromatique, très utilisée en médecine traditionnelle et dans les industries pharmaceutiques [112].

La présente étude a été réalisée sur les fleurs de *L. stoechas* (Figure 2.1). Ces dernières ont été récoltées au cours des cinq (5) sorties durant la période de floraison entre mars et mai 2014,



Figure 2.1 : *Lavandula stoechas*

A/ vue générale de la partie aérienne, B/ fleurs (Originale 2015)

Le site de la cueillette se situe au niveau de la station de Beni Ali (36°27' 08,7''N 2°51' 47,4''E 800 mètres) dans la montagne de Chréa, wilaya de Blida en Algérie (figure 2.2). La récolte a été faite le matin au lever du soleil.



Figure 2.2 : Carte géographique du site de la récolte de *L. stoechas* (Google earth)

La plante a fait l'objet d'une identification à l'université Saad Dahleb de Blida-1 au niveau du laboratoire de Botanique du département d'Agronomie et à l'école National supérieure d'Agronomie (ENSA) d'El Harrach au niveau du département de Botanique.

Les fleurs ont été lavées puis séchées à l'abri de la lumière et à température ambiante (25 à 28 °C). Après séchage, le matériel végétal est conservé dans des sacs en toile. Le matériel végétal a fait l'objet d'une étude phytochimique et d'une hydrodistillation afin de récupérer l'huile essentielle en vue de sa caractérisation en

l'occurrence l'identification de ses métabolites secondaires et une évaluation de ses effets thérapeutiques.

✓ Matériel animal

Selon la disponibilité en animaux de laboratoire, nous avons été dans l'obligation de travailler sur 2 souches de souris différentes à savoir : les NMRI et les BALB/c.

Les animaux de laboratoire utilisés dans les essais de la toxicité aiguë et subaiguë ainsi que pour l'étude de l'activité anti-inflammatoire sont des souris, avec l'identification suivante (Tableau 2.1) :

Tableau 2.1 : Caractéristiques des souches de souris utilisées

Souches	<i>Mus musculus</i> , variété Albinos — NMRI.	BALB/C
Poids	18 à 23 g	
Sexe	Mâles et femelles	
Nourriture	Granules d'origine ONAB	
Boisson	Eau du robinet	
Activités testées	Activité anti-inflammatoire	Toxicité aiguë — toxicité subaiguë

Les essais ont eu lieu dans une animalerie conventionnelle, on respectant les conditions normales, la température du local était de 22 °C (± 3) et l'humidité relative était comprise entre 40 et 60 %. Un éclairage artificiel est utilisé et la séquence doit être de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité.

Tous les animaux reçoivent de l'eau et de la nourriture « ad-libitum ». La nourriture est composée d'un concentré équilibré en protéines, glucides, lipides, vitamines et sels minéraux.

2.2 Méthodes

2.2.1 Étude ethnobotanique

Il s'agit d'un sondage effectué entre mars et mai 2014 au niveau des wilayas suivantes : Blida, Alger et Tipaza. L'étude a concerné un groupe de la population dont l'âge est supérieur à 18 ans. Les personnes interrogées sont au nombre de 105 réparties comme suit : 15 pour Alger, 13 pour Tipaza et 77 pour Blida

L'enquête ethnobotanique a été réalisée à l'aide d'une fiche remplie suite à une interrogation orale (Appendice C). Le questionnaire a été axé sur le nom local de la plante, la ou les parties de la plante utilisée, les indications thérapeutiques, les recettes, les modes d'administration et les effets secondaires.

Ce sondage est effectué dans le but de recueillir des informations sur la plante, mais aussi des informations sur les connaissances de l'utilisation en phytothérapie par le groupe interrogé.

2.2.2 Observation microscopique de la fleur de *L. stoechas*

Dans un premier temps, l'observation microscopique de la fleur fraîche a été effectuée sous loupe binoculaire au grossissement $G \times 2,5$ pour visualiser les différentes parties de la fleur et surtout localiser les sites sécréteurs.

L'observation microscopique des sites sécréteurs a été réalisée sous microscopie électronique à balayage (MEB : Quanta 650), la poudre de fleur de *L. stoechas* a été insérée sur un talon en aluminium surmonté de carbone afin de fixer l'échantillon. La méthode suivie est : low vacuum (vide bas) en utilisant une tension d'accélération de 10 kV et une pression de 130 Pa.

2.2.3 Détermination de la teneur en eau et en matière minérale

2.2.3.1 Teneur en eau

Nous avons placé des échantillons de fleurs fraîches de poids déterminé dans une étuve portée à 75 °C. Les échantillons ont été pesés chaque 24 heures, pendant une semaine, jusqu'à l'obtention d'un poids constant [113].

La teneur en eau a été calculée selon la formule suivante [113] :

$$\text{Teneur en eau \%} = \frac{\text{Poids frais} - \text{Poids sec}}{\text{Poids frais}} \times 100$$

2.2.3.2 Teneur en matière minérale «cendres»

✓ Principe

Le taux de cendres de matériel végétal est le résidu minéral après calcination complète de la matière organique dans des conditions bien déterminées. L'incinération permet d'éliminer la matière organique et l'obtention de cendre blanchâtre [114].

✓ Protocole expérimental

La technique suivie est celle de la pharmacopée européenne 8.0 (2014).

- Les creusets de silice ou de platine sont préalablement portés au rouge pendant 30 minutes. Ils sont refroidis dans un dessiccateur, puis pesés,
- Introduire dans le creuset une prise d'essai de 1 g des fleurs finement broyées,
- Mettez les creusets dans le four à moufle, à une température de 600 ± 25 °C pendant 4 à 6 heures,
- Les déposer à refroidir dans un dessiccateur avant leur pesée.

La teneur en cendre totale est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en cendre \%} = \frac{\text{Masse cendres (g)}}{\text{Masse de la prise d'essai (g)}} \times 100$$

Masse de cendre = masse totale après calcination — tare.

Masse de poudre de la plante essai = masse totale avant calcination — tare.

L'analyse des minéraux se fait par la chromatographie ionique. Le protocole utilisé est celui du centre de criminologie de Bouchaoui – Unité incendie — :

2.2.4 Chromatographie ionique

✓ Principe

Cette technique de chromatographie est orientée vers la séparation des ions et des composés polaires. Elle permet de doser les anions et les cations en une vingtaine de minutes et à des concentrations de l'ordre du mg/l. Pour cela, nous avons utilisé des colonnes contenant des phases stationnaires comportant des sites ioniques. Ces derniers permettent de créer des interactions dipolaires avec les

analytes à séparer. La phase mobile est une solution tampon aqueuse. La phase stationnaire est la plus courante, elle est constituée de polystyrène sous forme de sphères de quelques micromètres de diamètre. Ces sphères ont été chimiquement transformées en surface pour faire apparaître des sites ioniques. Ces derniers permettent l'échange de leurs ions mobiles avec des ions de même signe, présents dans la phase mobile [115].

✓ Mode opératoire

Le protocole suivi est expliqué ci-dessus :

- Dans un litre d'eau, on dilue 1 ml de la solution de cendre,
- À partir de cette solution, 20µl sont injectés dans l'appareil de la chromatographie ionique de type ICS 3000.

Les conditions opératoires sont détaillées dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Les conditions de l'analyse par chromatographie ionique

	Anions	Cations
Eluant	NaOH 30 mm	H2SO4 11 mm
Débit	1,5 ml/min	1 ml/min
Température	30 °C	Ambiante
Colonne	Ion Pac ASM-HC4 x 250 mm	Ion Pac CS 12A 4 x 250 mm
Détecteur	CD25	CD25
Suppresseur	ASRS ultra II 4 mm	CSRS ultra II 4 mm

2.2.5 Caractérisation de certains métabolites secondaires de *L. stoechas*

2.2.5.1 Le screening phytochimique

C'est l'ensemble des méthodes et des techniques qui permettent de mettre en évidence les substances organiques naturelles présentes dans la plante.

Infusé : 10 g de poudre de plante sont infusés dans 100 ml d'eau bouillante pendant 15 minutes, filtrer et ajuster à 100 ml avec de l'eau chaude, le filtrat est soumis à des tests par la suite.

Décocté à 2 % : 2 g de poudre de fleurs de *L. stoechas* sont bouillis pendant 30 minutes dans 100 ml d'eau.

Décocté à 5 % : 1 g de poudre de fleurs de *L. stoechas* est bouilli dans 20 ml d'eau pendant 15 minutes.

✓ Les saponosides

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse (IM) ainsi que par le degré de dilution d'un décocté aqueux des fleurs [116].

Les saponines ont été mises en évidence selon le protocole suivant [117] :

- Préparer un décocté à 2 %,
- Maintenir à ébullition pendant 15 minutes, filtrer et après refroidissement ajuster à 100 ml,
- Dans une série de 10 tubes à essai, introduire successivement 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 ml de décocté et ajuster le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée,
- Agiter chaque tube pendant 15 secondes,
- Laisser reposer 15 minutes, puis mesurer la hauteur de la mousse.

L'indice de mousse (IM) est calculé à partir du numéro de tube (n) dans lequel la hauteur de la mousse est supérieure ou égale à 1 cm, selon la formule suivante [118] :

$$IM = \frac{1000}{n}$$

✓ Les dérivés anthracéniques

Ils mettent en évidence les dérivés anthracéniques libres et les dérivés anthracéniques combinés à partir de l'extrait chloroformique et de l'hydrolysate, leur mise en évidence est illustrée dans le tableau 2.3 [119, 118] :

Extrait chloroformique : À 1 g de fleurs sèches de *L. stoechas*, on ajoute 10 ml de CHCl_3 et on chauffe au BM pendant 3 minutes. Filtrer à chaud et compléter à 10 ml avec l'eau distillée.

Hydrolysate : À une partie du résidu de poudre épuisé par le chloroforme, ajouter 10 ml d'eau distillée, plus 5 ml d'HCl concentré puis maintenir le tube à essai dans un BM bouillant pendant 15 minutes. Laisser refroidir sous un courant d'eau et filtrer.

Tableau 2.3 : Protocole expérimental des dérivés anthracéniques

Molécules recherches	Résultats
✓ Anthracéniques libres (Réaction de Borntrager) Ajouter à 1 ml d'extrait chloroformique, 1 ml de solution NH_4OH dilué et agiter.	Coloration plus ou moins rouge.
✓ Anthracéniques combinés ➤ O-hétérosides - Ajouter à 5 ml d'hydrolysate 5 ml de CHCl_3 , - Agiter puis soutirer la phase organique, - Introduire dans un tube à essai et garder la phase aqueuse. - Ajouter 1 ml de NH_4OH dilué au demi et agiter.	Coloration plus ou moins rouge. - Si la coloration est négative ou faiblement positive, rechercher les O-hétérosides à génines réduites et les C-hétérosides.
➤ O-hétérosides à génines réduites - À 5 ml d'hydrolysate ajouter 3 à 4 gouttes de FeCl_3 à 10 %, - Chauffer 5 min au BM puis refroidir, - Agiter avec 5 ml de CHCl_3 , - Soutirer la phase chloroformique et l'introduire dans un tube à essai, - Ajouter 1 ml de NH_4OH dilué au demi et agiter.	Coloration plus intense.

<p>➤ C-hétérosides</p> <ul style="list-style-type: none"> - Reprendre la phase aqueuse qui a été conservée par 10 ml d'eau distillée, - Ajouter 1 ml de FeCl₃ à 10 %, - Maintenir le tube à l'ébullition pendant 30 minutes, puis refroidir sous un courant d'eau et agiter avec 5 ml de CHCl₃, - Soutirer la phase chloroformique dans un tube à essai et y ajouter 1 ml de NH₄OH dilué au demi et agiter. 	<p>Coloration rouge plus ou moins intense.</p>
--	--

✓ Les alcaloïdes

La présence des alcaloïdes peut se faire par la précipitation des sels et la révélation à l'aide du réactif de Mayer (solution de tétra-iodomercure de potassium) [118] :

- Faire macérer 10 g de fleurs de *L. stoechas* dans 50 ml d'H₂SO₄ à 10 % pendant 24h à température ambiante du laboratoire (25 ± 2 °C),
- Filtrer le macérât et laver à l'eau de manière à obtenir 50 ml,
- Prélever 1 ml et ajouter 5 gouttes de réactif de Mayer* et attendre 15 minutes.

* Réactif de Mayer : 5 g de KI et 1,358 g de HgCl₂ solubilisé dans 100 ml d'eau distillée.

La présence des alcaloïdes se traduit par l'apparition d'un précipité blanc - jaune ou jaune-clair.

✓ Les substances polyphénoliques

Elles permettent de mettre en évidence les flavonoïdes et les tanins par un infusé à 5 %. Filtrer sur papier filtre et rincer avec un peu d'eau chaude de manière à obtenir 100 ml de filtrat. Cet infusé permet de caractériser [119, 117,118] :

✓ Les flavonoïdes

Ce sont des pigments universels des végétaux responsables de la coloration des fruits, des fleurs et parfois des feuilles. Plusieurs tests de caractérisation permettent de mettre en évidence les différents types de flavonoïdes (Tableau 2.4).

Tableau 2.4 : Protocole expérimental de la mise en évidence des flavonoïdes

Protocole	Test positif	Molécules détectées
<ul style="list-style-type: none"> - À 5 ml de l'infusé, - Ajouter 15 ml de H₂SO₄ à 10 %, - Ajouter 5 ml de NH₄OH dilués au demi. 	La coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique.	Anthocyanes.
	Coloration moins intense.	Hétérosides flavoniques.
Réaction à la cyanidine :		
<ul style="list-style-type: none"> - Introduire dans un tube 5 ml de l'infusé, Ajouter 5 ml d'éthanol chlorhydrique*, - Ajouter 2 à 3 copeaux de Mg, - Ajouter 1 ml d'alcool isoamylique. 	Coloration rose-orangé.	Flavone.
	Coloration rose-violacée.	Flavonone.
	Coloration rouge	Flavonol, flavononol.
	Coloration rassemblée dans le surnageant d'alcool isoamylique.	Génine : flavonoïde libre.
<ul style="list-style-type: none"> - Même réaction que la précédente, mais sans ajout de copeaux de Mg + chauffage de 15 min au BM. 	Rouge cerise ou violacée.	Leucoanthocyane.
	Brun rouge.	Catéchol.

*Éthanol chlorhydrique = Éthanol à 95 ° + eau distillée + HCl concentré, à parties égales V/V/V = 5 ml.

✓ Les tanins

Prendre 5 ml de l'infusé à 5 %, ajouter 1 ml de FeCl_3 à 1 %. La présence d'une coloration verdâtre ou bleu noirâtre indique la présence de tanins.

La différenciation des tanins catéchiques — non hydrolysable — et des tanins galliques – hydrolysable — se fait par le biais d'une réaction dite : Réaction de Stiasny (Tableau 2.5) [120].

Tableau 2.5 : Protocole expérimental de la mise en évidence des tanins

Protocole	Coloration apparue	Molécules détectées
<ul style="list-style-type: none"> – À 5 ml de l'infusé à 5 %, Ajouter 15 ml de réactif de Stiasny*, – Chauffez-les au BM à 80 °C pendant 30 min. 	Précipité en gros flocons.	Tanin catéchique.
<ul style="list-style-type: none"> - Filtrer la solution précédente et saturer 10 ml de filtrat avec l'acétate de sodium, - Ajouter 1 ml d'une solution de FeCl_3 à 1 %. 	Apparition d'une teinte noir intense.	Tanin gallique.

* Réactif de Stiasny = 10 ml de formol à 40 % + 5 ml d'acide chlorhydrique concentré.

✓ Les stérols et triterpènes [119]

- Mettre dans un tube à essai 1 g de poudre et 20 ml d'éther, puis agiter,
- Laisser macérer 24 heures puis filtrer et compléter le volume à 20 ml par l'éther,

Réaction de Libermann — Buchard,

- Prélever 10 ml du filtrat que l'on évapore à sec,
- Dissoudre le résidu dans 1 ml de $C_4H_6O_3$,
- Ajouter 1 ml de $CHCl_3$,
- Répartir dans 02 tubes à essai : l'un servira de témoin et l'autre pour la caractérisation,
- Déposer 1 à 2 ml H_2SO_4 au fond du tube à l'aide d'une pipette sans agiter.

À la zone de contact des liquides, il y a formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet. Une coloration verte ou violette de la couche surnageante révèle la présence de stérols et de triterpènes.

✓ Les caroténoïdes

- Dans une capsule, faire évaporer à sec 5 ml de l'extrait étheré,
 - Ajouter 2 à 3 gouttes de solution saturée de $SbCl_3$ dans du chloroforme,
- Le résultat positif se traduit par une coloration bleue devenant rouge [119].

✓ Les composés réducteurs

- Mettre 5 ml de décocté à 10 % dans une capsule et évaporer à sec au BM,
- Ajouter au résidu sec 1 ml de réactif de Fehling (0,5 ml de réactif A + 0,5 ml de réactif B).

Après chauffage, la réaction positive se traduit par l'apparition d'un précipité rouge brique [119].

✓ Les quinones libres

- Dans un tube, mélanger 1 g de fleurs de *L. stoechas* avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole,
- Agiter et laisser macérer 24 h,
- Filtrer et concentrer à l'évaporateur rotatif,
- Ajouter quelques gouttes de NaOH 1/10.

La présence des quinones libres est confirmée par le virage au jaune, rouge ou violet de la phase aqueuse [121].

✓ Les iridoïdes

Mettre 5 ml de décocté à 5 % dans un tube à essai et ajouter 1 ml d'HCl, puis chauffer dans un BM. L'obtention d'un précipité noir confirme la présence des iridoïdes [119].

✓ Les coumarines

Placer 1 g de fleurs de *L. stoechas* dans un tube à essai, ajouter quelques gouttes d'eau. Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué à 50 % et sont portés à ébullition,

Toute fluorescence jaune témoigne la présence des coumarines après examen sous lampe UV [122].

✓ Le mucilage

Mettre 5 ml de décocté à 10 % dans un tube à essai et ajouter 5 ml d'alcool absolu, l'obtention d'un précipité floconneux par mélange indique la présence de mucilage [119].

2.2.6 Extraction des huiles essentielles

✓ Principe

L'hydrodistillation est la méthode préconisée par la Pharmacopée européenne pour extraire les HEs. L'hydrodistillation des fleurs sèches de *L. stoechas* a été réalisée à l'aide d'un dispositif Clevenger [123].

✓ Protocole expérimental

La procédure d'extraction se résume comme suit : porter à ébullition une quantité de 100 g de matériel végétal sèche pendant 4h avec 1 litre d'eau distillée dans un ballon de 2 litres. La vapeur condensée obtenue conduit à deux phases :

- Une phase organique (HE) qui est séparée de l'eau par simple décantation. La quantité d'HE obtenue est pesée pour le calcul du rendement.
- Une phase aqueuse (eau aromatique ou hydrolat) qui contient une quantité non négligeable d'essence sous forme solubilisée. La récupération de cette huile essentielle est réalisée à l'aide d'une ampoule à décanter. L'HE est conservée dans un flacon opaque à une température de +4 °C.

Selon l'AFNOR [60], le rendement de l'HE (R_{HE}) est défini comme étant le rapport entre la masse (en gramme) de l'HE obtenue (M_{HE}) et la masse (en gramme) de la matière végétale utilisée (M_{MV}). Le rendement en HE est calculé par la formule ci-dessous [124] :

$$R_{HE} = \frac{M_{HE}}{M_{MV}} \times 100$$

L'HE récoltée en mois de mars a servi pour les études toxicologiques et l'activité antimicrobienne, ainsi celle récoltée en mois d'avril a permis l'évaluation de l'effet antiinflammatoire. Pour l'activité antiradicalaire, nous avons utilisées l'HE du mois de mai.

2.2.7 Mesure des grandeurs physiques de l'HE de *L. stoechas*

✓ Mesure de la densité

La densité relative de l'HE est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20 °C et la masse d'un volume égal d'eau distillée.

✓ Indice de réfraction

L'indice de réfraction (N) de l'HE est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée.

Mode opératoire et calcul :

- Nettoyer soigneusement le prisme du réfractomètre,
- Régler le réfractomètre en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée qui doit être de 1,333 à une température de 20 ° C,

- Nettoyer soigneusement le prisme de réfractomètre une deuxième fois,
- Mettre 02 gouttes de l'HE sur la partie centrale du prisme,
- Tourner les vis de réglage jusqu'à l'obtention de deux plages égales, l'une sombre et l'autre claire.

L'indice de réfraction est donné par la formule suivante :

$$N = n + 0,00004 (t' + t)$$

n : la valeur obtenue de la lecture à la température (t') à laquelle a été effectuée la détermination.

t' : la température à laquelle a été effectuée la détermination.

t : la température de référence.

2.2.8 Analyse chromatographique de l'huile essentielle de *L. stoechas*

L'étude analytique de l'HE a été réalisée au laboratoire de Biotechnologies végétales appliquées aux plantes aromatiques et médicinales (LBVpam) de Saint-Étienne en France. La CG-SM a été effectuée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Agilent HP (modèle 6850) couplée à une masse détectrice sélective Agilent HP (modèle 5973) fonctionnant en mode ionisation électronique (EI).

✓ Principe

La soumission de l'HE *L. stoechas* à la CG-SM déclenche un processus à plusieurs étapes :

- Ionisation des molécules qui se volatilisent sous l'effet de la haute température,
- Accélération des ions formés qui se dirigent vers le dispositif de séparation,
- Traitement du signal de sortie de l'appareil conduisant au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports m/z.

La comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs « banques de données » de référence permet son identification [125].

✓ Protocole expérimental

- L'HE a été diluée dans l'hexane, ensuite 0,2µl d'échantillon ont été injectés suivant le mode sans division « splitless »,
- Le gaz vecteur est l'hélium (He) d'un débit de 1,3 ml/min,
- La colonne utilisée est une colonne capillaire de silice fondue de type DB-5MS de 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre intérieur et d'une épaisseur de la phase stationnaire égale à 0,25 mm,
- Les températures de l'injecteur et de la ligne de transfert est comprise entre 250 et 280 °C respectivement, la température du four est égale à 60 °C, avec une augmentation de 3 °C/min, à 245 °C (isotherme pendant 4 min),
- Le volume d'injection est égal à 2 µl (0,5 % dans une solution d'hexane) en mode sans division,
- Les conditions de l'unité de masse : température de la source d'ions : 230 °C, spectres de masse : enregistrés à une tension ionisante de 70 eV avec une gamme de masse de balayage de m/z 35 à 250.

L'identification des composants huileux a été confirmée sur la base de leur fragmentation spectrale de masse en utilisant la recherche de bibliothèque Wiley 257.L MS et en comparant leurs données spectrales de masse et indices de rétention (IR) avec des données correspondantes dans la littérature et si possible des standards. Les IR ont été calculés expérimentalement en utilisant des temps de rétention de séries homologues de n alcanes (C8-C21), injectés dans les mêmes conditions chromatographiques. La composition en pourcentage des composants a été calculée à partir de la surface du pic sans facteurs de correction.

2.2.9 Études des activités biologiques de l'huile essentielle de *L. stoechas*

2.2.9.1 Étude de la toxicité aiguë

✓ Principe

L'étude toxicologique est effectuée en testant une concentration maximale 2 g/kg de l'HE de *L. stoechas* (dose limite). Cette dernière peut engendrer une mortalité lors de l'administration par voie orale.

Les animaux de l'expérience sont des souris femelles de souche Balb/c de 8 à 15 semaines environ avec un poids moyen de $23 \pm 0,71$ g. Ces animaux ont subi 5 jours d'acclimatation avec accès libre à l'eau et à la nourriture.

✓ Protocole expérimental

L'expérimentation a été conduite suivant le protocole OCDE N° 423 de L'Organisation de Coopération et de Développement Économiques [126]. La dose limite testée est égale à 2 g/kg du poids corporel de la souris. L'HE a été diluée dans l'eau physiologique avec quelques goutte de tween 80.

Le protocole expérimental est le suivant :

- Au total, 10 souris femelles ont servi à l'expérience (05 pour le lot témoins et 05 pour le lot de l'HE de *L. stoechas*),
- Deux souris sont mises à jeun pendant la nuit précédant l'expérimentation. Les souris sont pesées ensuite l'HE est administrée à la première souris alors que l'autre souris ne reçoit que de l'eau physiologique avec quelques goutte de tween 80 (Lot témoin),
- Après 72 heures de la première administration et si aucune mortalité n'est enregistrée, les huit (8) souris restantes sont traitées par l'HE de *L. stoechas* et l'eau physiologique.
- L'observation a été faite pendant 2 heures avant de leur donner à manger. Le comportement général des souris est observé pendant une période de 14 jours. Les souris sont pesées chaque semaine.

2.2.9.2 Étude de la toxicité subaiguë

L'étude de la toxicité subaiguë a été évaluée selon la ligne directrice de l'OCDE 407 [127]. Ainsi, la détermination de la toxicité orale à des doses répétées a été effectuée après l'obtention des résultats sur la toxicité aiguë (test de la dose limite 2 g/kg du PC de la souris).

Dans cette étude, des souris ont été utilisés car il est scientifiquement documenté que les données de doses létales prélevées sur des souris pourraient être plus appropriées pour anticiper les effets toxiques chez l'homme [128].

✓ Principe

L'étude de la toxicité subaiguë permet :

- D'évaluer la toxicité d'une substance administrée à plusieurs reprises, cette toxicité résulte du produit lui-même et/ou de ses métabolites.
- De mettre en évidence des altérations fonctionnelles et/ou anatomopathologiques provoquées par l'administration répétée et établir leur apparition en fonction de la posologie.
- De définir les limites de l'innocuité expérimentale.
- D'apprécier le degré de réversibilité des effets toxiques.

✓ Protocole expérimental

Les doses utilisées sont inférieures à la DL50 et n'ont pas causé la mort des souris lors de l'étude de la toxicité aiguë. Pour ce faire, nous avons travaillé avec des doses correspondant au 1/4, 1/8 et 1/16 de la DL50, soit 500, 250 et 125 mg/kg pour l'huile essentielle de *L. stoechas*.

L'HE a été dissoute dans de l'eau physiologique avec quelques gouttes de tween 80. Ces concentrations ont été administrées pendant 28 jours par voie orale au volume de 1 ml/100 g de PC de la souris.

Quatre lots de souris ont été utilisés pour l'étude de la toxicité subaiguë, chaque lot comporte (05 mâles et 05 femelles). Les souris des lots témoins ont reçu de l'eau physiologique + quelques gouttes tween 80. Les 03 autres lots restants sont traités avec l'HE de à différentes concentrations.

Durant l'expérimentation, nous avons suivi :

- Le poids corporel des souris par des pesées hebdomadaires,
- La consommation de l'eau et de la nourriture journalière,
- Le comportement des souris a été noté.

Le gain de poids relatif (GPR) des souris a été calculé selon la formule suivante [129] :

$$\text{GPR} = \frac{\text{Poids des souris J0} - \text{Poids des souris J28}}{\text{Poids des souris J0}} \times 100$$

Afin d'évaluer l'impact de l'HE sur certains organes et sur le métabolisme des souris, des prélèvements sanguins par la technique rétro-orbitale ont été effectués

après 28 jours de traitement pour l'ensemble des lots de souris (détail en appendice D).

Les souris sont mises à jeun pendant la nuit précédente les prélèvements. Le sang est prélevé dans des tubes EDTA (pour les paramètres hématologiques) et dans des tubes héparinés (pour les paramètres biochimiques).

À partir de ces prélèvements, les paramètres suivants ont été déterminés :

✓ Bilan hématologique

Les échantillons de sang prélevés sur tube EDTA ont été immédiatement utilisés pour déterminer les formules numérations sanguines (FNS) : les taux de globules blancs, de globules rouges, de plaquettes, de la formule leucocytaire, d'hémoglobine et d'hématocrite. L'analyse hématologique a été réalisée à l'aide d'un système automatique hématologique (Sysmex KX-21N).

✓ Bilan biochimique

Les tubes héparinés contenant le sang sont centrifugés à 3000 rotations par minute (rpm) pendant 05 minutes. Le plasma préparé à partir de ces échantillons concerne : le Glucose, le bilan rénal : la Créatinine, l'Urée, l'albumine et les protéines totales ; le bilan hépatique : l'Alanine l'aminotransférase (ALAT), l'Aspartate aminotransférase (ASAT) et le bilan lipidique : le cholestérol et le triglycéride. Les paramètres ont été déterminés à l'aide d'un automate biochimique (Mindray BS-303, Allemagne) avec le kit biochimique Spinreact (Espagne).

À la fin de l'étude, toutes les souris qui ont survécu ont été sacrifiées par dislocation cervicale après anesthésie à l'éther diéthylique. Tous les organes sont pesés en l'occurrence, le cœur, les poumons, le foie, la rate, les reins sans surrénale, les testicules (pour les souris mâles) et les ovaires (pour les souris femelles). Ces derniers ont été rincés avec une solution salée à 0,9 %, séchés puis pesés.

✓ Examen anatomopathologique

Le foie et les reins sont prélevés pour réaliser des analyses histopathologiques. Ils sont déposés dans des cassettes d'inclusion puis conservés dans des boîtes contenant le formol à 10 % afin d'éviter leurs dessiccation. Chaque organe a fait l'objet d'une analyse macroscopique et microscopique. Ces

dernières ont permis de rechercher d'éventuelles conséquences lésionnelles suite au traitement administré. Toutes les lésions, telles que les inflammations, les nécroses et les tumeurs, qui sont visibles à l'œil nu, doivent être conservées. Une corrélation entre les observations macroscopiques et les résultats microscopiques doit être établie.

Pour réaliser cette étude, nous avons suivi les étapes décrites ci-dessous [130] :

- Fixation et rinçage : après avoir prélevé les organes, ces derniers sont fixés dans le formol à 10 % pendant 48 heures puis rincés à l'eau courante pendant 24 heures. Le but de cette étape est de figer le tissu dans l'état le plus proche de son état initial et de garder sa structure morphologique et son intégrité chimique,

- Déshydratation et éclaircissement : ils permettent d'éliminer l'eau à partir des tissus pour les imprégner à la paraffine. La déshydratation est réalisée dans trois bains d'alcool éthylique à concentration croissante :

- Un bain d'alcool 70 ° pendant 1 heure,
- Un bain d'alcool 95 ° pendant 1 heure,
- Un bain d'alcool 100 ° pendant 1 heure.

L'éclaircissement est effectué dans un bain de xylène pendant 1 heure. Cette étape permet d'éliminer l'alcool à partir des tissus,

- Imprégnation Dans une étuve réglée à 58 °C, les organes sont imprégnés dans deux bains successifs durant une heure chacun. Le premier bain est composé de 50 % de xylène et 50 % de paraffine et le second bain contient la paraffine pure,

- Inclusion et mise en bloc : elle est réalisée dans des cassettes en plastique selon les étapes suivantes :

- Ecoulement de la paraffine dans des moules métalliques,
- Inclusion et orientation des pièces dans la paraffine,
- Refroidissement des blocs de paraffine sur une plaque métallique réfrigérée environ 10 minutes.

- Confection des coupes : les blocs ainsi obtenus sont coupés à l'aide d'un microtome de type « Leica » avec une épaisseur de 3 µm,

- Collage des rubans et séchage : les rubans sont étalés dans un bain marie (37 °C) puis récupérés et collés sur des lames propres. Ces dernières sont séchées dans une étuve réglée à 25 °C pendant 24 heures,
- Déparaffinage et réhydratation : cette étape sert à retirer la paraffine du tissu et la remplacer par l'eau pour permettre la pénétration des colorants. Les coupes sont passées dans un bain de xylène pendant 30 minutes. Cependant, la réhydratation a pour but de retirer le xylène du tissu et de le remplacer par l'eau. Les organes sont imprégnés dans un bain d'alcool 100 ° pendant 10 minutes,
- Coloration : elle permet de visualiser les différents composants tissulaires et cellulaires. Dans notre étude, nous avons appliqué la technique de coloration d'hématoxyline-éosine : C'est une coloration topographique qui permet de visualiser la morphologie des cellules (noyau bleu et cytoplasme rose violacé) afin de déterminer leur répartition, architecture et structure,
- Montage et observation Après la coloration : les lames sont prolongées dans un bain de xylène pour l'éclaircissement. Une lamelle est fixée sur chaque lame par l'Eukitt. A la fin, les lames sont nettoyées au xylène puis séchées et observées au microscope optique Leica DM1000, Allemagne aux différents grossissements (G x40, G x100).

2.2.9.3 Évaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de l'HE a été déterminée par la méthode de l'aromatogramme.

✓ Principe

L'aromatogramme consiste à déposer un disque stérile en cellulose, imprégné d'une quantité bien définie de l'HE à tester. Ce disque est déposé à la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de Pétri etensemencée avec le microorganisme à tester. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (en mm) de la zone d'inhibition [131].

Les répétitions sont au nombre de trois.

✓ Souches microbiennes étudiées

L'activité antimicrobienne a été testée sur neuf (9) souches bactériennes et deux (2) levures (Tableau 2.6). Les souches utilisées sont des souches de référence (ATCC), gracieusement fournies par le laboratoire central (Unité de microbiologie) du CHU Frantz Fanon de Blida et le laboratoire d'hygiène et de référence de la wilaya de Blida, d'autres proviennent de la collection du CRD — SAIDAL. Toutes les souches ont été conservées à une température +4 °C dans des tubes à essai contenant de la gélose inclinée.

Tableau 2.6 : Souches microbiennes étudiées

Bactéries/Levures	N° des ATCC
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 4157
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 4352
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 6539
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 9372
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
SARM	ATCC 43300
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 2601

✓ Protocole expérimental

➤ Étude qualitative : Dans le but de sélectionner les souches sensibles à l'HE, nous avons réalisé un prétest. Pour cela, nous avons adopté les étapes suivantes

- Préparation de la 1^{ère} couche de milieu de culture : faire fondre les milieux de culture au BM (Mueller Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures). Verser une 1^{ère} couche de chacun des milieux dans une boîte de Pétri et laisser refroidir.

- Préparation de l'inoculum : Réalisez une suspension microbienne, à partir d'une culture jeune de 18h pour les bactéries et de 48 h pour les levures.

- Préparation de la 2^{ème} couche du milieu : mettre au BM les flacons pour faire fondre les milieux de culture, on les laisse refroidir jusqu'à 45 °C. À 50 ml du milieu, on rajoute 200 µl de chaque suspension microbienne. Rajouter 4 ml de cette préparation à la 1^{ère} couche du milieu de culture, puis étaler immédiatement en faisant tourner la boîte de Pétri sous forme de huit.

- Imprégnation des disques et leur dépôt sur la gélose : les disques sont imbibés par 12 µl de l'HE. Ensuite, ils sont déposés sur la gélose.

- Incubation et lecture des résultats : les boîtes de Pétri sont incubées dans l'étuve à 37 °C pendant 24 h pour les bactéries et à 25 °C pendant 48 h pour les levures. La lecture des résultats se base sur la présence ou l'absence de la zone claire autour du disque.

Les souches qui présentent un diamètre de la zone d'inhibition supérieur ou égal à 15 mm sont dite sensibles [132]. Ces bactéries font l'objet d'une étude quantitative.

Deux témoins ont été réalisés, le témoin positif consiste à tester l'effet des antibiotiques sur les différentes souches bactériennes. Le témoin négatif a pour but de prouver que le tween 80 ajouté n'a aucun effet inhibiteur.

➤ Étude quantitative : elle consiste à déterminer les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides.

Détermination de la concentration minimale inhibitrice « CMI » : Il s'agit de déterminer les plus petites concentrations auxquelles l'HE présente encore une activité antibactérienne visible à l'œil nu. Cette valeur est établie après 24 h d'incubation chez les bactéries et 48 h chez les levures.

Son but est d'établir le niveau de sensibilité des pathogènes envers les agents antimicrobiens en l'occurrence l'HE de *L. stoechas*. La CMI est déterminée selon la

méthode de dilutions sur milieu glosé. Ainsi, la CMI a été déterminée selon les étapes suivantes :

- Préparation de l'inoculum : Préparer une suspension microbienne à partir de culture jeune. Ces solutions mères doivent avoir une DO à 620 nm comprise entre : 0,2 à 0,3 pour les Enterobacteriaceae et Bacillus ; 0,35 à 0,45 pour les Staphylococaceae et 3 à 4 pour les levures.

À partir de ces solutions mères, préparer des dilutions allant de 10^{-1} jusqu'à 10^{-4} et c'est cette dernière dilution qui sera utilisée pour déterminer la CMI.

- Préparation des dilutions de l'HE de $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ à $0,3125 \mu\text{g ml}^{-1}$: préparer deux (2) flacons, le premier contient 200 ml du milieu de culture (MH ou SAB) + 1 ml de tween 80 ; le deuxième flacon contient 50 ml du milieu de culture + 1 mg de l'HE. Réaliser des dilutions de $\frac{1}{2}$ au $\frac{1}{2}$ en versant la moitié du 2^{ème} flacon dans la boîte de Pétri en ajoutant par la suite la même quantité du milieu de culture. Procéder de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution 0,03 %. Déposer les disques stériles à la surface de la gélose, ensuite les ensemercer à l'aide d'une micropipette.

- Incubation et lecture des résultats : les boîtes de Pétri sont placées dans l'étuve à 37 °C pendant 24 h pour les bactéries et à 25 °C pendant 48 h pour les levures. La lecture de résultats se fait à l'œil nu, en indiquant la plus faible concentration inhibitrice, qui se traduit par l'absence de toute croissance microbienne visible.

Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB : elle correspond à la concentration minimale en HE qui permet la destruction de 99, 99 % de l'inoculum initiale en 24 h pour les bactéries et 48 h pour les levures [133]. La détermination de la CMB se fait comme suit :

- À partir de la CMI déterminée, prélever les disques où il n'y avait pas de culture microbienne visible,
- Mettre les disques dans une boîte de Pétri contenant le milieu MH ou SAB,
- Incuber les boîtes à l'étuve, après 24 h ou 48 h la lecture des résultats se base sur l'absence de toute croissance microbienne visible à l'œil nu.

Il est à noter que la valeur de la CMI est inférieure ou égale \leq à la valeur de la CMB.

2.2.9.4 Évaluation de l'activité des phytopathogènes

✓ Étude des bactéries phytopathogènes

Étude qualitative : L'activité antimicrobienne des bactéries phytopathogènes a été réalisée à l'INPV (El-Harrach, Alger — Algérie), l'HE de *L. stoechas* et ses deux composées majoritaires le camphre (Sigma Aldrich, 148 075-100 G) et la fenchone (Sigma Aldrich, 196 436-50 G) ont été testés sur deux souches bactériennes : *Erwinia amylovora* l'agent causal du feu bactérien et *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* responsable de la pourriture molle de la pomme de terre. Le milieu de culture utilisée est le LPGA (Levure Peptone Glucose Agar).

L'activité antibactérienne des bactéries phytopathogènes a été déterminée par la méthode de diffusion en disque [134] :

- Couler la couche du milieu de culture dans des boites de Pétri et laisser les refroidir,
- Préparer une suspension bactérienne (à partir d'une culture jeune de 24 h) et l'ajuster à 10^7 UFC ml^{-1} (par mesure de la densité optique à 620 nm),
- Ensemencer la suspension bactérienne sur le milieu LPGA,
- Après séchage, déposez des disques stériles de 6 mm de diamètre dans chaque boite de Pétri où se trouve le milieu de culture. Ils sont ensuite imprégnés par l'HE de *L. stoechas*, camphre, fenchone et camphre+ fenchone à raison de 12 μl par disque,
- Les boites de Pétri sont incubées dans l'étuve à 27 °C pendant 24 h à 48 h,
- La lecture des résultats se base sur la présence ou l'absence de la zone claire autour du disque, ceci est le diamètre d'inhibition D. Des expériences témoins réalisées dans des boites de pétri avec la streptomycine et l'éthanol ont été conduites en parallèle,
- Selon le diamètre d'inhibition, les résultats sont exprimés dans le tableau 2.7 :

Tableau 2.7 : Les valeurs des diamètres d'inhibition et leurs interprétations

Diamètres d'inhibition	Interprétations
D= 0 cm	Résistant
D < 0,5 cm	Peu sensible
1 cm ≥ D ≥ 0,5 cm	Sensible
D > 3 cm	Très sensible

Pour la détermination des paramètres antibactériens CMI et CMB, nous avons sélectionné l'HE dont les diamètres d'inhibition sont supérieurs ou égale à 0,5 cm.

