République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

UNIVERSITE YAHIAFARES DE MEDEA



Faculté de la **T**echnologie

Mémoire de fin d'études de Master

Spécialité : Génie des Procédés pharmaceutiques

Caractérisations physico-chimique et biologique d'une huile essentielle issue d'une plante médicinale

Présenté par :

BAHOUT Nesrine

ZERKANI Elbatoul

Proposé etDirigé par :

Dr. BENKIAR Amina

Dr. TERKMANE Naila

Année universitaire 2022-2023

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier ***ALLAH*** *le tout puissant et miséricordieux,*

qui nous a permis d'être ce que nous sommes aujourd'hui.

Car l'homme propose mais ALLAH dispose. Seigneur, veuillez toujours diriger nos pas.

On a la chance d'avoir les honorables

Mme ***BENKIAR Amina*** *et Mme* ***TERKMANE Naila*** *comme modératrices.*

Nous les remercions tout particulièrement pour leurs admissions à nous encadrer, pour le temps

qu'elles nous ont consacré, pour la confiance qu'elles nous ont accordée, pour leur

compréhensions, leurs patiences, leurs corrections, leurs précieux conseils,

et pourleurs disponibilités.

La route aurait été beaucoup plus difficile sans eux.

Merci chères dames, puissiez trouver notre profonde gratitude.

Enfin, nous tenons également à remercier nos parents qui nous ont toujours soutenus

et encouragé tout au long de ce mémoire, ainsi que toutes les personnes et nos amis qui ont directement ou indirectement participé à la réalisation de ce travail

dans l'espoir de satisfaire notre jury.

Nesrine et Elbatoul

Dédicace

Au nom de ***Dieu*** *et le salut sur Mohamed le messager de Dieu.*

A la mémoire de ma Grand-mère*, la plus chère dans ma vie. J'aurais tellement aimé que tu sois auprès de moi aujourd'hui. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde.*

A ma chère mère *que j'adore celle qui a sacrifie pour mon éducation, qui est ma source de tendresse de don et de confiance et qui fait tout pour ma réussite. Que Dieu la garde pour moi.*

A mon adorable père*, l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral, source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir. Que Dieu vous garde et vous accorde santé, bonheur et langue vie.*

A ma sœur Sarah*, en signe de l'affection et du grand amour que je vous porte, les mots sont insuffisants pour exprimer ma profonde estime.*

A mon binôme Elbatou*l et sa famille celle qui a partagé avec moi les bons et les mauvais moments.*

A toute Mes amies, et toutes personnes qui m'a aidé d'un mot, d'une idée ou d'un Encouragement.

« Merci ».

Nesrine

Dédicace

Grace à ***Dieu*** *tout puissant qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail*

A mon très cher père*, tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es.*
Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

A Ma cher mère *qui m'a entouré d'amour, d'affection et qui fait tout pour ma réussite, que dieu la garde*

A ma grande sœur CHAIMA *Merci à toi ma sœur pour ta gentillesse, ta patience, tes bons conseils, ta joie de vivre.*

*A mes chers frères****MOUSSAAB, RIADH, MOHAMED, ABDELKADER.***

A MON BINOME NESRINE *pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

A mes amisFEDOUA*,* ***CHAHINEZ****,* ***CHAIMA*** *je vous aime****.***

« Merci ».

Elbatoul

الملخص

خضعت النباتات الطبية للعديد من الدراسات الحديثة، نظراً لغناها بالمركبات الكيميائية ذات التأثير العلاجي. لهذا، يعد هذا العمل جزءًا من دراسة الخصائص الفيزيائية والكيميائية، والنشاط المضاد للميكروبات ومضادات الأكسدة لزيت أساسي مستخرج من أوراق نبات عطري وطبّي؛ .Laurusnobilis L تم إجراء الاستخراج بواسطةClevengerعلى أساس مبدأ التقطير المائي. سمح لنا هذا الفصل بمردودية بنسبة 1٪. تم تمييز الزيت العطري الذي تم الحصول عليه من أجل تحديد مؤشر الحمض ،و الأستر، ومؤشر التصبن، ... بالإضافة إلى ذلك، أظهر تقييم قوة مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات أن هذا النبات يحتوي على قوة مضادة للأكسدة للجذور الحرة لـ • DPPH مع IC50من 4.98 ميكرو لتر / مل والنشاط المضاد للميكروبات ضد العديد من الكائنات الحية الدقيقة. تم تقييم الأنشطة الأنزيمية (الليباز ،البروتياز و الكتلاز) لأوراق الغار في مستخلص خام بقيم 2866.66 مول / دقيقة / مل، 0.840 / Uمل و0.1 Kat / g على التوالي. كل هذا يشجعنا على تعميق دراستنا وإدخالها في تطبيق دوائي مناسب

الكلمات المفتاحية: التقطير المائي، الزيت العطري،*Laurusnobilis*، ، المضاد للميكروبات، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط الإنزيمي.

Résumé

Les plantes médicinales font l'objet de plusieurs études récentes, vue leurs richesses en composés chimique à effet thérapeutique. Pour cela, ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude des propriétés physico-chimique, l'activité antimicrobienne et anti-oxydante d'une huile essentielle extraite des feuilles d'une plante aromatique et médicinale ; *Laurusnobilis L.* L'extraction à été réalisé par clevenger en se basant sur le principe de l'hydro-distillation. Cette séparation nous à permis des rendements de 1 %. L'HE obtenue à été caractérisé à fin de déterminer son indice d'acide, d'ester, de saponification…… En plus, une évaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien à révéler que cette plante possède un pouvoir antioxydant pour le radical libre de DPPH• avec une IC50 de 4.98 µL/mL et une activité antimicrobienne vis-à-vis de plusieurs microorganismes. Les activités enzymatiques (lipasique, protéolytique et catalasique) des feuilles de Laurier Noble ont été évalué dans un extrait brute avec des valeurs de 2866.66 mol/min/mL, 0.840U/mL et 0.1 µKat/g respectivement. Tous cela, nous encourage à approfondir notre étude et l'introduire dans une application pharmaceutique adéquate.

Mots clés : Hydro-distillation, Huile essentielle, *Laurusnobilis L*, Activité antimicrobienne, Activité antioxydante, Pouvoir enzymatique

Abstract

Medicinal plants are the subject of several recent studies, given their richness in chemical compounds with therapeutic effect. For this, this work is part of the study of the physico-chemical properties, the antimicrobial and antioxidant activity of an essential oil extracted from the leaves of an aromatic and medicinal plant; Laurusnobilis L. The extraction was carried out by Clevenger based on the principle of hydro-distillation. This separation allowed us yields of 1%. The EO obtained was characterized in order to determine its acid index, ester, andsaponification index…… In addition, an evaluation of the antioxidant and antimicrobial power revealed that this plant has an antioxidant power for the free radical of DPPH• with an IC50 of 4.98 µL/mL and antimicrobial activity against several microorganisms. The enzymatic activities (lipase, proteolytic and catalase) of leaves were evaluated in a crude extract with values of 2866.66 mol/min/mL, 0.840U/mL and 0.1 µKat/g respectively. All this encourages us to deepen our study and introduce it into an adequate pharmaceutical application.

Keywords: Hydrodistillation, Essential oil, Laurus Nobilis Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Enzymatic power.

Sommaire

REMERCIEMENTS

DÉDICACE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GÉNÉRALE ……... **1**