Étude quantitative (détermination de la CMI et CMB) : La concentration minimale inhibitrice est déterminée comme suit :

- Préparer deux (02) flacons pour chaque produit à tester à savoir : HE, camphre, fenchone et camphre + fenchone. Ainsi, le premier flacon contient 300 ml du milieu de culture LPGA et quelques gouttes de tween 80. Le second flacon contient 75 ml du milieu de culture LPGA et 1,5 mg de l'HE de *L. stoechas* ou 1,5 mg de camphre, ou 1,5 mg de la fenchone ou 1,5 mg du camphre + fenchone.
- Préparer une suspension microbienne à partir de culture jeune. Ces suspensions bactériennes doivent avoir une DO comprise entre 0,2 et 0,3 à 620 nm; puis procéder aux dilutions jusqu'à 10^{-4} et c'est cette dernière dilution qui sera utilisée,
- Réaliser séparément des dilutions de l'HE de *L. stoechas*, du camphre, de la fenchone et du camphre + de la fenchone. Ces dilutions du $\frac{1}{2}$ au $\frac{1}{2}$ sont comprises entre $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ et $0,625 \mu\text{g ml}^{-1}$,
- Déposer les disques stériles à la surface de la gélose préalablement coulée, ensuite les imprégner par la suspension bactérienne à l'aide d'une micropipette,
- Incuber les boîtes de Pétri à 27 °C pendant 24 h à 48 h,
- La lecture de résultats se fait à l'œil nu, en indiquant la plus faible concentration inhibitrice, qui se traduit par l'absence de toute croissance microbienne visible.

La détermination de la concentration minimale bactéricide CMB est réalisée après la lecture des résultats de la CMI :

- À partir de la CMI déterminée, prélever les disques où il n'y avait pas de culture microbienne visible,
- Mettre les disques prélevés dans une boîte de Pétri contenant le milieu de culture LPGA,
- Incuber les boîtes à l'étuve à 27 °C, après 24 h ou 48 h la lecture des résultats se base sur l'absence de toute croissance microbienne visible à l'œil nu.

Détermination de l'indice de la concentration inhibitrice fractionnaire et de l'indice CIF (Σ CIF) du camphre et de la fenchone [135] : l'effet synergique entre les deux composés majoritaires a été testé ensemble (à des concentrations égales) pour rechercher une éventuelle synergie. Cette dernière a été évaluée par l'indice FIC (concentration inhibitrice fractionnaire). L'effet combiné a été calculé par la formule suivante :

$$FIC = \frac{CMI \text{ de composé A en combinaison}}{CMI \text{ de A}} + \frac{CMI \text{ de composé B en combinaison}}{CMI \text{ de B}}$$

✓ Étude des champignons phytopathogènes

L'activité antifongique a été réalisée suivant la méthode de contact direct [136]. Cette méthode permet d'identifier l'efficacité de l'HE de *L. stoechas* et de ses composants majoritaires (Camphre et Fenchone) contre les champignons suivants : *Fusarium sp*, *Aspergillus niger*, *Alternaria spp* et *Rhizoctonia solani* isolés respectivement du blé dur et de la pomme de terre. La technique de contact direct est décrite comme suit :

- Dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar), on ajoute aseptiquement et séparément soit l'HE de *L. stoechas*, soit l'un des composants majoritaires suivants le camphre, la fenchone ou le camphre + la fenchone à différentes concentrations (20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de PDA). A toutes ces concentrations on ajoute quelques gouttes du Tween 80,

- Un disque mycélien de 6 mm de diamètre du champignon a étudié est prélevé à partir d'une culture fongique de 7 jours puis déposé au centre de la boîte de Pétri,
- Un témoin négatif (milieu de culture PDA sans l'HE de *L. stoechas*) a été réalisé,
- Ensuite, les boîtes ont été incubées à l'étuve à 28 ° C pendant 7 jours.

Les résultats obtenus se basent sur les diamètres de croissance mycéliens. Ces derniers sont mesurés et comparés à celui du témoin. Les résultats obtenus ont permis de calculer le Pourcentage d'Inhibition (PI) selon la formule suivante [137] :

$$PI (\%) = \frac{D-D_i}{D} \times 100 \quad \text{PI : pourcentage d'inhibition}$$

D : représente le diamètre de la prolifération du champignon du témoin

Di : est le diamètre de la prolifération du champignon en présence d'HE.

Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Fongicides : la détermination des CMI a concerné uniquement les boîtes de Pétri où l'HE de *L. stoechas* a montré un Pourcentage d'Inhibition (PI) égal à 100 %. Ainsi, la CMI correspond alors à la plus faible concentration à partir de laquelle aucune croissance fongique n'est observée. Nous avons évalué l'activité fongicide ou fongistatique CMF. Ce test consiste à prélever le disque mycélien qui n'a pas poussé en fin d'incubation de la boîte de Pétri et à le réintroduire dans un milieu de culture PDA neuf sans HE, ni composants majoritaires [137].

Dans le cas où la croissance mycélienne est toujours inhibée, on parle d'activité fongicide de l'HE et dans le cas contraire, il s'agit de l'activité fongistatique [138].

2.2.9.5 Étude de l'activité anti-inflammatoire

Nous avons utilisé la méthode de l'œdème de la patte postérieure de la souris [139], mais cette méthode a été légèrement modifiée selon le protocole interne de CRD El Harrach.

✓ Principe

L'injection de carraghénine à 1 % sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure de la souris entraîne l'apparition d'un œdème de la région métatarsienne.

L'intensité de cet œdème, qui atteint son maximum de développement en 4 heures, est évaluée grâce à l'augmentation du volume de la patte (par rapport au volume initial). L'administration préventive par voie orale d'un produit anti-inflammatoire réduit de façon significative le développement de l'œdème. Pour cela nous avons testé l'HE de *L. stoechas* à la dose de 400, 600 et 800 mg/kg du poids corporel de la souris.

✓ Protocole expérimental

- Mettre les souris à jeun pendant 18 heures avec accès libre à l'eau,
- Peser les souris et les répartir en cinq groupes homogènes ; le groupe témoin « 1 » reçoit l'eau physiologique, les groupes « 2 », « 3 » et « 4 » reçoivent l'HE de *L. stoechas*, respectivement 400, 600 et 800 mg/kg de poids corporel (PC) de la souris, le dernier groupe « 5 » a été traité avec du diclofénac à raison de 2 mg/kg de PC,
- Gaver les souris par l'HE de *L. stoechas* à différentes concentrations à raison de 0.5 ml,
- Après 30 minutes, injecter la carraghénine à 1 % sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche de la souris par 0,025ml,

Une réaction œdémateuse immédiate et persistante est observée. Elle consiste en l'apparition d'un œdème d'intensité variable selon les applications aux 3 lots.

Surveiller l'œdème pendant 4 h, puis mesurer le volume des pattes à l'aide d'un pied à coulisse électronique. Le pourcentage de l'augmentation de l'œdème est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de l'augmentation de l'œdème} = \frac{\text{volume de la patte gauche} - \text{volume de la patte droite}}{\text{volume de la patte droite}} \times 100.$$

Le pourcentage de réduction de l'œdème est calculé comme suit :

$$\% \text{ de réduction l'œdème} = \frac{\% \text{ du lot témoin} - \% \text{ de l'essai}}{\% \text{ du lot témoin}} \times 100$$

2.2.9.6 Étude de l'activité antioxydante par DPPH

A afin d'évaluer l'activité antioxydante de l'HE de *L. stoechas*, le test au DPPH a été utilisé. C'est la méthode indirecte la plus ancienne. Cette dernière a été comparée avec un antioxydant synthétique qui est le BHT.

✓ Principe

Il repose sur la réduction du radical libre 1,1 — Diphenyl -2 — picryhydrazyl (DPPH) de couleur violet par un antioxydant phénolique donneur d'hydrogène 2,2 Diphényl 1 picryl hydrazine (DPPH-H) de couleur jaune [140]. Le DPPH présente un maximum d'absorption vers 517 nm. La diminution de l'absorbance du mélange réactionnel est donc proportionnelle à la recombinaison du radical.

Le transfert d'un hydrogène de l'échantillon testé vers le radical libre est très fréquemment exprimé en IC₅₀ [141]. Il s'agit de la concentration en échantillon entraînant la recombinaison de cinquante pour cent des radicaux libres.

✓ Protocole expérimental

L'activité anti-radicalaire a été établie selon les deux méthodes conjointement [142, 143] :

- Préparer la solution de DPPH (0,004 %) en solubilisant 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol,
- 1 ml des solutions de l'HE de *L. stoechas* à différente concentration (3 mg ml⁻¹ jusqu'à 20 µg ml⁻¹) ou du standard BHT (0,01 mg ml⁻¹ jusqu'à 0,1 mg ml⁻¹) sont ajoutés à 2 ml de la solution de DPPH,
- Mesurer le contrôle négatif (1 ml de méthanol + 2 ml de la solution méthanolique de DPPH) à 517 nm, le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard qui est le BHT,
- Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, la lecture de l'absorbance est faite par comparaison à un blanc préparé pour chaque concentration à 517 nm. Les valeurs de l'IC₅₀ ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

L'activité anti radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous [144] :

$$\% \text{ d'activité anti-radicalaire} = \frac{\text{Abs du contrôle à 517 nm} - \text{Abs des échantillons à 517 nm}}{\text{Abs du contrôle à 517 nm}} \times 100$$

2.2.9.7 Réduction du fer : Méthode de FRAP

✓ Principe

La méthode de FRAP est un test simple et direct qui consiste à mesurer la capacité antioxydante. Cette méthode a été initialement développée pour le dosage de la capacité antioxydante plasmatique. Néanmoins, elle peut être utilisée pour des extraits de plantes. Le potentiel antioxydant total de l'échantillon a été déterminé en utilisant une réduction de la capacité ferrique (FRAP) comme une mesure du « pouvoir antioxydant ». Ce test mesure la variation de l'absorbance à 700 nm en raison de la formation d'une couleur bleue (Fe^{2+}) composé tripyridyltriazine de la forme Fe^{3+} incolore oxydée par l'action des antioxydants donneurs d'électrons [145].

✓ Protocole expérimental

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée en 1986 par Oyaizu [146] :

- 1 ml de différentes concentrations de l'HE dilué dans le méthanol et compléter par l'eau distillée [147],
- Ajouter 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6),
- Puis 2,5 ml de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à 1 %,
- Les mélanges sont incubés au bain-marie à 50°C pendant 20 min,
- Par la suite, 2,5 ml de l'acide trichloracétique à 10 % sont additionnés,
- Le mélange est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min,
- Prélever 2,5 ml du surnageant de chaque concentration,
- Mélanger avec 2,5 ml d'eau distillée,
- À la fin, ajouter 0,5 ml FeCl_3 à 0,1 %.

Le contrôle négatif est préparé dans les mêmes conditions opératoires, en remplaçant l'HE par l'eau distillée. Le contrôle positif est représenté par l'acide ascorbique testé à différentes concentrations. L'absorbance est mesurée à 696 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

$$\text{Le pouvoir réducteur de fer \%} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

A_0 : est l'absorbance de FeCl_3 .

A_1 : est l'absorbance de FeCl_3 solution en présence de l'extrait.

2.2.10 Analyses statistiques

Les valeurs ont été exprimées en moyenne \pm SD ou moyenne \pm SEM. Trois logiciels sont utilisés pour l'étude statistique de ce travail à savoir : Systat version 7.0, logiciel R et XLstat version 2018.3. Les résultats des différents tests ont été analysés par ANOVA, suivie du test de Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification.

Le logiciel Excel 2013 est utilisé pour rentrer les données, qui correspondent aux densités optiques, diamètres d'inhibitions, poids des souris et des organes, le calcul de la moyenne et de l'écart type. Les valeurs de $p \leq 0,05$ sont considérées statistiquement significatives.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

3.1 Résultats de l'étude ethnobotanique

L'enquête a concerné un échantillonnage de 105 personnes choisis de manière aléatoire. Elle a abouti aux résultats illustrés dans la figure 3.1. La fiche du questionnaire est en appendice C. La médecine traditionnelle est très développée et occupe une place importante dans les régions de Blida, Tipaza et Alger.

Question N° 01 : connaissez-vous la phytothérapie ?

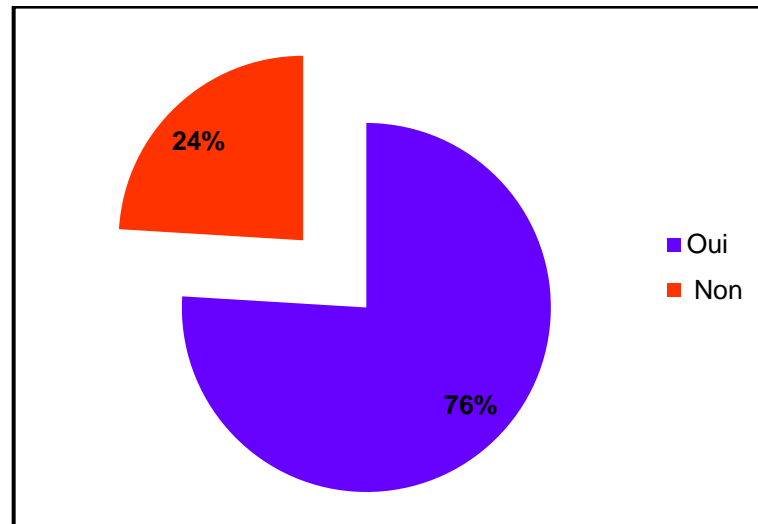


Figure 3.1 : Pourcentage des connaisseurs de la phytothérapie

La figure 3.1 montre que sur les 105 personnes interrogées, 96 % connaissent la phytothérapie alors que 24 % n'en ont jamais entendu parler. Donc la phytothérapie est majoritairement connue par la population interrogée.

Question N° 02 : quel type de médecines utilisez-vous ?

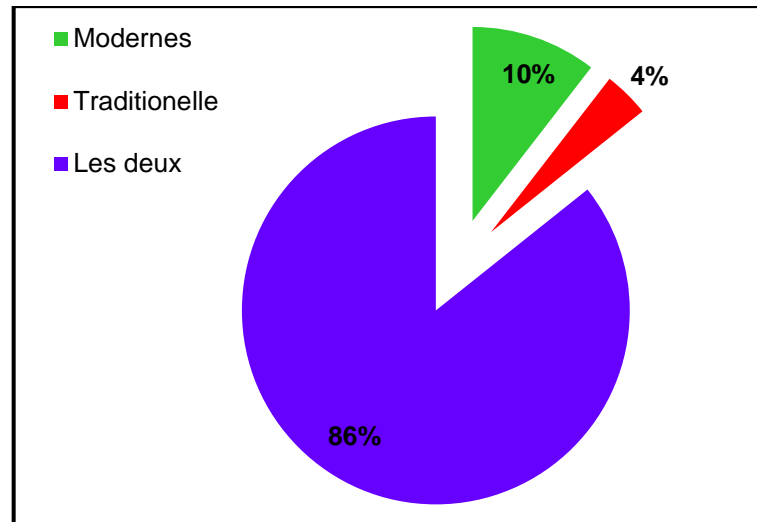


Figure 3.2 : Les différents types de médecines utilisées.

Nous avons constaté que la plupart (86 %) de la population interrogée utilise parallèlement la médecine traditionnelle et la médecine moderne pour se soigner. Cependant, une minorité à savoir 4 % de la population utilise uniquement la médecine traditionnelle.

Certes, l'échantillonnage n'est pas très important mais, par rapport à la population interrogée, nous pouvons déduire que la médecine traditionnelle n'est pas très développée et n'occupe pas une place de choix dans les régions suivantes : Blida, Tipaza et Alger.

Question N° 3 : la relation entre le niveau académique et la connaissance de la phytothérapie ?

Les résultats de la figure 3.3 montrent que le niveau d'étude a une influence sur la connaissance de la phytothérapie. Toutefois, il existe une minorité (23 personnes) de la population interrogée ayant suivi des études universitaires ne connaissent pas la médecine à base de plante.

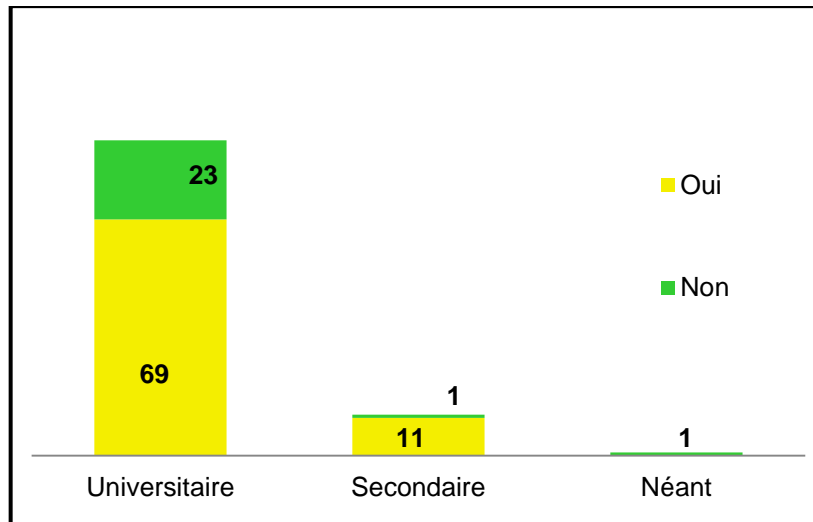


Figure 3.3 : La connaissance de la phytothérapie en fonction du niveau académique.

Question N° 4 : connaissez-vous la lavande ?

À travers les réponses reçues (Figure 3.4), nous avons pu constater que 92 % du groupe interrogés connaissent la Lavande et seulement 8 % n'en ont jamais entendu parler.

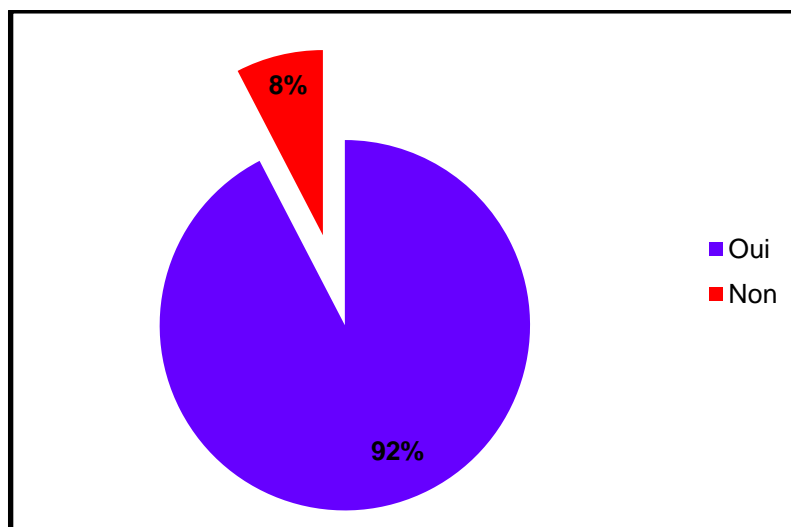


Figure 3.4 : Pourcentage de connaisseurs de la Lavande.

Question N° 5 : comment connaissez-vous la lavande ?

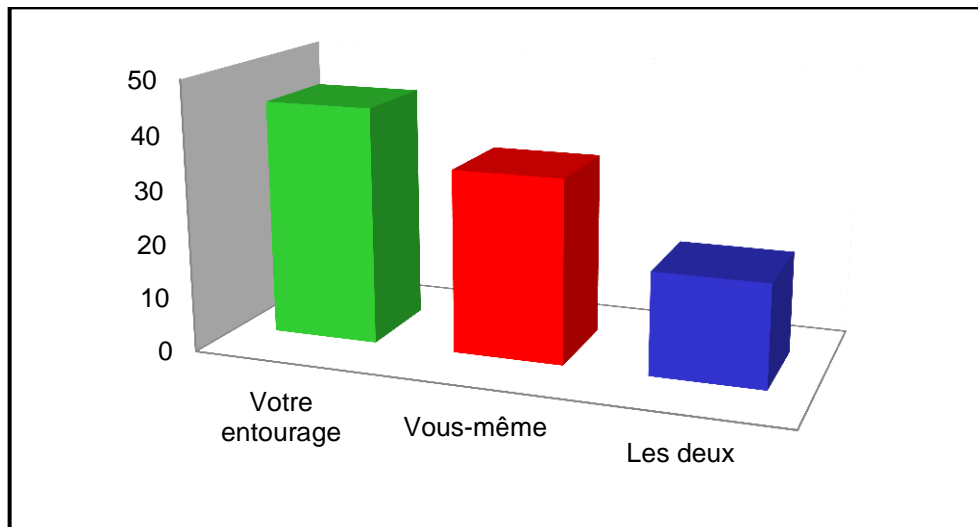


Figure 3.5 : Pourcentage des sources de connaissance de la lavande.

Sur les 92 % qui connaissent la lavande, 41,73 % connaissent la lavande par leur entourage et 32,25 % utilisent la lavande.

À l'issue de cette enquête et selon la figure n° 3.5, nous pouvons déduire que la majorité des personnes interrogées connaissent la lavande sauvage, soit pour l'avoir utilisée, soit par leur entourage.

Questions N° 6 : quels sont les domaines d'utilisation de la lavande ?

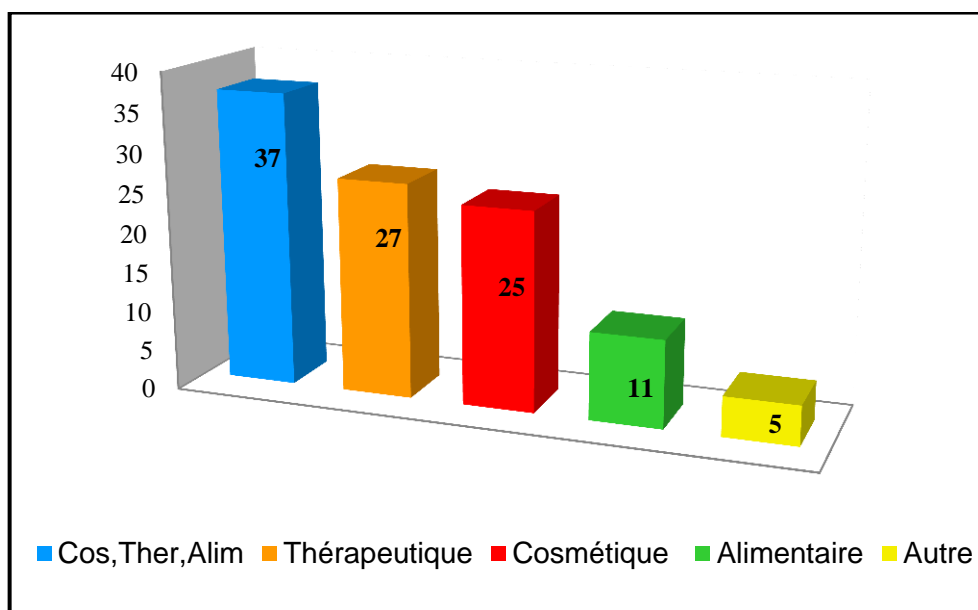


Figure 3.6 : Les domaines d'utilisation de la lavande.

D'après les sondages, la figure 3.6 illustre que la lavande est employée dans plusieurs domaines. La plupart des personnes interrogées utilisent généralement la lavande dans trois domaines différents ; thérapeutique, cosmétique et alimentaire. Par contre un nombre moins important se sert de la lavande dans un but thérapeutique ou cosmétique. L'espèce de *Lavandula stoechas* originaire d'Italie est utilisée en parfumerie et en cosmétologie [148, 149].

Les Blidéens consomment cette plante en l'introduisant au couscous qui s'appelle El — HAMMAMA. Ils préfèrent utiliser la plante spontanée en période de floraison qui s'étend du mois de février au mois de mai.

L'enquête ethnobotanique que nous avons menée prouve l'utilisation abondante et variée de *L. stoechas* en décoction-infusion (47 personnes) et dans l'alimentation cuite (43 personnes). Plusieurs utilisations recensées au cours de notre enquête peuvent être considérées comme nouvelles tel que son utilisation pour les affections génito-urinaires et respiratoires. Parmi les personnes interrogées, 35 utilisent la lavande en association avec d'autres plantes (Tableau 3.1). Gilani et *al.*, ont reporté que *Lavandula stoechas* est utilisée pour les affections du tube digestif comme calmant [150].

Tableau 3.1 : Résultats de l'enquête ethnobotanique de *Lavandula stoechas*

Plantes		Partie utilisée		Mode d'utilisation		Affections		Plantes associées
Plante seul	70	Feuille	5	Cuit	42	Dermatologique	39	<ul style="list-style-type: none"> - Romarin - Armoise - Camomille - Thym - Lentisque - Feuille de pêche - Feuille de coin - Feuille d'abricot - L'olivier
Plante en association	35	Fleur	41	Cataplasme	3	Génito-urinaire	29	
-	-	Plante entière	59	Décoction-infusion	47	Digestive	21	
-	-	-	-	Différentes formes	13	Respiratoire	30	
-	-	-	-	-	-	Autres	11	

3.2 Résultats de l'étude microscopique de *L. stoechas*

3.2.1 Observation de la fleur sous loupe

Après identification de la plante au laboratoire de botanique de l'université de Blida-1 et l'ENSA d'El-Harrach, nous avons procédé à l'observation de la fleur fraîche sous la loupe binoculaire.

Les fleurs fraîches de *L. stoechas* sont petites de couleur violacée regroupées en épis (Figure 3.7 a). Elles sont terminées par des bractées de couleur rose violète qui sont des organes stériles (Figure 3.7 b).



Figure 3.7 : Fleur de *L. stoechas* (loupe G : 10× 0,8)

a- Petites fleurs regroupées en épis ; b- Bractée (Originale 2014)

La corolle pubescente présente des pétales unis entre eux et formant un tube, ce type est appelé gamopétale (Figure 3.8 a). Les petites fleurs portées par le pédoncule sont hermaphrodites (Figure 3.8 b). Le calice est ovoïde, strié et très riche en poils épidermiques tecteurs (Figure 3.9 a) et sécréteurs (Figure 3.9 b). L'androcée est formé de deux étamines et d'un filet pubescent (Figure 3.10). Le pistil est formé d'un ovaire de 4 loges uniovulées et d'un style surmonté par un stigmate poilu (Figure 3.11). La fleur renferme quatre pétales et quatre sépales.

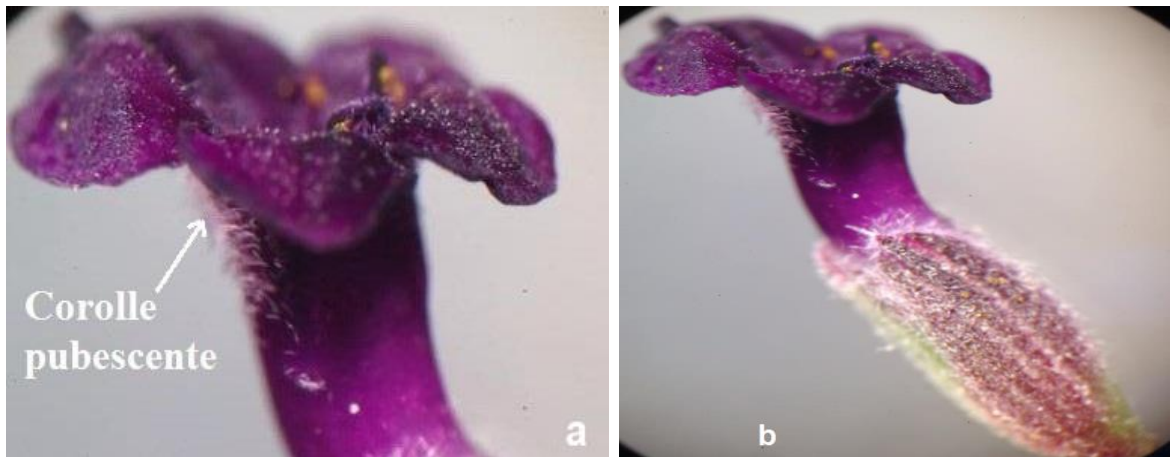


Figure 3.8 : Corolle pubescente de *L. stoechas* (loupe G : 10x 2,5)
a- corolle pubescente ; b- fleurs hermaphrodites (Originale 2014)

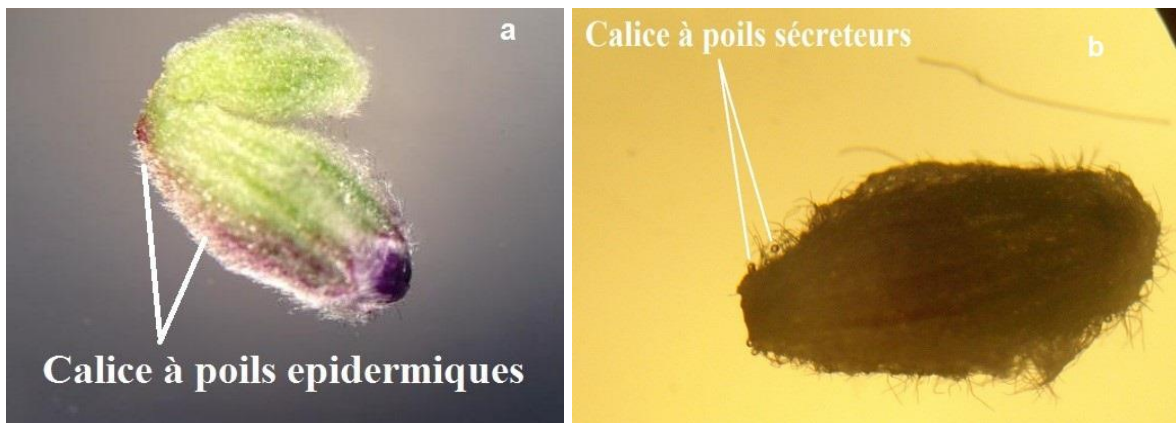


Figure 3.9 : Calice de *L. stoechas* (loupe G : 10x 2,5)
a- Poils épidermiques tecteurs ; b- Poils épidermiques sécréteurs (Originale 2014)



Figure 3.10 : Androcée de *L. stoechas* (loupe G : 10x 2,5) (Originale 2014)

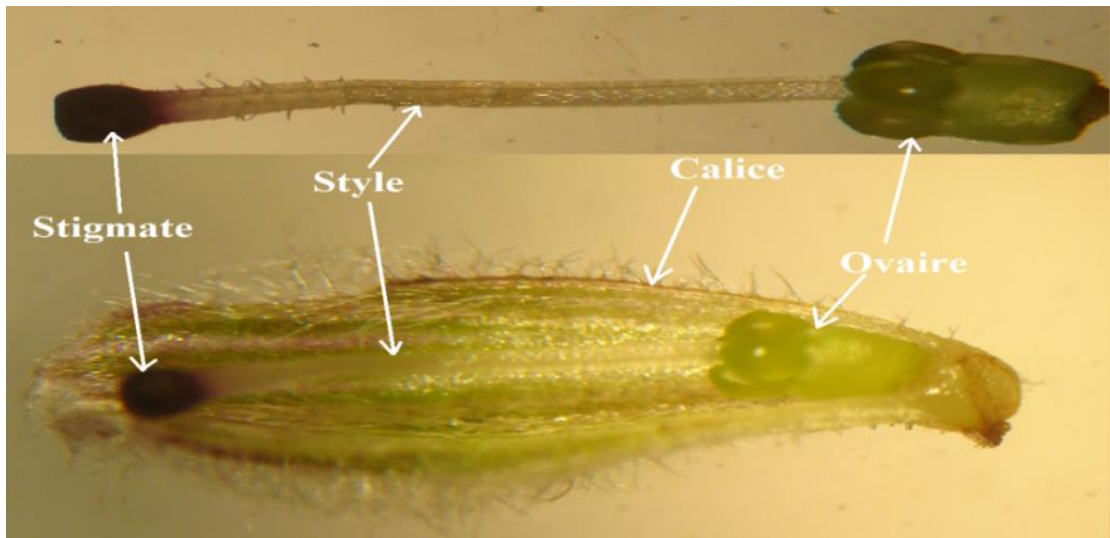


Figure 3.11 : Gynécée de *L. stoechas* (Loupe G : 10× 2,5) (Originale 2014)

3.2.2 Observations des trichomes de *L. stoechas*

L'examen par MEB a révélé la présence de trichomes glandulaires. Ces derniers sont appelés pelté ou capité, selon la structure de la tête sécrétoire. Les trichomes glandulaires du capitatum ont une ou deux cellules sous forme de disque sécrétoire et d'une tige très courte avec une tête arrondie, alors que les trichomes peltés peuvent avoir jusqu'à huit cellules dans le disque.

Les trichomes peltés étaient moins abondants que les trichomes capitats (Figure 3.12 A), la tête est arrondie, la taille varie de 19 μm à 23 μm de diamètre (Figure 3.12 B). Selon Clark et *al.*, 1997 ; Turner et *al.*, 2000, la substance sécrétée est accumulée dans un espace sous-cutané, à l'extérieur de la paroi cellulaire dans les deux types de trichomes. Toutefois, les trichomes de pelté produisent la plus grande partie d'huile essentielle [151, 152].

Les études menées sur la lavande originaire du Portugal concordent avec notre résultat [153, 154]. Ainsi, ces travaux montrent une plus grande diversité de trichomes sécréteurs, tels que les trichomes stellaires multicellulaires qui combinent les bras glandulaires et non glandulaires. Les trichomes de pelté ne présentent aucune diversité dans leur morphologie. Ils sont semblables à ceux observés chez d'autres Lamiaceae.

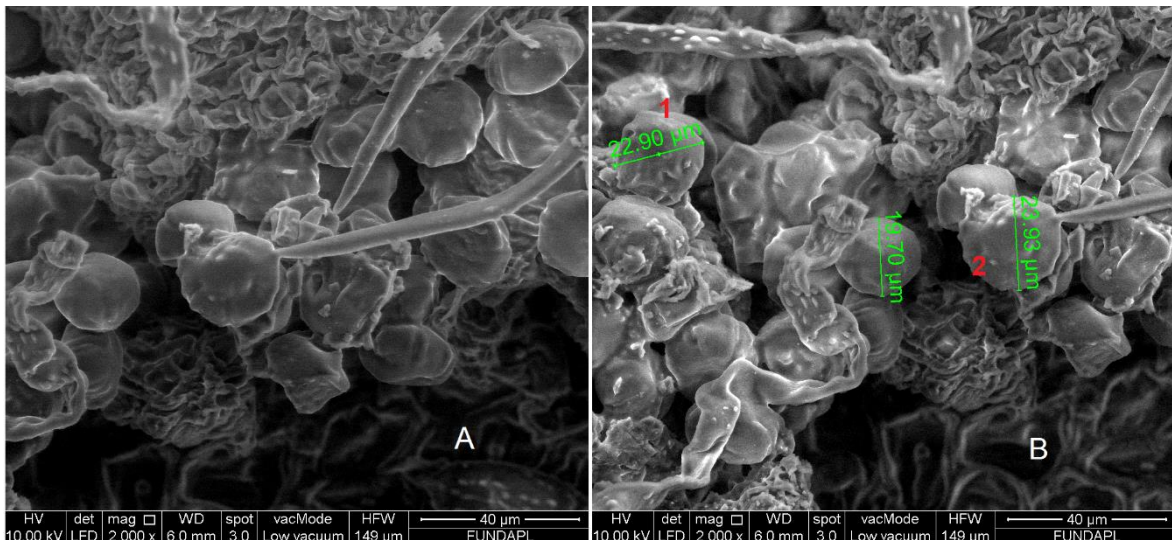


Figure 3.12 : Trichomes de *L. stoechas* sous microscope électronique à Balayage A/ trichomes glandulaire capité ; B/ taille des têtes de trichomes (1) trichome pelté (2) (Originale 2018)

3.3 Résultats de la teneur en eau et en matière minérale

3.3.1 Teneur en eau

La figure 3.13 montre la teneur en eau dans les fleurs de de *L. stoechas*.

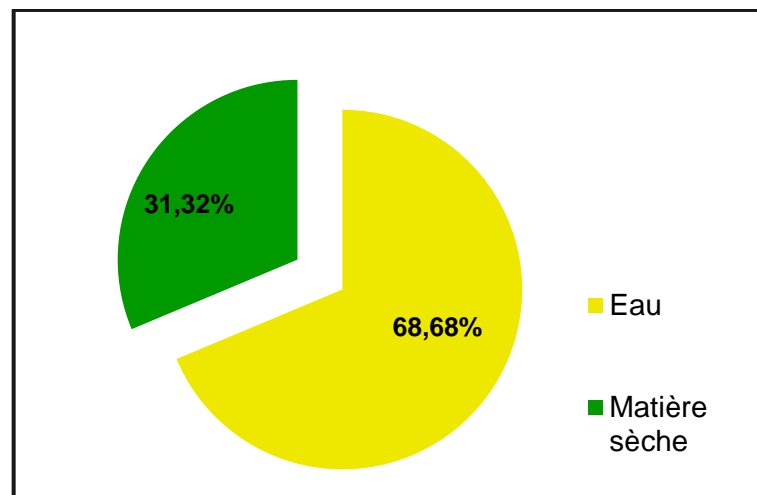


Figure 3.13 : Résultat de la teneur en eau

Les résultats obtenus (détail en appendice D) montrent que les fleurs fraîches sont riches en eau avec un pourcentage de $68,68 \pm 3,2410\%$ soit les 2/3 de la plante sont représentés par l'eau.

La teneur en eau des organes végétaux est relativement élevée. Elle oscille entre 60 et 90 %. Ce taux élevé est dû aux processus actifs nécessitant des apports suffisants en eau [155].

3.3.2 Teneur en matière minérale

La teneur en minéraux des fleurs sèches atteint 9,14 % du poids sec (Détails en appendice D). Ces valeurs sont proches de ceux de la Pharmacopée européenne [156], qui prévoient des valeurs comprises entre 10 et 12 %.

La quantité des ions minéraux absorbés est en relation avec les conditions physicochimiques du sol dans lequel évolue la plante, la température, l'intensité lumineuse, la longueur du jour et l'aération du milieu peuvent influencer sensiblement sur les teneurs en minéraux. L'état physiologique interne de la plante (stade de développement, âge, état hormonal) joue également un très grand rôle dans l'absorption des minéraux. De nombreuses plantes médicinales sont très riches en minéraux. Les plantes tirent les minéraux du sol et les transforment en une structure assimilable par l'organisme [157, 158].

La matière minérale en solution a été analysée par chromatographie ionique. Les cations et les anions ont été analysés séparément. Ces résultats sont représentés dans les tableaux 3.2 et 3.3 :

Tableau 3.2 : Cations détectés dans les cendres par chromatographie ionique

Cations détectés	Temps de rétention (min)	Concentration ($\mu\text{g/l}$)
Sodium	4,55	0,087
Potassium	6,33	4,232
NI	9,84	/
NI	12,22	/

L'analyse de la matière minérale dans les cendres par chromatographie ionique révèle quatre minéraux : sodium, potassium et deux autres non identifiés (Figure 3.14). Le potassium est le cation majoritaire (Tableau 3.2). Cette teneur peut

être expliquée par le fait que le potassium est indispensable au fonctionnement (développement, croissance et photosynthèse) de la plante [64].

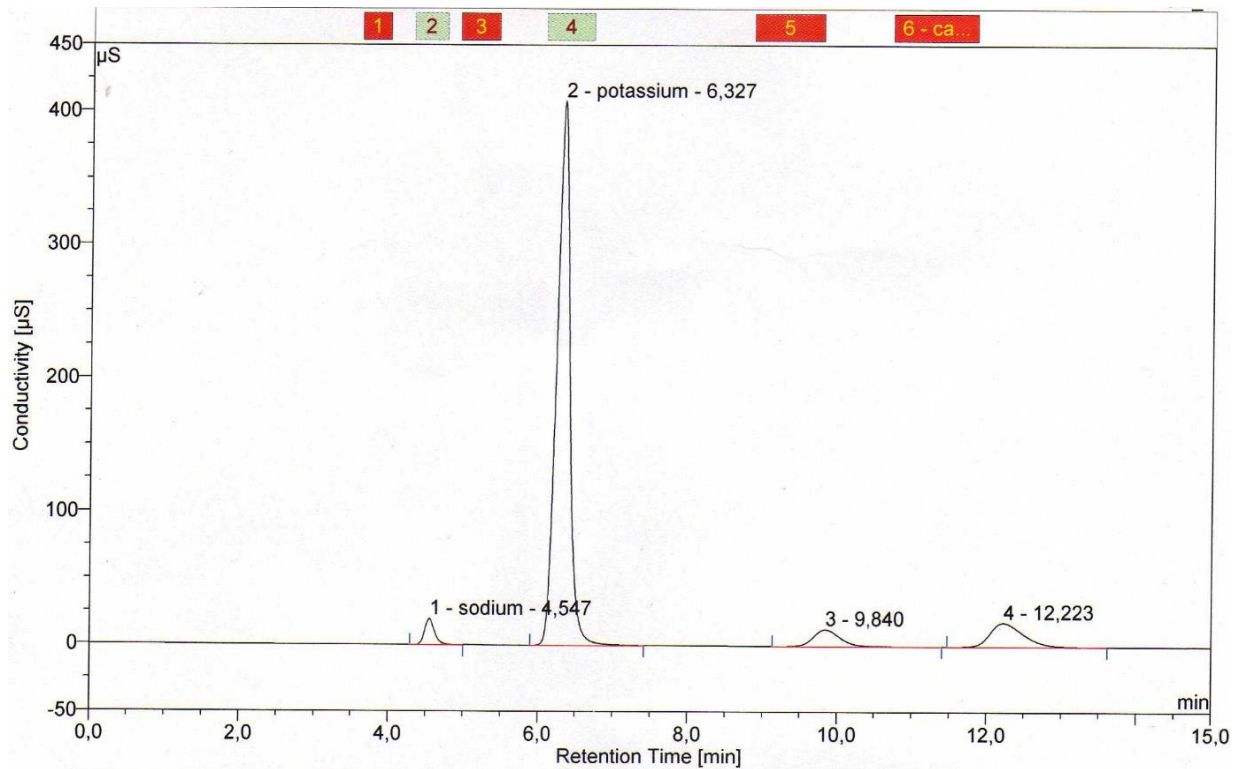


Figure 3.14 : Chromatogramme des cations

L'analyse des anions révèle la présence de chlorure et de sulfate (Tableau 3.3). La concentration en sulfate est de l'ordre de 112,921 µg/l, cette abondance peut s'expliquer par le fait que les lamiacées sont riches en acides aminés et produits soufrés (Figure 3.15).

Tableau 3.3 : Anions détectés dans les cendres par chromatographie ionique

Cations détectés	Temps de rétention (min)	Concentration (µg/l)
Chlorure	5,83	86,258
NI	10,79	/
Sulfate	12,67	112,921

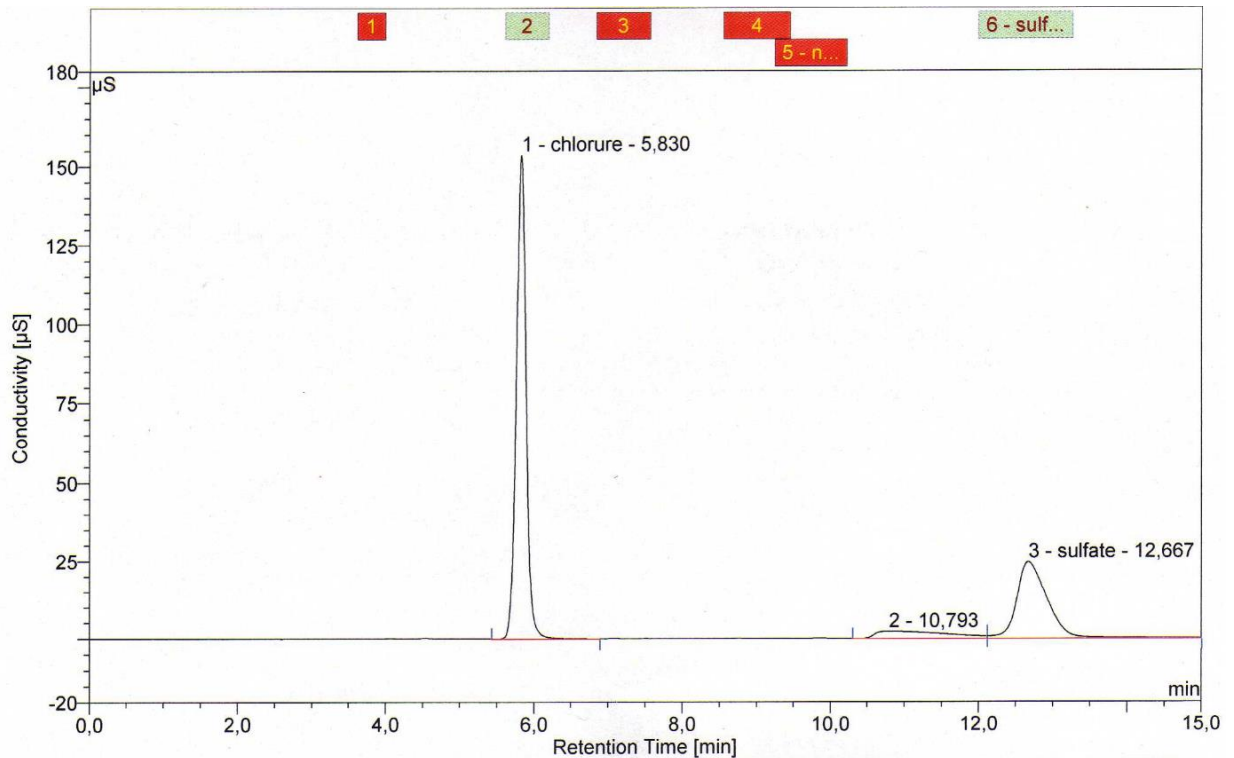


Figure 3.15 : Chromatogramme des anions

L. stoechas accumule les ions chlorures (86,258 µg/l), car le chlore est indispensable dans les réactions photosynthétiques productrices d'oxygène. Le chlore peut remplir deux fonctions principales, il joue le rôle d'un contre-ion qui maintient la neutralité électrique à travers les membranes des cellules de la plante ; il est l'un des principaux solutés osmotiquement actif dans la vacuole. Le chlorure est facilement absorbé et la plupart des plantes l'accumulent à des concentrations largement supérieures à leurs besoins [159].

La présence en excès des ions sulfates et des ions chlorures dans les fleurs sèches de la lavande que nous avons étudiée peut-être due à un excès du sol en ces éléments. Ainsi, *L. stoechas* les accumule en quantités importantes. Une analyse du sol nous aurait permis de mieux interpréter nos résultats.

3.4 Résultats du screening phytochimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur différents extraits préparés à partir des fleurs de *L. stoechas* en utilisant des réactifs spécifiques de révélation.

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de certains métabolites secondaires au niveau de la fleur.

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur les fleurs sèches broyées de *L. stoechas* sont mentionnés dans le tableau 3.4. Ils montrent la présence des flavonoïdes, tanins, stérols et triterpènes, caroténoïdes, composés réducteurs, mucilage, iridoïdes et des saponosides dans les fleurs.

La mise en évidence des flavonoïdes à partir de l'infusé des fleurs sèches de *L. stoechas* est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge rassemblée dans le surnageant. Ce résultat est observé après contact avec les copeaux de magnésium. Ceci confirme la présence des flavonoïdes libres. Ainsi la couleur rouge cerise explique la présence des leucoanthocyanes.

Les tanins sont présents avec une intensité importante. Leur présence est confirmée par une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique en donnant une coloration noir intense. Il s'agit donc des tanins catéchiques. Les tanins galliques ont montré des précipités en gros flocons.

Le test positif des stérols et triterpènes a montré l'apparition d'un anneau rouge-brun et une couche surnageante de couleur verte.

Les fleurs de *L. stoechas* renferment une quantité importante en caroténoïdes. Elle se traduit par l'apparition d'une couleur bleu foncé qui devienne par la suite rouge.

La présence des coumarines est confirmée par l'apparition d'une fluorescence sous la lumière ultra-violette.

Les résultats du screening phytochimique ont montré la présence des mucilages par obtention d'un précipité floconneux.

La présence des composés réducteurs a été confirmée par l'obtention d'un précipité rouge brique. Les iridoïdes ont présenté un précipité noir.

Le test des saponosides a révélé la présence d'une mousse de 1 cm de longueur, ce résultat confirme la présence des saponines dans les fleurs de *L. stoechas*. Ainsi, l'indice de mousse est égal à 250.

D'après les résultats obtenus, on remarque que les quinones libres, les alcaloïdes et les dérivés anthracéniques sont absents dans les fleurs de *L. stoechas*.

Tableau 3.4 : Identification colorimétrique de quelques métabolites secondaires de *L. stoechas*

Composés secondaires		EA	Observations
Flavonoïdes	Hétérosides flavoniques	+++	Coloration moins intense
	Flavonoïdes libres	++	Coloration rassemblée dans le surnageant d'alcool isoamylique
	Leucoanthocyanes	+	Rouge cerise ou violacée
Tanins	Galliques	+++	Teinte noir intense
	Catèchiques	++	Précipité en gros flocons
Stérols et triterpènes		+++	Rouge brunâtre ou violet et un surnageant vert ou violet
Caroténoïdes		+++	Coloration bleue devenant rouge.
Coumarines		+	Présence de la fluorescence
Composés réducteurs		+++	Précipité rouge brique
Mucilages		+++	Précipité floconneux
Iridoïdes		+	Précipité noir
Saponosides		++	Mousse persistante
Quinones libres		-	Virage au jaune, rouge ou violet de la phase aqueuse
Alcaloïdes		-	Précipité blanc — jaune
Dérivés antracéniques		-	Absence de coloration

+++ : Réaction très positive ; ++ : Réaction moyennement positive ; + : Réaction faiblement positive ; - : Réaction négative. EA : Extrait aqueux

Peu de travaux ont été menés sur le criblage phytochimique des fleurs sèches de *L. stoechas*. La partie aérienne de *L. stoechas* originaire du Maroc présente des tanins catéchique, flavonoïdes, stérols et terpènes, coumarines, Leucoanthocyanes et mucilages [160]. Ces mêmes auteurs ont enregistré l'absence des tanins galliques [160].

3.5 Extraction et rendement en huile essentielle

L'extraction par hydrodistillation conventionnelle des fleurs sèches de *L. stoechas* a été réalisée avec un dispositif de type Clevenger. Le tableau 3.5 représente les résultats des caractéristiques organoleptiques de l'HE de *L. stoechas*. Ces résultats sont spécifiques au genre *Lavandula*. Ainsi, nos résultats sont similaires à ceux décrits par Mohammedi et Atik, [161] ; Benabdelkader et al., [162].

Tableau 3.5 : Caractères organoleptiques de l'huile essentielle de *L. stoechas*

Aspect	Couleur	Odeur	Saveur
Liquide mobile	Jaune	Agréable forte	Douce

Le rendement moyen en HE est de $1,13 \pm 0,14$ %. Ainsi et pour chaque extraction, nous avons pu récupérer une quantité de 1,1 ml d'HE pour 100 g de fleurs sèches de *L. stoechas*. Cependant, ce rendement en HE est relativement élevé comparé à ceux rapportés par Zuzarte et al., [163] au Portugal (0,7 %), Sebai et al., [164] en Tunisie (0,05 %), Khia et al., [165] au Maroc (0,88 %).

Nos résultats concordent avec ceux enregistrés en Algérie par Dob et al., [23]. Au contraire, Hassiotis [166] ; Angioni et al., [167] ; Barkat et Laib [168] ; Skoula et al., [41] ont obtenu un rendement supérieur au nôtre qui sont respectivement 1,46 %, 3,46 %, 3,1 % et 4,2 %.

Les variations des teneurs en huile essentielle peuvent être dues à plusieurs facteurs notamment biotiques et abiotiques : le degré de maturité des fleurs, l'interaction avec l'environnement à savoir le type de climat, le sol et le moment de la récolte [169, 170,171].

Certaines plantes ont une teneur plus importante en HE lorsque la température est élevée [172] ; d'autres sont plus riches en HEs sous l'effet de

fertilisants [173]. La période de récolte, l'organe de la plante, la durée de séchage et la méthode d'extraction sont des facteurs parmi d'autres qui peuvent aussi avoir un impact direct sur les rendements en HE [174].

3.6 Résultats de la composition chimique de l'huile essentielle de *L. stoechas*

L'HE des fleurs sèches a été soumise à des analyses détaillées par CG/SM.

L'identification des composants a été réalisée par l'utilisation des indices de rétention (IR) sur colonne polaire et apolaire, par l'analyse des spectres de masse des composés constitutifs et par la comparaison de ces données à celles de bases de données électroniques à savoir WILEY et NIST, de bases bibliographiques [175] et celles obtenues sur des composés standards purs.

Les composés identifiés de l'HE de *L. stoechas*, leurs indices de rétention, leur pourcentage et leurs méthodes d'identification sont donnés dans le tableau 3.6 dans lequel les composants sont listés dans l'ordre de leur élution sur la colonne capillaire DB-5.

Le chromatogramme de la composition chimique de l'huile essentielle de *L. stoechas* est détaillé dans la figure 3.16.

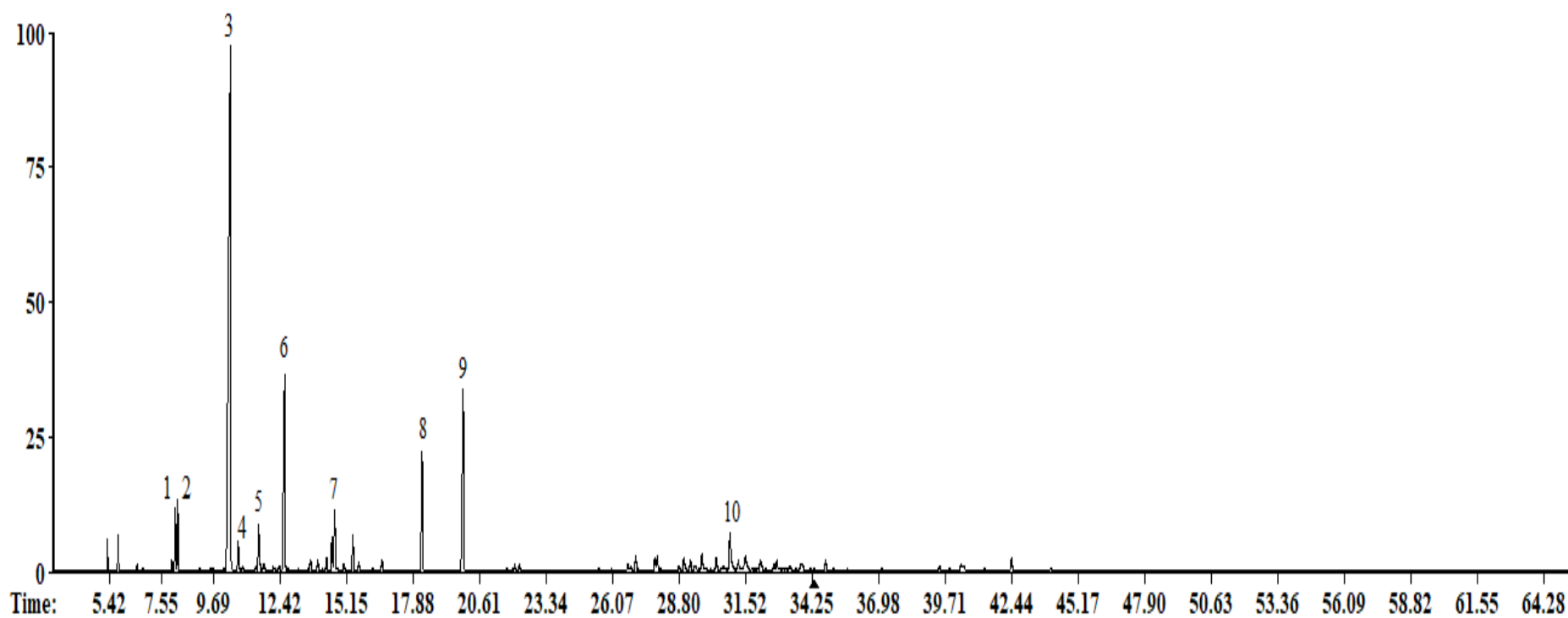


Figure 3.16 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas*

1 : Limonène, **2** : 1.8-Cinéole ; **3** : Fenchone, **4** : Linalool, **5** : α -Fenchol, **6** : Camphre, **7** : Myrtenal
8 : Bornyl acetate, **9** Myrtenyl acétate, **10** : Viridiflorol

Tableau 3.6 : Compositions chimiques de l'huile essentielle des fleurs sèches de *L. stoechas*

Composants ¹	RI _E	RI _L	(%)	Identification
Tricyclène	919	921	Tr	<i>a, b</i>
α -Pinène	929	932	0,79	<i>a, b, c</i>
α -Fenchone	944	945	0,12	<i>a, b, c</i>
Camphène	946	946	0,93	<i>a, b, c</i>
Verbénène	949	961	Tr	<i>a, b, c</i>
Benzaldehyde	959	952	Tr	<i>a, b</i>
Sabinène	967	969	0,05	<i>a, b, c</i>
1-Octen-3-one	971	972	Tr	<i>a, b</i>
1-Octen-3-ol	975	974	0,24	<i>a, b</i>
Myrcène	984	988	0,07	<i>a, b, c</i>
3-Octanol	995	988	Tr	<i>a, b</i>
δ -3-Carène	1006	1008	Tr	<i>a, b, c</i>
<i>p</i> -Cymène	1016	1020	Tr	<i>a, b, c</i>
<i>o</i> -Cymène	1022	1022	0,35	<i>a, b</i>
Limonène	1026	1024	2,04	<i>a, b, c</i>
1.8-Cinéole	1029	1026	2,23	<i>a, b, c</i>
γ -Terpinène	1054	1054	0,09	<i>a, b, c</i>
<i>cis</i> -Linalool oxide	1066	1067	0,11	<i>a, b, c</i>
<i>cis</i> -Sabinène hydrate	1069	1065	0,18	<i>a, b</i>
α -Terpinolène	1082	1086	0,11	<i>a, b, c</i>
Fenchone	1089	1083	40,78	<i>a, b, c</i>
Perillène	1095	1102	0,09	<i>a, b</i>
Linalool	1098	1095	1,16	<i>a, b, c</i>
1-Octen-3-yl acetate ^d	1103	1110	0,3	<i>a, b</i>
β -Thujone	1111	1112	0,07	<i>a, b</i>
α -Fenchol	1119	1114	2,14	<i>a, b, c</i>
α -Campholène aldehyde ^d	1124	1122	0,5	<i>a, b</i>
<i>cis</i> -Limonène oxide	1133	1132	0,2	<i>a, b, c</i>
<i>cis-p</i> -2.8-Menthadien-1-ol	1135	1133	0,11	<i>a, b</i>
<i>cis</i> -Verbénol	1140	1137	0,3	<i>a, b</i>

Camphre	1145	1141	9,76	a, b, c
α -Phellandrène-8-ol	1148	1149 ¹	0,1	a, b
Pinocarvone	1158	1160	0,1	a, b
Bornéol	1171	1165	0,6	a, b, c
Terpinène-4-ol	1178	1174	0,5	a, b, c
<i>p</i> -Cymène-8-ol	1187	1179	0,55	a, b
<i>p</i> -Methyl acetophenone	1183	1179	0,1	a, b
Myrténol	1192	1194	1,37	a, b, c
Myrténal	1195	1195	3,01	a, b, c
Verbénone	1204	1204	0,41	a, b, c
α -Fenchyl acetate	1213	1218	1,45	a, b, c
<i>trans</i> -(+)-Carveol	1218	1215	0,5	a, b
<i>cis</i> -Carveol	1232	1226	0,11	a, b
Carvone	1240	1239	0,5	a, b
Bornyl acetate	1279	1287	5,10	a, b, c
Perilla alcohol ^d	1299	1294	Tr	a, b
Carvacrol	1305	1298	Tr	a, b, c
Myrtenyl acétate	1319	1324	8,94	a, b, c
α -Cubebène	1340	1345	Tr	a, b
Eugénol	1349	1356	0,07	a, b, c
α -Copaène	1369	1374	0,3	a, b, c
Cyclosativene	1363	1369	0,17	a, b
Neryl acétate	1373	1371 ²	0,4	a, b
β -Bourbonene ^d	1376	1387	Tr	a, b
β -Cubebène ^d	1381	1387	0,1	a, b
α -Ionone ^d	1415	1413 ³	Tr	a, b
α -Humulène	1448	1452	Tr	a, b
Aromadendrène	1452	1439	0,11	a, b
Germacrène-D	1465	1465 ⁴	0,1	a, b, c
α -Amorphène	1468	1470 ⁵	Tr	a, b
β -Ionone ^d	1472	1475 ⁶	0,09	a, b
Bicyclosquiphéllandrène ^d	1484	1490 ⁷	0,3	a, b
α -Muuroolène	1493	1500	0,1	a, b

δ -Cadinene	1511	1522	0,68	a, b, c
<i>trans</i> -Calaménène	1515	1521	0,2	a, b
<i>trans</i> -Cadina-1.4-diene	1525	1533	0,1	a, b
α -Calacorène	1534	1544	0,3	a, b
β -Calacorène	1555	1564	0,1	a, b
Caryophyllene oxide	1573	1582	0,63	a, b, c
Spathuléol	1570	1577	0,06	a, b, c
Viridiflorol	1588	1592	2,46	a, b
Ledol	1603	1602	1,20	a, b
1- <i>epi</i> -Cubéol	1622	1627	0,68	a, b
τ -Cadinol ^d	1639	1638	0,45	a, b
α -Muurolol (Torreyol)	1645	1644	0,19	a, b
Total identified			95,21	
Monoterpène Hydrocarbonés			4,63	
Monoterpènes oxygénés			80,84	
Sesquiterpènes hydrocarbonés			2,68	
Sesquiterpènes oxygénés			5,67	
Autres			1,39	

¹ composants listés par ordre d'éluion sur la colonne DB-5. RI_E — indices de rétention déterminés expérimentalement sur la colonne mentionnée par co-injection d'une série homologue de n-alcanes C8-C29. RI_L- indices de rétention de la littérature. tr — trace (<0,05 %). a— constituant identifié par la comparaison des spectres de masse avec la bibliothèque et la littérature Wiley [175]. b— constituant identifié par la comparaison de l'indice de rétention avec la littérature [176, 177, 178, 179, 180, 175]. c- identité du constituant confirmée par co-injection d'un échantillon authentique. d- molécules identifiées pour la première fois en Algérie.

L'analyse chimique de l'HE de *L. stoechas* a permis d'identifier 75 composés (soit un taux de 95,21 %) dont la teneur est supérieure ou égale à 0,05 %. Dans l'huile essentielle de *L. stoechas* étudiées, 12 % de molécules n'ont jamais été identifiés en Algérie soit 09 molécules. Ces derniers portent l'exposant *d* dans le Tableau 3.6.

Comme on peut l'observer, l'huile essentielle de *L. stoechas* contient une proportion élevée de monoterpènes, soit 85,47 %, ces derniers sont dominés par les monoterpènes oxygénés (alcools, esters, éthers, aldéhydes, cétones, lactones, phénols, éthers phénoliques) avec 80,84 %. La fenchone est le constituant principal de l'huile (40,78 %), alors que le camphre (9,76 %), l'acétate de myrtényle (8,94 %) et l'acétate de bornyle (5,10 %) constituent les deuxième, troisième et quatrième composants de la fraction monoterpénique oxygénée. Plusieurs monoterpènes oxygénés mineurs présentent des teneurs également significatives, tels que le myrténal (3,01 %), le 1,8 — cinéole (2,23 %), l' α -fenchol (2,14 %). Le deuxième groupe est constitué par les sesquiterpènes (8,35 %) représentés par le viridiflorol (2,46 %) et le ledol (1,20 %) comme constituants principaux de la fraction oxygénée. Seule une petite quantité relative d'autres composants aromatiques (1,39 %) a également été identifiée.

Il existe de nombreux rapports sur la composition chimique de l'HE de *L. stoechas* des pays du bassin méditerranéen. La plupart de ces études sont similaires à la nôtre où le chémotype est la fenchone. Ces indications montrent que la fenchone est présente comme composant majeur [181, 182, 41, 183, 184, 185, 167, 23, 166, 162, 161, 164, 186]. De plus, le camphre, l'acétate de myrtényle et l'acétate de bornyle sont indiqués comme constituants caractéristiques de l'HE de *L. stoechas*. En effet, d'autres chémotypes tels que le chémotype camphre [165] et le chémotype 1,8 — cinéole [187, 27] ont également été rapportés.

Dans d'autres populations de *L. stoechas*, l'HE était caractérisée par un rapport de deux composés comprenant la fenchone et le camphre, mais aussi le cinéole, l'acétate de myrtényle et l'acétate de linalyle en quantité variable [167,168]. En Turquie, un chémotype à 1,8 — cinéol/camphre a été mis en évidence par Arabaci et Bayram, [188]. Enfin, la pulégone, le menthone, le menthol et le carvacrol sont des composés majeurs de l'HE de *L. stoechas* originaire de Turquie [189,190], mais ces composés volatils n'ont pas été observés dans notre échantillon. Gören et *al.*, ont enregistré l'absence totale de fenchone et de camphre [189].

L'étude menée sur des populations de plusieurs espèces de *Lavandula* espagnoles et portugaises montre que, l'acétate de myrtényle a été marqué comme composant caractéristique des HEs de *L. stoechas* [181]. Nous avons observé que, notre HE diffère de toutes les autres HEs de *L. stoechas* par la présence d'un taux

élevé de viridiflorol (2,48 %). Cependant, notre HE ainsi que les HEs étudiées par Garcia-Vallejo, sont aussi caractérisées par l'absence totale de quelques composés comme le β — phéllandrène, le longifolène, le thymol, le *trans*-Verbénol [181].

L'HE de l'espèce *Lavandula stoechas* est généralement riche en monoterpènes [11, 10]. La différence de la composition chimique observée pourrait s'expliquer par une adaptation de la plante aux facteurs biotiques et abiotiques tels que, le climat spécifique aux régions de provenance des échantillons, aux facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol qui orientent la biosynthèse vers la formation préférentielle de produits précis [191, 192]. Chez la *Mentha piperita*, les nuits froides favorisent la sécrétion de menthol alors que les nuits tempérées favorisent celle du menthofurane [172].

De nombreux travaux ont porté sur l'influence du site de récolte, du cycle circadien et des saisons sur la variation de la composition chimique des HEs [193, 194]. Deux autres facteurs importants sont l'heure de la récolte du matériel végétal ainsi que le mois dans l'année. Le chauffage prolongé et puissant engendre en effet la dégradation de certaines molécules aromatiques.

Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire des hydrolyses, déprotonations, hydratations et cyclisation, mais aussi réarrangements, isomérisations, oxydations et ce d'autant plus que la distillation est longue et le pH est acide [195].

3.7 Résultats des Indices physiques

Les huiles essentielles ont aussi des propriétés physiques communes. Elles ne sont pas solubles dans l'eau, mais elles le sont dans les solvants organiques et les huiles végétales.

L'HE obtenue dans ce travail présente une densité relative égale à 0,946. Cette dernière a été mesurée à l'aide d'un densitomètre à 20 °C. Notre résultat concorde avec celui enregistré par Mohammedi [196]. L'indice de réfraction de l'HE est généralement supérieur à celui de l'eau (1), il est égal à 1,471.

3.8 Résultats des activités biologiques de l'huile essentielle de *L. stoechas*

3.8.1 Résultats de la toxicité aiguë

Selon la pharmacopée européenne, si la DL₅₀ est supérieure ou égale à 2 g/kg du poids corporel, l'HE est considérée comme non toxique dans les limites de l'utilisation de l'aromathérapie. Après l'administration par voie orale de l'HE à une dose unique (2 g/kg), les observations n'ont révélé aucun signe d'asthénie, de somnolence, d'anorexie, de diarrhée ou de réduction importante de la mobilité durant toute la période de l'expérimentation. Il est à noter que le composé le plus toxique est l'acide hydrocyanique (0,005 g/kg). Ce composé est absent dans notre HE. Ceci nous a permis de dire que l'HE obtenue dans ce travail n'est pas toxique. La DL₅₀ est donc supposée être supérieure à la dose limite testée. Selon la littérature, la DL₅₀ de l'HE de lavande varie de 3,8 à 6,20 g /kg de PC de souris [197, 35].

Un petit changement de comportement a été observé chez les souris qui se résume comme suit :

- Une hypoactivité est observée immédiatement. Cette activité sédatrice a duré jusqu'à 2 heures après le gavage.
- Une prise de poids normale est observée chez les souris du lot témoin et le lot traité par l'HE. Cette prise a persisté jusqu'à leur sacrifice au 14^{ème} jour (Figure 3.17).

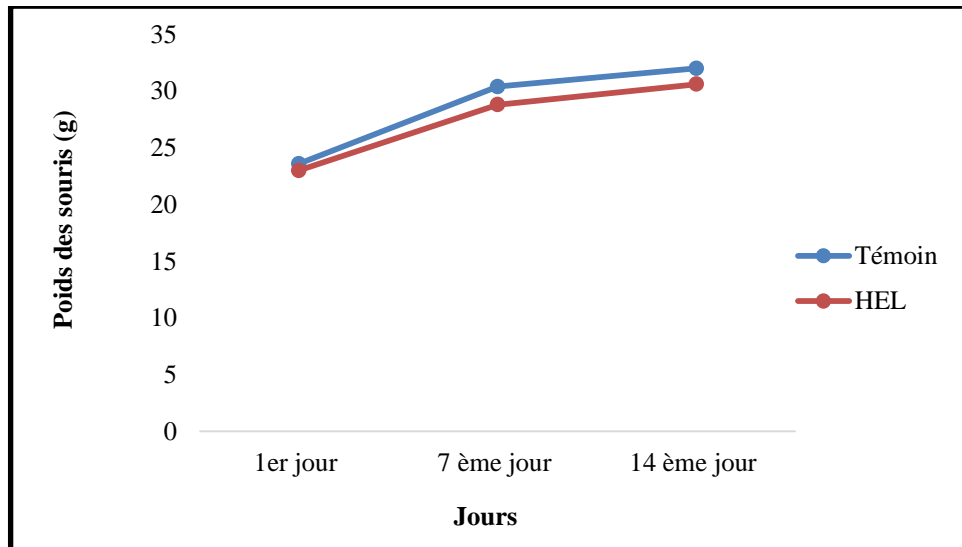


Figure 3.17 : Prise de poids des souris durant l'étude de la toxicité aiguë

Aucun signe de toxicité n'a été observé tel que la diminution de la sensibilité à la douleur, aux bruits ou à la locomotion (Tableau 3.7)

Tableau 3.7 : Effets de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* sur quelques paramètres physiologiques chez les souris

Période	2h	4h	J1	J7	J14
Pelage	N	N	N	N	N
Tremblement	N	N	N	N	N
Motilité	R	N	N	N	N
Réaction au bruit	N	N	N	N	N
Aspect des selles	N	N	N	N	N
Prise de poids	N	N	N	N	N
Nombre de morts	0	0	0	0	0

N= Normale ; R=réduit ; Dose : 2 g/kg

Aucun travail sur la toxicité aiguë de l'HE de *L. stoechas* n'a été réalisé. Selon la littérature, l'HE de lavande est très peu toxique et très bien toléré [198, 199].

Certains composés chimiques sont présents dans notre HE et s'avèrent toxiques. Ces molécules sont : limonène, linalool et acétate de linalyle [19]. En

l'occurrence, cette HE doit être utilisée avec modération surtout chez la femme enceinte et les enfants de moins de 3 ans

3.8.2 Résultats de la toxicité subaiguë

L'huile essentielle de *L. stoechas* n'a présenté aucun signe de toxicité pendant l'expérimentation qui a duré 28 jours.

Les résultats de la toxicité subaiguë de l'HE de *L. stoechas* sont répartis en sept points :

- Comportement des souris,
- Consommation alimentaire et hydrique,
- Evolution du poids corporel des souris,
- Masse relative des organes,
- Analyse des données hématologiques du sang,
- Analyse des constantes biochimiques du sang,
- Examen anatomopathologique des organes des souris.

✓ Comportement des souris

Durant toute la période de l'expérimentation, aucune mortalité n'a été observée aussi bien chez les souris du lot témoin que celles des lots de souris traitées par l'HE.

Les souris des lots témoins qui sont gavées par l'eau distillée + tween 80 (Na Cl, 0,9 %) et ceux des lots traités par l'HE à la dose de 125 mg/kg, 250 mg/kg et 500 mg/kg n'ont présenté aucun comportement anormal. Ces résultats indiquent que l'HE étudiée ne possède aucun effet toxique sur les souris même à dose répétée.

Selon Ez zoubi et *al.*, l'extrait hydro-éthanolique, les flavonoïdes, les tanins et le mucilage de la partie aérienne de *L. stoechas* originaire du Maroc n'ont pas présenté de signe de toxicité ni de mortalité durant toute l'expérimentation [160]. Les mêmes résultats ont été observés par l'étude menée sur l'HE de *L. stoechas* originaire de la Tunisie [200].

✓ Suivi de la consommation hydrique et alimentaire

Les consommations hydriques et alimentaires des souris de tous les lots ont été surveillées de façon hebdomadaire pendant toute la durée de l'expérimentation. Les résultats sont représentés dans les tableaux 3.8 et 3.9 sous forme de moyenne \pm Erreur type de la moyenne.

Les résultats obtenus montrent que la quantité de l'alimentation consommée par les mâles est plus importante par rapport à celle des femelles (tableau 3.8). Cette observation s'inscrit chez tous les lots de souris à savoir les lots témoins et les lots traités par l'HE. La consommation des granules par les souris mâles et femelles des lots témoins et celles des lots traités par l'HE à 500mg/Kg et 250 mg/kg est plus importante durant la première semaine de l'expérimentation, ensuite elle diminue. Au contraire, le lot des souris mâles traitées par l'HE à 125 mg/kg a montré une stabilité dans la consommation alimentaire durant les quatre semaines.

Tableau 3.8 : Consommation alimentaire des souris mâles et femelles

Jours / lots		J7	J14	J21	J28
Témoins	Mâles	41,88 ± 1,03	36,60 ± 0,92	23,80 ± 0,85	28 ± 0,29
	Femelles	29,5 ± 0,39	30,75 ± 0,86	18 ± 0,11	19,1 ± 0,46
HE à 500 mg/kg	Mâles	36,3 ± 0,63	35 ± 0,76	32 ± 1,55	14,0 ± 0,42
	Femelles	27,4 ± 0,58	27 ± 0,85	25,6 ± 0,78	11 ± 0,52
HE à 250 mg/kg	Mâles	42,75 ± 1,18	29,29 ± 0,97	32,14 ± 0,40	32 ± 0,42
	Femelles	29,75 ± 1,50	19,29 ± 0,6	20,57 ± 0,95	20,25 ± 0,75
HE à 125 mg/kg	Mâles	40 ± 0,49	39,67 ± 0,71	42,71 ± 0,6	44,17 ± 0,4
	Femelles	36,29 ± 0,68	30,40 ± 1,22	27,29 ± 0,47	27,33 ± 0,33

Les résultats sont exprimés en moyenne ± Erreur standard moyenne (SEM) ; n=5 pour chaque groupe ; la consommation alimentaire est exprimée en (g).

La diminution de la consommation alimentaire observée dans certains lots serait éventuellement due à l'effet anorexique probablement exercé par les HEs.

La prise de nourriture est régulée par l'hypothalamus qui dépend de l'interaction entre deux régions à savoir le centre de l'appétit et le centre de la satiété. La stimulation du centre de l'appétit déclenche un comportement de prise alimentaire chez les animaux conscients et sa destruction chez des animaux sains produit une anorexie sévère et mortelle. Toutefois, une stimulation du centre de satiété entraîne l'arrêt de la prise alimentaire [201].

Les figures 3.18 et 3.19 représentent la consommation hydrique des souris durant les quatre semaines de l'expérimentation.

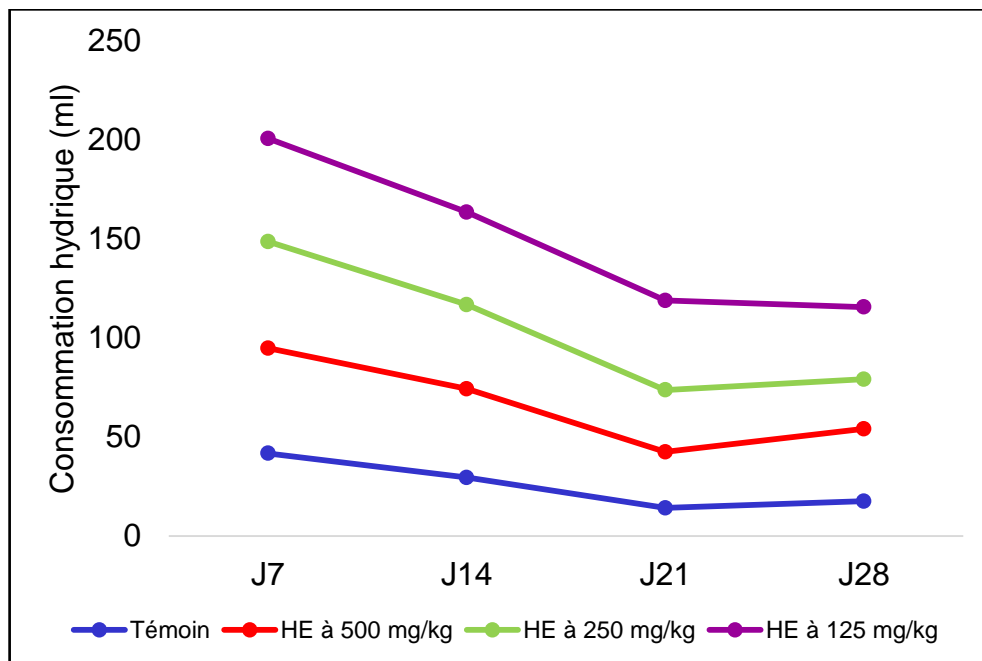


Figure 3.18 : Résultats de la consommation hydrique chez les souris mâles

Tableau 3.9 : Consommation hydrique des souris mâles et femelles

Jours / lots		J7	J14	J21	J28
Témoins	Mâles	41,75 ± 0,45	29,50 ± 0,96	14,17 ± 0,93	17,57 ± 0,57
	Femelles	30,36 ± 0,68	29,50 ± 0,50	18,20 ± 0,38	23 ± 1,58
HE à 500 mg/kg	Mâles	53 ± 0,71	44,8 ± 1,48	28,3 ± 1,10	15,3 ± 0,87
	Femelles	20,9 ± 0,60	20,2 ± 0,82	19,3 ± 1,20	8,4 ± 0,45
HE à 250 mg/kg	Mâles	53,83 ± 1,61	42,43 ± 1,58	31,29 ± 1,93	25 ± 0,71
	Femelles	20,50 ± 1,17	18,71 ± 0,74	18,86 ± 1,37	18,13 ± 0,92
HE à 125 mg/kg	Mâles	52 ± 0,49	46,71 ± 0,68	45,14 ± 0,91	36,40 ± 0,87
	Femelles	43,86 ± 0,46	26,83 ± 0,79	24,57 ± 0,57	24,67 ± 0,42

Les résultats sont exprimés en moyenne ± Erreur standard moyenne (SEM) ; n=5 pour chaque groupe ; la consommation hydrique est exprimée en (ml).