PARTIE I : APERCU BIBLIOGRAPHIQUE…….. **3**

I. Huiles essentielles…… **3**

I .1. Introduction.…….. **3**

I .2. Historique.……... **3**

I .3. Définition d'huile essentielle. …… **4**

I .4. Localisation des huiles essentielles. ……..... **4**

I .5. Critères de la qualité des huiles essentielles. ……..…… **5**

L'espèce botanique. ……...……... **5**

L'organe producteur……...…...……**5**

L'origine géographique. …… **5**

Le mode de culture. ……..…….... **6**

Le chimio type.…….……...…….. **6**

Le mode d'extraction.…….……...…… **6**

I .6. Compositions chimiques des huiles essentielles…… **6**

I .6.1. Classification des composes terpéniques et aromatique…..…… **6**

I .6.1.1. Les Hydrocarbures terpéniques. ……. **7**

a. Monoterpènes.…….... **7**

b. Sesquiterpènes…….... **8**

I .6.1.2. Composés terpéniques oxygénés.……...…… **9**

a. Les alcools terpéniques…..…….…..... **9**

b. Les aldéhydes terpéniques. ...……. **10**

I .6.1.3. Composés aromatiques. ...…….. **10**

I .7. Méthodes d'extraction des huiles essentielles. ……..….. **11**

I .7.1. La distillation.……..……..…… **11**

I .7.1.1. Hydrodistillation.……..…….…… **11**

I .7.1.2. Entrainement à la vapeur d'eau.…….. **12**

I .7.1.3. Hydro diffusion.……...……... **13**

I .7.1.4. La distillation sèche.……... **14**

I .7.2. Méthodes industrielles. ……. **14**

I .7.2.1. Extraction par solvant volatil.……. **14**

I .7.2.2. Extraction aux CO_2 supercritique……..... **15**

I .7.2.3. Extraction par micro-ondes…… **15**

I .7.2.4 Extraction par ultrasons……..... **15**

I .*7.3.* Méthodes traditionnelles……... **16**

I .7.3.1. Expression à froid……...……... **16**

I .7.3.2. L'extraction par enfleurage…… **16**

I .8. La conservation des huiles essentielles.…… **17**

I .9. Toxicité et précautions d'emploi des huiles essentielles.…… **17**

I .9.1. Toxicité des huiles essentielles…… **17**

I .9.2. Précautions d'emploi des huiles essentielles…… **17**

I .10. Domaines d'application des huiles essentielles.……..... **18**

I .10.1. En agroalimentaire……... **18**

I .10.2. En parfumerie et cosmétologie……... **19**

I .10.3. En pharmacie……..... **19**

I .11. Les activités biologiques des huiles essentielles…… **20**

I .11.1. Activité antimicrobienne…… **20**

Ⅰ.11.2. Activité antifongique……..... 20

Ⅰ.11.3. Activité antioxydante. …… 20

Ⅰ.11.4. Activité anti-inflammatoire…….…… 21

Ⅰ.11.5. Activité anticancéreuse……... 21

Ⅱ. Laurier Noble.…… 22

Ⅱ.1. Les plants médicinaux.……... 22

Ⅱ.2. Historique du Laurier Noble.……. 22

Ⅱ.3. Classification botanique.…… 23

Ⅱ. 3.1. Famille des lauracées.……... 23

Ⅱ.3.2. Le nom vernaculaire…… 24

Ⅱ.3.3. Origine et distribution géographique de laurier noble.……...……... 24

Ⅱ.4. Caractères botanique et morphologiques de Laurier noble.……... 25

Ⅱ.4.1. Les caractères botaniques……... 25

Ⅱ.4.2. Les caractères morphologiques……. 25

a. Les feuilles.…… 25

b. Les fleurs.……..... 26

c. Les fruits.…… 27

d. L'écorce..... 27

II.5. Compostions chimiques de laurier noble...... 28

II.6. Usage et propriétés thérapeutiques..... 28

II.7. Propriétés pharmacologiques et activités biologiques...... 29

II.7.1. Activité anti-inflammatoire..... 29

II.7.2. Activité antibactérienne..... 30

II.7.3. Activité anti-oxydante..... 30

II.7.4. Effet antifongique..... 30

II.7.5. Effet gastro-protectif..... 30

II.7.6. Effet de rééquilibrage de la glycémie..... 30

II.7.7. Autres effets..... 31

III.1. Introduction 33

III.2. Matériels et produits utilisés 33

III.2.1. Les produits chimiques et appareillages utilisés..... 33

III.2.2. Matières biologiques..... 35

III.2.3. Matière végétale 36

III.2.4. Site d'échantillonnage 36

III.3. Caractérisations physiques des feuilles de Laurier Noble..... 36

a.Taux d'humidité…… **36**

b. Taux de cendre……... **37**

III.4. Méthodes utilisées.....**37**

III.4.1. Préparation du matériel végétal **37**

III.4.2. Procédé d'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *Laurier Noble* par.clevenger …… **38**
…...

III.4.3. Détermination du rendement **39**

III.4.4. Les méthodes de caractérisation d'une huile essentielle **39**

II.4.4.1. Les critères organoleptiques **39**

a. La couleur.....**40**

b. L'odeur.....**40**

c. L'aspect.....**40**

III.4.4.2. Caractérisations physico-chimiques d'une huile essentielle **40**

c. L'indice de réfraction **40**

d. Densité relative **41**

e. Potentiel d'hydrogène pH **42**

f. Indice d'acide **42**

g.Indice de saponification **43**

h.Indice d'ester.....**44**

i. Activité anti-oxydante **44**

j. Activité enzymatique.....**47**

III.4.4.3. Caractérisations microbiologiques **52**

a. Activité antimicrobienne **52**

III.4.4.4. Identification de la présence des (par HPLC) **54**

IV.1. Introduction **57**

IV.2. La zone de récolte de la matière végétale...... **57**

IV.3. Caractérisation physiques des feuilles du Laurier Noble…..... **57**

a. Taux d'humidité de la matière végétale..... **57**

b. Taux de cendre de la matière végétale..... **58**

IV.4. Rendement.....**59**

IV.5. Caractérisation des huiles essentielles de Laurier Noble.....**59**

IV.5.1. Critères organoleptiques **59**

IV.5.2. Caractérisation physicochimique **60**

a. L'indice de réfraction de l'huile essentielle **60**

b. Densité relative **60**

c. Le potentiel d'hydrogène.....**61**

d. L'indice d'acide **61**

e. L'indice desaponification **61**

f. L'indice d'ester.....**62**

g. Activité anti-oxydante.....**62**

h. Activité enzymatique **64**

IV.5.3. Caractérisation microbiologique **66**

c. Activité antimicrobienne **66**

IV.5.4. Détermination de la composition chimique de l'HE par HPLC…… **70**

Conclusion générale……... **72**

Références bibliographiques……..…… **74**

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

C : Taux de cendre.

CG/MS : Chromatographie en phase gazeuse liée à une spectrométrie de masse.

CPG : Chromatographie en phase gazeuse.

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMB : Concentration minimale bactéricide.

CMF : Concentration minimalefongicide.

HE : Huile essentielle.

HSV : Virus herpès simple.

HPLC : Chromatographie liquide haute performance.

IA : Indice d'Acide.

IR : Indice de réfraction.

IS : Indice de saponification

MF : Masse fraiche.

MS : Masse sèche.

NM : Nanomètre.

ORL : Oto-rhino-laryngologie.

PAM : Plantes médicinales et aromatiques.

pH: Potentiel d'hydrogène.

PP : Phénolphtaléine.

R% : Rendement en pourcentage %.

RHE : Rendement d'huile essentielle.

ROS : Espèces réactives oxygénées.

rpm : Rotation pour minute.

$\boldsymbol{T_{eau}}$ **(%)** : Taux d'humidité en pourcentage.

Liste des symboles

C° : Degré Celsius.

cm : Centimètre.

G : Gramme.

H : Heure.

Kg : kilogramme.

L : Litre.

M : Mètre.

Mg : Milligramme.

Min : Minutes

mL: Millilitre.

mm : millimètre.

UV : Ultra-violet.

µL : Microlitre

% : Pourcentage.

Liste des figures

Figure I.1 : Unité d'isoprène……..	**7**
Figure I.2 : Structures de quelques sesquiterpènes……	**9**
Figure I.3 : Menthol……	**9**
Figure I.4 : Linalol……..	**9**
Figure I.5 : Géranial…….	**10**
Figure I.6 : Lenéral……..	**10**
Figure I.7 : Structure de quelques composés aromatiques…….	**11**
Figure I.8 : Schéma du processus de la distillation par entrainement à la vapeur d'eau…….	**13**
Figure I.9 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante…….	**13**
Figure II.1 : Distribution des Lauracées à travers le monde……	**25**
Figure II.2: Laurier Noble……...	**25**
Figure II.3: Feuille de Laurier Noble……..	**26**
Figure II.4 : Coupe de feuille de *Laurusnobilis L* montrant les grandes cellules sécrétrices…….	**26**
Figure II.5 : Fleurs de *Laurusnobilis L*……	**27**
Figure II.6 : Graines de laurier……	**27**
Figure III.1 : Localisation par satellite du lieu de la récolte……...	**34**
Figure III.2 : Feuilles de laurier séchées…….	**38**
Figure III.3: Photo du montage d'extraction de l'huile essentielle……..	**39**
Figure III.4: Réfractomètre…….	**41**
Figure III.5 : Protocole de l'indice d'acide……..	**43**
Figure III.6: Protocole d'indice de saponification……...	**44**
Figure III.7: Réaction d'une molécule anti-oxydante avec le radical DPPH……	**45**

Figure III.8 : Préparation de la solution de DPPH…….	**46**
Figure III.9 : Préparation des dilutions de laurier…….	**46**
Figure III.10 : Schéma représentatif du protocole expérimental de l'activité antioxydant……	**47**
Figure III.11 : L'extrait brut……	**48**
Figure III.12 : L'activité lipasique de laurier…….	**49**
Figure III.13: Protocole de l'activité catalasique……...	**51**
Figure III.14 : Evaluation de l'activité antibactérienne d'HE de Laurier Noble L sur les bactéries, les champignons et les levures avant l'incubation…….	**53**
Figure III.15 : Détermination de la CMI sur *Staphylococcus Epidermidis*……..	**54**
FigureIV.1 : Taux d'humidité de la plante…….	**58**
Figure IV.2: Incinération de laurier…….....	**58**
Figure IV.3: Huile essentielle du *laurier noble*……..	**59**
Figure IV.4: Indice de réfraction d'HE du*Laurusnobilis L*……	**60**
Figure IV.5: pH d'HE laurier noble……..	**61**
Figure IV.6 : Efficacité des extraits naturels (*laurusnobilis L*) à piéger le radical libre de DPPH en fonction de la concentration……	**63**
Figure IV.7 : Pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de Laurusnobilis sur *:* *a : Bacilus subtilis ; b : Staphylococcus Epidermidis ; c : Salmonella Typhimurium ;* *d : Staphylococcus aureues ; e : Escherichia Coli ; f : Pseudomonas Aeruginosa*……	**66**
Figure IV.8 : Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Laurusnobilis* sur : **A :** *Candidat Albicans*et **B** *Aspergillus Brasiliensis*……	**67**
Figure IV.9 : Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Laurusnobilis* sur : *Saccharomyces*……	**68**
Figure IV.10 : Pouvoir antimicrobien de l'extrait brut sur les levures :	**68**

A : *Candidat Albicans*et**B** *Aspergillus Brasiliensis*.....	
Figure IV.11 : Pouvoir antiphonique de l'huile essentielle de *Laurusnobilis* sur : *Saccharomyces*.....	*69*
Figure IV.12 : Pouvoir antiphonique de l'extrait brut de *Laurusnobilis* sur : *Saccharomyces*.....	*69*
Figure IV.13 : Chromatogramme des Polyphénols.....	*71*
Figure IV.14 : Chromatogramme des Flavonoïdes.....	*71*

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Les composés terpéniques et aromatiques……. **6**

Tableau I.2 : Diversité des monoterpènes……... **8**

Tableau II.1 : Dénomination internationale de *Laurusnobilis L*…….. **24**

Tableau III.1 : Le matériel utilisé…… **33**

Tableau III.2 : Les produits utilisés…… **34**

Tableau III.3: Les souches ……. **35**

Tableau III.4 : Différentes concentration d'HE dans la gélose……..…..**54**

Tableau IV.1 : Tableau récapitulatif des indices d'HE de Laurier noble…… **62**

Tableau IV.2 : Valeurs des CMI pour la souche*Staphylococcus Epidermidis*..... **70**