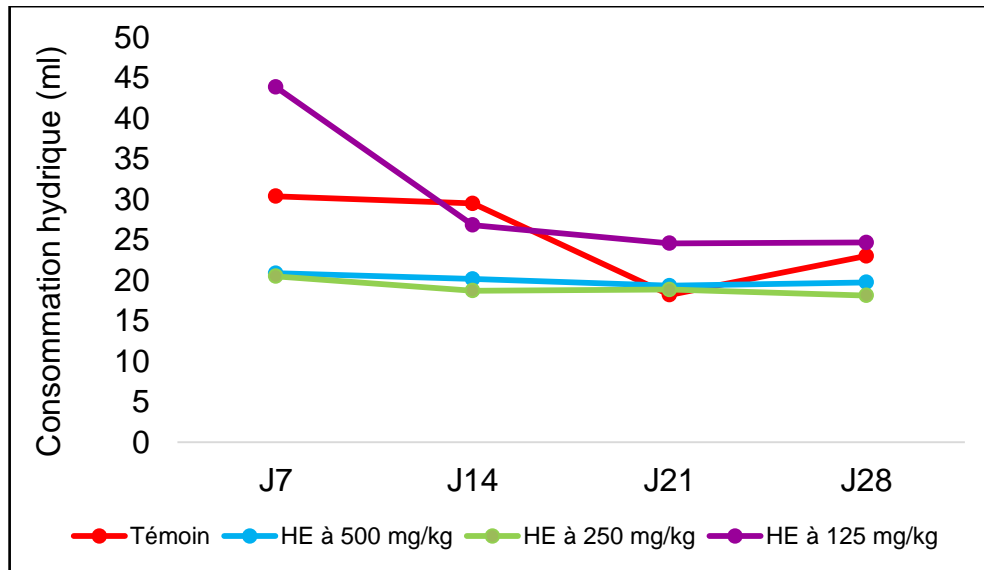


Figure 3.19 : Résultats de la consommation hydrique chez les souris femelles

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté qu'il y a une légère différence dans le volume d'eau consommée pour les différents groupes de souris traitées par rapport au lot de souris témoin (tableau 3.9).

Cette légère diminution est probablement due aux facteurs du stress et aux conditions d'élevage des souris. Selon Folz et Ullman-Culleré [202], en cas de déshydratation, le corps subit un déficit en eau. Les cellules du corps et leurs tissus se rétrécissent à mesure qu'elles perdent de l'eau. Les animaux déshydratés ont tendance à avoir une apparence particulière liée à la perte d'eau dans ces tissus : les yeux sont enfoncés dans leur orbite, l'abdomen se creuse, les muqueuses s'assèchent et le poil devient terne. On peut observer ces signes chez les animaux qui ont subi une perte de poids appréciable. Tous ces symptômes n'ont pas été décrits chez les souris de notre expérimentation.

✓ Évolution du poids des souris

Pour l'essai de la toxicité subaiguë, l'évolution du poids chez les souris soumises à l'essai est suivie chaque semaine (J 0, J 7, J14, J 21 et J 28). Les figures 3.20 et figure 3.21 représentent les moyennes des poids chez les souris mâles et femelles témoins et celles traitées par l'HE.

Les résultats obtenus montrent une prise de poids normale chez les souris mâles et femelles des lots traités et témoins jusqu'aux jours de leur sacrifice à savoir le 29^{ème} jour (Figures 3.20 et 3.21). À la lumière de ces résultats, on peut déduire, que nous n'avons pas observé de signes de toxicité chez les souris traitées par l'HE de *L. stoechas* et une tolérance des souris pour cette HE.

Le changement du poids corporel est utilisé comme un indicateur des effets indésirables des composés chimiques ingérés. La perte et/ou la prise de poids sont corrélées à l'état physiologique de l'animal. Ainsi, ce changement du poids peut être expliqué par une réduction de la consommation des aliments, mais aussi par les possibilités d'interactions dose/absorption et par la diminution et/ou l'augmentation de la quantité de nourriture absorbée. Toutefois, une perte d'appétit entraîne souvent une perte de poids due à des perturbations dans le métabolisme des glucides, des protéines ou des graisses [203, 129, 204].

Les études menées sur *L. stoechas* originaire respectivement de la Turquie et du Maroc montrent une augmentation du poids corporel des souris et des rats [200, 160]. Ces résultats concordent avec ceux obtenus dans le présent travail.

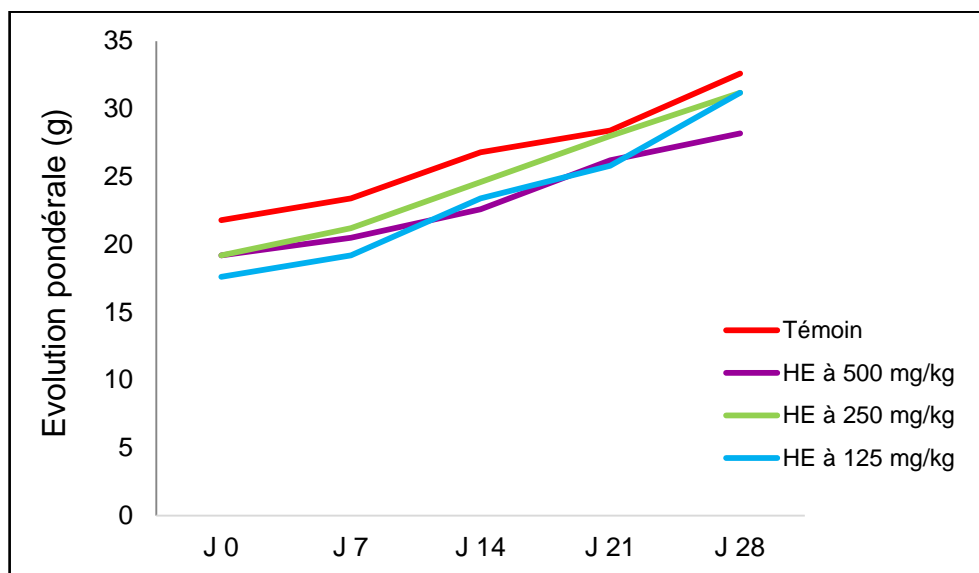


Figure 3.20 : Résultats de l'évolution pondérale chez les souris mâles

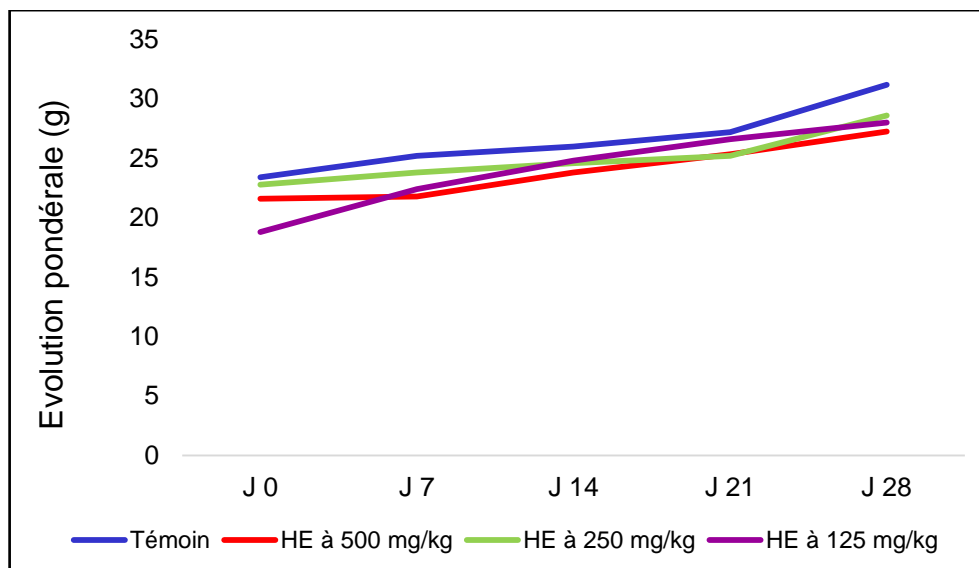


Figure 3.21 : Résultats de l'évolution pondérale chez les souris femelles

Le Tableau 3.10 présente le gain de poids relatif des souris mâles et femelles des lots traités et des lots témoins. Les résultats obtenus montrent que le gain de poids relatif est plus important chez les souris mâles par rapport aux souris femelles pour les lots traités et témoins. Ce gain peut être dû au fait que les souris mâles consomment plus de nourriture que les souris femelles. Toutefois, les plus grandes valeurs du gain de poids sont observées chez les lots de souris ayant reçu l'HE à une dose de 125 mg/kg.

L'étude statistique montre qu'il y a une différence significative à J0 et J28 ($p \leq 0,05$) entre les souris femelles des lots témoins et les trois lots de souris traitées par l'HE à savoir 500 mg/kg, 250 mg/kg et 125 mg/kg. Cependant, chez les mâles une différence hautement significative enregistrée entre le témoin et l'HE à 500 mg/kg à J28. Toutefois, cette perte de poids chez ces souris peut être due à l'effet de l'HE. Concernant le gain de poids relatif, aucune différence significative n'est constatée entre les souris femelles du lot témoin et celles traitées par l'HE. Néanmoins, les souris mâles montrent une différence significative à la concentration de 125 mg/kg ($p \leq 0,05$).

Tableau 3.10 : Résultats du gain de poids relatif chez les souris mâles et femelles

Jours / Traitements		Témoin	HE à 500 mg/kg	HE à 250 mg/kg	HE à 125 mg/kg
J0	Mâles	21,8 ± 1,30	19,2 ± 1,3	19,2 ± 1,79	17,6 ± 0,89*
	Femelles	23,4 ± 0,89	21,6 ± 1,14*	22,8 ± 1,30*	18,8 ± 0,84*
J28	Mâles	32,6 ± 0,55	28,2 ± 0,8*	31,2 ± 0,45	31,2 ± 1,30
	Femelles	31,2 ± 0,84	27,25 ± 0,96*	28,6 ± 0,55*	28 ± 1,41*
GPR	Mâles	50 ± 8,83	47,41 ± 1,1	63,4 ± 12,51	77,71 ± 3,37 *
	Femelles	33,5 ± 6,66	24 ± 6,52	25,8 ± 7,40	49,41 ± 3,36

Les résultats sont exprimés en Moyenne ± Ecart type ; le poids des souris à J0 et J28 est exprimé en (g) ; le GPR est exprimé en %. * : différence significative avec le témoin ($p \leq 0,05$).

✓ Masse absolue et relative des organes

Les organes prélevés ont été observés sous loupe binoculaire puis pesés. Les résultats du poids absolu des organes sont représentés dans le tableau 3.11. Les résultats du poids relatif des organes des lots traités et témoins sont détaillés dans le tableau 3.12.

Tableau 3.11 : Résultats du poids absolu des organes des souris mâles et femelles

Lots / organes		Reins	Foies	Rates	Poumons	Cœurs	Testicules/ ovaires
Témoin	Mâles	0,4658 ± 0,07	1,4374 ± 0,12	0,1382 ± 0,02	0,1954 ± 0,04	0,1874 ± 0,02	0,1903 ± 0,03
	Femelles	0,3394 ± 0,05	1,3324 ± 0,09	0,1278 ± 0,02	0,1924 ± 0,03	0,1847 ± 0,04	0,015 ± 0
HE à 500 mg/kg	Mâles	0,3559 ± 0,03*	1,1848 ± 0,07*	0,0879 ± 0,01*	0,1778 ± 0,02	0,1543 ± 0,02	0,2092 ± 0,04
	Femelles	0,2754 ± 0,04	1,0484 ± 0,14*	0,0865 ± 0,03*	0,1543 ± 0,04	0,1379 ± 0,03	0,013 ± 0
HE à 250 mg/kg	Mâles	0,4213 ± 0,04	1,5741 ± 0,09	0,1131 ± 0,03	0,1828 ± 0,07	0,1505 ± 0,02*	0,2575 ± 0,01
	Femelles	0,2754 ± 0,02	1,1744 ± 0,11	0,1111 ± 0,01	0,1702 ± 0,06	0,1524 ± 0,02	0,013 ± 0
HE à 125 mg/kg	Mâles	0,4014 ± 0,03	1,691 ± 0,13*	0,1151 ± 0,01	0,1939 ± 0,02	0,1658 ± 0,02	0,2161 ± 0,07
	Femelles	0,2865 ± 0,04	1,3768 ± 0,15	0,1287 ± 0,02	0,1884 ± 0,02	0,1344 ± 0,01*	0,014 ± à

Les résultats sont exprimés en Moyenne ± écart type ; n=5 pour chaque groupe ; le poids est exprimé en « g », * : différence significative avec le témoin ($p \leq 0,05$).

Tableau 3.12 : Résultats du poids relatif des organes de souris mâles et femelles

Lots / organes		Reins	Foies	Rates	Poumons	Cœurs	Testicules/ ovaires
Témoin	Mâles	1,5 ± 0,25	4,61 ± 0,44	0,44 ± 0,07	0,63 ± 0,13	0,6 ± 0,08	0,61 ± 0,11
	Femelles	1,13 ± 0,18	4,45 ± 0,43	0,43 ± 0,09	0,64 ± 0,10	0,62 ± 0,14	0,05 ± 0,01
HE à 500 mg/kg	Mâles	1,28 ± 0,11	4,28 ± 0,47	0,32 ± 0,03*	0,64 ± 0,09	0,56 ± 0,08	0,76 ± 0,16
	Femelles	1,04 ± 0,15	3,96 ± 0,54	0,33 ± 0,11*	0,58 ± 0,15	0,52 ± 0,10	0,05 ± 0
HE à 250 mg/kg	Mâles	1,35 ± 0,14	5,05 ± 0,28	0,36 ± 0,08	0,59 ± 0,21	0,48 ± 0,06*	0,83 ± 0,05
	Femelles	1,08 ± 0,06	4,59 ± 0,42	0,43 ± 0,04	0,67 ± 0,23	0,59 ± 0,06	0,05 ± 0,01
HE à 125 mg/kg	Mâles	1,32 ± 0,06	5,56 ± 0,24*	0,38 ± 0,04	0,64 ± 0,06	0,55 ± 0,10	0,7 ± 0,23
	Femelles	1,07 ± 0,16	5,10 ± 0,55	0,48 ± 0,06	0,7 ± 0,06	0,5 ± 0,06*	0,05 ± 0,01

Les résultats sont exprimés en Moyenne ± écart type ; n=5 pour chaque groupe ; le poids est exprimé en « g », * : différence significative avec le témoin ($p \leq 0,05$).

Les résultats obtenus montrent que le poids des organes des souris mâles est plus important que celui des souris femelles. Aucune différence significative n'est observée dans la masse relative des reins chez les souris mâles et femelles des lots témoins par rapport aux lots traités par l'HE. Une légère augmentation du poids du foie dans le lot de souris traitées par l'HE de *L. stoechas* à la dose 125 mg / kg a été observée. Néanmoins, une différence significative est enregistrée au niveau de la rate chez les souris mâles et femelles traitées par l'HE à la dose de 250 mg / kg. Le cœur des souris mâles traitées par l'HE à 250 mg / kg et des souris femelles qui ont reçu l'HE à 125 mg / kg montrent une différence significative par rapport au souris mâles et femelles du lot témoin. Ces différences dans le poids des organes des souris peuvent être due au fait que le poids des souris au début et à la fin de l'expérimentation diffère.

L'augmentation du poids du foie peut être liée à une congestion par réservation du sang dans le foie [205]. Cependant, ces résultats nécessitent, des analyses plus approfondies pour connaître l'effet de l'HE sur ces organes, car le poids relatif des organes est considéré comme étant un indicateur relativement sensible dans les études de la toxicité [206, 207].

Selon Raza *et al.*, [207], ces résultats suggèrent que l'HE de *L. stoechas* a des effets sur certains organes étudiés. Généralement, le changement du poids des organes internes est un indice de toxicité après l'exposition à une substance toxique. Ces résultats pourront être confirmés par l'étude histopathologique.

Les changements dans le poids du cœur et de la rate n'ont pas beaucoup d'implications dans la toxicité en raison du rôle limité de ces organes dans l'élimination des substances nocives du corps [208, 209].

✓ Bilan hématologique

Les paramètres hématologiques sont représentés dans le tableau 3.13. Des différences significatives ont été enregistrées dans les valeurs de GB, GR, HB, HCT, PLT et CCMH des souris des lots traités comparées à celles des lots témoins ($p \leq 0,05$).

D'après Gregg et Voigt, [210] ; Mukinda et *al.*, [211], l'analyse des paramètres sanguins est importante car elle donne des informations sur le système hématopoïétique (évaluation des cellules de la lignée myéloïde), sur l'apparition d'allergies (études des globules blancs) et sur les effets intravasculaires comme l'hémolyse. Ces données sont l'une des cibles les plus exposées aux substances toxiques. Ils sont aussi des marqueurs importants du statut physiologique et pathologique chez l'homme et l'animal [212, 213, 214].

✓ Bilan biochimique

Les cellules hépatiques (hépatocytes) ont un rôle dans la neutralisation des toxines. Les hépatocytes interviennent dans la détoxification des toxines endogènes et exogènes. Néanmoins, le rein a pour rôle l'élimination des déchets et l'épuration du sang [215]. Ainsi, le bon fonctionnement de ces deux organes est nécessaire à la survie de l'organisme [216]. Ainsi, l'analyse de la fonction hépatique et rénale est donc très importante dans l'évaluation de la toxicité des extraits végétaux et des médicaments.

Le tableau 3.14 représente les résultats du bilan biochimique des souris mâles et femelles des lots témoins et des lots traités par l'HE de *L. stoechas*.

Il est évident que le signe des dommages hépatiques est la fuite d'enzyme cellulaire dans le plasma. Les transaminases (ALAT et ASAT) sont des enzymes ayant une activité métabolique importante à l'intérieur des cellules, l'augmentation de leurs taux sérique reflète une lésion cellulaire, en particulier au niveau hépatique [217, 218].

Selon Filippin et *al.*, [219] ; Ez zoubi et *al.*, [160] et Etame loe et *al.*, [220] , l'ALAT est un marqueur spécifique des lésions hépatiques. Il se produit plus fréquemment dans le foie, or l'ASAT est également présent dans le cœur, les muscles squelettiques, les reins, le cerveau, le pancréas et les cellules sanguines. Au niveau du foie, l'ALAT est confinée au cytoplasme, tandis que l'ASAT se retrouve à la fois dans les mitochondries (80 %) et dans le cytoplasme (20 %) [221, 220].

La fonction rénale est évaluée par le dosage sérique de l'urée et de la créatinine. L'élévation de la créatinine sérique est un bon indicateur de la fonction rénale. Néanmoins, l'urée sérique est souvent considérée comme un prédicteur de la fonction rénale plus fiable que la créatinine sérique [222, 220].

Les résultats des paramètres biochimiques obtenus montrent que l'HE de *L. stoechas* a induit des changements statistiquement significatifs chez les lots des souris mâles et femelles traités par rapport aux souris des lots témoins ($p \leq 0,05$). D'après ce résultat, on suggère que l'HE étudiée peut éventuellement présenter une hépatotoxicité. Ces résultats seront éventuellement confirmés par l'étude histopathologique des organes. Dans la présente étude, la diminution de la concentration de la créatinine (différence significative ($p \leq 0,05$) chez les souris mâles traitées par l'HE à 250 mg / kg) et particulièrement de l'urée dans les lots de souris mâles et femelles traitées par l'HE ne peuvent à eux seuls indiquer une altération de la fonction rénale. Sachant que l'étude histologique n'a montré aucune altération de la structure rénale, ce résultat peut être expliqué par leur métabolisation et élimination rapide [223]. Cependant, il est connu que la concentration sérique de la créatinine varie considérablement car elle est étroitement liée à la masse musculaire, au métabolisme musculaire et au poids corporel de chaque individu composant l'échantillonnage [224].

Notre étude présente des valeurs du bilan hématologiques et biochimiques différentes de celles observées par d'autres auteurs pour la même espèce de souris [224]. Ces divergences peuvent être justifiées par les différentes méthodologies appliquées, aux équipements et aux réactifs pour les dosages ainsi que par l'utilisation d'analyses manuelles ou automatisées [224]. Des facteurs supplémentaires, tels que : le sexe, l'âge, la lignée, le stress environnemental, le site de collecte et la méthode de confinement, sont également des sources de variation des valeurs biochimiques [225].

En 2016, Ez zoubi et *al.*, ont mené une étude sur l'extrait hydro-éthanolique, les flavonoïdes, les tanins et le mucilage produits par la partie aérienne de *L. stoechas* originaire du Maroc [160]. Les résultats ne montrent pas d'altération des fonctions hépatiques et rénales chez les souris témoins et traitées. Ainsi aucune

modification des paramètres biochimiques et hématologiques n'a été constatée [160].

Les résultats obtenus corroborent avec ceux du laboratoire Charles river (North American Colonies) [226]. Ce dernier a mené une étude sur le profil hématologique et biochimique des souris Balb/c. L'étude menée en 2017 au Portugal par Barbosa et *al.*, [224] sur le profil hématologique et biochimique des souris Balb/c ne concordent pas avec les nôtres. Ces différences dans les valeurs peuvent être due à de nombreuses variables à savoir : la variation génétique, les conditions d'alimentation et de l'environnement dans lequel ces animaux sont soumis (la température, l'humidité relative, la ventilation, l'éclairage, le bruit, la manipulation, la nourriture, l'eau, les agents pathogènes et le contact avec d'autres animaux). Toutefois, l'environnement dans lequel les rongeurs sont maintenus interfère directement dans leur métabolisme et par conséquent, dans les valeurs hématologiques et biochimiques de l'animal [227]. Les variations dans les valeurs des globules rouges chez la souris peuvent être dues à la présence des globules rouges immatures dans la circulation sanguine périphérique qui sont indispensables à l'action du système endocrinien de la rate et du foie [228]. La variation dans le taux de glucose peut être expliquée par une altération de l'action de l'insuline ou à une sécrétion inadéquate de l'insuline. Ces changements dans les valeurs de la glycémie peuvent être dus aussi à l'état physiologique des souris et à leurs vulnérabilités [229].

Tableau 3.13 : Résultats du bilan hématologique des souris mâles et femelles des lots témoins et traités

Lots/ paramètres	Témoin		HE à 500 mg/kg		HE à 250 mg/kg		HE à 125 mg/kg	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
GB ($10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	12,85 \pm 0,61	6,75 \pm 0,06	10,47 \pm 2,63	9,47 \pm 0,21*	12,4 \pm 2,70	9,27 \pm 1,81*	5,47 \pm 0,75*	9,53 \pm 0,55*
GR ($10^6 \mu\text{l}^{-1}$)	10,87 \pm 0,61	9,87 \pm 0,56	10,63 \pm 0,20	11,13 \pm 0,36*	9,68 \pm 0,15	9,32 \pm 0,28	9,47 \pm 0,95*	9,67 \pm 0,16
HB (g dl ⁻¹)	16,45 \pm 0,70	16,15 \pm 0,81	16,67 \pm 0,29	15,73 \pm 0,87	14,60 \pm 0*	14,37 \pm 0,06*	14,07 \pm 1,25*	15,57 \pm 0,60*
HCT (%)	54,15 \pm 2,41	51,6 \pm 2,31	54,07 \pm 0,15	54,63 \pm 0,15	50,75 \pm 0,15	47,90 \pm 0,10*	47,8 \pm 5	51,63 \pm 1,31
MCV (fl)	49,83 \pm 0,57	52,3 \pm 1,56	50,97 \pm 0,81	48,87 \pm 1,75*	52,45 \pm 0,95*	51,43 \pm 1,42	50,6 \pm 0,20	53,27 \pm 0,50
MCH (pg)	15,15 \pm 0,21	16,63 \pm 0,84	15,77 \pm 0,06*	13,93 \pm 1,37*	15,10 \pm 0,20	15,27 \pm 0,55	14,93 \pm 0,21	16,07 \pm 0,35
CCMH (gdI ⁻¹)	30,43 \pm 0,10	31,3 \pm 0,80	30,67 \pm 0,70	28,7 \pm 1,59*	28,80 \pm 0,10*	30 \pm 0,17	29,5 \pm 0,46	30,2 \pm 0,40
PLT ($10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	1279,50 \pm 14,29	844 \pm 84,37	797,67 \pm 28,57**	1130,3 \pm 174,3	805,33 \pm 28,50**	774,33 \pm 103	490 \pm 45**	753,33 \pm 194,50

LYM (%)	60,30 ± 3,19	78,63 ± 2,61	80,03 ± 10,05	73,73 ± 2,63	85,90 ± 10,50	90,57 ± 4,28	78,37 ± 17,75	86,40 ± 6
---------	--------------	--------------	---------------	--------------	---------------	--------------	---------------	-----------

Les résultats sont exprimés en Moyenne ± ET ; n= 3 pour chaque groupe ; - : Valeurs non détectées

GB : Globule blanc ; GR : Globule rouge ; HB : hémoglobine ; HCT : Hématocrite ; MCV : volume globulaire moyen ; MCH : teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine ; CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine PLT : plaquettes, LYM : Lymphocytes. * : différence significative avec le témoin ($p \leq 0,05$) ; ** : différence hautement significative avec le témoin ($p \leq 0,001$)

Tableau 3.14 : Résultats du bilan biochimique des souris mâles et femelles des lots témoins et traités

Lots/ paramètres	Témoin		HE à 500 mg/kg		HE à 250 mg/kg		HE à 125 mg/kg	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
ALAT (U l ⁻¹)	53 ± 3	75 ± 5	58,33 ± 2,89	51,67 ± 2,89*	61,67 ± 2,89*	55 ± 8,66*	67,33 ± 2,52*	66,67 ± 7,64
ASAT (U l ⁻¹)	133 ± 5,75	120 ± 15	91,67± 2,89**	81,33 ± 3,21*	85 ± 5**	83,33 ± 7,64*	54 ± 1**	91,67 ± 2,89*
Urée (mg l ⁻¹)	0,38 ± 0,03	0,47 ± 0,06	0,32 ± 0,03*	0,37 ± 0,03	0,23 ± 0,03**	0,27 ± 0,08*	0,2 ± 0**	0,28 ± 0,03*
Créatinine (mg l ⁻¹)	7,73 ± 0,34	7 ± 1	6 ± 1	5,67 ± 1,15	5 ± 0*	5,33 ± 0,58	6 ± 1	7 ± 2,65
Albumine (g dl ⁻¹)	38,33 ± 2,89	47 ± 3	65 ± 5*	56,67 ± 2,89	63,33 ± 10,41*	58,33 ± 2,89	55 ± 0	58,33 ± 7,64*
Protéines totales (g dl ⁻¹)	61,67 ± 2,89	60 ± 0	53 ± 2,65*	53,33 ± 2,89	51,67 ± 2,89*	50 ± 5*	51,67 ± 2,89*	55 ± 0
Cholestérol Total (g l ⁻¹)	1,27 ± 0,25	1,28 ± 0,03	1,28 ± 0,01	1,25 ± 0,1	1,33 ± 0,45	1,28 ± 0,03	1,4 ± 0,2	1,08 ± 0,21

Triglycéride (g l ⁻¹)	1,77 ± 0,13	1,63 ± 0,06	0,83 ± 0,08**	1,15 ± 0,05	0,88 ± 0,28**	1,18 ± 0,21	1,35 ± 0,1	1,45 ± 0,61
Glycémie (g l ⁻¹)	1,14 ± 0,11	1,59 ± 0,23	1,02 ± 0,23	1,13 ± 0,23*	1,28 ± 0,03	1,16 ± 0,06*	1,39 ± 0,21	1,19 ± 0,07*

Les résultats sont exprimés en Moyenne ± ET ; n= 3 pour chaque groupe ; ASAT : Aspartate aminotransférase ; ALAT : Alanine aminotransférase ; * : différence significative avec le témoin ($p \leq 0,05$) ; ** : différence hautement significative avec le témoin ($p \leq 0,001$)

✓ Examen histopathologique des organes

L'observation microscopique sous loupe binoculaire des organes à savoir, le cœur, le foie, les reins, la rate, les poumons, les ovaires et les testicules n'a révélé aucune anomalie morphologique et/ou présence d'hémorragie qui pourrait être dues à l'administration de l'HE. Ainsi, nous avons observé que la taille et la forme des organes sont normales.

Les résultats de l'examen histopathologique sont indiqués dans la figure 3.22 A-B et figure 3.23 A-B. D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué que le foie et les reins des souris mâles et femelles des lots traités et des lots témoins montrent une architecture hépatique et rénale conservée, sans signe de cytolyse, ni d'apoptose et ni d'inflammation (absence de polynucléaire et de lymphocytes). Aucune lésion organique ni fibrose n'a été enregistrée au niveau rénal ou hépatique. Des signes de congestion sans hémorragie ont été observés dans les lots traités et les lots témoins. Ceci peut être dû au sacrifice.

Les coupes réalisées au niveau des reins des souris mâles et femelles des lots traités et des lots témoins ne présentent aucune infiltration cellulaire au niveau de la capsule de Bowman. Les glomérules et les tubules des souris étudiées (tube collecteur) sont intacts.

Aucun travail similaire n'a été réalisé sur les coupes histologiques des reins et/ou du foie des souris traitées par l'HE de *L. stoechas*.

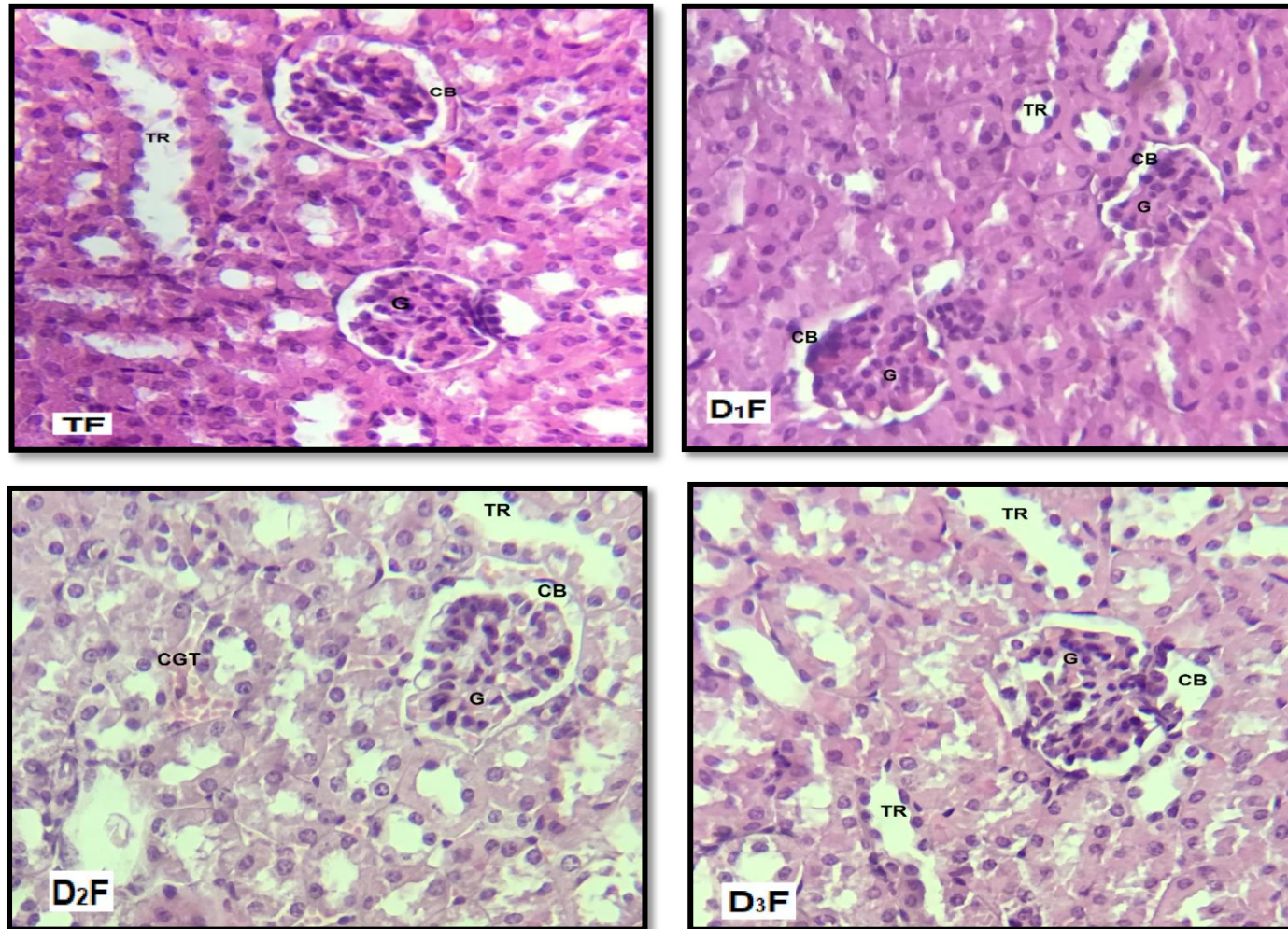


Figure 3.22 A: Histologie du rein des souris femelles témoins (TF), des souris traitées : HE à 500 mg/kg (D1F), HE à 250 mg/kg (D2F), HE à 125 mg/kg (D3F) CGT : Congestion, G : glomérule, TR : tubule rénal, CB : chambre ou espace de Bowman. Coloration H&E (GX 40) (Originale 2018)

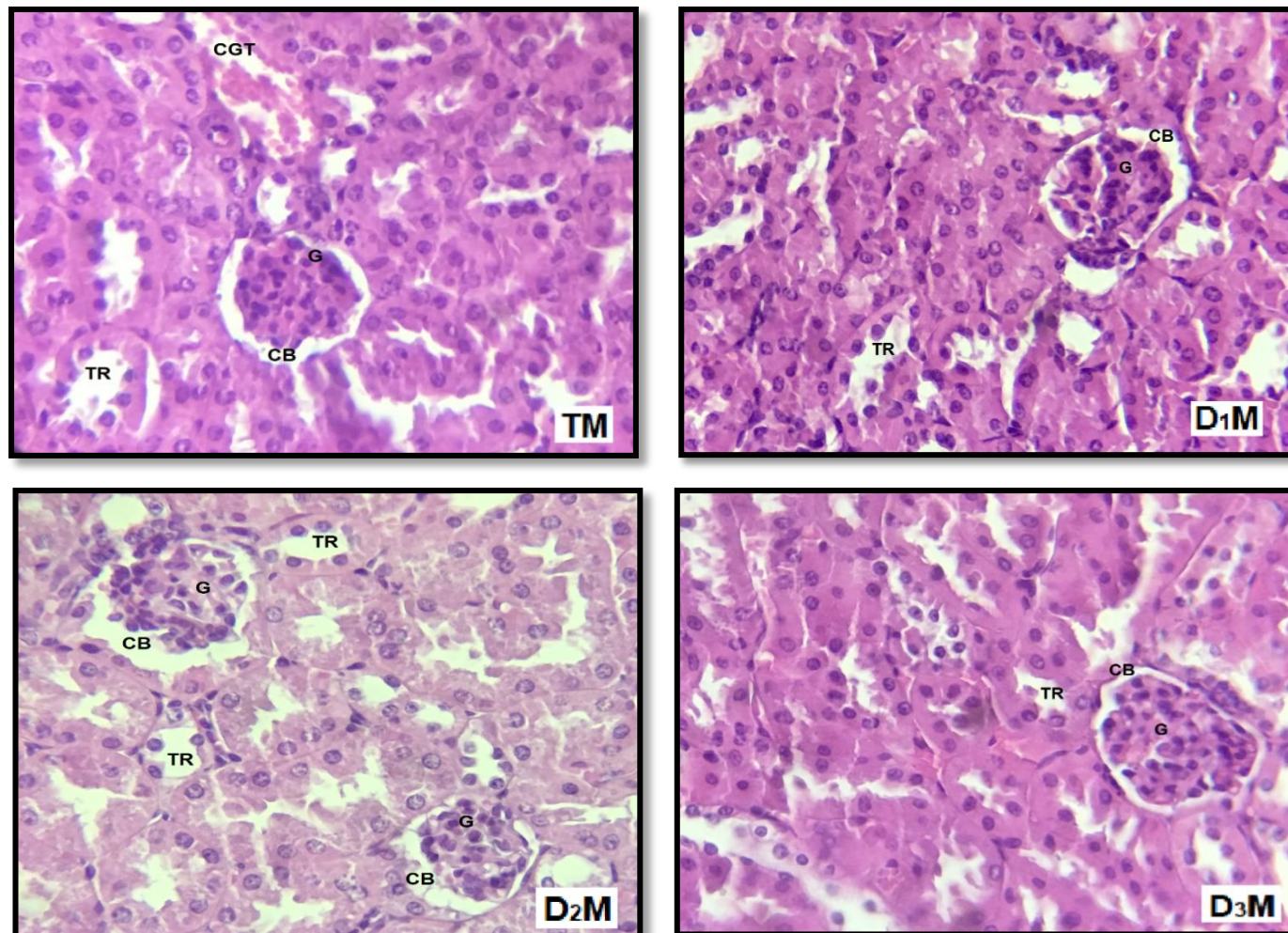


Figure 3.22 B : Histologie du rein des souris mâles témoins (TM), des souris traitées : HE à 500 mg/kg (D1M), HE à 250 mg/kg (D2M), HE à 125 mg/kg (D3M) CGT : Congestion, G : glomérule, TR : tubule rénal, CB : chambre ou espace de Bowman. Coloration H&E (GX 40) (Originale 2018)

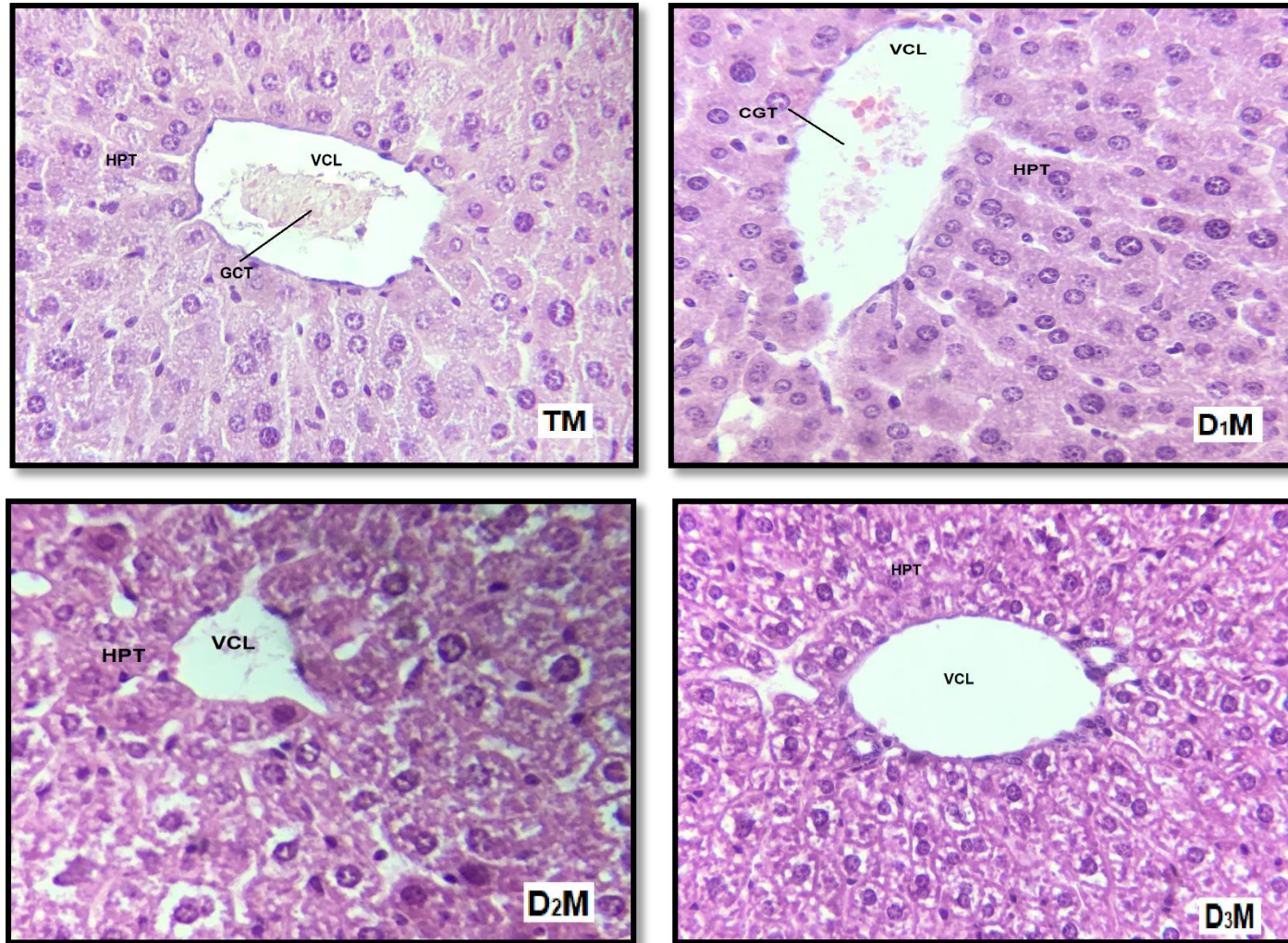


Figure 3.23 A: Histologie du foie des souris mâles témoins (TM), des souris traitées : HE à 500 mg/kg (D1M), HE à 250 mg/kg (D2M), HE à 125 mg/kg (D3M); VCL : veine centrolobulaire ; CGT : congestion ; HPT : hépatocytes. Coloration H&E (GX40) (Originale 2018)

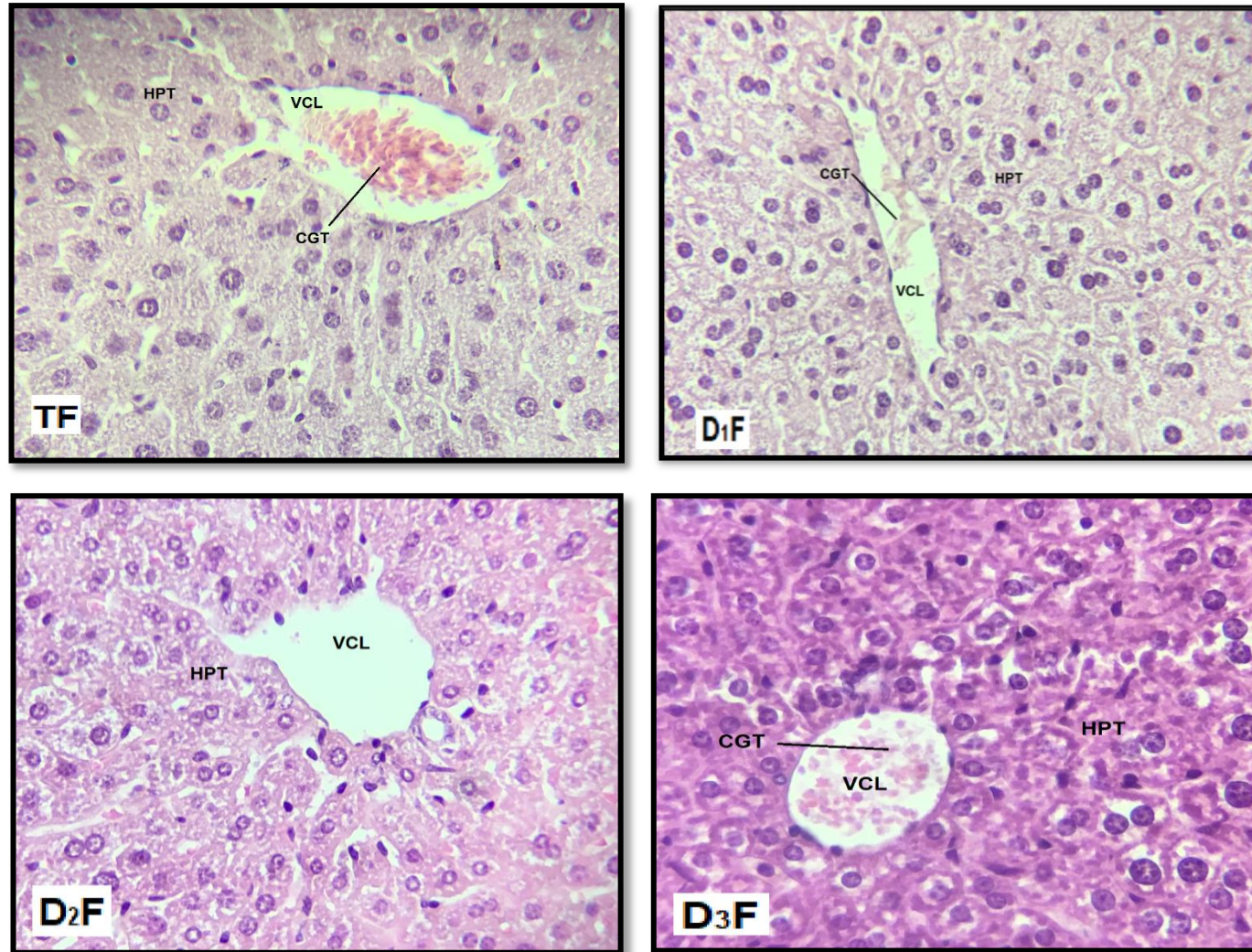


Figure 3.23 B: Histologie du foie des souris femelles témoins (TF), des souris traitées : HE à 500 mg/kg (D1F), HE à 250 mg/kg (D2F), HE à 125 mg/kg (D3F) ; VCL : veine centrolobulaire ; CGT : congestion ; HPT : hépatocytes. Coloration H&E (GX40) (Originale 2018)

3.8.3 Résultats de l'activité antimicrobienne

L'huile essentielle de *L. stoechas* a été testée in vitro afin d'évaluer son pouvoir antimicrobien sur dix-sept microorganismes pathogènes et phytopathogènes. Elle a montré un effet appréciable sur la majorité des espèces utilisées. Les souches évaluées par la méthode de l'aromatogramme ont agi de manières différentes. Le tween 80 est ajouté dans le milieu de culture pour améliorer la solubilité de l'HE de *L. stoechas*. Un milieu avec le tween 80 et l'eau distillée a servi de contrôle négatif. Les antibiotiques ont été utilisés en tant que contrôle positif.

✓ Microorganismes de pathologies humaines

L'activité antimicrobienne a été estimée en termes de diamètre d'inhibition \pm écart type. Parmi les onze (11) microorganismes étudiés, deux (2) souches bactériennes ont montré une résistance à l'HE.

Pour l'interprétation des résultats du test qualitatif, nous avons utilisé une échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne décrite par Mutai et *al.*, [230]. Ces auteurs ont classé les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne « D » en cinq (5) classes (Tableau 3.15).

Tableau 3.15 : Interprétation des diamètres d'inhibition

Très fortement sensible	$D \geq 30\text{mm}$
Fortement sensible	$21\text{mm} \leq D \leq 29\text{mm}$
Modérément sensible	$16\text{mm} \leq D \leq 20\text{mm}$
Légèrement sensible	$11\text{mm} \leq D \leq 16\text{mm}$
Résistante	$D < 10\text{mm}$

Selon la figure 3.24, les (04) bactéries Gram positifs présentent des diamètres d'inhibition variables. Les souches bactériennes : *B. cereus*, *S. aureus* et SARM sont très fortement sensibles à l'HE de *L. stoechas* avec des diamètres d'inhibition moyens respectivement égales à $57,7 \pm 0,6\text{mm}$, $50,7 \pm 0,6\text{mm}$ et $37 \pm 1\text{mm}$. Le diamètre de la zone d'inhibition de *B. subtilis* est de $25,3 \pm 0,6\text{mm}$, cette souche est considérée comme fortement sensible à l'HE de *L. stoechas*.

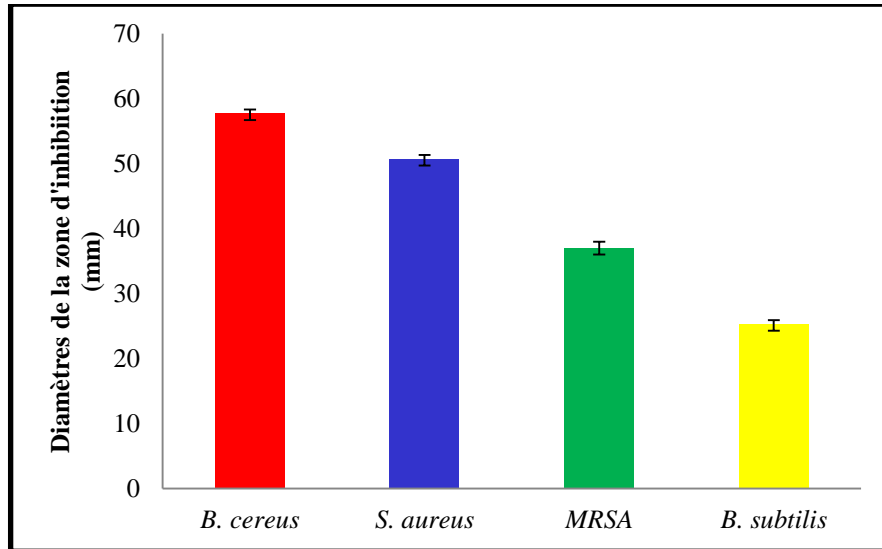


Figure 3.24 : Diamètre moyen des zones d'inhibition des bactéries Gram positifs

Les bactéries Gram négatifs ont présenté une légère sensibilité vis-à-vis l'HE de *L. stoechas* (Figure 3.25) mis à part la souche d'*E. faecalis* qui est considérée comme fortement sensible avec un diamètre égal à $29,3 \pm 0,6$ mm. Les autres souches sont légèrement sensibles à l'HE de *L. stoechas* avec des diamètres d'inhibition égale à $13,3 \pm 0,6$ mm pour *E. coli* et $12,7 \pm 1,2$ mm pour *S. typhi*. Les souches *S. enteritidis* et *P. aeruginosa* sont résistantes à l'HE de *L. stoechas* avec respectivement des diamètres d'inhibition de 9 ± 0 mm et de 6 ± 0 mm.

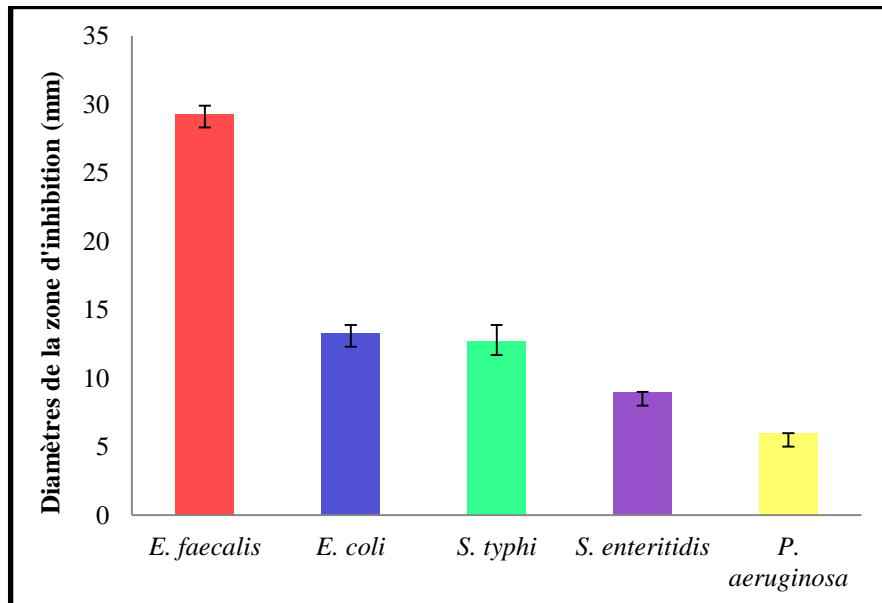


Figure 3.25 : Diamètre moyen des zones d'inhibition des bactéries Gram négatifs

C. albicans est un agent pathogène opportuniste responsable d'environ 60 % des mycoses superficielles et/ou systémiques [231], de plus, il est capable de

transition réversible entre la forme levure et hyphale. Cependant, L'HE de *L. stoechas* est très fortement inhibitrice sur *C. albicans* avec un diamètre moyen d'inhibition égale à $29,5 \pm 0,7$ mm. La levure *S. cereviceae* est également sensible à l'HE avec un diamètre égal à $31,8 \pm 0,4$ mm (Figure 3.26).

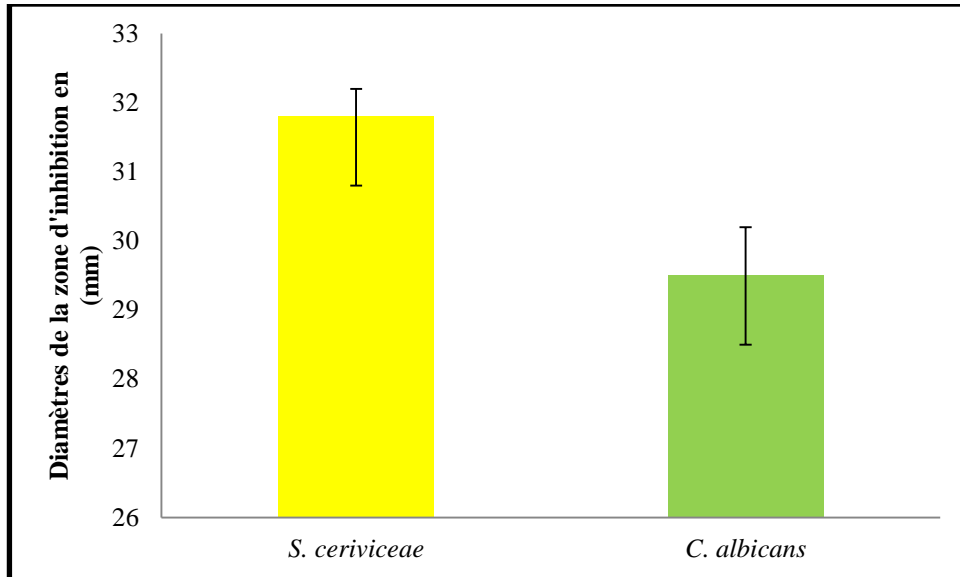


Figure 3.26 : Diamètre moyen des zones d'inhibition des levures

L'antibiogramme qui constitue le contrôle positif a été réalisé, il permet de comparer la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques. Nous avons testé deux antibiotiques de familles différentes pour chaque souche bactérienne. Les résultats des zones d'inhibition figurent en appendice E.

La plupart des souches ont montré une sensibilité à au moins un antibiotique testé. Les souches *E. coli* et *P. aeruginosa* sont résistantes aux deux antibiotiques testés, en l'occurrence la pénicilline et l'AMC : Amoxicilline + acide clavulanique. Contrairement aux deux bactéries : *E.coli* et *P. aeruginosa*, *S. aureus* est sensible à l'oxacilline et la vancomycine, *S. typhi* est sensible à l'ofloxacine et au chloramphénicol.

La comparaison des moyennes (test HSD de Tukey) entre l'HE de *L. stoechas* et tous les antibiotiques testés a révélé une différence très significative ($P < 0,05$) pour toutes les bactéries étudiées ; à l'exception de *S. enteritidis*, qui présente une différence non significative entre l'HE et le chloramphénicol.

La comparaison des moyennes (test ANOVA) de l'effet de l'HE de *L. stoechas* sur les différentes bactéries de pathologies humaines montre que les bactéries Gram négatifs sont plus sensibles que les bactéries Gram positifs (détails en appendice F).

L'HE de *L. stoechas* a montré une plus grande activité inhibitrice que les antibiotiques pour toutes les bactéries, à l'exception de *S. enteritidis* et *S. typhi* (Tableau 3.16).

Tableau 3.16 : Résultats des diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques

Souches	HE de <i>L. stoechas</i>	Antibiotiques						
		AMC	P	IMP	OX	VA	OFX	C
<i>B.cereus</i>	57,7 ±0,6	6 ±0*	-	-	-	17,3 ±0,6*	-	-
<i>S. aureus</i>	50,7 ±0,6	-	-	-	24,7 ±0,6*	17,3 ±0,6*	-	-
SARM	37 ±1	-	-	-	19 ±1*	21 ±0*	-	-
<i>B .subtilis</i>	25,3 ±0,6	6 ±0*	-	-	-	17,3 ±0,6*	-	-
<i>E. faecalis</i>	29,3±0,6	-	-	34,3±1,2*	-	18,7±0,6*	-	-
<i>E. coli</i>	13,3 ±0,6	6 ±0*	6 ±0*	-	-	-	-	-
<i>S. typhi</i>	12,7 ±1,2	-	-	-	-	-	37,3 ±1,5*	32,7 ±0,6*
<i>S.enteritidis</i>	9 ±0	-	-	-	-	-	31 ±0*	10,7 ±1,2
<i>P.aeruginosa</i>	6 ±0	6 ±0	6 ±0	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	29,5 ±0,7	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. ceriviceae</i>	31,8 ±0,4	-	-	-	-	-	-	-

P : pénicilline, AMC : amoxicilline+ acide clavulanique, IMP : imipenème, VA : vancomycine, OX : oxacilline, OFX : ofloxacine, C : chloramphénicol, * différence significative entre l'HE de *L. stoechas* et l'antibiotique ($p \leq 0,05$). Moyenne± Écart type.

✓ Bactéries phytopathogènes

L'huile essentielle de *L. stoechas* et ses deux composants majoritaires (Camphre et fenchone) ont été testés in vitro sur deux bactéries phytopathogènes qui sont : *E. amylovora* et *P. carotovorum* subsp *carotovorum*. Cette HE montre une très bonne activité antibactérienne car elle a inhibé la croissance de ces deux bactéries.

Les résultats de l'activité antimicrobienne sur *P. carotovorum* subsp *carotovorum* montre que, l'HE de *L. stoechas* présente un diamètre moyen d'inhibition égale à 19 ± 1 mm. Ainsi, le diamètre moyen enregistré pour le Camphre, fenchone et Camphre + fenchone est respectivement égale à : $12,33 \pm 1,53$ mm ; $10,33 \pm 0,58$ mm et $12,33 \pm 0,58$ mm (Figure 3.27).

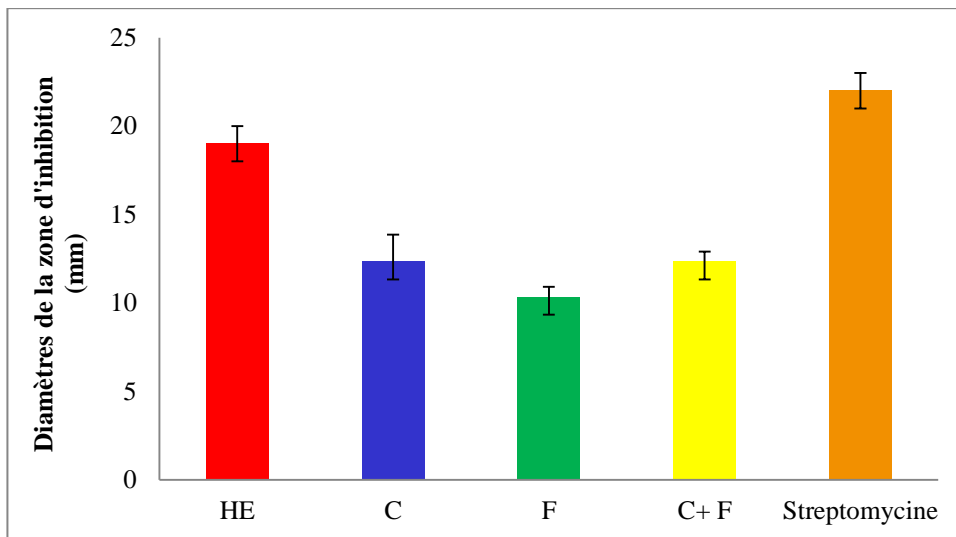


Figure 3.27 : Diamètre d'inhibition de *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum*

HE : huile essentielle de *L. stoechas*, C : camphre, F : fenchone, C+ F : camphre + fenchone

La souche *E. amylovora* a été fortement inhibée par l'HE de *L. stoechas* avec un diamètre égal à 18 ± 1 mm. Le mélange camphre + fenchone a montré un diamètre de 16 ± 1 mm. *E. amylovora* a montré une sensibilité à la fenchone ($15,33 \pm 0,58$ mm). Toutefois, elle est moins sensible au camphre où nous avons enregistré un diamètre égal à $12,33 \pm 1,15$ mm (Figure 3.28).

Le témoin négatif qui est l'éthanol n'a présentée aucune inhibition (6 ± 0 mm) sur les deux bactéries testées séparément. Le témoin positif testé est la streptomycine. C'est un antibiotique qui traite le feu bactérien causé par *E. amylovora* [232, 233]. Nos résultats montrent que la streptomycine a un effet appréciable sur les deux souches testées avec un diamètre d'inhibition moyen de 22 ± 1 mm pour *P. carotovorum* subsp *carotovorum* et 15 ± 1 mm pour *E. amylovora*. Les figures de l'activité antibactérienne des phytopathogènes sont représentées en appendice E.

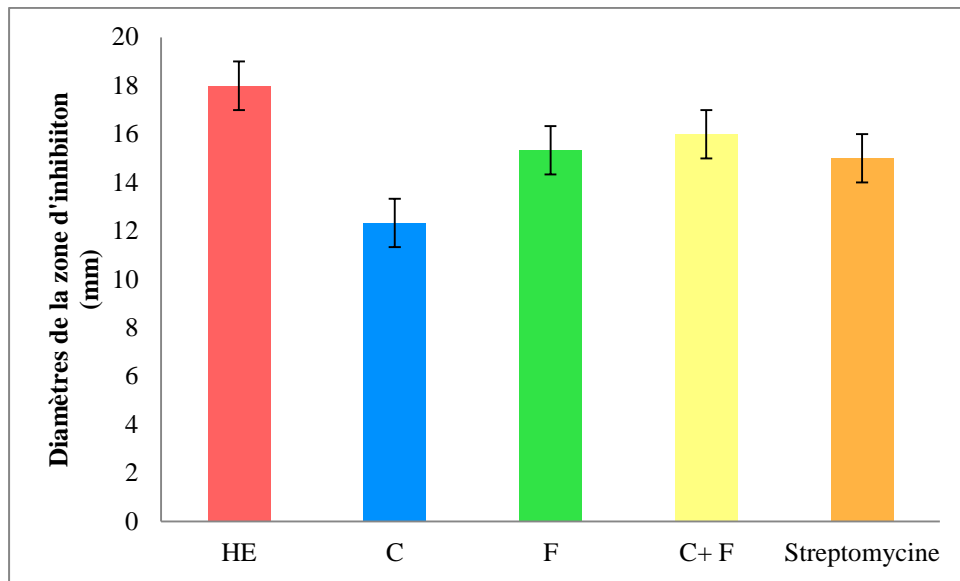


Figure 3.28 : Diamètre moyen des zones d'inhibition d'*Erwinia amylovora*

HE : huile essentielle de *L. stoechas*, C : camphre, F : fenchone, C+ F : camphre + fenchone

Les résultats de l'analyse de variance montrent qu'il y a une différence non significative entre l'HE et la streptomycine (Détails en appendice F). Toutefois, l'HE de *L. stoechas* exerce la même action que l'antibiotique.

Selon les résultats de l'activité antibactérienne obtenus, les bactéries Gram positifs semblent être plus facilement inhibées que les bactéries Gram négatifs. Ceci peut être expliqué par la différence structurale de la paroi bactérienne, ainsi la résistance des Gram négatifs peut être attribuée aux lipopolysaccharides présents dans leur membrane externe. Ce constituant de la membrane rend la bactérie intrinsèquement résistante aux agents extérieurs, tels que les composants hydrophiles des huiles essentielles, les antibiotiques et les détergents [234].

La sensibilité que présente les bactéries suivantes *E. amylovora* et *P. carotovorum* subsp *carotovorum* à l'HE de *L. stoechas* peut être due au fait que leur peptidoglycane est plus mince et plus relâché [235]. Il est aussi surmonté d'une membrane externe de nature lipidique. Ces caractères permettent aux composants actifs de l'HE de traverser la paroi bactérienne [235].

Cette différence de la sensibilité des bactéries à l'huile essentielle de *L. stoechas* pourrait être due aussi à des variations du taux de pénétration des constituants de l'HE à travers les structures de la membrane microbienne [235]. Néanmoins, il convient de prendre en considération le fait que la zone d'inhibition dépend de la capacité du composé antibactérien de diffuser uniformément à travers la gélose [234].

La souche *P. aeruginosa* se révèle la plus résistante à l'HE de *L. stoechas*. Cette résistance serait éventuellement due à leur grande capacité à développer des résistances vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens, d'où leur fréquence dans les infections hospitalières [236].

Selon la littérature, L'HE de *L. stoechas* présente une toxicité vis-à-vis d'un nombre important de microorganismes (bactéries, levures et champignons), ceci est due à la présence de certains composants chimiques qui sont le camphre, le linalool, le 1,8 — cineole [237], le carvacrol, l'eugénol, le terpinène-4-ol [238], le myrtenal [167], l' α — pinène et le borneol [239]. Ainsi tous ces composants sont présents dans la composition chimique de notre HE à des teneurs variables et certains d'entre eux sont majoritaires. Les alcools terpéniques sont particulièrement actifs contre les cellules microbiennes, car ils sont solubles dans les milieux aqueux et provoquent d'importants dégâts sur les parois cellulaires des microorganismes [240].

Les phénols ont une bonne efficacité antimicrobienne puisqu'ils causent des dommages au niveau de la membrane externe des bactéries, les composées phénoliques sensibilisent les phospholipides membranaires [241]. Cette action entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons et aux ions potassiums, une réduction des réserves de l'ATP intracellulaire, une perturbation de la force proton motrice et une dénaturation des protéines intracellulaires [242].

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *L. stoechas* pourrait être due à la présence du de camphre et du 1-8 cineole. Il a été rapporté que le camphre est

l'un des agents antimicrobiens les plus efficaces de diverses plantes [243], [160]. Le mécanisme de l'activité antibactérienne du camphre n'est pas complètement compris en détail. Il a été démontré que le mécanisme d'action du camphre sur les microorganismes de croissance incluait la déstabilisation de la structure bicouche des phospholipides, l'interaction avec les enzymes membranaires et les protéines. Le camphre peut jouer le rôle d'échangeur de protons en réduisant le gradient de pH à travers la membrane [244], [245], [160].

L'évaluation de l'activité antimicrobienne se conforme aussi sur les valeurs de la CMI. Elle est considérée comme [246, 236] :

- Forte lorsque la CMI se situe entre 0,05 et 0,50 mg ml⁻¹.
- Moyenne quand elle est entre 0,6 et 1,50 mg ml⁻¹.
- Faible quand la CMI est au-dessus de 1,50 mg ml⁻¹.

Les valeurs de la CMI et CMB de l'HE de *L. stoechas* diffèrent d'une souche à une autre. Elles sont représentées dans le tableau 3.17.

La plus grande valeur de CMI (2,5 µg ml⁻¹) est observée chez *E. coli*, *S. typhi*, *S. enteritidis* et *E. amylovora*. Ces souches montrent un petit diamètre d'inhibition lors de l'étude qualitative. De ce fait, on peut dire que le diamètre d'inhibition est inversement proportionnel à la CMI.

Les valeurs de la CMB sont variables, ainsi l'HE de *L. stoechas* est létale pour *B. cereus*, *P. carotovorum* subsp *carotovorum* et SARM à une concentration de 10 µg ml⁻¹. Une valeur de CMB égale à 5 µg ml⁻¹ décrite chez *E. amylovora* et 2,5 µg ml⁻¹ est efficace pour entraîner la mort d'au moins 99,99 % des bactéries suivantes : *S. aureus*, *S. typhi* et *S. enteritidis* ainsi que la levure *C. albicans*. La plus faible valeur de CMB est égale à 0,3125 µg ml⁻¹ observée chez *S. ceriviceae*.

L'étude de la CMI et la CMB des deux molécules majoritaires à savoir le camphre, la fenchone ainsi que leur activité associée (Camphre + fenchone) sur *E. amylovora* et *P. carotovorum* subsp *carotovorum* ont montré des valeurs variables (Tableau 3.17).

Tableau 3.17 : Résultats des valeurs de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide de l'HE de *L. stoechas*

Les souches microbiennes	La valeur de CMI ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	La valeur de CMB ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
<i>B. subtilis</i>	< 0,3125	1,25
<i>B. cereus</i>	0,625	10
<i>S. aureus</i>	1,25	2,5
SARM	0,625	10
<i>E. coli</i>	2,5	5
<i>S. typhi</i>	2,5	2,5
<i>S. enteritidis</i>	2,5	2,5
<i>C. albicans</i>	1,25	2,5
<i>S. ceriviceae</i>	< 0,3125	0,3125
<i>E. amylovora</i> (HE)	2,5	5
<i>E. amylovora</i> (F)	5	10
<i>E. amylovora</i> (C)	20	>20
<i>E. amylovora</i> (C + F)	2,5	5
<i>P. carotovorum</i> subsp <i>carotovorum</i> (HE)	1,25	10
<i>P. carotovorum</i> subsp <i>carotovorum</i> (F)	2,5	5
<i>P. carotovorum</i> subsp <i>carotovorum</i> (C)	20	>20
<i>P. carotovorum</i> subsp <i>carotovorum</i> (C+F)	5	10

HE : huile essentielle de *L. stoechas*, C : camphre, F : fenchone, C+ F : camphre + fenchone

Les études menées sur l'activité antimicrobienne de l'HE de lavande montrent qu'elle est active sur un grand nombre de microorganismes de pathologie humaine. Le tableau 3.18 illustre les résultats des travaux antérieurs sur des souches

microbiennes de pathologie humaine vis-à-vis différentes HEs extraites à partir de lavande de plusieurs pays. Les résultats de l'étude menée en Tunisie rejoignent les résultats observés dans ce travail, ainsi leur l'HE a montré une très haute sensibilité vis-à-vis des bactéries Gram positifs ainsi que sur celles des Gram négatifs [185]. L'étude menée au Maroc par Bouyahya et *al.*, sur l'HE de *L. stoechas* a montré que *S. aureus* est sensible alors que *P. aeruginosa* est résistante [186].

L'HE de *L. stoechas* originaire du Portugal, montre une valeur de la CMI comprise entre 1,25 $\mu\text{l ml}^{-1}$ et 2,50 $\mu\text{l ml}^{-1}$ pour *C. albicans*. Ces résultats concordent avec les nôtres [163]. L'étude menée par D'Auria et *al.*, en Italie sur l'effet antifongique de l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* montre une activité fongistatique et fongicide sur *C. albicans* [247]. Selon D'Auria et *al.*, l'HE de *Lavandula angustifolia* peut être considérée comme efficace contre le dimorphisme de *C. albicans*. Elle réduit ainsi la progression fongique et la propagation de l'infection [247].

L'étude menée en Algérie par Mohammedi et Atik en 2011 sur l'effet de l'huile essentielle de *L. stoechas* a montré un faible pouvoir antibactérien par rapport à nos résultats. [248]

Tableau 3.18 : Résultats des travaux antérieurs de différents pays

Souches microbiennes	Nos résultats		Turquie [189]	Arabie Saoudite [249]		India [235]		Algérie [162]
	D (mm)	CMI (μgml^{-1})	D (mm)	D (mm)	CMI (μgml^{-1})	D (mm)	CMI (μgml^{-1})	CMI ($\text{mg}\mu\text{l}^{-1}$)
<i>E. coli</i>	13,3 \pm 0,6	2,5	23	-	> 150	10	\leq 0,5	8,52
<i>P. aeruginosa</i>	6 \pm 0	-	-	21 \pm 1,7	50 \pm 1,81	07	\leq 2,0	8,52
<i>B. subtilis</i>	25,3 \pm 0,6	< 0,3125	18	-	-	13	\leq 1,0	11,36
<i>B. cereus</i>	57,7 \pm 0,6	0,625	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	50,7 \pm 0,6	1,25	22	6,7 \pm 6,5	50 \pm 1,1	13	\leq 1,0	-
SARM	37 \pm 1	0,625	-	11,7 \pm 10	50 \pm 1,77	-	-	-
<i>C. albicans</i>	29,5 \pm 0,7	1,25	-	-		-	-	8,52

Selon Berenbaum, 1981, les résultats obtenus peuvent être interprétés selon les valeurs du FIC comme suit [135] : synergie (S, $FIC \leq 0,5$), addition (A, $0,5 < FIC < 1$), l'indifférence (I, $1 < FIC < 2$), l'antagoniste (AN, $FIC \geq 2$).

Les valeurs de l'indice de FIC sont égales à 0,625 pour *E. amylovora* (effet d'addition) et 2,25 pour *P. carotovorum* subsp *carotovorum* (effet antagoniste). Ces résultats révèlent l'absence d'un effet synergique entre ces composés (le camphre et la fenchone).

Aucun travail de recherche n'a été effectué sur l'effet de l'HE de *L. stoechas*, du camphre et de la fenchone sur ces deux bactéries phytopathogènes en Algérie. Ainsi, une étude menée à Téhéran (Iran) montre que les HEs de *Satureja hortensis* et *Thymus vulgaris* ont un effet appréciable sur *E. amylovora* avec un diamètre d'inhibition de 25 mm [250]. Ce diamètre reste très élevé par rapport à celui constaté dans notre étude. Cette différence peut être expliquée par la notion du chémotype spécifique à chaque huile essentielle [250]. En 2014, lors d'une étude au Maroc, Yakoubi et *al.*, ont testé l'effet de plusieurs huiles essentielles sur la souche *E. amylovora* [251]. Cette dernière a réagi de manières différentes vis-à-vis de ces huiles essentielles, mais elle reste toujours sensible à l'HE de *Lavandula augustifolia* [251].

L'étude menée au Portugal en 2014 par Rita Eduardo, montre une résistance de *Pectobactérium carotovorum* vis-à-vis l'HE de *Lavandula stoechas* [252]. Une autre étude réalisée en Iran par Mehrorosh et ses collaborateurs, montre que l'HE de *Lavandula officinalis* a une légère activité inhibitrice même à différentes concentrations sur *Pectobacterium sp* [253]. L'étude réalisée au Japon par Ikeura et Kobayashi, révèle une résistance de *Pectobacterium sp* à l'HE de *Lavandula vera* [254]. Tous ces résultats sont en discordance avec les nôtres.

Le résultat de l'antibiogramme sur *E. amylovora* réalisé avec la streptomycine concorde avec celui de Yakoubi et *al.*, [251].

✓ Champignons phytopathogènes

L'activité antifongique de l'HE de *L. stoechas* et de ses composants majoritaires (le Camphre et la fenchone) a été déterminée par la méthode du contact direct. Les résultats du tableau 3.19 montrent qu'une inhibition totale ($100 \pm 0 \%$) de

la croissance mycélienne sur les quatre souches testées à savoir, *Fusarium sp*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger* et *Alternaria spp* a été enregistré. Ces résultats sont obtenus après 7 jours d'incubation à 26 ± 1 °C et pour des concentrations en HE de 20 et $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. Les concentrations de $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ jusqu'à $0,625 \mu\text{g ml}^{-1}$ en HE ont montré des diamètres mycéliens différents selon le champignon étudié.

En général, les résultats obtenus avec les différentes concentrations en HE de *L. stoechas* révèlent que l'activité inhibitrice croît au fur et à mesure que la concentration augmente. De ce fait, nous avons enregistré des diamètres moyens d'inhibition qui varient de $14,67 \pm 1,53$ mm pour *A. niger* à $60,33 \pm 0,58$ mm pour *R. solani*.

Une comparaison du diamètre de la zone d'inhibition avec celui du témoin où se trouve le champignon en absence de l'HE, nous a permis de confirmer que l'inhibition est due à l'HE de *L. stoechas* présente dans le milieu PDA. Nous avons remarqué aussi que dans certaines boîtes du témoin, le champignon a complètement envahi les boîtes de Pétri. Le diamètre enregistré est de 90 ± 0 mm.

Tableau 3.19 : Résultats de l'activité antifongique de l'HE de *L. stoechas* et de ses composants majoritaires

<i>Aspergillus niger</i>							
	20 µg ml ⁻¹	10 µg ml ⁻¹	5 µg ml ⁻¹	2,5 µg ml ⁻¹	1,25 µg ml ⁻¹	0,625 µg ml ⁻¹	Témoins
HE	100 ± 0*	100 ± 0*	100 ± 0*	89,68 ± 0,58	64,58 ± 0,58	57,29 ± 0,58	0 ± 0
C	17,19 ± 1	14,58 ± 1,53	13,02 ± 0,58	11,98 ± 1,53	9,90 ± 0,58	8,33 ± 0,58	
F	93,23 ± 0,58	56,77 ± 1,53	42,19 ± 1	28,65 ± 1,53	20,83 ± 1,15	14,58 ± 0,58	
C+F	38,02 ± 1,15	31,77 ± 1,53	30,73 ± 1,53	24,48 ± 0,58	10,94 ± 0	3,13 ± 1	
<i>Rhizoctonia solani</i>							
	20 µg ml ⁻¹	10 µg ml ⁻¹	5 µg ml ⁻¹	2,5 µg ml ⁻¹	1,25 µg ml ⁻¹	0,625 µg ml ⁻¹	Témoins
HE	100 ± 0*	100 ± 0*	100 ± 0*	89,68 ± 0,58	49,60 ± 0,58	35,32 ± 0,58	0 ± 0
C	0 ± 0						
F	100 ± 0*	0 ± 0					
C+F	0 ± 0						

<i>Fusarium sp</i>							
	20 µg ml ⁻¹	10 µg ml ⁻¹	5 µg ml ⁻¹	2,5 µg ml ⁻¹	1,25 µg ml ⁻¹	0,625 µg ml ⁻¹	Témoins
HE	100 ± 0*	100 ± 0*	88,49 ± 0,58	77,38 ± 1,19	62,70 ± 0,69	41,67 ± 1	0 ± 0
C	29,37 ± 1,53	0 ± 0					
F	100 ± 0*	44,05 ± 1	30,16 ± 1,15	17,86 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	
C+F	93,65 ± 0,58	36,51 ± 0,58	25,79 ± 0,58	14,68 ± 0,58	11,90 ± 1	0 ± 0	
<i>Alternaria sp</i>							
	20 µg ml ⁻¹	10 µg ml ⁻¹	5 µg ml ⁻¹	2,5 µg ml ⁻¹	1,25 µg ml ⁻¹	0,625 µg ml ⁻¹	Témoins
HE	100 ± 0*	100 ± 0*	83,33 ± 1	61,90 ± 1	53,57 ± 1,19	43,25 ± 1,53	0 ± 0
C	66,67 ± 1	13,89 ± 0,58	22,62 ± 1	19,05 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	
F	100 ± 0*	70,24 ± 1	40,48 ± 1	17,06 ± 1,15	0 ± 0	0 ± 0	
C+F	100 ± 0*	42,46 ± 0,58	13,49 ± 0,58	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	

T : témoins, C : Camphre, F : fenchone, C+F : camphre+ fenchone * différence significative entre les groupes de l'HE de *L. stoechas* et/ou les composants majoritaires. Pourcentage moyen d'inhibition ± Écart type.