Introduction Générale

Introduction générale

L'utilisation des plantes médicinales remonte à un passé lointain, à plusieurs siècles et à plusieurs civilisations. Les plantes médicinales sont utilisées comme remèdes pour les maladies humaines car elles contiennent des composants naturels ayant un intérêt thérapeutique. Selon des études pharmacologiques plus de 1200 plantes ont été utilisées à travers le monde en médecine traditionnelle, pour leurs activités biologiques contre diverses maladies**[1, 2].**

Ces maladies sont à l'origine du stress oxydatif et sont dues généralement à la production excessive des radicaux libre et qui pourraient devenir toxiques pour les composants majeurs de la cellule comme les lipides, les protéines et les acides nucléiques **[3].** Ceci provoquerait un dysfonctionnement cellulaire et serait impliqué dans diverses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète, les maladies neuro-dégénératives (Alzheimer, Parkinson) et le processus de vieillissement **[4].**

De façon générale, les plantes médicinales et aromatiques **(PAM)** sont reconnues comme une ressource importante pour les soins de santé et la parfumerie depuis l'antiquité **[5].** Ils représentent une nouvelle source de composés actifs naturels tels que les composés phénoliques, les saponosides, et les huiles essentielles qui font l'objet de nombreuses recherches in vitro et in vivo **[6].** Les métabolites secondaires qui trouvent des utilisations comme agents aromatisants, parfums, insecticides, colorants et médicaments. La biotechnologie offre plusieurs choix grâce auxquels le métabolisme secondaire des plantes médicinales peut être modifié de manière innovante, pour surproduire des composés phytochimiques d'intérêt, réduire la teneur en composés toxiques ou même pour produire de nouveaux produits chimiques **[7].**

L'Algérie possède une position géographique particulière lui accordant une large bande de végétation très variée notamment les plantes aromatiques médicinales. La flore algérienne recèle un patrimoine végétal très riche, mais peu connu par manque d'études sur les vertus et les richesses qu'il peut probablement engendrer, celui-ci est malheureusement très peu exploité **[8].** À leur tête les huiles essentielles, qui par leurs multitudes propriétés ouvrent le champ pour cette orientation vers la nature.

Actuellement, près de 3000 huiles essentielles sont décrites, parmi lesquelles environ 300 présentent une importance commerciale dans le cadre des applications pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires, agronomiques ou dans le domaine de la parfumerie **[9].**

Pour cela, nous avons choisi une plante médicinale qui est nommée *Laurier Noble* qu'est l'une des espèces des plantes aromatiques les plus utilisée en Algérie. Elle attire beaucoup l'attention en raison de son importance économique, sa richesse en composés bioactives et ses propriétés thérapeutiques.

Notre travail a été divisé en deux parties :

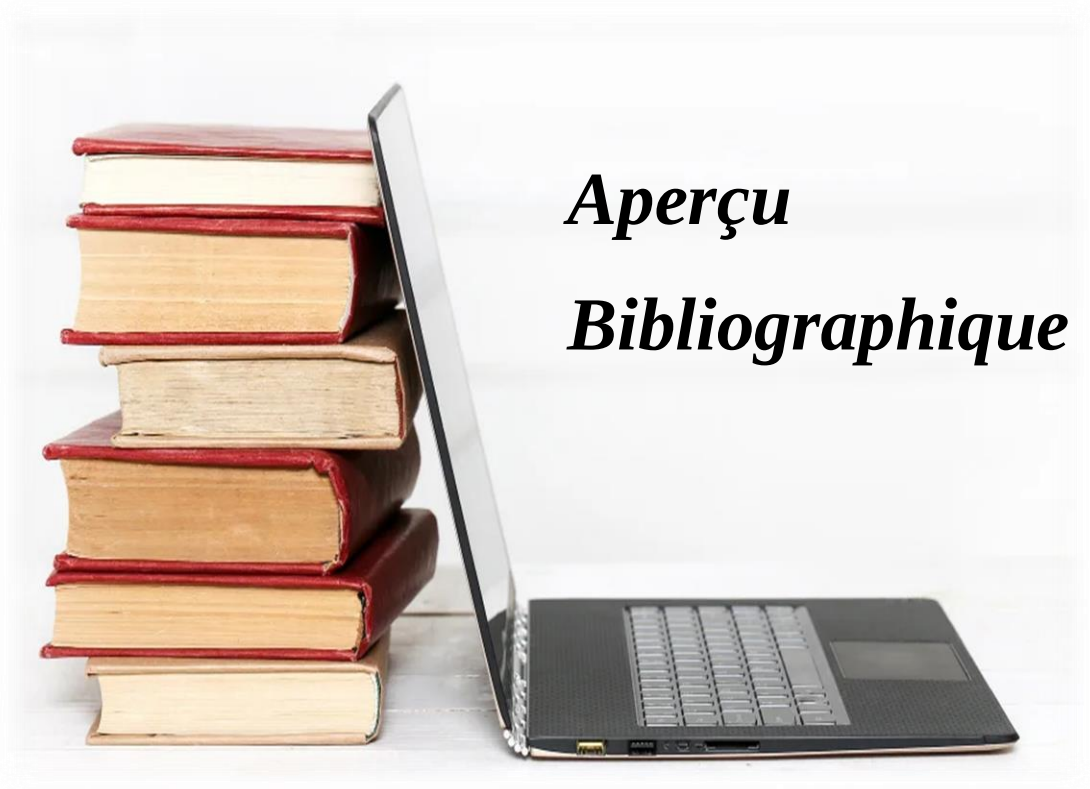
Nous aborderons dans la première partie une étude bibliographique qui regroupe deux chapitres dont :

- Le premierréservéauxhuiles essentielles et leurs propriétés ;
- Le deuxième est une recherche bibliographique consacrée à une description de Laurier *Noble* en précisant la composition chimique de différentes parties de la plante, sa classification botanique et sa composition.

La deuxième partie est une étude expérimentale consacrée à l'extraction de l'huile essentielle de *Laurier Noble* ainsi que sa caractérisation physico-chimique détaillée en utilisant les moyens disponibles.

Enfin, nous présenterons les résultats obtenus et leurs discussions et on termine par une conclusion générale qui englobe l'ensemble des résultats obtenus et les perspectives à envisager.

Première partie :



« Une mauvaise herbe est une plante dont on n'a pas encore trouvé les vertus »

Ralph Waldo Emerson

Chapitre I : Huiles Essentielles



I.1.Introduction :

Les huiles essentielles sont des principes actifs issus du métabolisme secondaire des plantes médicinales, ils ont été utilisés depuis l'antiquité et ils sont largement employées de nos jours, pour leurs propriétés biologiques (antimicrobienne, anti-oxydante, analgésique, anti- inflammatoire, anti-cancérigène, antiparasitaire, insecticide…)et leurs applications dans de multiples et diverses industries : alimentaire, cosmétique, parfumerie et pharmacie**[10].**

L'importance économique que représentent ces essences du fait de leurs propriétés biologiques, thérapeutiques, odoriférantes…, de leur impact au niveau de l'environnement et de leur utilisation dans le traitement de certaines maladies infectieuses pour lesquelles les antibiotiques de synthèse sont de moins en moins actifs ou dans la conservation des aliments contre l'oxydation comme alternatives aux produits chimiques de synthèse suscite de plus en plus l'intérêt des biologistes, des médecins et des chimistes**[11].**

I.2.Historique :

Les premières traces d'utilisation de l'aromathérapie remontent à plus de trente mille ans. Les aborigènes d'Australie, au moyen de la fumigation, étaient de grands utilisateurs de teatree (arbre à thé), une huile essentielle aujourd'hui très prometteuse sur les plans antibactérien, antiviral, antiparasitaire et antifongique.

Les Egyptiens et les Perses étaient experts dans l'art de la distillation. Pour preuve des inscriptions retrouvées, datant de 4000 ans en Mésopotamie et des écrits égyptiens datant de 3500 ans.

Les Grecs aussi firent grand cas des " huiles à parfum " et s'en sont servi pour guérir lors de l'épidémie de peste à Athènes.

Les Romains, grands utilisateurs de parfums, utilisaient les aromates sous forme de graisse aromatique ou huile parfumée. Ils connaissaient les propriétés antibactériennes et antiseptiques des plantes aromatiques qu'ils cultivaient.

Les civilisations avancées des Aztèques, Mayas et Incas connaissaient l'emploi des drogues végétales aromatiques pour guérir les infections et les plaies.

L'Aromathérapie "moderne" provient directement du monde arabe où les savants commencèrent à distiller les plantes à la vapeur d'eau. Le grand savant Avicenne met au point

l'alambic autour de l'an 1000. Ce n'est qu'au XIIIème siècle que l'aromathérapie arrive en Europe. De retour des croisades.

Au XIVème siècle, les appareils distillatoires évoluent et font leur apparition dans les laboratoires médicaux et alchimiques.

Après bien des ouvrages sur l'art de la distillation, le "Liber de distillation" écrit par Giovanni Battistadella Porta en 1563, où il fait la distinction des huiles grasses, des huiles essentielles et la manière de séparer les essences des eaux distillées aromatiques. Ce n'est qu'au cours des XVIe et XVIIe siècles que les huiles essentielles ont reçu leurs premières applications en tant que telles et leur introduction dans le commerce.

A la fin du XIXème siècle, avec l'avènement de la chimie organique, les essences livrent peu à peu leurs secrets : elles sont le mélange de nombreux composants, terpènes, alcools, esters, aldéhydes, cétones, phénols **[12].**

I.3.Définition de l'huile essentielle :

Les huiles essentielles, appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal **[13].**

Selon la commission de la pharmacopée Européenne l'huile essentielle est : « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenue à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ».