L'activité antifongique des composants majoritaires (le camphre et la fenchone) est variable d'un champignon à un autre :

Le camphre n'a montré aucune efficacité sur les quatre champignons étudiés avec des diamètres moyens d'inhibition variables qui se situent entre 34 ± 1 mm pour *Alternaria spp* et 90 ± 0 mm pour *Fusarium sp* et *R. solani*.

La fenchone est le constituant le plus actif, aucune croissance mycélienne n'a été observée pour *R. solani*, *Fusarium sp* et *Alternaria sp* à la concentration de $20 \mu\text{g ml}^{-1}$. Il est à signaler que la croissance d'*A. niger* est partiellement inhibée. Ainsi, le diamètre moyen d'inhibition enregistré est de $10,33 \pm 0,58$ mm soit un pourcentage de $93,23 \pm 0,58$ %.

L'association camphre + fenchone est efficace uniquement sur *Alternaria sp* (100 ± 0 %) à la concentration de $20 \mu\text{g ml}^{-1}$; les autres champignons étudiés en l'occurrence, *A. niger*, *R. solani* et *Fusarium sp* n'ont pas été inhibés par l'association camphre + fenchone. Les diamètres moyens d'inhibition varient de $45,67 \pm 1,15$ mm pour *A. niger* à 90 ± 0 mm pour *R. solani*, *Fusarium sp* et *Alternaria sp*.

Les résultats de l'étude statistique (détails en appendice F) ont montré une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les différents traitements utilisés et les champignons étudiés. Une différence non significative a été observée entre l'HE de *L. stoechas* et les 4 champignons étudiés à savoir *A. niger*, *Alternaria sp*, *R. solani* et *Fusarium sp*. Le résultat de l'analyse de variance entre les différents traitements a montré une différence hautement significative entre l'HE de *L. stoechas* et la fenchone.

Les résultats de l'analyse de variance pour les souches *Fusarium sp* et *Alternaria spp* révèlent qu'il y a une différence hautement significative ($p < 0,05$) entre l'HE de *L. stoechas*, la fenchone et l'association camphre + fenchone. À partir de ces résultats, on peut déduire que les composants majoritaires appliqués seuls ou en association exercent le même effet que l'HE de *L. stoechas* sur ces deux champignons. Au contraire, *A. niger* et *R. solani* montrent une différence hautement significative ($p < 0,05$) uniquement pour l'HE de *L. stoechas* et la fenchone (détails en appendice F).

L'HE de *L. stoechas* est fongicide sur *A. niger*, *R. solani*. Nous avons remarqué que ces deux champignons présentent la même valeur de CMF. Elle est

égale à $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Au contraire, chez *Alternaria spp* et *Fusarium sp*, les valeurs de la CMF sont différentes et sont respectivement égales à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ et $20 \mu\text{g ml}^{-1}$. Contrairement, l'HE de *L. stoechas* est fongistatique sur *Fusarium sp* à la concentration de $10 \mu\text{gml}^{-1}$. Nos résultats concordent avec ceux observés en Italie [167]. Les figures des résultats obtenus sont représentés en appendice E.

La fenchone est fongicide sur *Alternaria spp* et *Fusarium sp* à la concentration de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. Au contraire, *R. solani* est fongistatique vis-à-vis la fenchone, il présente une CMF supérieur à $20 \mu\text{g ml}^{-1}$.

L'association camphre + fenchone est fongicide sur *Alternaria spp*. La valeur de la CMI est égale à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (détails en appendice E).

L'étude menée au Portugal par Zuzarte et al., [255] a montré des résultats différents des nôtres. Cette dernière porte sur l'effet de 43 huiles essentielles de *Lavandula pedunculata* et ses composants majoritaires (Fenchone, camphre et 1,8 cinéole) sur *A. niger*. Ainsi, l'HE de *L. pedunculata* présente une CMI qui varie de $2,5 \mu\text{l ml}^{-1}$ à $5 \mu\text{l ml}^{-1}$ et une CMF qui varie de $5 \mu\text{l ml}^{-1}$ à $10 \mu\text{l ml}^{-1}$. La fenchone a été testée aussi sur *A. niger* et montre des valeurs de CMI = $10 \mu\text{l ml}^{-1}$ et de CMF > $20 \mu\text{l ml}^{-1}$. Pour le camphre les valeurs de la CMI et la CMF sont supérieures à $20 \mu\text{l ml}^{-1}$, ce résultat concorde avec le nôtre pour cette même molécule majoritaire.

Une autre étude menée sur l'effet antifongique a montré que l'huile essentielle de *Lavandula viridis* a montré une CMI de $2,5 \mu\text{l ml}^{-1}$, tandis que sur le composé majoritaire, en l'occurrence le camphre, a montré une valeur de CMI \geq à $20 \mu\text{l ml}^{-1}$. La même valeur de CMF est enregistrée pour l'HE et le camphre, elle est \geq à $20 \mu\text{l ml}^{-1}$ [256].

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de différents composés, il est donc difficile d'attribuer leurs activités biologiques à un constituant particulier. Généralement, les principaux composés sont responsables de l'activité antifongique des huiles essentielles. Cependant, certaines études montrent que toutes les huiles essentielles ont une activité antifongique plus élevée que la combinaison des principaux composés isolés. Ces études confirment que même les composants mineurs présentent une importance dans les activités biologiques des huiles essentielles [257].

L'apparition et la sévérité de l'infection fongique dépendent de la charge de l'inoculum et de la résistance du champignon, car, ce dernier, déclenche un certain mécanisme de synthèse et de production de molécules, de communication microbienne et de développement de paramètres de pathogénicité spécifiques. Tous ces mécanismes les rendent intrinsèquement résistants aux produits naturels testés [258].

Selon Freisesleben et Jager, L'HE et les composés phytochimiques peuvent désactiver le champignon selon les modalités suivantes [259] :

- Inhibition de la formation de paroi cellulaire : l'intégrité de la paroi cellulaire peut être perturbée en bloquant la formation de bêta-glucanes.

- Dysfonctionnement de la membrane cellulaire : les ergostérols jouent un rôle essentiel dans la préservation de l'intégrité et de la fonction de la membrane cellulaire fongique. Si de tels stérols sont liés par des composants antifongiques, ou que leur biosynthèse est inhibée par des inhibiteurs spécifiques, l'intégrité de la membrane cellulaire sera rompue.

- Dysfonctionnement des organelles tel que les mitochondries fongiques : les agents antifongiques peuvent inhiber la fonction de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons ; cela entraînera une réduction du potentiel membranaire mitochondrial. L'inhibition des pompes à protons dans la chaîne respiratoire, entraînant une réduction de la production d'ATP et la mort cellulaire subséquente.

L'activité antifongique de l'huile essentielle de *L. stoechas* pourrait être causée par les propriétés des terpènes qui, en raison de leur nature hautement lipophile et de leur faible poids moléculaire, peuvent perturber la membrane cellulaire, causer la mort de la cellule ou inhiber la sporulation et la germination. Ainsi, L'HE de *L. stoechas* peut représenter l'un des produits naturels les plus prometteurs pour l'inhibition fongique [258].

L'effet antifongique important peut être en relation avec la forte teneur en camphre de notre HE. Car ce composé phénolique est réputé pour avoir une grande action antibactérienne et antifongique [260].

3.8.4 Résultats de l'activité anti-inflammatoire

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire sont établis dans le tableau 3.20. Ce dernier montre les variations individuelles de réduction de l'œdème provoqué pour les 3 essais effectués à savoir : l'eau physiologique, le diclofénac à 2 mg/kg/jour et l'HE de *L. stoechas* à des doses de 400 mg/kg, 600 mg/kg et 800 mg/kg.

Tableau 3.20 : Résultats de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *L. stoechas*

Lots (n=5)	Pourcentage de réduction de l'œdème
Eau physiologique	-
Diclofénac 2 mg/kg	55,22 %*
HE 800 mg/kg	58,30 %*
HE 600 mg/kg	48,52 %*
HE 400 mg/kg	30,85 %

*Les groupes avec des lettres identiques en exposant sont comparables (Test Tukey).

Le lot témoin est traité avec de l'eau physiologique, il a présenté le pourcentage d'œdème le plus élevé en comparaison avec les 3 autres lots. Ainsi, après 4 heures du début de l'application du traitement, nous avons observé que l'HE de *L. stoechas* dont la concentration est égale à 800 mg/kg induit une réduction de l'œdème de 58,30 %. Ce taux est légèrement supérieur à celui du lot de référence traité par le diclofénac. Ce dernier a induit une réduction quasi-totale de l'œdème. Cependant, la différence du volume moyen des pattes gauches des 2 essais en l'occurrence, l'HE et le Diclofénac n'est pas significative. L'HE à 800 mg/kg et à 600 mg/kg présente un effet anti-inflammatoire identique à celui du diclofénac, contrairement à la dose de 400 mg/kg l'analyse de la variance a montré que la différence du volume moyen des pattes gauches des 2 essais à savoir l'HE à 400 mg/kg et le Diclofénac à 2 mg/kg est significative (détails en appendice F).

Les résultats révèlent que l'HE de *L. stoechas* à 800 mg/kg et 600 mg/kg provoque une diminution de l'inflammation d'intensité similaire à celle du diclofénac. Cet effet anti-œdémateux peut être expliqué par la présence des composants non médiateurs de neutrophiles, qui inhibent leur migration et leur intervention dans le processus inflammatoire [261].

Les huiles essentielles bloquent la formation et/ou la sécrétion des médiateurs de l'inflammation comme l'histamine, les cytokines pro-inflammatoires, les prostaglandines, les leucotriènes, l'oxyde d'azote et les radicaux libres produits par les neutrophiles [262].

D'autres travaux confirment que les composants monterpéniques tels que linalool, 1-8 cineole, α -pinène de l'HE de *L. stoechas*, sont de puissants inhibiteurs des médiateurs de l'inflammation et des cytokines [261],[263].

Peu de travaux de recherche ont été réalisés sur l'effet anti-inflammatoire de l'HE de *L. stoechas*. En 2003, Hajhashemi et *al.*, [264] ont évalué l'effet anti-inflammatoire de HE de *L. augustifolia*. Cette dernière a réduit l'œdème (5 %) à une concentration de 2 g/kg.

3.8.5 Résultats de l'activité antioxydante

✓ Test de piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydante de l'HE de *L. stoechas* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotométrie à 517 nm en suivant la capacité de réduction du radical libre qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune.

Les résultats obtenus lors du test de la mesure du pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont enregistrés dans les figure 3.29 et figure 3.30. Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration en BHT ou en HE de *L. stoechas*.

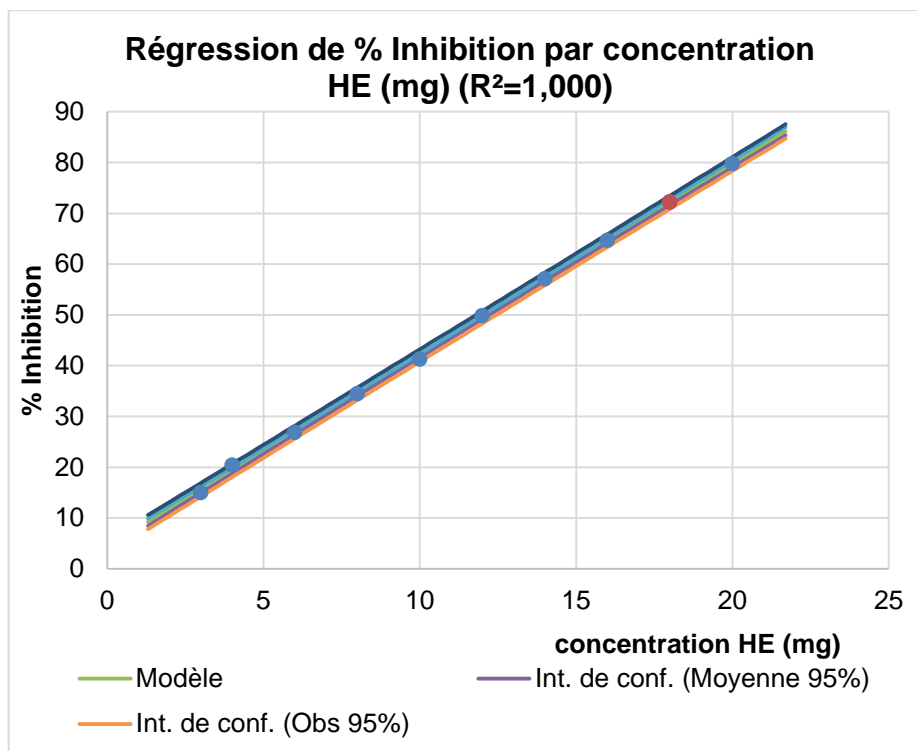


Figure 3.29 : Pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle de *L. stoechas*

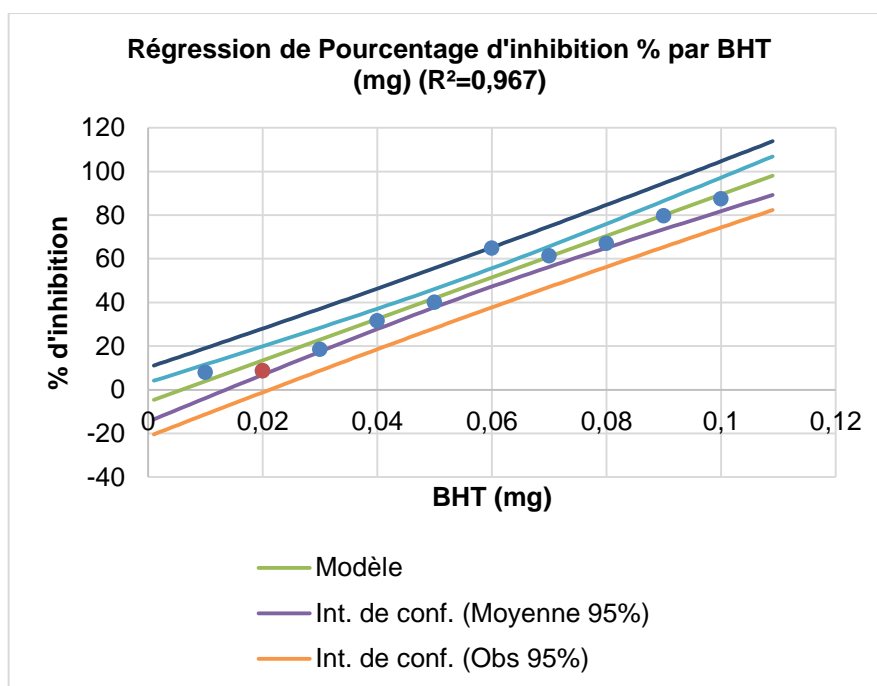


Figure 3.30 : Pourcentage d'inhibition du BHT

On remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'HE de *L. stoechas* est inférieur à celui du BHT pour toutes les concentrations testées. Ainsi, pour la concentration en HE de *L. stoechas* à savoir, 3 mg ml^{-1} et du BHT ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$)

¹), on observe un pourcentage d'inhibition respectivement de $14,98 \pm 0,002 \%$ et $87,46 \pm 0,001 \%$

La technique du DPPH nous a permis d'exprimer l' IC_{50} . Ce dernier est inversement lié à la capacité antioxydante d'une HE. Il exprime la quantité nécessaire d'antioxydant capable de diminuer la concentration du radical libre de 50 %. C'est-à-dire plus la valeur de l' IC_{50} est faible plus l'activité antioxydante est importante.

Les valeurs de l' IC_{50} de chacun de l'HE ou du BHT ont été déterminées dans la figure 3.31. L'HE de *L. stoechas* a donné une valeur de l' IC_{50} de $11,95 \pm 0,03 \text{ mg ml}^{-1}$. Cette valeur déterminée est plus élevée par rapport à la valeur d' IC_{50} de la référence (BHT) qui est de $0,058 \pm 0 \text{ mg ml}^{-1}$. D'après les résultats obtenus, il semble que le BHT est un puissant antioxydant. De plus, il est plus efficace en comparaison à notre HE.

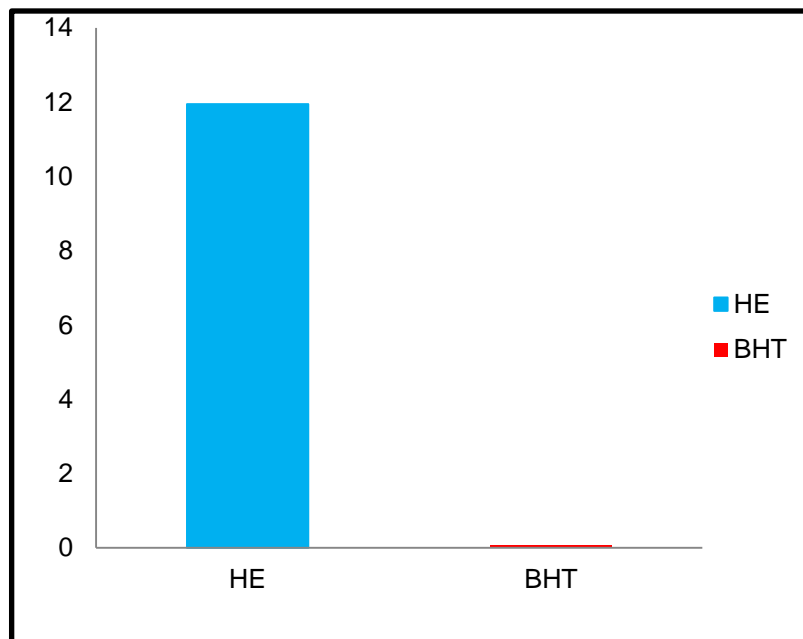


Figure 3.31 : Les valeurs de l' IC_{50}

Plusieurs travaux menés sur l'effet antioxydant de *L. stoechas* ont montré une activité antioxydante faible par rapport à l'antioxydant de référence.

Ainsi, Bouyahya et *al.*, [186], ont rapporté une valeur de l' IC_{50} égale à $785,38 \pm 9,04 \mu\text{g ml}^{-1}$ pour l'HE de *L. stoechas* originaire du Maroc. En Algérie, Dif et *al.*, [265] et Barkat et Laib, [168] ont évalué l'activité antioxydante de l'extrait

méthanolique et l'HE de *L. stoechas*. Les valeurs de l'IC₅₀ sont de 25,52 mg ml⁻¹ pour l'extrait méthanolique et 584 ± 0,58 µg ml⁻¹ pour l'HE de *L. stoechas*. Au Portugal, Baptista et al., [266], ont mis en exergue une activité antioxydante appréciable et comparable à celle du BHT avec un pourcentage d'inhibition de 68,7 ± 2,9 % qui correspond à une dose de 50 µg ml⁻¹. Carrasco et al., ont observé une activité antioxydante appréciable [267], tandis que Cherrat et al., (2014) ont montré un effet antioxydant modéré de l'huile essentielle de *L. stoechas* [268]. Une autre étude menée en Turquie montre que l'extrait méthanolique des feuilles de *L. stoechas* présente une IC₅₀ égale à 0,300 mg [269]. Tous ces résultats ne corroborent pas avec les nôtres, puisqu'ils présentent des valeurs d'IC différentes.

Selon Edris, une activité antioxydante remarquable des huiles essentielles est attribuée à la teneur en composés phénoliques tels que le thymol et le carvacrol. L'effet antioxydant faible résulte éventuellement de l'absence du thymol dans notre HE [270].

Des études ont montré que les activités biologiques des HEs des plantes aromatiques sont liées à leur composition chimique et notamment aux composés majoritaires. Cependant, des composés minoritaires peuvent interagir directement, ou d'une façon synergique ou antagoniste, pour créer un mélange doté d'activité biologique.

Les HEs sont des sources potentielles de constituants chimiques naturels doués d'activité antioxydante. Elles ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto-oxydation [270].

Plusieurs composés que nous avons détectés dans l'HE de *L. stoechas* ont déjà été décrits comme antioxydants lors de tests de criblage chimique. Il s'agit notamment de l'eugénol, du carvacrol, du terpinolène et du β-terpinène [271] et du terpinène-4-ol [272]. La présence de ces molécules dans l'HE de *L. stoechas* même à l'état de trace peut expliquer l'activité de piégeage du radical DPPH.

Les antioxydants naturels sont apparus comme une alternative aux antioxydants de synthèses. Ces derniers sont de moins en moins utilisés dans l'industrie alimentaire pour leurs effets secondaires nuisibles pour la santé humaine. Les antioxydants de synthèses tels que le BHA et le BHT sont suspectés d'être

responsables des dommages qu'ils peuvent causer au foie et à l'induction de certains cancers [273], [274]. Par conséquent, le développement et l'utilisation d'antioxydants plus efficaces d'origine naturelle seraient souhaitables.

Un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur élimination par le système antioxydant du corps conduit au stress oxydatif [275], [276]. Dans cette situation, un apport externe d'antioxydants est nécessaire pour rétablir l'équilibre entre les radicaux libres et les antioxydants.

✓ Test de réduction du fer (FRAP)

L'activité antioxydante de l'HE de *L. stoechas* a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible [277]. L'utilisation de ce test est universelle. Il peut être appliqué aussi bien pour les plantes que dans les extraits organiques et aqueux [278].

La présence des réducteurs dans les plantes provoque la réduction de Fe^{3+} / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, le Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700nm [279]. En l'occurrence, le système $FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi-quantitative » des concentrations en polyphénols, qui participent à la réaction redox [280].

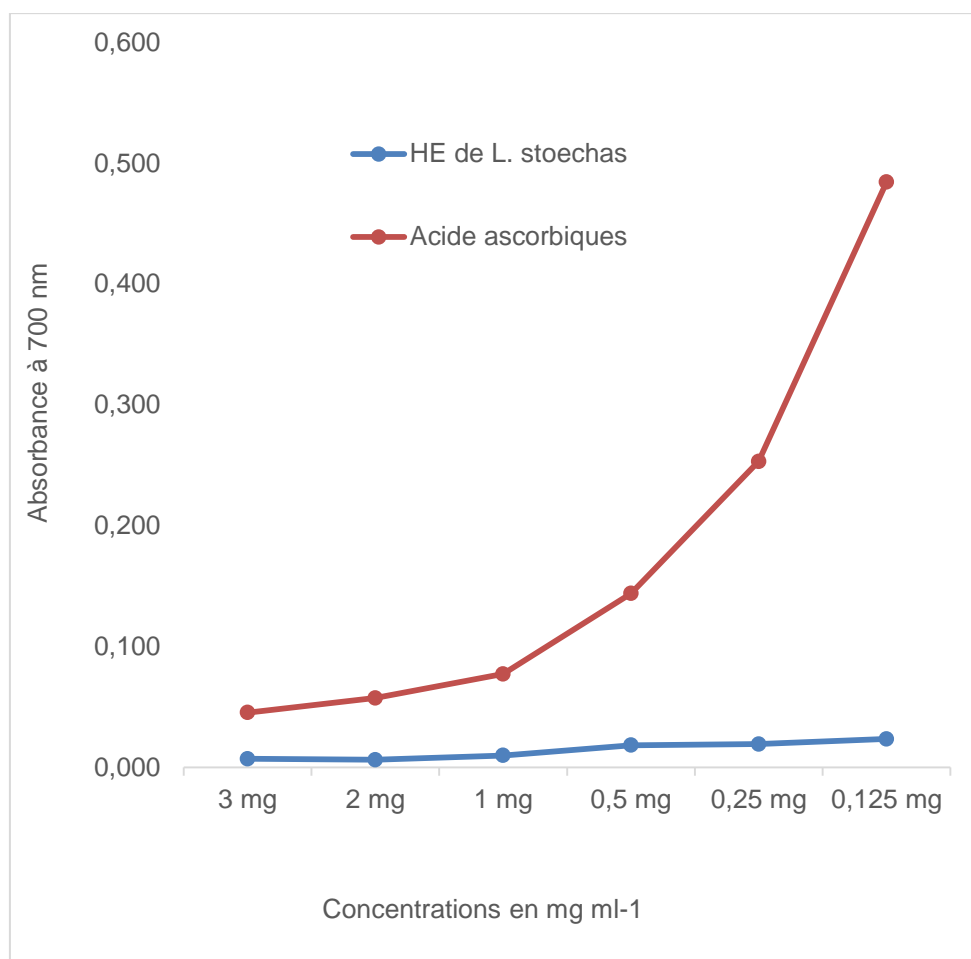


Figure 3.32 : Pouvoir réducteur de l'huile essentielle de *L. stoechas*

Les résultats obtenus dans la figure 3.32 montrent que la capacité de l'HE de *L. stoechas* à réduire le fer est nettement plus inférieure à celle de l'acide ascorbique qui présente une DO = 0,485 à une concentration de 0,125 mg ml⁻¹. À cette même concentration l'HE de *L. stoechas* a présenté une DO= 0,024.

À notre connaissance, très peu de travaux de recherche ont été menés sur la capacité de réduction du fer par l'HE de *L. stoechas*. L'étude menée sur l'extrait méthanolique des feuilles de *L. stoechas* montre une activité réductrice ferrique inférieure à celle des standards utilisés qui sont le BHT et le BHA [267]. L'étude réalisée en Espagne sur les HEs de *Lavandula latifolia* provenant de plusieurs localisations, montre un pouvoir réducteur ferrique nettement supérieur à notre HE. Ce dernier a enregistré des valeurs d'IC 50 très variables comprises entre 6,21 mg ml⁻¹ et 1,79 mg ml⁻¹ [281].

Selon Yang et *al.*, [282], la capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. Beaucoup

de travaux ont montré qu'il y a une relation directe entre la puissance de réduction des phytoconstituants et l'activité antioxydante [267], [279], [283]

Les faibles valeurs des activités antioxydantes obtenues par les deux méthodes (DPPH et FRAP) pourraient être la conséquence de l'absence des composés phénoliques tels que le thymol et le carvacrol. En effet ces deux derniers constituants phénoliques ont déjà prouvé leur fort pouvoir antioxydant [284], [285], [286]. En effet, certains composés autres que les composés phénoliques tels que le γ -terpinène (0,09 % dans notre HE) possèdent aussi une forte activité antioxydante [276]. Les propriétés antioxydantes sont influencées aussi par plusieurs facteurs, dont l'espèce, les organes de la plante utilisés, la saison de la récolte, l'origine géographique et la méthode d'extraction. Ces facteurs influencent également la composition chimique des huiles essentielles [153].

CONCLUSION

Notre travail de thèse s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche menés par le laboratoire de recherche de biotechnologies, environnement et santé (USDB-1, Blida). Nous pouvons dire que les objectifs fixés au départ ont été atteints. Ainsi, le but de notre travail était d'étudier la bioactivité et la composition chimique de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L. récoltée dans la montagne de Chréa où elle évolue spontanément.

Lavandula stoechas L. est une plante utilisée en médecine traditionnelle. Toutefois, bien qu'utilisée dans la région méditerranéenne et le Moyen-Orient, cette plante demeure relativement peu utilisée en médecine conventionnelle.

L'enquête ethnobotanique préliminaire réalisée au niveau des régions suivantes : Blida, Tipaza et Alger nous a permis de connaître l'usage fréquent de cette plante par la population urbaine interrogée afin de remédier durablement aux nombreuses maladies et infections. Cette enquête a révélé certains usages non décrits à ce jour dans la littérature comme l'utilisation de *L. stoechas* L. pour traiter certaines affections respiratoire, uro-génitale et ostéo-articulaire.

Le screening phytochimique réalisé sur les fleurs nous a permis d'identifier la nature des principaux métabolites secondaires présents. Ainsi, nous avons confirmé la présence de composés polyphénoliques (flavonoïdes, tanins), de stérols et terpènes, de saponosides, de composés réducteurs (coumarines). Ces composées possèdent pour la plupart des activités biologiques intéressantes qui justifieraient l'utilisation abondante et variée de cette espèce dans la médecine traditionnelle.

L'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle (HE) à partir des fleurs sèches de *L. stoechas* nous a permis de connaître la nature chimique et la variabilité de ses composés volatils. Il nous a paru intéressant d'évaluer le potentiel antimicrobien, anti-inflammatoire et antioxydant de l'HE.

L'analyse des minéraux des cendres, par chromatographie ionique, révèle la présence des ions sodium, potassium, chlorure et sulfate.

L'analyse chimique des composés volatils des sommités fleuries de *L. stoechas* a été effectuée par Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM). Nous avons constaté une dominance de la fenchone (40,78 %) suivie du camphre (9,10 %), l'acétate de myrtényle (8,94 %) et l'acétate de bornyle (5,10 %). Cette huile essentielle est caractérisée aussi par la présence de myrténal (3,01 %), 1,8-cinéol (2,23 %) α -fenchol (2,14 %) et viridiflorol (2,46 %) en parallèle avec une grande biodiversité, au total 75 des composés ont été identifiés. Ainsi, 09 composés volatils rapportés n'ont jamais été signalés auparavant dans les HEs de *L. stoechas* de Blida – Algérie qui sont les suivants : 1-octen-3-yl acetate, α - Campholene aldehyde, Perilla alcohol, β - Bourbonène, α - Ionone, β - Ionone, β - Cubebène, Bicyclo sesquiphéllandrène, Cardinol.

L'HE que nous avons extraite de *L. stoechas* fait preuve d'une grande diversité dans la composition qui affecte des constituants majeurs et mineurs. Les connaissances acquises sur leur composition élargissent d'avantage les connaissances actuelles sur la gamme de la diversité des composés organiques volatils pour cette espèce avec la première détection de plusieurs constituants mineurs. Avec sa grande biodiversité chimique, on peut supposer que *L. stoechas* est une très bonne source de matériel végétal pour une large gamme de molécules bioactives.

Les résultats de l'étude de la toxicité aiguë suivant la ligne directive OCDE 423 de l'huile essentielle de *L. stoechas* confirme qu'elle ne présente aucune toxicité aiguë à la dose de 2 g/kg même après deux semaines d'observation. Ces résultats ont été suivis par une étude toxicologique à des doses répétées pendant 28 jours. À partir des résultats obtenus, nous avons pu conclure que l'huile essentielle de *L. stoechas* a provoqué des changements dans les bilans hématologiques et biochimiques. Néanmoins, les organes d'élimination ne sont pas atteints, ils sont sains.

L'activité antimicrobienne de l'HE de *L. stoechas* a été évaluée *in vitro* sur onze microorganismes pathogènes de l'homme (bactéries Gram positifs, bactéries Gram négatifs et levures) et six microorganismes phytopathogènes (bactéries et champignons). Notre HE est plus efficace sur les bactéries Gram positifs et les levures, ainsi les diamètres moyens des zones d'inhibition sont plus importants chez

ces microorganismes. Les bactéries Gram négatif ont présenté une légère sensibilité vis-à-vis l'HE de *L. stoechas* toutefois, nous avons observé une résistance de *Pseudomonas aeruginosa*. Les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricides (CMB) enregistrées sont très variables d'une souche à une autre, ainsi, les valeurs de la CMB varient de 0,3125 µgml⁻¹ à >20.

Le présent travail a mis en évidence une activité antimicrobienne appréciable suite à l'utilisation de l'HE de *L. stoechas* de Blida- Algérie. Ces résultats sur les microorganismes phytopathogènes sont rapportés pour la première fois. Toutes ces informations témoignent du potentiel que présentent les HEs pour la recherche de molécules antimicrobiennes innovantes.

L'effet de l'HE de *L. stoechas* et de ses deux composants majoritaires « camphre et fenchone » contre les microorganismes phytopathogènes montrent des sensibilités variables. Ainsi l'effet antimicrobien est plus intense lorsque les concentrations sont plus élevées. Le camphre est moins efficace sur l'ensemble des bactéries et champignons voir totalement inefficace sur *Rhizoctonia solani*. L'association entre les deux composants majoritaires à savoir, camphre + fenchone a montré un effet antimicrobien proche de celui de l'HE de *L. stoechas*. Le calcul de la concentration fractionnaire inhibitrice (FIC) a indiqué un effet d'addition et d'antagoniste respectivement pour *E. amylovora* et *P. carotovorum* subsp *carotovorum*.

Outre ses potentialités antimicrobiennes vérifiées sur des germes standardisés en milieu gélosé, l'HE de *L. stoechas* présente une action anti-inflammatoire indéniable *in vivo*. De ce fait, elle pourra être proposée, éventuellement, comme un actif de choix dans le traitement local des inflammations.

L'activité antioxydante de l'HE de *L. stoechas* a été évaluée et comparée en utilisant les méthodes suivantes : la méthode de DPPH et la méthode de FRAAP. Notre HE a présenté une activité antioxydante, cependant, elle est faible par comparaison à l'antioxydant de référence étudiée qui est le BHT. Ces données, suggèrent que cette activité de l'HE de *L. stoechas*, en dépit de son potentiel relativement faible, peut être intéressante du fait de la diversité des substances

actives. Toutes ces substances sont présentes en quantités très faibles, le plus souvent inférieures à 0,3 % de la teneur totale de l'huile.

L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* constitue une première étape dans la recherche de substances de source naturelle biologiquement actives. Il serait intéressant aussi d'étudier la possibilité d'exploiter cette plante pour la production de nouveaux médicaments. Des études complémentaires *in vivo* seraient nécessaires pour évaluer les autres effets de la *Lavandula stoechas*. Dans ce contexte, l'effet antimicrobien de l'HE de *L. stoechas* devra également être exploré sur un spectre plus large de microorganismes en utilisant plusieurs méthodes d'évaluation. Il est indispensable d'évaluer la toxicité de cette HE sur l'homme pour éviter tout problème d'effet secondaire. Il serait, utile d'envisager et de préciser la nature des composés responsables de cette activité par un fractionnement mené en parallèle à l'aide de tests biologiques (bio guidage).

Cette contribution permettra d'élargir l'arsenal thérapeutique dont nous disposons pour lutter contre le problème récurrent de la résistance microbienne aux antibiotiques. Ainsi, la disponibilité de ces biomolécules peut dans un avenir proche satisfaire éventuellement les besoins des industries pharmaceutiques.

En plus de cet apport thérapeutique, le gain économique ne serait pas négligeable. Il s'agit de valoriser le patrimoine végétal de notre pays et promouvoir la culture et la transformation des plantes aromatiques et médicinales à même de servir encore de tremplin pour la recherche scientifique.

Cette étude mériterait d'être poursuivie afin de répondre à des questions essentielles à savoir :

- Il est primordial, dans un premier temps d'exploiter les voies de biosynthèse des terpènes et notamment des terpènes synthases (TPS).
- Des essais culturaux en plein champ de cette espèce et l'évaluation de leur capacité productive en principes actifs.
- Des tests d'applications de l'HE de *Lavandula stoechas* dans le domaine pharmaceutique,
- Évaluer la toxicité chronique (90 jours) des huiles essentielles sur différentes lignées cellulaires *in vitro* et sur des modèles utilisant les animaux afin de

déterminer les doses thérapeutiques et les doses létales car les remèdes traditionnels souffrent beaucoup du problème de dosages,

– Il serait intéressant de mener une étude sur les effets thérapeutiques des composants majoritaires (fenchone) de cette HE car ils n'ont pas fait l'objet d'études scientifiques approfondies. Ainsi, ces composants pourraient constituer un créneau de recherche intéressant.

- [1] Sofowora. A., "Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique". KARTHALA Editions académie Suisse des sciences culturelles. (2010) 384.
- [2] Amarti. F., El-Ajjouri. M., Ghanmi. M., Satrani. B., Aafi. A., Khla. A., Guedira. A., Rahouti. M., Chaouch. A., "Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *thymus zygis* du Maroc". *Phytothérapie*,9 : (2011)149-157p.
- [3] Fuinel. G. "Arbres et plantes médicinales du jardin". Edition Fernand Lanore (2002).
- [4] Ouédraogo. N., Lompo. M, Sawadogo. R.M., Tibiri. A., Hay. A.E., Koudou. J., Dijoux. M.G., Guissou. I.P. "Etude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir (Fabaceae)". *Phytothérapie* 10: (2012) 286-292.
- [5] Hmamouchi, I., Rachidi, M., Abourazzak. F.M., Khazzani. H., Bennani. L., Bzami. F., El Mansouri. L., Tahiri. L., Harzy. T., Abouqa. R., Allali. F., Hajjaj-Hassouni. N. "Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales marocaines en rhumatologie". *Revue Marocaine de Rhumatologie*; 22: (2012) 52-56.
- [6] Elaerts, V., "La phytothérapie de la femme enceinte". Edition Lulu. (2014) 59p.
- [7] Skalli. S., Soulaymani-Bencheikh, R., "Pharmacovigilance des Plantes Médicinale : Cours Francophone Inter pays de Pharmacovigilance". Centre de Pharmacovigilance du Maroc – Rabat- (2008). 40.
- [8] Simonet-Avril. A., "Lavande : la lavande aux champs, au jardin, dans la maison et dans l'assiette". Edition : Kubik. (2005) 143. [9] Benabdelkader. T., "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. (2012) 281p.
- [9] Benabdelkader. T., "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. (2012) 281p. 00

- [10] Upson. T., Andrews. S., "The genus *Lavandula*. Portland and oregon, USA: Timber Press". (2004) 442.
- [11] Lis-Balchin. M., "Lavender: The Genus *Lavandula*". Edition : Taylor & Francis (2002). 296p.
- [12] Bossard, R., Cuisance. P., "Arbres et arbustes d'ornement des régions tempérées et méditerranéennes". Edition Lavoisier, Paris, Tec& doc, Baillière. (1986) 736p.
- [13] Magnan, B., " La lavande une plante parmi les plantes. Mémoire en réflexologie". (2006) 11p.
- [14] Chaytor. D. A., "A taxonomic study of the genus *Lavandula*. Botanical Journal of the Linnean". Society 51, (1937) 338. 153-204p.
- [15] Allaby, M., "The Concise Oxford Dictionary of Botany". 1er edition, Oxford University Press. (1992) 448p.
- [16] Chu. C.J., Kemper. K.J., " Lavender (*Lavandula* spp.)". The Longwood Herbal Task Force and The Center for Holistic Pediatric Education and Research. (2001) 32p.
- [17] Rameau, J.C., Mansion, D., Dumé, G., Gauberville. C., "Flore forestière française: Région Méditerranéenne". Edition de l'Institut pour le développement forestier. (2008) 2432.
- [18] Upson. T., The Monograph, an overview: new classification and future prospects. First international Lavender conference, Cambridge university botanic garden and Clare college (2009).
- [19] Ryley, C., "Roman gardens and their plants". Succes Archaeological Society. Lewes England. (1998) 56.
- [20] Padrini, F., Lucheroni. M.T., Le grand livre des huiles essentielles Guide pratique pour retrouver vitalité, bien être et beauté grâce ay essences. Edition De Vecchi S.A, Paris. (2006) 206.
- [21] Murray, J.A.H., Bradley. H., Craigie. W.A., "The Oxford English Dictionary". Edition: John Simpson & Edmund Weiner. Vol.6 (1933), clarendon Press, Oxford. 111.

- [22] Paton, A.J., Springate, D., Suddee, S., Otieno. D., Grayer. R.J., Harley. M.M., Willis. F., Simmonds. M.S., Powell. M.P., Savolainen. V., "Phylogeny and evolution of basilis and allies (*Ocimeae*, *Labiatae*) based on three plastid DNA regions". *Mol. Phylogenet. Evol.* 31 (2004.), 277-299.
- [23] Dob. T., Dahmane. D., Agli. M., Chelghoum. C., "Essential oil composition of *Lavandula stoechas* from Algeria ". *Pharmaceutical Biology*, Vol 44, N° 1 (2006), 60-64.
- [24] Couplan. F., " Les plantes et leurs noms : Histoires insolites". Edition Quæ. (2012) 223 p.
- [25] Quezel. P., SANTA. S., "Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales", Tome II, Ed. CNRS, Paris. (1963) 1170.
- [26] Kimbrough. K.A., Swift. C.E., Growing Lavender in Colorado. Gardening Series/Flowers. Fact Sheet N° 7. (2010) 245. 3.
- [27] Zheljzkov, V. D., Cantrell, C. L., Astatkie, T., Jeliaskova, E., "Distillation time effect on lavender essential oil yield and composition". *Journal of Oleo Science*, 62(4): (2013) 195–199.
- [28] Boelens, M. H., "Chemical and sensory evaluation of *Lavandula* Oils". *Perfum. Flavor.* 20, (1995) 23-51.
- [29] Weiss, E. A., *Essential Oil Crops*, CAB International, Wallingford, UK. (1997) 600.
- [30] Barceloux. D.G., "Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, and Venomous Animals". Edition: John Wiley & Sons. (2008) 1184p.
- [31] Boufflers. B., *Soins naturels des dents*. Edition : Equilibre. (2005) 223p.
- [32] Abourashed. A.E., Khan. A.I. "Leung's Encyclopedia of Common Natural Ingredients: Used in Food, Drugs and Cosmetics". 3^{ème} Edition Wiley. (2009) 810p.
- [33] Esiyok. D., Otles. S., Akcicek. E., "Herbs as a food source in Turkey". *Asian pacific Journal of Cancer prevention*.5, (2004) 334-339.

- [34] Lis-Balchin. M., "Aromatherapy science: A guide for healthcare professionals". Pharmaceutical Press, London: (2005) 195-201.
- [35] Bruneton. J., " Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales". Edition Lavoisier (4e ed) Tec & Doc, Paris. (2009) 1 270p.
- [36] Grünwald. J., Jänicke. C., "Guide de la phytothérapie". Marabout Editeur. (2006) 416p
- [37] Evelegh, T., "Lavender: practical inspirations for natural gifts, country crafts and decorative displays". Lorenz books: Sydney. (1996) 128p.
- [38] Castellana. R., Jama. S., Floriculture Et Parfumerie: Les Origines De L'acclimatation Végétale Sur La Côte D'azur. The Phoenix Project. (2012) 17p
- [39] Nadkarni, K. M., Indian Materia Medica, third ed. Popular Prakashan, Bombay, (1982) 730.
- [40] Said. H. M. 1996. Medicinal Herbs, Vol. 1. Bait al-Hikmah, Madinat al-Hikmah: Pakistan.
- [41] 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.
- [42] Usmanghani. K., Saeed. A., Alam. .M.T. 1997. Indusynic Medicine. Traditional Medicine of Herbal, Animal and Mineral Origin in Pakistan, University of Karachi, University of Karachi Press, 273.
- [43] Baytop. T. 1999. *Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and Present)*. No. 3255 (2nd ed.,. 244–245 p). Istanbul: Publications of the Istanbul University.
- [44] Vialard. N. 2008. Remèdes et recette à la Lavande. Edition Rustica. 64.
- [45] Scimeca. D., Tétau. M. 2013. Votre santé par les huiles essentielles, Le guide pratique pour prévenir et guérir tous les maux quotidiens. Edition: Alpen Eds. 96.
- [46] Bouchard. A.M., Charroin. G., Thomassey. N. 2014. La bible du grand voyageur – Santé. 2eme édition LONELY PLANET. 348p.

- [47] Moro-Buronzo. A., Schnebelen. J.C. 2012. Petit Livre de - Huiles essentielles 18 huiles essentielles pour se soigner. Edition: First. 160.
- [48] Böhning. M.I. 2008. Propositions thérapeutiques de traitements comprenant des huiles essentielles lors de borréliose de Lyme. Edition : Aromarc-com. 44p.
- [49] Bonnafous. C. 2013. Traité scientifique Aromathérapie : Aromatologie & Aromachologie. Edition Dangles. 522p.
- [50] Debuigne. G., Couplan. F. 2013. Le petite LAROUSSE des plantes qui guérissent 500 plantes et leurs remèdes. Edition LAROUSSE. 1029p.
- [51] Boulard. B. 2001. Dictionnaire : plante médicinales du monde, réalité et croyance. Edition Estem. 660p.
- [52] Chevallier. A. 2013. Larousse des plantes médicinales - Nouvelle présentation: Identification, préparation, soins. Edition LAROUSSE. 336p.
- [53] Gurib-Fakim. A. 2014. Toutes les plantes qui soignent : description, préparation, usages et bienfaits. Edition Michel Lafon. 735p.
- [54] McIntyre. A. 2011. Le guide complet de la phytothérapie. Edition : courrier du livre Paris. 256.
- [55] Ollier. C. 2011. Le conseil en phytothérapie. Edition Pro-officina. 2ème édition Wolters Kluwer France. 174p.
- [56] Iserin. P. 1996. Encyclopédie de plantes médicinales : identification, préparation, soin. Bordas : Larousse. 336p
- [57] Wichti. M., Anton. R. 2003. Plantes thérapeutique : tradition, pratiques officinales. *Tec & Doc*. 692.
- [58] Faucon. M. 2012. Traité d'aromathérapie scientifique et médicale. Edition Sang de la terre et médical. 879p.
- [59] Raynaud. J. 2006. Prescription et conseil en aromathérapie. Edition Lavoisier. 247p.

- [60] Afnor. 2000. Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p.
- [61] Zhiri. A., Baudoux. D. 2005. Huiles essentielles chémotypées et leur synergie. Inspir et developement. Luxembourg. 8-43.
- [62] Rai. M.K., Acharya. D., Wadegaonkar. P. " Plant derived- antimycotics: potential of Acteraceous plants. In: Plantb- derived antimycotics : current trends and future prospects", Howorth press, N-York, Londin, Oxford. (2003) 165- 185.
- [63] Keane. S., Ryan. M.F., "Purification, characterisation, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria mellonella* (L.)". *Insect biochemistry and molecular biology* Vol 29 (12) (1999)1097-1104.
- [64] Hopkins. W.G., "Physiologie végétale". Edition De Boeck Université. (2003) 514p.
- [65] Bakkali. F., Averbeck. S., Averbeck. D., Zhiri. A., Baudoux. D., Idaomar. M., Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. *Mutation Research* 606 (2006): 27-38.
- [66] Girard. G., "Les propriétés des huiles essentielles dans les soins bucco –dentaires d'hier à aujourd'hui, Mise au point d'un modèle préclinique de lésion buccale de type aphte pour tester les effets thérapeutiques des huiles essentielles. Université de Nancy. (2010) 116 p
- [67] Staub. H., Bayer. L., "Traité approfondi de phytothérapie avec présentation de 750 huiles essentielles connues". Edition Grancher. (2013) 685.
- [68] Gorenflot. R., Foucault. B., "Biologie végétale : les cormophytes". Edition Dunos, Paris. (2005) 594p.
- [69] Baudoux. D., "Pour une cosmétique intelligente : huile essentielles et végétales". Edition Amyris SPRL. (2010) 208 p.
- [70] Zahalka. J.P., "Les huiles essentielles : 230 Huiles Essentielles, 170 maux traités". Edition du Dauphin. (2010) 367.

- [71] Kaloustian. J., Hadji-Minaglou. F., "La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie". Edition Springer-Verlag France, Paris. (2012) 210p.
- [72] Miles. E., "Les huiles essentielles pour les nuls". Edition Frist. (2010) 342.
- [73] Baudoux. D., Zhiri. A., "Les cahiers pratiques d'aromathérapie selon l'école française : Dermatologie". Edition Inspir S.A. volume 2. (2003) 292p.
- [74] Bahorun, T., "Substances naturelles actives, la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle". *Food and Agricultural Research*, (1997) 83-94.
- [75] Iserin. P., "Larousse des plantes médicinales". Edition Larousse, (2013) 335p.
- [76] Catier. O., Roux. D., "Botanique, pharmacognosie, phytothérapie". Edition : Wolters Kluwer. (2007) 150 p.
- [77] Chevallier. A., "Plantes médicinales". Edition Gründ. (2013) 288p.
- [78] Folliard. T., "Le petit Larousse des huiles essentielles". Edition Larousse. (2014) 303p.
- [79] Audigié. C., Zonszain. F., "Biochimie structural". Edition Wolters Kluwer France. (2009) 266 p.
- [80] Hoffmann. D., *Medical Herbalism: The Science Principles and Practices Of Herbal Medicine*. Edition: Hardcover. (2003) 672p.
- [81] Schmelzer. G.H., Gurib-Fakim. A., "Ressources végétales de l'Afrique tropicale : Plantes médicinales". Edition : Prota. (2008) 869.
- [82] Khiati. M., "Guide des maladies infectieuses et parasitaires". Edition OPU (1998).
- [83] Nicklin J., Graeme K-Cook., Paget RT., Killingtons R., « Essentiel en microbiologique » .Berti édition (2000) .paris. P : 3,75.
- [84] Corbaz. R., "Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes". Edition presses polytechniques et universitaires romandes. Suisse (1990) 275 p.
- [85] Lepoivre. P., "Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte". Ed. De Boeck Supérieur. (1990) 432p

- [86] Rezki-Bekki, M.A., "Production de métabolites par les levures : caractérisation et identification des arômes et des alcools". Thèse de doctorat en biotechnologies. (2014)
- [87] Akoua, K., Guessennd, N., Gbonon, V., Faye Ketté, H., Dosso, M., "Methicillin resistance of Staphylococcus in Abidjan 1998-200 : A new problem". *Médecine et maladies infectieuses* ; 34 (3) : (2004) 132-6.
- [88] Guessennd, K.N., Loubienga, S.W., Gbonon, V., Kouassi M'Bengue, A., Kacou N'Douba, A., Dosso, M., "Résistance aux antibiotiques de 241 souches d'*Escherichia coli* isolées des infections urinaires des patients hospitalisés au CHU de Cocody à Abidjan". *International Journal of Biological Sciences*, 5(1) (2004) : 38-45.
- [89] Garnier Delamare., Dictionnaire des termes de médecine. Editions Maloine, Paris (1992)
- [90] Burt, S., Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol* 194(3) (2004) : 223-53.
- [91] Souza, E.L., Stamford, T.L.M., Lima, E.O., "Sensitivity of Spoiling and Pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*) essential oil". *Brazilian Journal of Microbiology*, 37 (2006) : 527-532
- [92] Pavel, M., Ristic, M., Stevic, T., "Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity". *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75 (1) (2009) : 27-34
- [93] Wendakoo, C.N., Sakaguchi, M., "Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components of spices". *Journal of Food Protection*. 58 (1995):280-283.
- [94] Malecky, M., Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins". Thèse de Doctorat, INRA, UMR 791 Physiologie de la Nutrition et alimentation, (2007) F-75231 Paris.
- [95] Boyd, B., Ford, C., Koepke-Michael, C., Gray, K., Horn, E, McAnalley, S. et McAnalley, B., "Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé". *GlycoScience & Nutrition* 4 (2003), 7p.

- [96] Morel, Y., Barouki, R., "Repression of gene expression by oxidative stress". *Biochemical Journal* 342(3) (1999), 481-496.
- [97] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. Telser, J., "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1) (2007), 44-84.
- [98] Behera, J. N., Rao, J., "A Ni²⁺ (S = 1) Kagome Compound Templated by 1,8-Diazacubane". *American of Chemistry Society* 128 (29) (2006), 9334 -9335.
- [99] Meda, A., Laien, C.E., Romito, M., Millogo J., Nacoulma, O.G., "Determination of total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honeys as well as well as their radical scavenging activity". *Food Chem.*, 91 (2005), 571-577.
- [100] Ribeiro, M.A., Bernardo-Gil, M.G. Esquivel, M.M., "*Melissa officinalis* L.: study of antioxidant activity in supercritical residues", *Journal of Supercritical Fluids*, 21 (2001) ; 51-60.
- [101] Marongiu, B., Porcedda, S., Piras A., Rosa A., Deiana, M., Dessi. A., "Antioxidant Activity of Supercritical Extract of *Melissa officinalis* Subsp. *Inodora*, *Phytoter. Res.*, 18 (2004) ; 789-792.
- [102] Herodez, S. S., Hadolinb, M., Skergeta, M. Zeljko-Knez., "Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves", *Food Chemistry*, 80 (2003), 275-282.
- [103] Schorderet, M., Dayer J-M. et coll., "Physiopathologie de la fièvre, de la douleur et de l'inflammation ; Analgésiques, antipyrétiques, anti-inflammatoires et immunosuppresseurs (in *Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*)". Slatkine, Paris-Génève, (1998) 569-606.
- [104] Medzhitov, R., "Origin and physiological roles of inflammation". *Nature*. Vol.454, N°.7203, (2008) 428-435.
- [105] Dieng, C., Contribution à l'étude de *Khaya senegalensis* (DESR.) A.JUSS (Meliaceae). Thèse pharmacie, Dakar, 10 (1993), 109.

- [106] Bayes, O.M., "Contribution à l'étude de l'activité anti-inflammatoire de la pulpe de fruit de *Balanites aegyptiaca* L. (Zygophyllaceae)". Thèse pharmacie, Bamako. (1997) 67.
- [107] Revillard, H., «Immunologie» ;De Boeck Université 4ème Edition; (2001) 600.
- [108] Moulin, M., "Médicaments antiinflammatoires, in : Abrégé de pharmacologie". Masson, Paris, (1998) 332-336.
- [109] Miossec, P., "Physiopathologie de l'inflammation". La revue du praticien, 53, (2003) 1-7.
- [110] Serhan, C.N., Ward, P.A., Gilroy, D.W., "Fundamentals of inflammation". Hardback, USA, pp; (2010) 13-14.
- [111] Dorward, D.A., Lucas, C.D., Rossi, A.G., Haslett, C., Dhaliwal, K., "Imaging inflammation : molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution". *Pharmacology and Therapeutics*, 135 ; (2012) 182-199.
- [112] Djenane. D., Aïder. M., Yangüela. J., Idir. L., Gómez. D., Roncalés. P., "Antioxidant and antibacterial effects of Lavandula and Mentha essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature". *Meat Science* 92: (2012) 667–674.
- [113] Zerrad. W., Mataoui. B.S., Hillali. S., El antris. S., hmeyen. A., "Etude comparative des mécanismes biochimiques et moléculaires de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur". Bull Laboratoire de Biochimie, d'environnement et d'Agroalimentaire, Maroc,N°7 : (2006) 10-14.
- [114] Ayel. J., Born. M., Germain. F., Martin-Demezil. J., Rio. D., Wirth. J., Lubrifiants et fluides pour l'automobile. Edition TCHNIP. (1998) 260p.
- [115] Rouessac. F., Rouessac. A., Cruché. D., Duverger Arfuso. C., Martel. A. "Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales". Edition Dunod. (2011) 512.
- [116] Yemoa. A.L., Gbenou. J.D., Johnson. R.C., Djego. J.G., Zinsou. C., Moudachirou. M., Quetin-Leclercq. J., Bigot. A., Portaels. F., "Identification et étude phytochimique de

plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin". *Ethnopharmacologia*, n°42, (2008) 48-55.

[117] Diallo. A., "Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* willd (Myrtaceae)". thèse de doctorat. (2005) 100p.

[118] Badiaga. M., "Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali". Thèse de doctorat. Université de Bamako et université Blaise Pascale de CLERMONT FERRAND. (2011) 183p.

[119] Diarra. M.N., "Etude phytochimique d'une plante antipaludique utilisée au Mali : *spilanthus oleracea* Jacq. (Asteraceae)". Thèse de doctorat. Université de Bamako. (2003) 78p.

[120] N'guessan. K., Kadja. B., Zirihi. G.N., Traoré. D., Aké-Assi .L, "Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire)". *Sciences & Nature* Vol. 6 N°1: (2009) 1-15.

[121] Dohou. N., Yamni. K., Tahrouch. S., Idrissi Hassani. L.M., Badoc. A., Gmira. N. "Screening phytochimique d'une endémique ibéro marocaine, *Thymelaea lythroides*". *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 142: (2003) 61-78.

[122] Rizk. A.M., "Constituents of plants growing in Qatar". *Fitoterapia*, 52(2), (1982)35-42.

[123] Clevenger. J.F., "Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type". *American Perfumer & Essential Oil Review*: (1928)467-503.

[124] Caree, P., "Précis de technologies et de chimie industrielle". Edition Ballière Jb et fils, Tome 3, (1953)170p.

[125] De maack. F., sablier. M., "Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation, (1953)2614p.

[126] OCDE. "Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë", N° 423 (2001).

- [127] OCDE. "Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : Etude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur des rongeurs", N° 407 (2008).
- [128] Walum, E., Nilsson, M., Clemenson, C., Ekwall, B. The meic program and its implications for the prediction of acute human systemic toxicity. *Alternative Methods in Toxicology*, x11: (1995) 275- 282
- [129] Sreeraj. G., Joby, J., Kotrappa, Y. M., "Acute and subchronic oral toxicity studies of hydrogenatedcurcuminoid formulation 'CuroWhite' in rats". *Toxicology Reports* 3 ; (2016) 817–825.
- [130] Martoja, R., Martoja-Pierson, M., " Initiation aux techniques de l'histologie animale". Paris: Masson, (1967) 345p.
- [131] Hambaba. L., Boudjellal. K., Abdeddaim. M., Aberkane. M.C., Boudiaf. K., "Etude in vitro des activités antimicrobiennes et antioxydantes des extraits du fruit d'*Elaeagnus augustifolia* L". *phytothérapie* 10, issue6, (2012) 350-356.
- [132] Leclerc, H., "Précis de phytothérapie". Edition Masson, (1975) 170p.
- [133] Mann. C.M., Markham. J.L., "A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oil". *Journal of Applied Microbiology*. N° 84, (1998) 538- 544.
- [134] Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H., "Manual of Clinical Microbiology", vol. 6th ed. ASM, Washington, DC (1995).
- [135] Berenbaum. M.C., "Criteria for analyzing interactions between biologically active agents", *Advances in Cancer Research* 35: (1981)269-335.
- [136] Grover, R.K., Moore, J.D., "Toxicometric studies of fungicides against brown rot organisms *Sclerotinia fructicola* and *S. laxa*". *Phytopath.* 52, (1962) 876–880.
- [137] De Billerbeck. V.G., Roques. C.G., Bessière. J.M., Fonvieille. J.L., Dargent. R., "Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*". *Canadian Journal of Microbiology* 47(1): (2001)9-17.

- [138] Thompson. D.P., "Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi". *Mycologia*, 81(1), (1989)151-153.
- [139] Winter. C.A., Risley. E.A., Nuss. G.W., " Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs". *Proc Soc Exp Biol Med* ;111: (1962)544–547.
- [140] Athamena. S., Chalghem. I., Kassah-Laouar. A., Laroui. S., Khebri. S., "Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L." *Lebanese Science Journal*, Vol. 11, No. 1, (2010) 69-81.
- [141] Roginsky. V., Lissi. E.A., "Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food". *Food Chemistry*, 92, (2005) 235-254.
- [142] Cuendet, M., Hostettmann, K., and Potterat, O., "Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*". *Helv. Chim. Acta* 80, (1997)1144±1152
- [143] Kirby, A. J., and Schmidt, R. J., "The antioxidant activity of chinese herbs for eczema and of placebo herbs". *J. Ethnopharmacol.* 56, (1997)103±108.
- [144] Bougandoura. N., Bendimerad, N., "Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp.Nepeta* (L.) Briq." *Revue Nature & Technologie*, n° 09. (2013) 14-19.
- [145] Politeo. O., Jukic. M., Milos. M., "Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil". *Food Chemistry*: 101. (2007)379-385.
- [146] Oyaizu. M., "Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine". *Japanese Journal of Nutrition*, 44, (1986) 307–315.
- [147] Galego. L., Almeida. V., Gonçalves. V., Costa.M., Monteiro. I., Matos. F., Miguel. G., "Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Thymbra capitata*, *Origanum vulgare*, *Thymus mastichina* and *Calamintha baetica*". *ISHS Acta Horticulturae* 765. (2006) 7pages.
- [148] Lawless, J., "In Enciclopedia degli Oli Essenziali; Editore Tecniche Nuove: Milano", Italy, p 175 (2003).

- [149] Atzei, A. D., "In Le Piante nella Tradizione Popolare della Sardegna"; Carlo Delfino Editore: Sassari, Italy, pp (2003) 221- 222.
- [150] Gilani, A. H., Aziz, N., Khan, M. A., Shahen, F., Jabeen, Q., Siddiqui, B. S., Herzig, J. W., "Ethnopharmacological evaluation of the anticonvulsant, sedative and antispasmodic activities of *Lavandula stoechas* L." *J. Ethnopharmacol*, 71, (2000) 161-167
- [151] Clark, R. J., Hamilton, J. G. G., Chapman, J. V., Rhodes, M. J. C., Hallanhan, D. L., "Analysis of monoterpenoids in glandular trichomes of catmint *Nepeta racemosa*". *Plant J*. 11: (1997)1387–1393.
- [152] Turner, G. W., Gershenzon, J., Croteau. R. B. "Development of peltate glandular trichomes of Peppermint". *Plant Physiol*. 124: (2000) 665–679.
- [153] Teixeira, B., Marquesa, A., Ramosa C., Nengc, N.R., Nogueirac, J.M.F., Saraivab, J.A., Nunesa, M.L., "Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils". *Industrial Crops and Products*, 43, (2013) 587– 595.
- [154] Zuzarte, M., Dinis, A.M, Cavaleiro, C., Salgueiro, L. R., Canhotoa, J.M., "Trichomes, essential oils and in vitro propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae)". *Industrial Crops and Products* 32 (2010) 580–587.
- [155] Nultsch. W., "Botanique générale". Edition De Boeck Université s,a –Paris. (1998) 602.
- [156] Pharmacopée Européenne. 8ème édition, Strasbourg, Conseil d'Europe, (2014), 2600.
- [157] Richter, G., Métabolisme des végétaux : physiologie et biochimie. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, (1993) 303.
- [158] Riedacker. A., Dreyer. E., Pafadnam. C., Joly. H., Bory. G., "Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides". *John Libbey Eurotext*, Paris. (1993) 489.
- [159] Marschner. H., "Mineral Nutrition of Higher Plants". London: Academic Press, 61-96. In Hopkins WG. Physiologie végétale : Molécules et metabolism, Ed. De boeck, Paris, (2003) 273-281.

- [160] Ez zoubi. Y., Bousta. D., El Mansouri. L., Boukhira. S., Lebtar. S., Achour. S., Farah. A., "Phytochemical Screening, Anti-inflammatory Activity and Acute Toxicity of Hydro-ethanolic, Flavonoid, Tannin and Mucilage Extracts of *Lavandula stoechas* L. from Morocco". *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 8(1) ; (2015) 31-37.
- [161] Mohammedi, Z., Atik, F., "Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L." *Nature & Technologie*, (6): (2012) 34–39.
- [162] Benabdelkader. T., Zitouni. A., Guitton. Y., Jullien. F., Maitre. D., Casabianca. H., Legendre. L., Kameli. A., "Essential Oils from Wild Populations of Algerian *Lavandula stoechas* L.: Composition, Chemical Variability, and in vitro Biological Properties". *Chemistry & Biodiversity* – Vol. 8, (2011) 937-953.
- [163] Zuzarte. M., Gonçalves. M.J., Cavaleiro. C., Cruz. M.T., Benzarti. A., Marongiu. B., Maxia. A., Piras. A., Salgueiro. L., "Antifungal and anti- inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils". *Industrial crops and products* 44: (2013) 97-103.
- [164] Sebai, H., Selmi, S., Rtibi, K., Souli. A., Gharbi. N., Sakly. M., "Lavender (*Lavandula stoechas* L.) essential oils attenuate hyperglycemia and protect against oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats". *Lipids Health Dis* (2013)12:189.
- [165] Khia. A., Satrani. B., Ghanmi. M., Aafi. A., Aberchane. M., Chaouch. A., "Caractérisation chimique et microbiologique des huiles essentielles de *Lavandula dentata* et *Lavandula stoechas* from the high atlas region of Morocco". *ScienceLib* 6(140803): (2014) 21.
- [166] Hassiotis. N.C., "Chemical compounds and essential oil release through decomposition process from *Lavandula stoechas* in Mediterranean region". *Biochemical Systematics and Ecology* 38(4): (2010) 493–501.
- [167] Angioni. A, Barra. A, Coroneo. V, Dessi. S, Cabras.P., "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, (2006) 4364–4370 p.

- [168] Barkat. M., Laib. I., "Antioxydant activity of the essential oil from the flowers of *Lavandula stoechas*". *Journal of Pharnacognosy and phytotherapy* Vol.4 (7) (2012) 96-101.
- [169] Putievsky. E., Ravid. U., Dudai. N., "The influence of season and harvest frequency on the essential oil and the herbal yield from a pure clone of sage (*Salvia officinalis*) grown under cultivated conditions". *J. Nat. Prod.* 49, (1986) 326-329.
- [170] Figueiredo. A.C., Barros. J.G., Pedro. L.G., Scheffer. J-J-C., "Physiological aspects of essential oil production. In Ch. Franz, A. Mathe, & G. Buchbauer (Eds.), *Essential oils: Basic and applied research, Proceedings of the 27th international symposium on essential oils*". *Carol Stream, IL: Allured Publishing*. (1997) 95–107.
- [171] Merghache. S., Hamza. M., Boufeldja-Tabti., "Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta Chalepensis* L. de Tlemcen", Algérie. *Afrique SCIENCE* 05(1): (2009) 67 – 81.
- [172] Bruneton, J., "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales". 2ème édition. *Technique et Documentation Lavoisier, Paris*. (1999) 915 p.
- [173] Alvarez-Castellanos. P.P., Pascual-Viilalobos. M.J. Effect of fertilizer on yield and composition of flowerhead essential oil of *Chrysanthemum caronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain". *Ind. Crops Prod.* 17, (2003) 77-81 p.
- [174] Vekiari. S.A., Protopapadakis. E.E., Papadopoulou. P., Papanicolaou. D., Panou. C., Vamvakias. M., "Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a lemon variety". *J. Agr. Food Chem.* 5(1), (2002) 147-153.
- [175] Adams, R.P. "Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy". *Carol Stream, Illinois, USA : Allured Publishing Corporation* (2007.)
- [176] Misharina. T.A., Samusenko, A.L., Belyaeva. N.V., "Gas chromatographic and IR spectroscopic characteristics of tri- and tetramethylcyclohexenyl butenyl ketones". *Russian Chemical Bulletin*, 51(9), (2002)1684-1688.

- [177] Jantan, I., Ling, Y. E., Romli, S., Ayop, N., Ahmad, A. S., "A comparative study of the constituents of the essential oils of three cinnamomum species from malaysia". *Journal of Essential Oil Research*, 15(6) : (2003) 387–391.
- [178] Cozzani, S., Muselli, A., Desjobert, J.M., Bernardini, A.F., Tomi, F., Casanova, J. "Chemical composition of essential oil of *Teucrium polium subsp. capitatum (L.) from Corsica*", *Flavour and Fragrance Journal*, 20(4): (2005) 436-441.
- [179] Seo. W.H., Baek, H.H., "Identification of characteristic aroma-active compounds from water dropword (*Oenanthe javanica DC.*)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 17, (2005) 6766-6777.
- [180] Pavlovic. M., Tzakou. O., Petrakis. P.V., Couladis. M. "The essential oil of *Hypericum perforatum L.*, *Hypericum tetrapterum Fries* and *Hypericum olympicum L.* growing in Greece". *Flavour Fragrance Journal*, 21(1), (2006) 84-87.
- [181] Garcia-Vallejo. M. I., "*Aceites esenciales de las Lavandulas ibéricas: ensayo de la quimiotaxonomía*. Departamento de biología vegetal I. Madrid", Universidad Complutense de Madrid. PhD: (1992) 498p.
- [182] Valentini, G., Arnold, N., Bellomaria, B. "Etude chimique comparative des huiles essentielles de quatre populations de *Lavandula stoechas L. subsp. stoechas* spontanées de Chypre". *Plantes Méd. Phytothérapie*. 26, (1993) 289-299.
- [183] Ristorcelli, D., Tomi, F., Casanova, J., "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 Fragr. J.* 13(3), (1998)154-158.
- [184] Zrira. S., Benjilali. B., "The constituents of the oils of *Lavandula stoechas L. ssp. atlantica Br.-Bl.* and *L. stoechas ssp. stoechas* from Morocco". *J. Essent. Oil Res.* 15, (2003) 68-69.
- [185] Bouzouita. N., Kachouri. F., Hamdi. M., Chaabouni. M.M., Ben aissa. R., Zgoulli. S., Thonart. P., Carlier. A., Marlier. M., Lognay. G.C. "Volatile constituents and antimicrobial activity of *Lavandula stoechas L.* oil from Tunisia". *Journal Of Essential Oil research*, 17, (2005) 584-586.

- [186] Bouyahya. A., Et-Touys. A., Abrini. J., Talbaoui. A., Fellah. H., Bakri. Y., Dakka. N. "*Lavandula stoechas* essential oil from Morocco as novel source of antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*: 12, (2017) 179-184
- [187] Ben slimane. B., Ezzine. O., Dhahri. S., Chograni. H., Ben jamaa. M.L. "Chemical composition of *Rosmarinus* and *Lavandula* essential oils and their insecticidal effects on *Orgyia trigotephras*". *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (2015) 98-103.
- [188] Arabaci, O. and Bayram, E., "Populations of *Lavandula stoechas* L. evaluation of chemical composition, essential oil and morphological traits in wild in the Mediterranean environment". *Asian J. Chem.* 18 (1), (2005) 371-380 p.
- [189] Gören. A.C., Topçu. G., Bilsel. G., Bilsel. M., Aydogmus. Z., Pezzuto. M.J., "The chemical constituents and biological activity of essential oil of *Lavandula stoechas* ssp". *Stoechas. Z. Naturforsch.*57c, (2002) 797-800.
- [190] Dadalioglu. I., Evrendilek. G.A., "Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, (2004.) 8255–8260.
- [191] Brada. M., Bezzina. M., Marlier. M., Carlier. A., Lognay. G., "Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie". *J Biotechnol Agron Soc Environ* 11 (1) : (2007) 3-7.
- [192] Ghanmi. M., Satrani. B., Aafi. A., Isamili. M.R., Houti. H., El Monfalouti. H., Benchakroun. H.K., Harki. L., Boukir. A., Chaouch. A., Charrouf. Z. "Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herbaalba*) de la région de Guerçif (Maroc oriental)", *Phytothérapie*, 8 (5), (2010) 295-301.
- [193] Assad, Y.O.H., Torto, B., Hassanali, A., Njagi, P.G.N., Bashir, N.H.H., Mahamat, H., "Seasonal variation in the essential oil composition of *Commiphora quadricincta* and its effect on the maturation of immature adults of the desert locust, *Schistocerca gregaria*". *Phytochemistry* 44, (1997) 833-841.

- [194] Lopes, N. P., Kato, M. J., Andrade, E.H., Maia, J.G. ., Yoshida, M. , Planchart, A.R., Katzin, A.M., "Orcadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves", *Phytochemistry* 46, (1997) 689-693.
- [195] Granger, R., Passet, J. Lamy, J., "Sur les essences dites de " Marjolaine " *Riv. Ital. Essenza Profumi Plante Officinal". Aromi. Saponi. Cosmetici. Aerosol.* 57, (1975) 199-208.
- [196] Mohammedi. Z., "Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoides de quelques plantes de la région de Tlemcen". Mémoire magistère. (2006) 155.
- [197] Tisserand. R., Balacs. T., "Essential Oil Safety. Churchill Livingstone", Edinburgh. (1995) 279p.
- [198] Chemouny. R. Soigner le stress par l'homéopathie et la phytothérapie. Edition Odil Jacob. (2012) 224p.
- [199] Millet. F., "Le grand guide des huiles essentielles". Edition: Marabout référence. (2013) 480.
- [200] Selmi. S., Jallouli. M., Gharbi. N., Marzouki. L., "Hepatoprotective and Renoprotective Effects of Lavender (*Lavandula stoechas* L.) Essential Oils Against Malathion-Induced Oxidative Stress in Young Male Mice2015.. *J Med Food* 00 (0), (2015) 1-9
- [201] Ganong, W., "Physiologie médicale". France : Amazon France. (2005) 849 p.
- [202] Folz, C.J., Ullman-Culleré M.H., "Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice". *Laboratory Animal Science*, 49 (3): (1999) 319-323.
- [203] Hilaly, J.E., Israili, Z.H., Lyouss, B. "Acute and chronic toxicological studies of *Ajuva Ivavin* experimental animals". *Journal of Ethnopharmacology*, 91: (2004)43-50.
- [204] Klaassen, C. D., Casarett, L.J. & Doull, J., "Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons", McGraw-Hill Press, New York, NY, USA, (2001)1236 p.

- [205] Rasekh, R.H., Nazari, P., Kamli-Najed, M., Hosseinzadeh, L., "Acute and subchronic oral toxicity of *Galega officinalis* in rats. *Journal of ethnopharmacology*" (1), (2008) 21-26.
- [206] Kluwe, W. M., "Renal function tests as indicators of kidney injury in subacute toxicity studies", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 57 (3): (1981) 414–424
- [207] Raza, M., Al-Shabanah, O.A., El-Hadiyah, T.M., Al-Majed, A.A., "Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss *albino* mice". *Scientia Pharmaceutica*, 70 : (2002) 135–145.
- [208] Greaves, P., "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation"; Academic Press: New, York, NY, USA (2011)
- [209] Sellers, R.S., Mortan, D., Michael, B., Roome, N., Johnson, J.K., Yano, B.L., Perry, R., Schafer, K. "Society of toxicologic pathology position paper: Organ weight recommendations for toxicology studies". *Toxicol. Pathol.*, 35, (2007) 751–755.
- [210] Gregg, L.V., Voigt, D.V.M., "Hematology techniques and concepts for veterinary technicians." USA: Iowa State University Press, (2000) p 95-101.
- [211] Mukinda, J.T., Syce, J.A., "Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents". *Journal of Ethnopharmacology*, 112: (2007) 138–144.
- [212] Almança, C. C.J., Saldanhab, S.V., Sousaa, D. R., Trivilin, L. O., Nunesa, L. C., Porfírio, L.C., Marinhoc, B. G., "Toxicological evaluation of acute and sub-chronic ingestion of hydroalcoholic extract of *Solanum cernuum* Vell. In mice". *Journal of Ethnopharmacology* 138, (2011) 508– 512.
- [213] Muthuraman, A., Singh, N., "Acute and sub-acute oral toxicity profile of *Acorus calamus* (Sweet flag) in rodents". *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, (2012) 1017- 1023.
- [214] Sujith, K., Darwin, R., Suba, V., "Toxicological evaluation of ethanolic extract of *Anacyclus pyrethrum* in albino wistar rats". *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, (2012) 437- 441.

- [215] Lullmann-Rauch, R., "Histologie. de Boeck Supérieur", Bruxelles, Belgique. (2008) 704p.
- [216] Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W. & Schomaker, S., "The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity". *Toxicology*, 245: (2008) 194–205.
- [217] Lazare, T., Jacques, D. Y., Michel, O. A., "Alcoolisation chronique des rats (*Rattus norvegicus*) de souche Wistar à une eau-de-vie traditionnelle produit en Côte d'Ivoire (Koutoukou)". *J. Appl. Biosci.* 41: (2011) 2772 – 2779.
- [218] Kumar, G., Sharmila, B., Vanitha, P.P., Sundararajan, M., Rajasekara, P. M., "Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacastrum* L. against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats". *Journal of ethno pharmacology* 92: (2004) 37-40.
- [219] Filippin, F.B., Reis, K., Cemin, L., Duzzioni, M., Hermes, E.M., Souza, L. C., "Novo intervalo de referência para alanina aminotransferase usando o sistema automatizado de bioquímica Dade Behring Ar Dimension". *News Lab* ; 65: (2004) 148- 160.
- [220] Etame Ioe, G., Yinyang, J., Okalla Ebongue, C., Makondo, B.V., Ngaba, G.P., Mpondo Mpondo, E., DIBONG, S.D., "Étude de la toxicité aigüe et subaigüe de l'extrait au vin des graines de *Carica papaya* Linn". *Journal of Applied Biosciences* 120: (2017) 12077-12085.
- [221] Kew, M. C., "Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage". *Lancet*; 355: (2000) 591-592.
- [222] Atsamo A.D., Nguenefacka T. B., Dattéb J. Y., Kamanyia A., "Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents". *Journal of Ethnopharmacology* 134, (2011) 697–702.
- [223] Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Gilman, A.G., "Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments". 9ème éd. *McGraw-Hill*, London (1998).

- [224] Barbosa, B.S., Praxedes E.A., Lima, A.M., Lustosa Pimentel, M.M., Santos, F.A., Dias Brito, P., Gadelha Lelis, I.C.N., Fernandes de Macedo, M., Marcelo Barbosa Bezerra., "Haematological and Biochemical Profile of Balb-c Mice. *Acta Scientiae Veterinariae*, (2017). 45: 1477.
- [225] Fernández. I., Peña. A., Teso. N.D., Pérez. V. & Rodríguez- Cuesta J., "Clinical biochemistry parameters in C57BL/6J mice after blood collection from the submandibular vein and retroorbital plexus". *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*.49: (2010) 202-206.
- [226] Charles River. 2011-2012. BALB/c Nude Mouse Hematology. North American Colonies. 2p.
- [227] Santos E.W., Oliveira D.C., Hastreiter A., Silva G.B., Beltran J.S.O., Tsujita M., Crisma A.R., Neves S.M.P., Fock R.A. & Borelli P., "Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice". *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 53: (2016) 138-145.
- [228] Everds N., "Hematology of the mouse. In: Hans Hedrich (Ed). *The Laboratory Mouse*". Amsterdam: Elsevier Academic Press, (2004) 271-286.
- [229] Emily M., "Encyclopaedia of Earth", Washington, DC. (2007).
- [230] Mutai. C., Bii. C., Vagias. C., Abatis. D., Roussis. V., "Antimicrobial activity of Acacia mellifera extracts and lupane triterpenes". *Journal of ethnopharmacology* ; 4 ; 123(1): (2009) 143-8.
- [231] White. T.C., Marr. K.A., Bowden. R.A., "Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance". *Clin Microbiol Rev*, 11: (1998) 382-402.
- [232] Sholberg. P.L., Bedford. K.E., Haag. P., Randall. P., "Survey of *Erwinia amylovora* isolates from British Columbia for resistance to bactericides and virulence on apple". *Can. J. Plant Pathol*. 23: (2001) 60–67.
- [233] Rinaldi. F.C., Meza. A.N., Guimaraes. B.G., "Structural and biochemical characterization of *Xylella fastidiosa* DsbA family members: New insights into the enzyme-substrate interaction". *Biochemistry* 48, (2009) 3508-3518.