I.4.Localisation des huiles essentielles :

Selon plusieurs chercheurs, les huiles essentielles en peuvent être extraite qu'à partir des végétaux supérieurs repartie sur 60 familles comme par exemple ; les Lamiacées (thym, menthe) ; les Myrtacées (Le myrte) : les Lauracées (cannelle). Les huiles essentielles se trouvent dans tous les organes de la plante : feuilles, fleure, racines, graines, écorces et bois. La composition de l'huile essentielle (qualitative et quantitative) peut varier selon sa localisation dans la plante**[14,15].** Elles sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se

trouvent sur presque toutes les parties de la plante. Elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules **[16].**

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence des structures histologiques spécialisés, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante qui sont : cellules à huiles essentielles de Lauracées (Lauracea), les poils sécréteurs des Laminacées, poches sécrétrices des Myrtacées, des Rutacées, et les Laminacées, et les canaux sécréteurs qui existent dans de nombreuses familles. Il est intéressant de remarquer que les organes d'une même espèce peuvent renfermer des huiles essentielles de composition différente selon la localisation dans la plante **[17].**

I.5.Critères de qualité des huiles essentielles :

Six critères doivent être pris en considération pour évaluer la qualité des huiles essentielles :

I.5.1. L'espèce botanique :

La plante utilisée pour fabriquer une huile essentielle doit être définie par son genre, son espèce et si possible la sous-espèce à laquelle elle appartient **[18].**

I.5.2. L'organe producteur :

Selon la partie de la plante (feuilles, fleurs…) distillée ou pressée (pour les zestes de Citrus), il peut exister plusieurs huiles essentielles pour la même plante avec des compositions chimiques et des activités différentes.

Par exemple, pour la cannelle de Ceylan, l'huile essentielle peut être extraite de ses feuilles et de son écorce. Ainsi, l'huile essentielle provenant de l'écorce a des propriétés plus marquées que celle extraite des feuilles**[19].**

I.5.3. L'origine géographique :

Cela permet de connaître l'environnement dans lequel grandit la plante et de caractériser ainsi l'huile essentielle obtenue. Il y a des différences de composition chimique selon le pays d'origine. Une même plante grandissant dans des lieux différents avec changement de situation géographique (altitude et latitude), avec variation de la nature du sol, peut produire des huiles essentielles différentes **[19].**

I.5.4. Le mode de culture :

Il définit si la plante est cultivée ou sauvage **[19].**

I.5.5. Le chimio-type :

Il définit la molécule aromatique révélatrice des principales propriétés thérapeutiques de l'huile essentielle. Une plante de même variété botanique peut produire des huiles essentielles de compositions chimiques différentes selon son origine, son pays, son climat, son sol.On effectue une chromatographie en phase gazeuse liée à une spectrométrie de masse (CG-MS) pour identifier et quantifier ces compositions et connaître ainsi la composition précise des huiles essentielles **[19].**

I.5.6. Le mode d'extraction :

Il existe plusieurs modes d'extraction des huiles essentielles comme la distillation, l'hydro-distillation, la percolation, l'expression qui peuvent faire évoluer la composition de l'huiles essentielle**[19].**

I.6.Composition chimique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont dotées d'un très grand nombre de composants chimiques, qui leur confèrent leurs différentes propriétés et éventuelles toxicités, peuvent comporter plus de soixante composés différents. Les composants principaux peuvent constituer jusqu'à 85% de l'huile, tandis que d'autres composants sont présents seulement comme traces**[20].**

I.6.1. Classification des composés terpéniques et aromatiques :

On peut diviser cescomposants chimiques en deux grands groupes : le groupe majeur des terpénoïdes (hydrocarbures terpéniques, terpéniques oxygénés) et le groupe des composés aromatiques qui sont des dérivés du phénylpropane **[20].**

Tableau I.1 : Les composés terpéniques et aromatiques

Groupes chimiques	**Hydrocarbures terpéniques**	**Terpéniques oxygénés**	**Composés aromatiques**
Composés chimiques	Monoterpènes Sesquiterpènes	Alcool Aldéhydes	La vanilline L'eugénol L'anéthole L'estragole

I.6.1.1. Les Hydrocarbures terpéniques :

Ce sont les molécules les plus banales constituant les HE dont le squelette carboné est composé de molécules d'isoprènes **(Figure I.1)** arrangées en cycle ou de façon linéaire. Les principaux terpènes sont les monoterpènes (C10) et les sesquiterpènes (C15), mais les hemiterpènes (C5), diterpènes (C20), triterpènes (C30), et tetraterpènes (C40) existe aussi, et les terpènes contenant l'oxygène sont appelés des terpènoïdes**[9].**La formule générale des terpènes est $[C_5H_8]_n$.

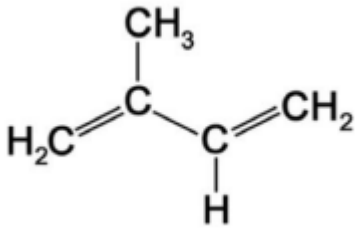


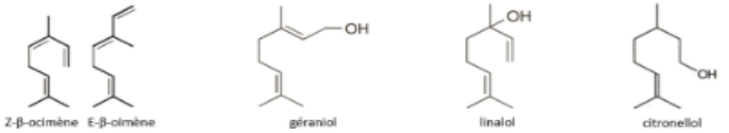
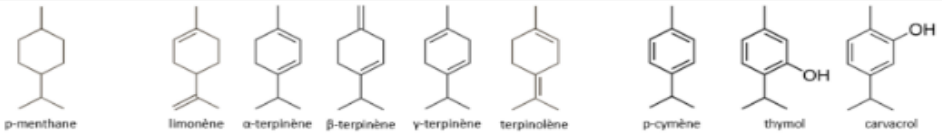
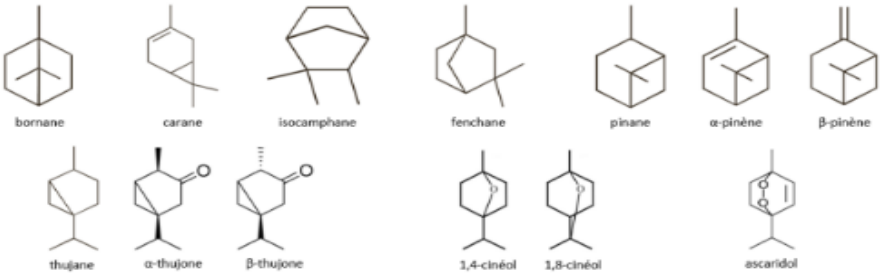
Figure I.1 : Unité d'isoprène**[21].**

Le point d'ébullition des terpènes augmente avec le nombre d'atomes de carbone dans la molécule ; les molécules de masse plus élevées sont moins volatiles, ainsi les huiles extraites par hydro-distillation ou par extraction à la vapeur contiennent plus de monoterpène.Les terpènes peuvent facilement polymériser d'où l'importance d'éviter les facteurs accélérant ce processus au cours de la conservation des HE (lumière, air, chaleur)**[22].**

❖ **Monoterpènes :**

Les composés monoterpéniques sont constitués de deux unités d'isoprène, leur formule chimique brute est $C_{10}H_{16}$**.**Ces composés peuvent être : monoterpènes acycliques (myrcène, ocimènes…), monoterpènes monocycliques (α- et γ terpinène, p-cymène..) et aux monoterpènes bicycliques (pinènes, Δ3-carène, camphène, sabinène…) et monoterpènes tricyclique)**(Tableau I.2) [23].**

Tableau I.2 : Diversité des monoterpènes**[24].**

Structures acycliques	
Structures monocycliques	
Structures bicycliques	
Structures tricycliques	

Les monoterpènes sont les plus retrouvés car il faut savoir que plus une molécule contient d'atomes de carbones, plus elle sera « lourde » et donc difficile à extraire lors de ladistillation. Ce sont des composés :

- ❖ Anti-infectieux, bactéricides, virucides et fongicides ;
- ❖ Stimulent les glandes à mucines « décongestion des voies respiratoires » ;
- ❖ Utilisés dans les pathologies oreille, nez et gorge ;
- ❖ Antalgiques cutanés, lors de douleurs localisées **[25].**

2. Sesquiterpènes

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en $C_{15}H_{22}$ (assemblage de trois unités isoprènes). Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurelles, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques. Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature **[26].**Ils sont :

- ❖ Antiseptiques et bactéricides ;
- ❖ Puissants anti-inflammatoires ;
- ❖ Utilisés dans les pathologies artériocapillaires ;
- ❖ Antiallergiques ;
- ❖ Antihistaminique chez certains asthmatiques **(Figure I.1) [25].**

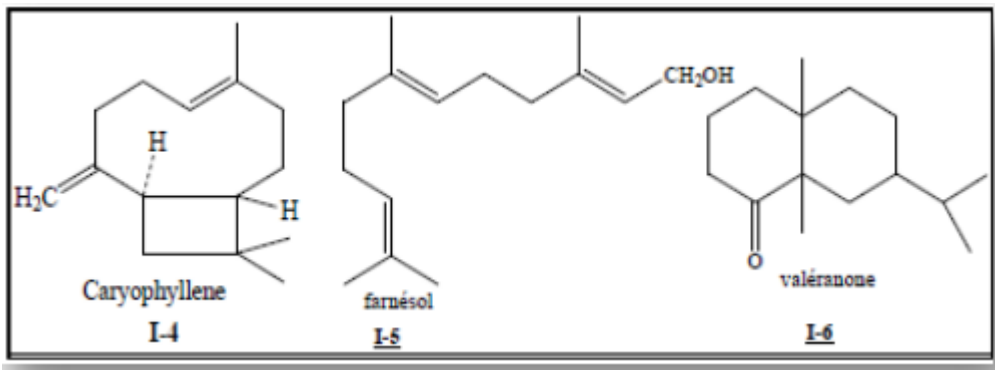


Figure I.2 : Structures de quelques sesquiterpènes**[27].**

I.6.1.2. Composés terpéniques oxygénés :

a) Les alcools terpéniques :

Les alcools terpéniques sont utilisés dans de nombreuses pathologies infectieuses. Ils ont des actions anti-infectieuses à large spectre d'action et également des stimulants immunitaires**[19].**Les principales molécules et huiles essentielles contenant des alcools :

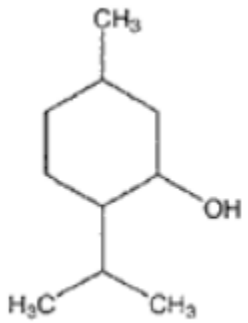


Figure I.3 : Menthol**[19]**

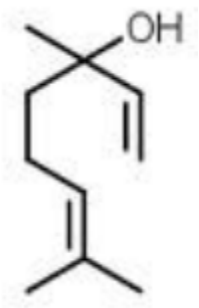
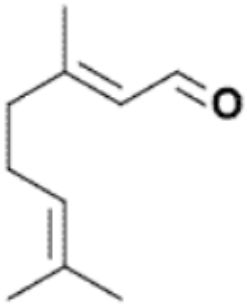


Figure I.4: Linalol**[19]**

Le menthol contenu dans l'huile essentielle de Menthe poivrée (Mentha x piperita) apporte un effet vasoconstructeur et anesthésiant.Le linalol présent dans l'huile essentielle de Thym CT linalol (Thymus vulgaris CT linalol) possède une action stimulante immunitaire**[19].**

b) Les aldéhydes terpéniques :

Les aldéhydes terpéniques confèrent despropriétés anti-inflammatoires relaxantes. Ils comportent le groupe caractéristique –CHO. Les principales molécules et huiles essentielles contenant des alcools :



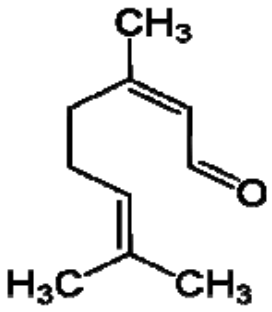


Figure I.5 : Gérani**[19]** **Figure I.6 :** Lenéral**[19]**

Les Citrals (général et néral), qui sont des aldéhydes terpéniques,se retrouvent dans l'huiles essentielle de Citronnelle (Cymbopogon)**[19].**

I.6.1.3. Composés aromatiques.

Ces composés dérivent du phenylpropane (C6-C3), Ils sont moins fréquents que les terpènes. Cette classe comprend des composés odorants comme : la vanilline, l'eugénol, l'anéthole et l'estragole. Ils se distinguent entre eux par :

- ❖ Le nombre et la position des groupements hydroxyles et méthoxy ;
- ❖ La position de la double liaison de la chaîne latérale, allylique ou propénylique ;
- ❖ Le degré d'oxydation de la chaîne aliphatique **[14].**

Ces composés aromatiques constituent un ensemble important, car ils sont généralement responsables des caractères olfactifs et organoleptiques des huiles **[28].**

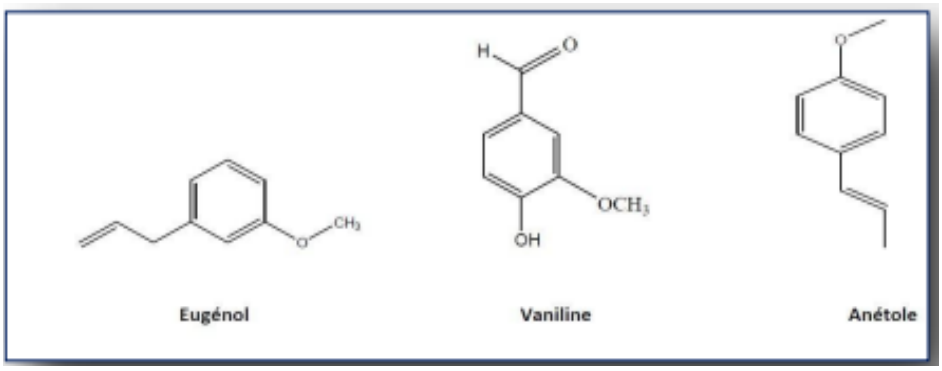


Figure I.7 : Structure de quelques composés aromatiques **[27].**

I.7.Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Les gouttelettes d'huile stockées dans les glandes ou les sacs d'huile peuvent être extraites soit par accélération de la diffusion à travers la paroi de la cellule, soit par écrasement de la paroi cellulaire. Les techniques adoptées dépendent de la partie des plantes où l'huile doit être extraite, de la stabilité de l'huile à la chaleur et de la sensibilité des constituants de l'huile aux réactions chimiques **[29].**Les principales méthodes d'extraction sont :

I.7.1. La distillation :

Selon Benjilalila,la distillation peut être définie comme étant la séparation des constituants d'un mélange de deux ou plusieurs composants en fonction de leur température de passage à l'état gazeux (ébullition ou sublimation)**[30]**. La distillation peut s'effectuer avec recyclage de l'eau de distillation (cohobation), ou sans recyclage. La production des huiles essentielles se ferait donc en deux étapes : la diffusion de l'huile essentielle de l'intérieur des tissus vers la surface du matériel végétal, et l'évaporation et entraînement à la vapeur d'eau**[31].**

I.7.2. Hydro-distillation :

L'hydro-distillation est composée de hydro- en grec « eau » et de -distillation qui vient du latin stilla, « goutte » et de distillare (latin savant), « tomber goutte à goutte » **[31].** L'hydro-distillation est la méthode la plus simple et la plus anciennement utilisée et normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité **[32].**

Elle se produit dans l'appareil de Clevenger et consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (entier, coupé ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite portée à ébullition **[33].** La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique (eau + huiles essentielles) et l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par différence de densité **[34].**La durée de la distillation est plus longue pour les organes de plantes ligneuses que pour les herbacées, cette différence est liée à la localisation des structures d'élaboration ou de stockage des huiles essentielles pouvant être superficielles ou internes. De ce fait, elles ont une influence sur le déroulement de l'hydro-distillation, c'est-à-dire sur les mécanismes successifs mis en jeu, et par conséquent sur la durée **[35].**

I.7.3. Entrainement à la vapeur d'eau :

C'est la technique la plus couramment utilisée pour la fabrication des HEs. C'est la seule distillation préconisée par la Pharmacopée française, car elle minimise les altérations hydrolytiques (notamment des esters). Dans cette méthode, la matière végétale n'est pas en contact avec l'eau. Cette opération s'accomplit dans un alambic. Un flux de vapeur d'eau traverse une cuve remplie de plantes aromatiques disposées sur des plaques perforées. Le but consiste à emporter avec la vapeur d'eau, les constituants volatils de la plante aromatique(**Figure I.8) [25].**

Les huiles essentielles sont généralement obtenues par distillation et entraînement à la vapeur d'eau, cette opération s'accomplit dans un distillateur. Le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Ce courant de vapeur entraîne les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. La vapeur d'eau chargée ainsi d'essence retourne à l'état liquide par condensation. Le produit de la distillation se sépare donc en deux phases distinctes : l'huile essentielle et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat **[36].**

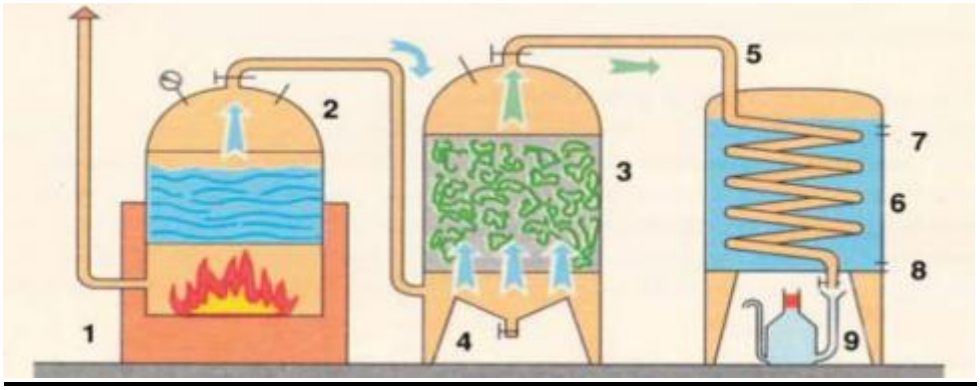


Figure I.8 : Schéma du processus de la distillation par entrainement à la vapeur d'eau **[29].**

1 : Chauffage**, 2** : Chaudière produisant de la vapeur, **3** : Cuve contenant les plantes à distiller, **4** : Vidange, **5** : Col de cygne permettant le passage de la vapeur chargée en huiles essentielles, **6** : Réfrigérant (ou serpentin), **7** : Sortie de l'eau chaude, **8** : Entrée de l'eau froide**, 9** : Essencier (ou vase florentin) permettant la séparation de l'huile essentielle et de l'hydrolat.