- [234] Hayouni. E.A., Abedrabba. M., Marielle. B., Moktar. H., "The effects of solvents and extraction method on phenolic contents and biological activities in vitro of tunisian *Quercus coccifera* L and *jupiperus phoenicea* L. fruit extracts". *Food chemistry* 105: (2007) 1126-1134.
- [235] Hanamanthagouda. M.S., Kakkalameli. S.B., Madhava. N.P., Praveen Nagella, Seetharamareddy. H.R., Murthy. H.N., "Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities". *Food Chemistry* 118, (2010) 836–839.
- [236] Yekhlef. G., Laroui. S., Hambaba. L., Aberkane. M.C., Ayachi. A., "Evaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plante utilisées en médecine traditionnelle". *phytothérapie* 9 : (2011.) 209-218.
- [237] Pattnaik. S., Subramanyam. V.R., Bapaji. M., "Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils". *Microbios* 89 : (1997) 39-46.
- [238] Carson. C.F., Mee. B.J., Riley. T.V., "Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy". *Antimicrob. Agents Chemother* 46 : (2002) 1914.
- [239] Bourkhiss. M., Hnach. M., Bourkhiss. B., Ouhssine. M., chaouch. A., "Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc". *Afrique SCIENCE* 03(2): (2007) 232 – 242.
- [240] Satrani. B., Ghanmi. M., Farah. A., Aafi. A., Fougrach. H., Bourkhiss. B., Bousta. D., Talbi. M., "Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *cladanthus mixtus*". *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146, (2007) 85-96.
- [241] Singh, N., Singh, R.K., Brunia, A.K., Stroshine, R.L. efficacy of chlorine dioxide, ozone and thyme essential oil or a sequential washing in killing *E.coli* O157/H7 on lettuce and baby carrots. *Lebensmittel- Wissenschaft and Technology*, (2002) 35, 720-729.
- [242] Amrati. F., Satrani. B., Ghanmi. M., Farah. A., Aafi. A., Aarab. L., El Ajjouri. M., Chaouch. A., "Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc". *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2010 14 (1), (2010) 141-148 p.

- 1.1 [243] Magiatis P., Skaltsounis AL., Chinou I., Haroutounian SA.
“Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek Achillea species”. *Z. Naturforsch.* 57 c, (2002)287-290.
- 1.2 [244] Xu H., Blair NT., Clapham DE. « Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism”.*J Neurosci.* 28;25 (39) (2005) 8924-37.
- 1.3 [245] Prudent D., Perineau F., Bessiere J. M., Michel G. and Bravo R.
Chemical analysis, bacteriostatic and fungistatic properties of the essential oil of the Atoumau from Martinique (Alpinia speciosa K. Schum.).*J. Ess. Oil. Res.* 5 (1993)255-264.

[246] Aligiannis. N., Kalpotzakis. E., Mitaku. S., Chinou. I.B., "Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species". *J Agric Food Chem* 40: (2001) 4168- 4170.

[247] D’Auria. F. D., Tecca. M., Strippoli. V., Salvatore. G., Battinelli. L., Mazzanti. G., "Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form". *Medical Mycology*, 43, (2005) 391-396.

[248] Mohammedi, Z., Atik F. Antibacterial activity of essential oils from *Cistus ladaniferus* L. and *Lavandula stoechas* L. (2011) 3, No.1, pp 487-484.

[249] Aly. M.M., Al-Ghamdi. M., Bafeel. S.O., Khedr. A.M., "Antimicrobial activities and phytochemical analysis of essential oil of *Lavandula dentata* and *Plectranthus tenuiflorus*, collected from el Baha Region, Saudi Arabia". *Life Science Journal* : 10 (4) (2013).

[250] Karami-Osboo. R., Khodaverdi. M., Ali-Akbari. F., "Antibactériale effect of effective compounds of *Satureja hortensis* and *Thymus vulgaris* essential oils against *Erwinia amylovora*". *J.Agr.Sci. Tech.* Vol .12 : (2010) 35-45.

[251] Yakoubi. S., Cherrat. A., Alaoui. M., El Hilali. F., Zair. T., "Efficacité des huiles essentielles de *thymus zygis* subsp. *gracilis* vis-à-vis d’*Erwinia amylovora* (Burrill)

Winslow et al. Agent du feu bactérien". *ScienceLib* Editions Mersenne : volume 6, N° 140206. 18 (2014).

[252] Rita Eduardo. J., "Avaliação de óleos essenciais e extratos de *Lavandula* SPP. no controlo de microrganismos". Editionb LISBOA : ISA/UL. (2014) 61.

[253] Mehrorosh. H., Gavanji. S., Larki. B., Mohammadi. M.D., Karbasiun. A., Bakhtari. A., Hashemzadeh. F., Mojiri. A., "Essential oil composition and antimicrobial screening of some Iranian herbal plants on *Pectobacterium carotovorum*". *Global NEST Journal*. 12 (2014).

[254] Ikeura. H., Kobayashi. F., "Antimicrobial and Antifungal Activity of Volatile Extracts of 10 Herb Species against *Glomerella cingulate*". *Journal of Agricultural Science*; Vol. 7, No. 9 (2015).

[255] Zuzarte. M., Gonaalves. J.M., Cavaleiro C., M. Dinis. M.A., Canhoto. M.J., Salgueiro. R. L., "Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oils of *Lavandula pedunculata* (Miller) Cav". *Chemistry & Biodiversity* – Vol. 6 : (2009) 1283-1292.

[256] Zuzarte. M., Gonçalves. M.J., Cavaleiro. C., Canhoto. J., Vale-Silva. L., João Silva. M., Eugénia Pinto Lígia Salgueiro. L., "Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Her". *Journal of Medical Microbiology*, 60, (2011) 612–618.

[257] Koroch. A.R., Juliani. H.R., Zygadlo. J.A., "Bioactivity of essential oils and their components". *Flavours and Fragrances.*, (2007) 87-115.

[258] Nazzaro. F., Fratianni. F., Coppola. R., De Feo. V., "Essential Oils and Antifungal Activity". *Pharmaceuticals*, 10, 86 (2017).

[259] Freisesleben, S.H., Jager, A.K., "Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanism—a review". *Med. Arom. Plants*, 3, (2014) 1–6.

[260] Kolai. N., Saiah. F., Boudia. A., "Effet inhibiteur in vitro de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* sur deux souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*". *Algerian journal of arid environment* vol. 2, n°1: (2012) 71-76.

- [261] Silva. J., Abebe. W., Sousa. S.M., Duarte. V.G., Machado. M-I-L., Matos. F-J-A., "Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus". *Journal of Ethnopharmacology* 89 : (2003) 277–283.
- [262] Inouye. S., Abe. S., "Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse". *Phytothérapie* 1 : (2007) 2-4.
- [263] Chao. L.k., Hua. K.F., Hsu. H.Y., Cheng. S.S., Liu. J.U., Chang. S.T., "Study on the Anti-inflammatory Activity of Essential Oil from Leaves of *Cinnamomum osmophloeum*". *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, (2005) 7274–7278.
- [264] Hajhashemi. V., Ghannadi. A., Sharif. B. "Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula augustifolia* Mill". *Journal of Ethnopharmacology* 89: (2003) 67-71.
- [265] Dif. M. M., Benyahia. M., Toumi Benali. F., Rahmani. M., Bouazza. S. "Phenolic content and antioxidant activity of three algerian species of lavenders". *Phytothérapie* : 15, 6, (2017) 367–372.
- [266] Baptista. R., Madureira. A.M., Jorge. R., Adão. R., Duarte. A., Duarte. N., Lopes. M.M., Teixeira. G., "Antioxidant and Antimycotic Activities of Two Native *Lavandula* Species from Portugal. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume (2015), Article ID 570521, 10.
- [267] Carrasco, A., Ortiz-Ruiza, A., Martinez-Gutierrezb, R., Tomasc, V., Tudela, J., "Lavandula stoechas essential oil from Spain: Aromatic profile determined by gas chromatography-mass spectrometry, antioxidant and lipoxygenase inhibitory bioactivities". *Indus. Crop. Prod.* 73, (2015)16-27.
- [268] Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., Pagan, R., Laglaoui, A., "Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes". *Innov. Food. Sci. Emerg. Technol.* 22, (2014) 221-229.

- [269] Ceylan. Y, Ustab. K, Ustab. A, Maltasc. E, Yildizc. S. "Evaluation of Antioxidant Activity, Phytochemicals and ESR Analysis of Lavandula Stoechas". *Acta Physica Polonica A*, Vol. 128 ; (2015) 2-B
- [270] Edris. E.A., "Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review". *Phytother. Res.* 21, (2007) 308–323
- [271] Ruberto, G., Baratta, M. T. "Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems". *Food Chem.* 69, (2000) 167-174.
- [262] Lertsatitthanakorn, P., Taweechaisupapong, S., Aromdee. C., Khunkitti. W., "In vitro bioactivities of essential oils used for acne control". *Int. J. Aromather.* 16, (2006) 43-49.
- [268] Grice, H. C., "Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract". *Food. Chem. Toxicol.* 24, (1986) 1127-1130.
- [274] Wichi, H. P., "Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium." *Food. Chem. Toxicol.* 26, (1988) 717-723.
- [275] Abdollahi. M., Salehnia. A., Mortazavi. S.H., Ebrahimi. M., Shafiee. A., Fouladian. F., Keshavarz. K., Sorouri. S., Khorasani. R., Kazemi A., "Antioxidant, antidiabetic, antihyperlipidemic, reproduction stimulatory properties and safety of essential oil of *Satureja Khuzestanica* in rat *in vivo*: a toxicopharmacological study". *Med Sci Monit* 9: (2003) 331–335.
- [276] McCord. J., "The evolution of free radicals and oxidative stress". *Am J Med* 108: (2000) 652–659.
- [277] Benzie I.F.F. Strain J.J. "The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power" the FRAP assay". *Analytical Biochemistry.* 239, (1996) 70-76.
- [278] Li. H.B., Wong. C.C., Cheng. K.W., Feng. C., "Antioxidant properties in vitro and total Phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants". *Lebensmittel-Wissenschaft and Technology.* 41(3), (2002) 385–390.

- [279] Chung, Y-C., Chang, C-T., Chao, W-W., Lin, C-F., Chou, S-T., "Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, (2002) 2454–2458.
- [280] Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A., "Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies". *Food Chemistry*. 84, (2004) 551–562.
- [281] Méndez-Tovar. I, Herrero. B, Pérez-Magarino. S, Pereira. J.A., Asensio-S.-Manzanera. "By-product of *Lavandula latifolia* essential oil distillation as source of antioxidants". *Journal of food and drug analysis* Vol 23, 2, (2014) 225–233
- [282] Yang. J, Guo. J, Yuan. J., "In vitro antioxidant properties of rutin, *LWT*", 41 : (2008) 1060-1066.
- [283] Yildirim. A, Mavi. A, Kara, A.A., "Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts", *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49 ; (2001) 4083-4089.
- [284] Kulisic, T., Radonic A., Katalinic, V., Milos, M., "Analytical, nutritional and clinical methods use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil". *Food Chem.*, 85, (2004) 633-640.
- [285] Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sokmen, M., Sahin. F., "The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*". *Food Control*, 15, (2004) 627-634.
- [286] Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Daferera, D. Polissiou, M., Sokmen, A. "Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*". *Journal of Food Engineering*, 66(4), (2005) 447–454.

APPENDICE A

LISTE DES ABREVIATIONS

% : pourcentage

°C : degré Celsius

µl : microlitre

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

AFNOR : Association Française de Normalisation.

ATCC : l'American type culture collection

BHT : hydroxytoluène butylé

BM : Bain Marie

C +F : Camphre + Fenchone

C : Camphre

C₄H₆O₃ : anhydride acétique

CHCl₃ : chloroforme

CHU : centre hospitalo-universitaire

CM : centimètre

CMB : Concentration Minimale Bactéricide / Bactériostatique

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CO₂ : dioxyde de carbone

DL₅₀ : Dose Létale qui tue 50% d'une population donnée

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité Optique

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl

EC₅₀ : Concentration Effective de l'antioxydant qui correspond à une réduction de 50% de l'activité du DPPH dans le milieu réactionnel

EI : Ionisation Electronique

ET : EcartType

F : Fenchone

FeCl₃ : Chlorure de fer(III)
FIC : Concentration Fractionnaire Inhibitrice
GPR : Gain de Poids Relatif
H : heures
H₂SO₄ : Acide Sulfurique
HCl : Acide Chlorhydrique
HE : Huile Essentielle
HEs : Huiles Essentielles
HgCl₂ : chlorure de mercure
HV : Huile végétale
INPV : Institut National de la Protection des Végétaux
IR : Indice de Rétention
K⁺ : Potassium
K₃Fe(CN)₆ : Ferricyanure de potassium
Kg : kilogramme (s)
KI : iodure de potassium
L. stoechas : *Lavandula stoechas*
LPGA : Levure Peptone Glucose Agar
M : mètre
MEB : Microscopie Electronique à Balayage
Mg : magnésium
MH : Mueller Hinton
Min : Minute (s)
MI : Millilitre
Mm : millimètre
NaOH : Ammoniaque
NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium
Nm : nanomètre
ONAB : Office National de l'Alimentation du Bétail
PAM : Plante Aromatique et Médicinales
PDA : Potato Dextrose Agar
PI : Pourcentage d'inhibition

PRO : Poids Relatif des Organes

SAB : Sabouraud

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la métiline

SbCl₃ : Trichlorure d'antimoine

SEM : Erreur Standard Moyenne

APPENDICE B

Instruments, Appareillages Et Réactifs Utilisés

a. Verreries et consommables

- Pince
- Ecouvillon en coton
- Pipettes pasteur
- Micropipette
- Lames et lamelles
- Boite de pétri
- Poire d'aspiration
- Compresse stérile
- Portoirs pour les tubes
- Tubes à essai
- Papier filtre
- Fioles et Erlenmeyers et entonnoirs
- Eprouvette graduée
- Ballon
- Disques à imprégnés
- Embouts
- Capsule en platine.
- Bécher

b. Appareillage

- Etuve
- Bec bunsen
- Densitomètre
- Sécheuse
- Clevenger
- Plaque chauffante
- Loupe binoculaire de type Motic ST-30
- Microscope photonique de type Motic BA200
- Appareil de chromatographie ionique ICS3000
- Sysmex KX-21N
- Mindray BS-303
- Réfrigérateur
- Balance de précision
- Microscope
- Chambre UV
- Sonde de gavage
- Hotte à flux laminaire
- Four à moufle de marque Muve MF12.
- Appareil de chromatographie en phase gazeuse Agilent HP (modèle 6850) couplé à une Spéctrometrie de masse ilent HP (modèle 5973).

c. Solution stériles et réactifs

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| - Acide acétique. | - Folin-Ciocalteu. |
| - Acide chlorhydrique HCl. | - Hydroxyde d'ammonium. |
| - Acide trichloracétique. | - Iodure de potassium. |
| - Anhydride acétique. | - L'acide sulfurique. |
| - Carbonate de sodium. | - Lugol. |
| - Chlorure de fer (III). | - Méthanol. |
| - Chlorure de mercure. | - Rouge Congo. |
| - DPPH. | - Solution tampon |
| - Eau de Javel à 12°. | phosphate. |
| - Eau distillée. | - Trichlorure d'aluminium. |
| - Eau physiologique stérile. | - Tween 80. |
| - Ether de pétrole. | - Vert de méthyle. |
| - Ferricyanure de potassium. | |

d. Compositions des milieux de cultures

Milieu LPGA pH 7,2

L: extrait de levure	7 g
P: Bacto Peptone	7 g
G: Glucose	7 g
A: Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf	300,0 g
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	17,0 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu sabouraud pH= 6.0

Peptone	10 g
Glucose massé	20 g
Agar-agar	15 g
Eau distillée (qsp)	1 000 ml
vitamines et facteurs de croissance	

Gélose nutritive pH = 7,0

Extrait de viande	1,0g
Extrait de levure	2,5g
Peptone	5,0g
Chlorure de sodium	5,0g
Agar	15,0g

Milieu PDA

Pomme de terre	200 g
Dextrose	15 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000ml

APPENDICE C

Questionnaire de l'étude ethnobotanique

Questionnaire Plante médicinale et phytothérapie

***Obligatoire**

Vous êtes : *

Femme Homme

Dans quelle tranche d'âge vous situez vous *

12-25 ans 26-50 ans 50 ans et plus

Quelle est votre situation familiale ?

Célibataire Marié (e)

Où habitez-vous ? *

Douar Village Ville Nomade

Quelle est votre profession ? *

Quel est votre niveau académique ? *

Néant Primaire Secondaire Universitaire

Est-ce que vous utilisés : *

La médecine traditionnelle La médecine moderne Les deux

Connaissez-vous la phytothérapie *

Oui Non

Connaissez-vous la Lavande (الحلحال) *

Oui Non (Dans ce cas, ne répondez pas à la question suivante).

Comment la connaissez-vous ? *

Utilisée par une personne de votre entourage

Utilisée par vous –même

Quelle est son nom vernaculaire (nom commun) ?

Nom scientifique (Si vous le connaissez)

De quel type de plante est la Lavande ? *

- Sauvage Cultivée

Dans quels domaines vous utilisez cette plante ? *

- Thérapeutique
 Alimentaire
 Cosmétique
 Autres, Citez :

Est-ce que vous utilisez : *

- Plante seul Association de plante

Si association, avec quelles plantes ?

Quelle est la partie utilisée de cette plante ? *

- Fleur Feuille Tige Plante entière

Quelles sont ces formes d'emploi ? *

- Tisane Poudre Huiles essentielles Autres, Citez :

Mode d'administration : *

- Oral Massage Autre, Citez :

Mode de préparation : *

- Infusion Décoction Cataplasme Cru Cuit Autre,
Citez :

Dose utilisée :

- Cuillerée Poignée Pincée Autre, Citez :

Dans quelles maladies est –elle utilisée *

- Affections dermatologiques
 Affections génito-urinaires
 Affections ostéo-articulaires
 Affections des tubes digestifs

Affections respiratoires

Autre, Citez :

La plante a été diagnostic Par *

Vous-même Le médecin L'herboriste Autre, Citez :

Résultats :

Amélioration Inefficace Autre, Citez :

Est-ce que le résultat est positif ?

Oui Non

Ya-t-il des effets secondaires ? *

Oui Non (Dans ce cas, ne répondez pas à la question suivante).

S'il y a des effets secondaires, lesquels ?

APPENDICE D

Figures et tableaux des résultats obtenus



Prélèvement rétro-orbitale (originale 2018)

Partie phytochimie

Détails sur la teneur en eau des fleurs de *Lavandula stoechas*

Résultat de la teneur en eau des fleurs de *L. stoechas*

	Échantillo n 1	Échantillo n 2	Échantillon 3	Moyenne	Écart type
Plante fraîche « g »	1,18	1,31	1,36	1,28	0,1
Plante sèche « g »	0,40	0,42	0,38	0,40	0,02
Pourcentage d'eau %	66,09	67,65	72,32	68,69	3,24

Teneurs en cendre

Résultat de la Teneur en cendres des fleurs de *L. stoechas*

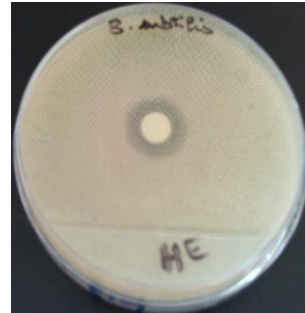
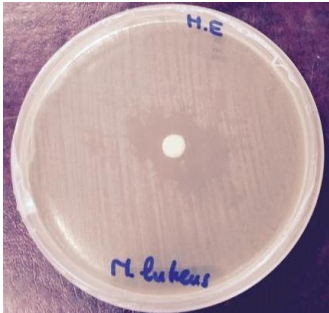
Pesée de la poudre (g)	Pesée des cendres (g)	Taux de cendre (%)
1,50 ± 0,00014	0,14 ± 0,0009	9,14 ± 0,060

APPENDICE E

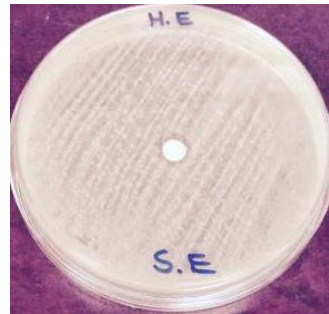
Résultats de l'activité antimicrobienne

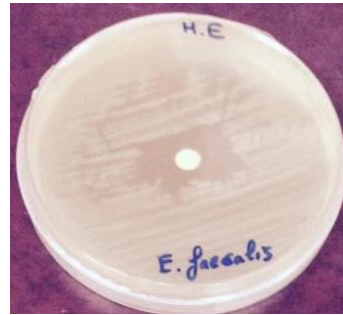
Photos de l'aromatogramme de l'HE de *L. stoechas* (Originale 2014)

Bactéries Gram positifs



Bactéries Gram négatifs





Les levures

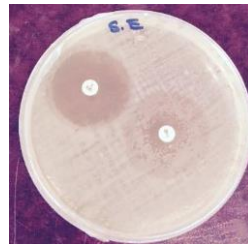
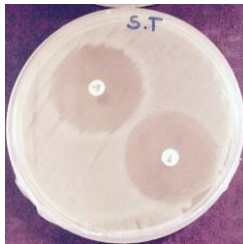


Photos des diamètres de la zone d'inhibition des antibiotiques (Originale 2014)




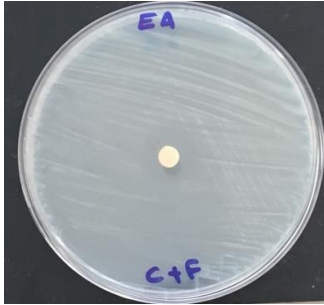
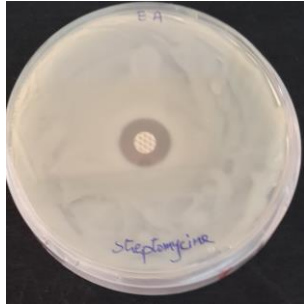
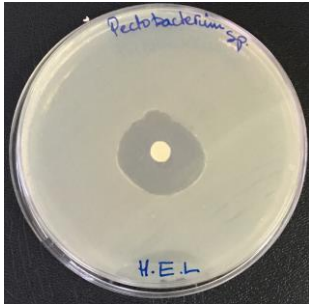


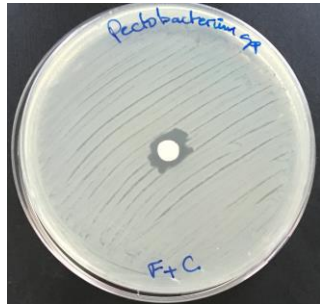
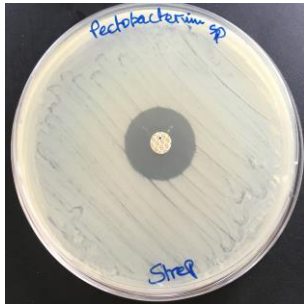
Bactéries Gram positifs



Bactéries Gram négatifs

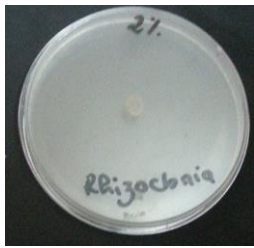


Résultats de l'activité antibactériennes de l'HE de *L. stoechas* et ses composants majoritaires contre les bactéries phytopathogènes

	HE <i>L. stoechas</i>	Fenchone	Camphre	Fenchone + camphre	Streptomycine
<i>Erwinia amylovora</i>					
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp <i>carotovorum</i>					

Résultats de l'activité antifongique de l'HE de *L. stoechas* (Originale 2016)

Rhizoctonia solani



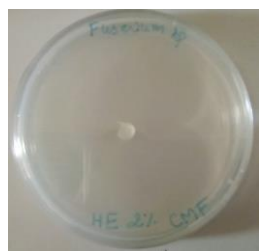
Aspergillus niger







Alternaria spp



Fusarium sp

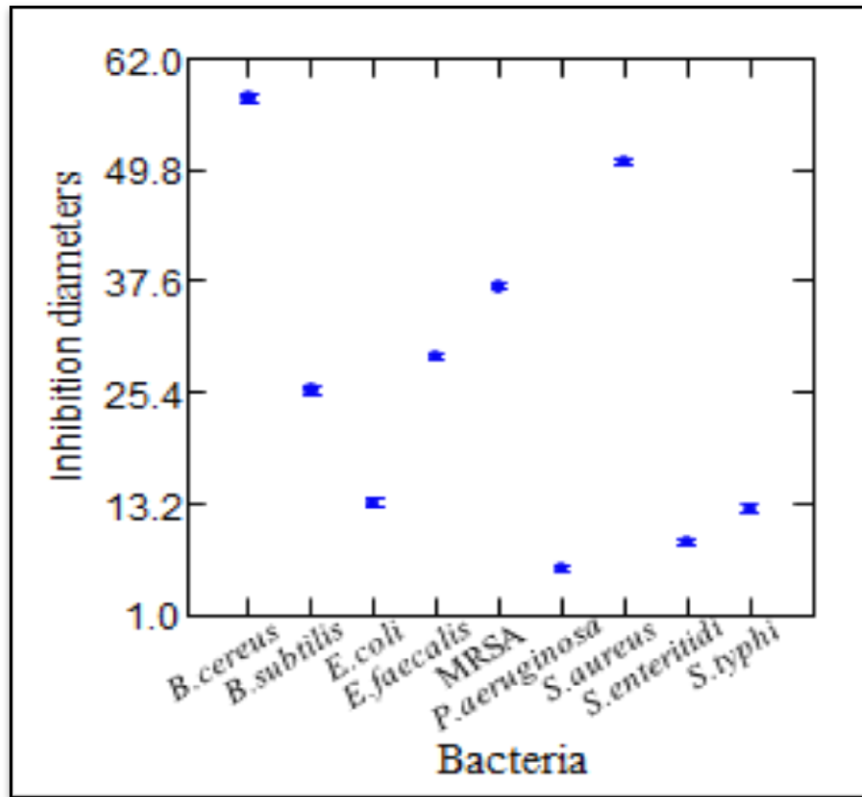


Résultats de l'activité antifongique de l'HE de *L. stoechas* et de ses composants majoritaires (CMF) (Originale 2016)

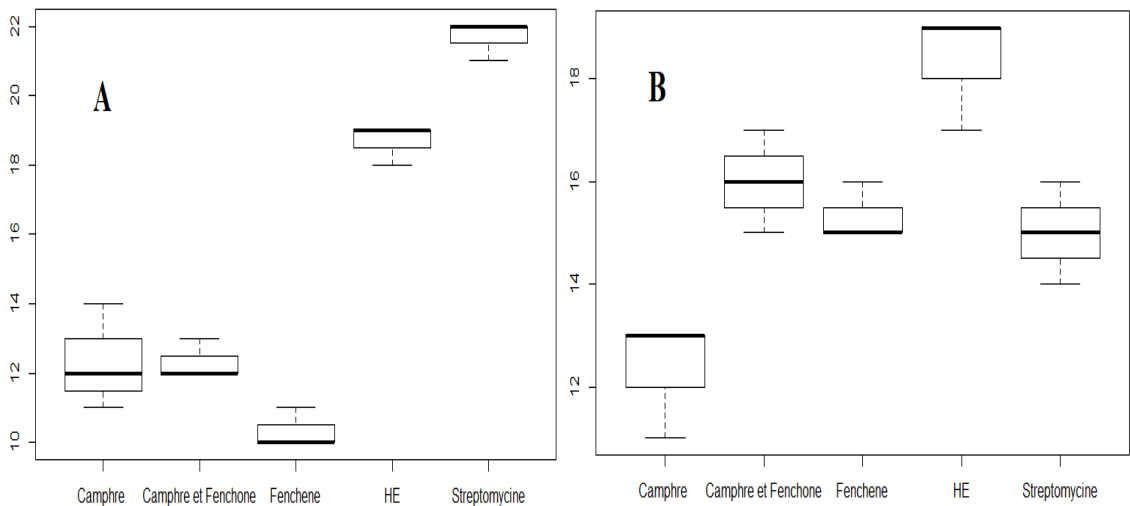
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Alternaria spp</i>	<i>Fusarium sp</i>
 <p>A petri dish containing a yellowish, circular fungal growth of <i>Rhizoctonia solani</i>. The growth is dense and radiating from the center. Handwritten blue ink labels "CMF R.S." are at the top and "F 2:" are at the bottom of the dish.</p>	 <p>A petri dish showing a small, dark brown, circular growth of <i>Alternaria spp</i> in the center. Handwritten black ink labels "Alternaria spp" are at the top and "CMF 3:" are at the bottom.</p>  <p>A petri dish showing a small, dark brown, circular growth of <i>Alternaria spp</i> in the center. Handwritten black ink labels "Alternaria spp" are at the top and "F 2: CMF" are at the bottom.</p>	 <p>A petri dish showing a small, white, circular growth of <i>Fusarium sp</i> in the center. Handwritten green ink labels "Fusarium sp" are at the top and "F 2: CMF" are at the bottom.</p>

APPENDICE F

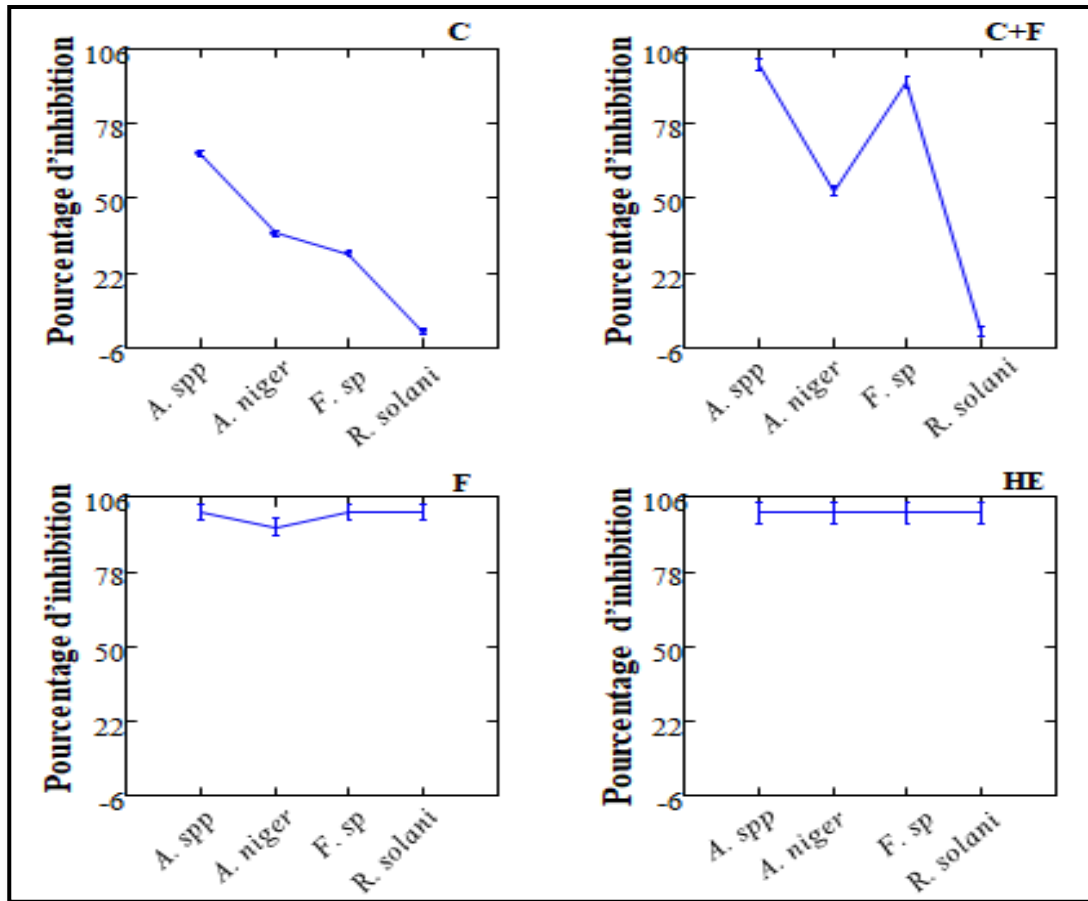
Résultats de l'analyse statistique de l'activité antimicrobienne



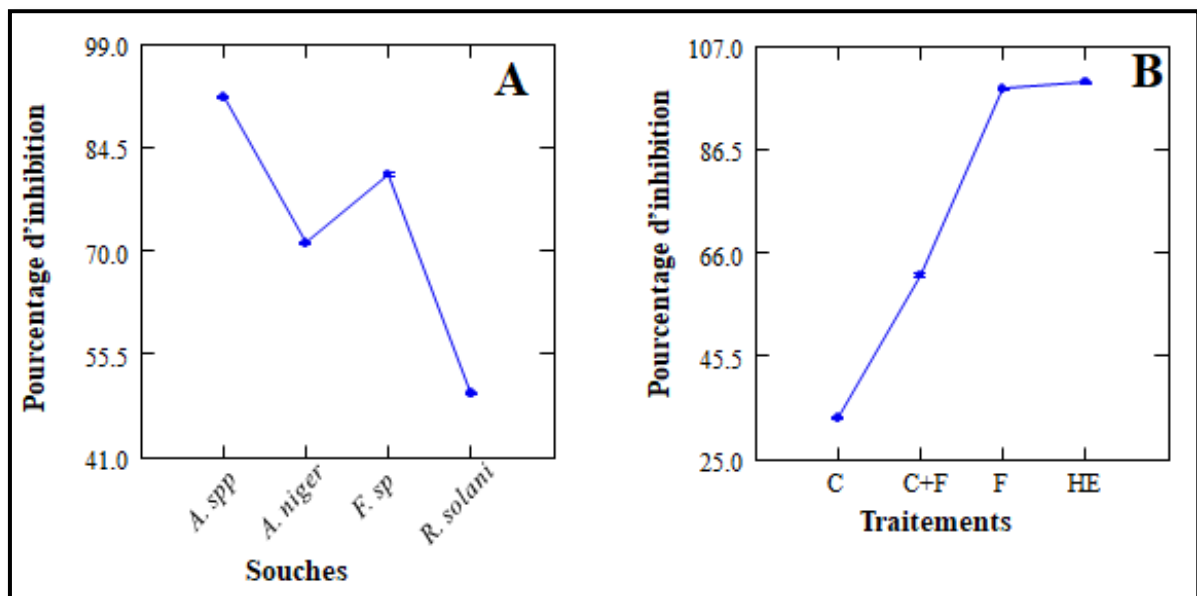
L'effet de L'HE de *L. stoechas* sur les souches bactériennes de pathologie humaines



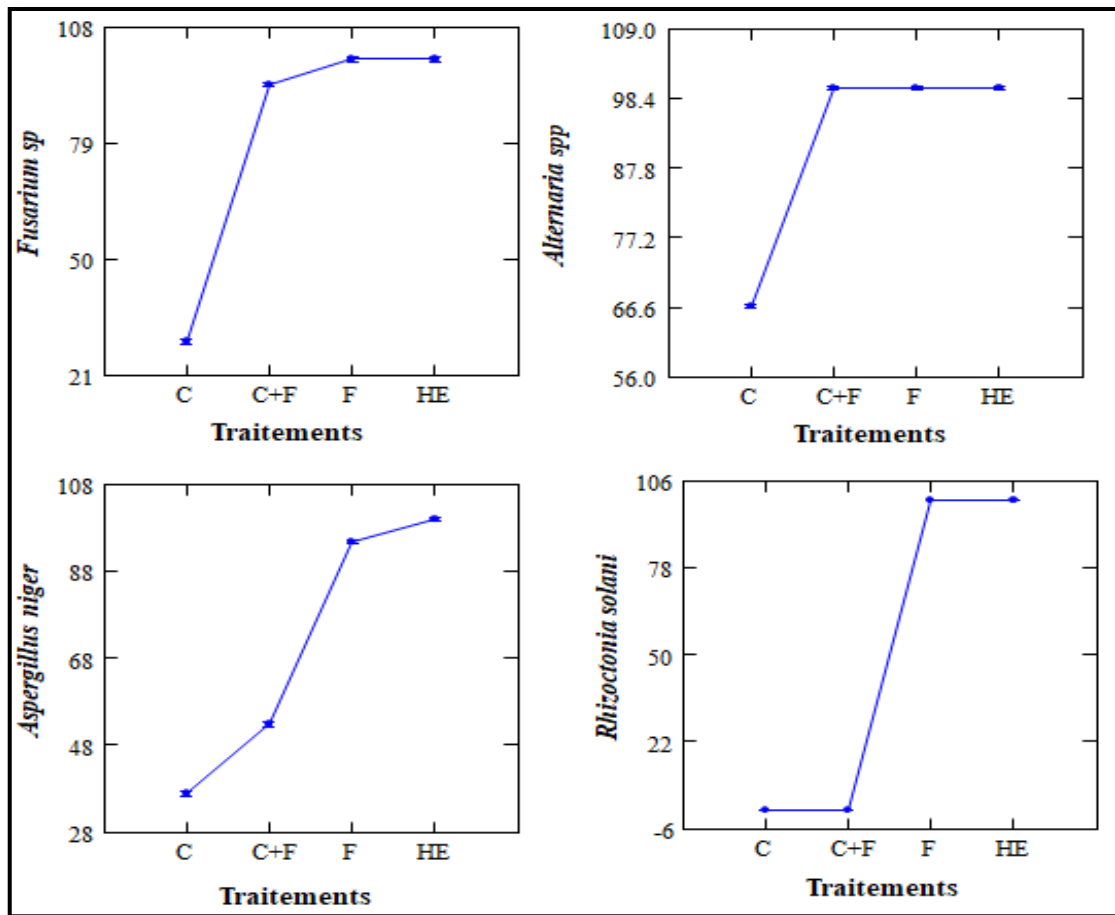
Les boxplots de la variation des diamètres d'inhibition de différents traitements contre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (A) and *Erwinia amylovora* (B).



Le pourcentage d'inhibition de l'HE de *L. stoechas* et de ses composants majoritaires.

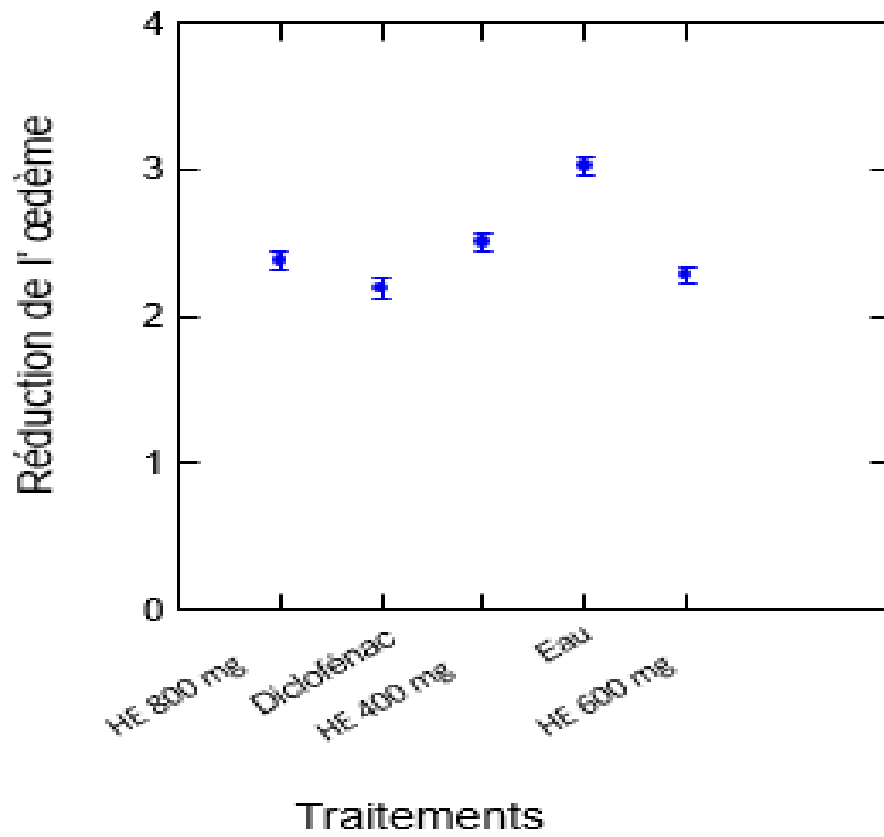


La variation du pourcentage d'inhibition en fonction des souches (A) et des traitements utilisés (B).



Les variations des traitements utilisés en fonction des champignons étudiés.

Résultats de l'activité anti-inflammatoire



Résultats de l'analyse de variance de l'activité anti-inflammatoire