I.7.4.Hydro-diffusion :

L'hydro-diffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur. Dans le cas de l'hydro diffusion, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant **(Figure I.9)**. Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « Vapeur d'eau + huile essentielle » dispersé dans la matière végétale. Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydro diffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydro-diffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur **[37].**

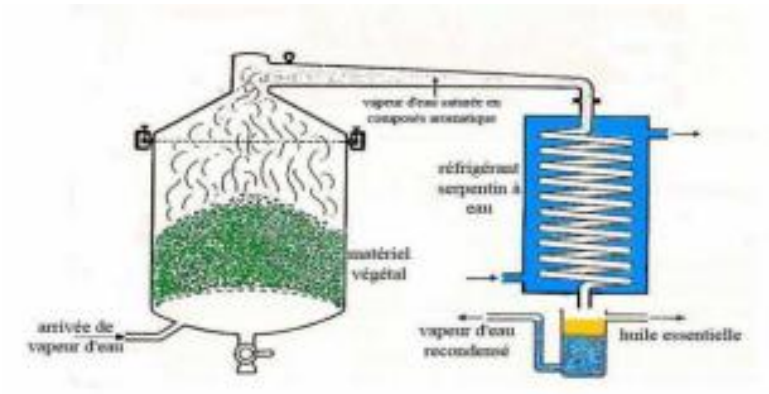


Figure I.9 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante **[37].**

I.7.5. Distillation sèche :

Contrairement à l'entrainement à la vapeur d'eau, cette technique est utilisée pour l'extraction des huiles essentielles à partir d'écorce ou de bois, la distillation est obtenue par leurs chauffages à température élevée. Elle n'utilise pas d'eau liquide ou sous forme vapeur, le bois est placé dans une cuve de distillation où le four est situé autour de la cuve. La chaleur produite par le four dans le couloir de chauffage permet la combustion du bois. Le distillat est récupéré dans une cuve de condensation. Le liquide condensé passe ensuite dans une cuve de décantation afin de séparer l'eau et l'huile essentielle **[38].**

I.8. Méthodes industrielles :

I.8.1. Extraction par solvants volatils :

Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut extraire par distillation. Elle est basée sur le pouvoir qu'ont certains solvants organiques à dissoudre les composants des huiles essentielles**[39].**

Dans ce procédé, un épuisement des plantes est effectué à l'aide d'un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé « concrète ». Le traitement de cette concrète par l'alcool absolu conduit à « l'absolue » **[39,40].**Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économiques : sélectivité (pouvoir solvant à l'égard des constituants odorants), stabilité, inertie chimique, température d'ébullition pas trop élevée pour permettre son élimination totale, pas trop faible pour éviter les pertes et donc une élévation des coûts, sécurité de manipulation c'est à dire non toxique ou inflammable. Les solvants les plus utilisés sont les hydrocarbures aliphatiques : l'éther de pétrole et l'hexane, mais aussi le propane ou le butane liquide (sous pression). Si le benzène est un bon solvant, sa toxicité limite de plus en plus son utilisation. On a également recours aux solvants halogénés (dérivés chlorés et fluorés du méthane et de l'éthane) ainsi qu'à l'éthanol. Après l'extraction, le solvant est distillé et en fin de l'opération, le solvant qui imbibe la masse végétale est récupéré par injection de vapeur d'eau dans celle-ci **[41].**

En effet,Viaud**[42]** affirme que des analyses sérieuses, par les méthodes les plus modernes, montrent que les proportions de solvants résiduaires dans les concrètes se situent entre 2 et 4% atteignant souvent 6% et même parfois 25%. Les absolues obtenues par lavage à l'alcool des concrètes contiennent encore des ppm importantes de ces solvants. De telles

huiles ne sont donc pas admissibles à l'usage médical par contre, elles sont admissibles en parfumerie**[42].**

I.8.2. Extraction au dioxyde de carbone(CO_2) supercritique :

La technique est fondée sur la solubilité des constituants dans le dioxyde de carbone à l'état supercritique. Grâce à cette propriété, le dioxyde de carbone permet l'extraction dans le domaine liquide (supercritique) et la séparation dans le domaine gazeux. Le dioxyde de carbone est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Il est ensuite injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, puis le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant **[41].**

I.8.3. Extraction par micro-ondes :

C'est un procédé utilisant les micro-ondes et les solvants transparents aux micro-ondes pour extraire de façon rapide et sélective des produits chimiques de diverses substances **[43].**Le matériel végétal est immergé dans un solvant transparent aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les micro-ondes vont chauffer l'eau présente dans le système glandulaire et vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant (non chauffé). On filtre et on récupère ensuite l'extrait. L'extraction par micro-ondes a le grand avantage de réduire le temps d'extraction à quelques secondes **[44].**Ce procédé, très rapide et peu consommateur d'énergie, livre un produit qui, est le plus souvent, de qualité supérieure à celle du produit d'hydro-distillation traditionnelle **[41].** Par ailleurs, l'analyse des huiles essentielles obtenues par cette méthode,Scheffera montré que la composition qualitative des huiles essentielles était la même que celle des huiles obtenues par distillation mais le pourcentage des constituants variait de manière significative**[45].**

I.8.4. Extraction par ultrasons :

Les micro-cavitations, générées par ultrasons, désorganisent la structure des parois végétales, notamment les zones cristallines cellulosiques. Les ultrasons favorisent la diffusion et peuvent modifier l'ordre de distillation, des constituants des huiles essentielles. L'extraction par les ultrasons est une technique de choix, pour les solvants de faible point d'ébullition, à des températures d'extraction inférieures au point d'ébullition. L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée d'extraction, d'augmenter le rendement en extrait et de faciliter l'extraction de molécules thermosensibles **[46].**

I.8.5. Méthodes traditionnelles :

a. Expression à froid :

Ce mode d'obtention particulier est réalisé uniquement pour les fruits de la famille botanique des Rutacées (citron, orange, bergamote, mandarine, etc.). C'est une méthode simple qui consiste à briser mécaniquement par abrasion les poches oléifères localisées au niveau de l'écorce ou du péricarpe du fruit pour en recueillir le contenu. L'huile essentielle est séparée du jus de fruit par un procédé mécanique de décantation à froid.

De nos jours, l'expression mécanique reste le procédé le plus simple et le seul ne modifiant pas le produit obtenu. Ainsi, l'HE recueillie porte le nom d'essence.

Le produit obtenu ne subissant pas de modifications, les essences obtenues par extraction mécanique possèdent une activité thérapeutique nettement supérieure à celle des HEs produites par d'autres procédés**[47].**

b. Extraction par enfleurage (macération) :

Ce procédé met à profit la liposolubilité des composants odorantsdes végétaux dans les corps gras. Il consiste à déposer des pétales de fleurs fraîches sur des plaques de verre recouvertes de minces couches de graisse (graisse animale type saindoux). Selon les espèces, l'absorption des huiles essentielles des pétales par le gras peut prendre de 24 heures (Jasmin) à 72 heures (Tubéreuse). Les pétales sont éliminées et remplacées par des pétales fraîches jusqu'à saturation du corps gras. On épuise ce corps gras par un solvant que l'on évapore ensuite sous vide **[39, 44].** Pour certaines plantes, on procédé à une immersion des fleurs dans de la graisse chauffée, c'est ce que l'on appelle enfleurage à chaud ou « digestion » **[41].**

Cette méthode appelée également macération à chaud par d'autres auteurs est surtout utilisée pour les fleurs délicates qui perdent leurs aromes très rapidement après la cueillette, comme les violettes et certains lys **[44].** Cette technique laborieuse, qui demande une grande labilité, est de moins en moins employée au profit de l'extraction par les solvants, en raison de son faible rendement et de l'importante main d'œuvre qu'elle nécessite **[48].**

I.9. Conservation des huiles essentielles :

A cause de leur évaporation rapide, leur sensibilité à l'air et à la lumière, les huiles essentielles doivent être conservées dans des flacons opaques et fermés hermétiquement **[49, 50].**

Il va de soi que la relative instabilité des molécules constituants les huiles essentielles rend leur conservation difficile. Les possibilités de dégradation sont nombreuses, facilement objectivé par les indices (peroxydes, réfraction), par la détermination des caractères physiques (viscosité, miscibilité à l'alcool, pouvoir rotatoire) et/ou par l'analyse en CPG **[41].**Les différents types de dégradation sont multiples comme par exemple photo-isomérisation, photo cyclisation, coupure oxydative, peroxydation et décomposition en cétones et alcools, thermo-isomérisation, hydrolyse et trans-estérification. Ces dégradations peuvent modifier les propriétés et/ou mettre en cause l'innocuité de l'huile essentielle **[38].**

Les huiles essentielles ne devraient pas être conditionnées dans des flacons transparents. Elles sont en effet sensibles à la lumière, à l'air et à la température et doivent par conséquent être conservées dans des récipients protecteurs, comme des flacons de verre brun, bleu ou laiteux par exemple **[51].**

I.10.Toxicité et précaution d'emploi des huiles essentielles :

I.10.1. Toxicité des huiles essentielles :

Les études scientifiques montrent que les huiles essentielles peuvent présenter une certaine toxicité. Il faut cependant remarquer que celle-ci varie selon la voie d'exposition et la dose prise. Les huiles essentielles semblent n'être toxiques par ingestion que si celle-ci est faite en de grandes quantités et en dehors du cadre classique d'utilisation. Les huiles ne seront toxiques par contact que si des concentrations importantes sont appliquées **[52].**

I.10.2. Précautions d'emploi des huiles essentielles :

- La durée de conservation des huiles essentielles après ouverture est de 2 ans pour les huiles essentielles à base d'agrumes et de 5 ans maximum pour les autres **[53] ;**
- Il faut toujours respecter les voies d'absorption indiquées ainsi que la posologie **[54] ;**

- Certaines huiles essentielles pures sont dermocaustiques (agressives pour la peau), comme l'huile essentielle de Thymus vulgaris. Il faudra donc les diluer dans une huile végétale (amande douce, olive…) **[19] ;**

- Toutes huiles essentielles vendues dans un flacon en plastique, ou dans un flacon en verre non coloré et foncé, ne doit pas être considérée comme de qualité pharmaceutique. Se détourner de ces huiles essentielles qui ne présentent pas d'intérêt thérapeutique **[25] ;**

- Eviter d'utiliser des bouchons ou des emballages en plastique puisque la matière plastique peut entrainer une réaction contenant contenu et altérer la qualité de l'huile essentielle **[53] ;**

- Il faut veiller à toujours bien se laver les mains après massage ou application cutanée pour éviter toute ingestion accidentelle **[20] ;**

- Ne pas utiliser chez la femme enceinte ou allaitante. Mais plus précisément c'est pendant les 3 premiers mois de grossesse que les HEs sont interdites **[25] ;**

- En cas d'ingestion accidentelle, en grande quantité : prendre du charbon végétal en poudre avec un peu d'eau ou boire de l'huile végétale pour absorber et diluer l'huile essentielle et diminuer sa toxicité **[55] ;**

- Ne jamais appliquer l'huile essentielle pure sur les yeux, le nez, le conduit auditif, les muqueuses ano-génitales **[19] ;**

- Gardez toujours les huiles essentielles hors de portée et hors de vue des enfants. Et Ne pas administrer des huiles essentielles par voie orale chez l'enfant de moins de 3 ans **[55] ;**

- Il est interdit de faire des aérosols d'huiles essentielles aux patients allergiques et asthmatiques sans contrôle médical, ainsi que chez les personnes ayant des antécédents épileptiques ou convulsifs **[19] ;**

- Certaines huiles sont photos sensibilisantes, donc Il ne faut pas mettre sur la peau des huiles essentielles avant toute exposition au soleil **[54] ;**

- Il ne faut pas associer un traitement médicamenteux à un traitement par les huiles essentielles car cela pourrait provoquer des effets indésirables, potentialiser ou annuler les effets du traitement médicamenteux **[20] ;**

I.11. Domaines d'application des huiles essentielles :

En raison de leurs diverses propriétés, les huiles essentielles sont devenues une matière d'importance économique considérable avec un marché en constante croissance. En effet, elles sont commercialisées et présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels comme en pharmacie, en alimentation, en parfumerie et en cosmétiques **[14].**

I.11.1. En Agroalimentaire :

Les huiles essentielles sont utilisées dans les domaines nutritionnels et agricoles pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, nématicides, insecticides et antioxydants rapportés **[56].**On les retrouve dans une grande variété de biens de consommation tels que les produits alimentaires de confiserie, les boissons gazeuses et les boissons distillées alcoolisées. En plus de leur utilisation répandue comme matière aromatisant**[57].**

Les huiles essentielles sont généralement sûres avec un minimum d'effets secondaires. Plusieurs d'entre elles ont été approuvés comme additifs alimentaires par l'administration Américaine des denrées alimentaires et des médicaments (Food and Drug Administration FDA)**[58].**Ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments, mais l'évaluation de leurs propriétés antimicrobiennes demeure très importante pour les exploiter dans l'industrie comme étant des conservateurs naturels **[59].**

I.11.2. En parfumerie et cosmétologie :

Les propriétés odoriférantes des huiles essentielles confèrent à ces dernières une consommation importante en parfumerie et en cosmétique. Elles présentent environ 60% des matières premières de l'industrie des parfums synthétiques, des savons et des cosmétiques **[60].**L'utilisation des huiles essentielles dans les crèmes et les gels permet de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et anti-oxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable **[61].**

I.11.3. En pharmacie :

Les huiles essentielles sont utilisées en produits pharmaceutiques pour leur potentiel en tant qu'agents médicinaux **[62].**

L'industrie pharmaceutique utilise les huiles essentielles en raison de leurs pouvoirs : anti- infectieux, antiseptiques, cicatrisant, énergisant, antidouleur et anti-inflammatoire. Les huiles essentielles sont également utilisées pour l'aromatisationdes formes médicamenteusesdestinées à la voie orale. Elles constituent également le support d'une thérapeutique particulière : l'aromathérapie (thérapie par les huiles essentielles des plantes aromatiques) **[63].**

I.12. Les activités biologiques des huiles essentielles :

I.12.1. Activité antimicrobienne :

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix **[64].** Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes **[65].** Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre **[66].**

I.12.2. Activité antifongique :

L'activité antifongique dépend strictement de la composition et des proportions des composés chimiques. Kuritaet al.ont classé ces composés purs selon leurs activités antifongiques vis-à-vis de sept champignons. Cette activité a été estimée selon la durée d'inhibition de la croissance observée sous microscope, ainsi ils ont déterminé l'échelle suivante : Phénols>Alcools>Aldéhyde>Cétone>Ether>Hydrocarbures **[67].**

Parmi les aldéhydes aliphatiques, le cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actif. En ce qui concerne les composés phénoliques, l'activité antifongique augmente avec l'encombrement stérique de la molécule (p-n-propylphénol › thymol › isoeugénol › eugénol) **[68].**

Pour étudier leurs activités, Janssen et al.ont testé le pouvoir inhibiteur de 53 huiles essentielles vis-à-vis de trois champignons dermatophytes : Epidermaphytonfloccosum, Trichophyton metagrophytus et T. rubrum.Les résultats montrent que toutes les huiles

essentielles riches en thymol, carvacrol, eugénol et cinnamaldehyde sont très actives sur les 3 microorganismes testés **[69,70].**

I.12.3. Activité anti-oxydante :

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Les antioxydants s'utilisent pour réduire l'oxydation du produit auquel ils sont mélangés. L'effet des antioxydants provient de deux mécanismes :

- Ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaine initialisées par ces derniers ;
- Les antioxydants détruisent les hydroperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaison O-O), diminuant ainsi la vitesse de formation des radicaux libres **[71].**

Les huiles essentielles de Cannelle, noix de muscade, gironfle, basilic, persil, origan et thym sont caractérisées par les propriétés anti-oxydantes les plus importantes, le thymol et le carvacrol sont les composants les plus actifs. Leur activité est reliée à leurs structure phénolique qui leurs confèrent des propriétés redox, et donc joue un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres et aussi sur la décomposition des peroxydes **[72].**

L'activité anti-oxydante des huiles essentielles est aussi due à certains alcools, éthers, cétone, aldéhyde, et des monoterpènes : linalol, 1,8-Cineole, citral … **[73].**

I.12.4. Activité anti-inflammatoire :

En plus de la capacité de certaines huiles essentielles à éliminer les radicaux libres, il existe également des preuves que certaines huiles essentielles possèdent une activité anti-inflammatoire **[74].** Les composés actifs agissent en inhibant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs d'inflammation **[72].**

Les huiles essentielles (eucalyptus, romarin, lavande, millefolia) ainsi que d'autres plantes (pin, clouté et myrrhe) qui ont été utilisées comme formulations mixtes comme anti-inflammatoires dans l'aromathérapie traditionnelle **[75].**

I.12.5. Activité anticancéreuse :

Les huiles essentielles pourraient également exercer des effets anticancéreux parce qu'il existe une relation directe entre la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) et les états oxydatifs et inflammatoires qui peuvent conduire au cancer **[76].**Il existe plus de cinq cents articles publiés portant sur l'activité anticancéreuse des huiles essentielles, et Plus de vingt familles de plantes ont été testées pour plus de Vingt types de cancers **[77].**

Chapitre II : Laurier Noble.



II.1. Les plantes médicinales :

D'après la Xème édition de la Pharmacopée française, les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses **[78,79].** C'est -à-dire qu'elles sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales **[80,78].**

Actuellement la médication, par les plantes connaît un regain d'intérêt notable, et c'est grâce aux études scientifiques basées sur les méthodes analytiques et les expérimentations nouvelles, donnant naissance à des prescriptions empiriques des plantes médicinales **[81].**

Les grands types de plantes aromatiques et médicinales utiles à l'homme peuvent être définis par leur principal usage telles que : les tisanes, les cosmétiques, les condimentaires, l'alimentaires et les industrielles **[82].**

Le continent africain regorge de plantes médicinales très diversifiées. En effet, sur les 300.000espèces végétales recensées sur la planète, plus de 200.000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique et ont des vertus médicinales **[79].**

II.2. Historique du laurier noble :

Le Laurier est une plante très symbolique, associée le plus souvent à la poésie, la gloire et à la paix **[83].**

Consacrée de la beauté masculine et de la lumière solaire dans la mythologie grecque, cette plante sacrée est mentionnée plus précisément dans le célèbre poème Métamorphoses d'Ovide. Un jour Apollon n'a cessé de se moquer d'Eros, Dieu d'amour, au sujet de ses talents d'archer qui finit par en prendre outrage.

Eros tire alors deux flèches une à pointe d'or, visant Apollon, ce qui le rend fou amoureux de Daphné, et l'autre, à pointe de plomb, destinée à Daphné, la rend impassible à ses charmes.Follement amoureux de Daphné, Apollon la suit même lors de ses parties de chasse. Elle réussit à s'enfuir grâce à Eros avant qu'il ne la saisisse. Afin de s'en sortir de cette situation, elle demande de l'aide à son père, le dieu Fleuve Pénée ; le suppliant même de lui retirer sa beauté. C'est ainsi que son père la transforme en un Laurier qui reflète encore sa beauté originelle.Apollon, profondément attristé, implore Daphné de devenir son arbre pour l'éternité. Elle finit par accepter la proposition en agitant son merveilleux feuillage.Le Laurier

devient alors le symbole d'Apollon représenté avec une couronne de laurier sur la tête ainsi que sur sa lyre et son carquois **[84].**

II.3. Classification botanique :

II.3.1. Famille des lauracées :

Laurier (*Laurusnobilis L*) appartient à la famille des Lauracées (Lauraceae), famille botanique importante souvent aromatiques, ses espèces peuvent être reconnues par leur odeur aromatique. Celle-ci comprennent 32 genres et environ 2000 à 2500 espèces **[85, 86].**

Le laurier, ou laurier-sauce (*laurusnobilis L.)* est un arbuste ou un arbre de la famille des Lauraceaes, à feuilles persistantes et coriaces **[87].** Etymologiquement, le nom latin laurus signifiant « toujours vert » fait allusion au feuillage persistant de la plante et nobilis du latin « fameux » **[88].** Son nom et aussi symbole du succès dans nos jours à travers le baccalauréat du latin « Bacca Lauri » soit baies de laurier **[89].** La classification botanique de *LaurusNobilis L*. d'aprèsQuezel et Santa**[90] :**

Règne : Plantes.

Sous règne : Plantes vasculaires.

Embranchement : Spermaphytes.

S/Emb : Angiospermes.

Classe : Dicotylédones.

S /classe : Dialypétales.

Ordre : Laurales.

Famille : Lauracées.

Genre : Laurus.

Espèce : *Laurusnobilis L.*

II.3.2. Le nom vernaculaire :

Tableau II.1 : Dénomination internationale de *Laurusnobilis L*. **[51].**

Pays	Dénomination vernaculaire
Français	Laurier commun,lauriersauce,laurierfranc,laurier noble.
Allemand	Bay,lorbeebaum,gewurzlorbee.
Anglais	Bay,sweetbay,baylaurel,truelaurel, roman laurel,noble laurel.
Arabe	Rand (رند),warakatesidnamousa(ورقة سيدنا موسى),El ghar (الغار).

II.3.3. Origine et distribution géographique du *Laurier Noble* :

Le laurier est la seule espèce représentant la famille des lauracées dans la régionméditerranéenne en particulier en (Turquie, Grèce, Espagne, Italie, France). IL Pousse dans les lieux humides et ombragés, également dans les jardins, où il est cultivé comme condiment. Actuellement, la plante est largement cultivée comme plante ornementale dans le sud et l'ouest de l'Europe, l'Amérique centrale et aux Etats-Unis. Il fait l'objet de production commerciale dans beaucoup de pays tels que la Turquie, l'Algérie, la France, la Grèce, le Maroc, l'Amérique centrale et les Etats-Unis Méridionaux **[80,86,91].**

C'est une espèce affectionnant particulièrement les hivers doux avec des températures ne descendant pas sous les -5°C. Les conditions idéales sont les endroits ensoleillés et protégés du vent, même si elle est tolérée l'ombre. Concernant l'humidité, la plante ne supporte pas la sécheresse prolongée : il lui faudra au minimum 600 mm de précipitations par an **[51].**

Exceptés les sols trop acides, le laurier peut s'adapter à tout type de sol. Il se développe aisément dans les sols profonds et humides toute l'année. Le sol type doit être riche en nutrimentset en bases avec un pH proche de la neutralité **[51].**

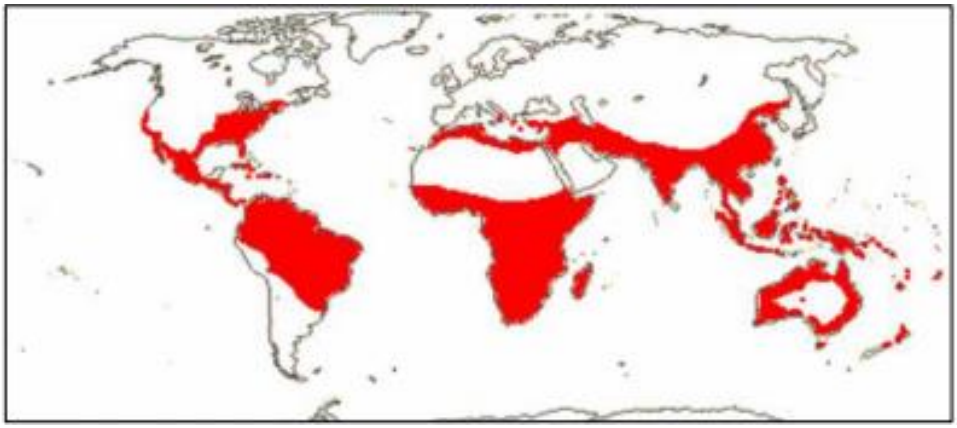


Figure II.1 : Distribution des Lauracées à travers le monde **[92].**

II. 4. Caractères botaniques et morphologiques de *Laurier Noble* :

II.4.1. Les caractères botaniques :

Le laurier est un arbuste ou arbre aromatique de 2 à 10m de hauteur à croissance lente, et au tronc droit, ramifié dès la base avec un sommet conique, et s'arrondissant en fil du temps. L'écorce est noire à gris foncé et lisse. Ces branches remontent en oblique avec des jeunes pousses fines, glabres et brun rougeâtre dont les bourgeons sont étroits, verts rougeâtres et longs de 0,2 à 0,4cm **[93].**



Figure II.2. : *Laurier Noble* **[94].**

II.4.2. Caractères morphologiques :

Laurusnobilis L. est caractérisé par :

- **Les feuilles :**Simples, alternes et coriaces, longues de 5 à 12cm et large de 2 à 6cm et dont le pétiole mesure de 2 à 5cm. Elles sont lancéolées, légèrement ondulées et entaillées au bord, de couleur vert foncé, brillantes sur la face supérieure et verte clair

au-dessous avec des nervures latérales pennées et rougeâtres **[93].** Elles ont une odeur aromatique, surtout après froissage, une saveur un peu amère **[95].**



Figure II.3 : Feuille de *Laurier NobleL***[94].**

Au niveau cellulaire, le caractère lignifié des parois et l'enfoncement des stomates augmentent la résistance de la plante aux températures basses comme élevées. Les feuilles présentent également une odeur aromatique caractéristique lors de leur froissement, due à la présence de grandes cellules sécrétrices situées dans le parenchyme palissadique **[51,83].**

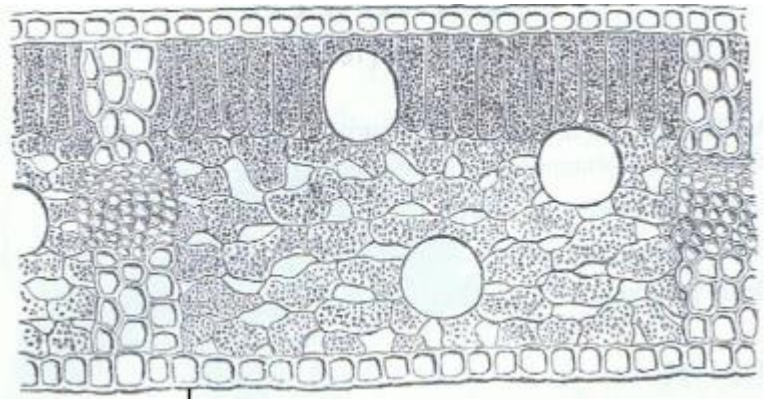


Figure II.4: Coupe de feuille de *LaurusnobilisL.*montrant les grandes cellules sécrétrices **[96].**

- **Les fleurs:**Dioïques (fleurs mâles et femelles sur des pieds séparés), de 0,4 à 0,8 cm avec une couleur jaune verdâtre, à périanthe simple soudé à la base. Groupées en 4 à 6 ombelles. Elles apparaissent en mois de mars-avril de l'année **[93,97].**



Figure II.5 : Fleurs de *Laurusnobilis L.* **[94].**

Les fleurs mâles sont composées de 8 à 12 étamines dont deux sont pourvues de nectaires. Les anthères s'ouvrent par deux pores au moyen de clapets afin de libérer les grains de pollen **[83].**

- **Les fruits:**Une baie ovoïde, soutenue par le tube périanthaire peu dilaté de 2cm de longueur à 1cm de largeur, il est noir vernissé **[98].**

Elles contiennent une seule graine formée de deux cotylédons riches en lipides et parfumés. Les matières grasses s'oxydent rapidement ce qui limite la capacité germinative de la graine. Très souvent, les baies restent présentes tout l'hiver sur l'arbre, voire même jusqu'au printemps suivant. L'huile peut en être extraite pour fabriquer des savons **[93,99].**



Figure II.6 : Graines de laurier Noble **[96].**

- **Écorce:**Écorce gris foncé à très foncé, mate plus ou moins lisse chez les jeunes sujets et s'écaillant chez les très vieux arbres **[93].**

II.5. Compositions chimiques de *Laurier Noble* :

De nombreuses études ont été réalisées pour la détermination de la composition chimique des feuilles de *Laurusnobilis L.* et plusieurs ont prouvé la richesse de ses feuilles en substances actives. Par hydro-distillation les feuilles fournissent environ 10-30 ml/Kg (1-3%) d'huile essentielle **[91,96].**

Dans l'ensemble, 30 constituants de l'HE, soit 99,0 % de la teneur totale en huile, ont été trouvés dans l'HE de laurier grec. Quatorze des constituants de l'HE avaient des concentrations supérieures à 1 %. Les principaux constituants de l'HE étaient : 1,8-cinéole (30,8 %), acétate d'α-terpinyle (14,9 %), α-terpinéol (8,0 %), sabinène (7,9 %), terpinène-4-ol (6,0 %), α -pinène (5,3 %), β-pinène (3,6 %), méthyléugénol (3,6 %) et γ-terpinène (3,3 %). Trente-trois constituants, soit 97,8 % de l'huile totale ont été identifiés dans l'HE de laurier géorgien. Onze de ces constituants de l'HE avaient des concentrations supérieures à 1 %. Les principaux dans l'HE de laurier géorgien étaient : 1,8-cinéole (29,2 %), acétate d'α-terpinyle (22,6 %), sabinène (12,2 %), méthyl eugénol (8,1 %), α-pinène (5,5 %), linalol (3,7 %) et β-pinène (3,7 %).

Certaines différences dans la composition chimique des HE de feuilles de laurier dans cette étude et dans certains rapports peuvent être dues à des facteurs environnementaux et génétiques.

Des rapports antérieurs ont montré que les HE de feuilles de laurier produites à partir de différentes régions étaient riches en 1,8-cinéole (5,7–6,3 %), acétate d'α-terpinyle (5,9–25,7 %), linalol (3,7–16,4 %), sabinène(2,3–14,1 %), méthyleugénol (3,1–12,5 %), terpinène-4-ol (3,4–11,1 %), limonène (5,3 %), α-pinène (3,00–7,4 %) et β-pinène (1,6–13,4 **%) [100-105].**

II.6. Usage et propriétés thérapeutiques :

Les feuilles de *Laurusnobilis L.* sont parmi les assaisonnements les plus connus dans tous les pays, elles sont généralement utilisées comme épice valable en culinaire (en potages, ragoûts, sauce, …) et aromatisant en industrie alimentaire. Cette plante a aussi des applications importantes en médecine traditionnelle et représente récemment un sujet de recherche scientifique intéressant **[106].**

La saveur aromatique des feuilles est à l'origine des propriétés apéritives et digestives de laurier, en cas de perte d'appétit et de troubles digestifs, traditionnellement les feuilles de laurier sont employées comme carminatif, expectorant, diurétique, antispasmodique, emménagogue et sudorifique. Utilisé également dans le cas de flatulence, et de bronchites chroniques**[107-110].**Le laurier a une action antiseptique, antivirale et bactériostatique, grâce à ses propriétés antibactériennes, antifongiques, et anti-oxydantes, ainsi, il est un remède efficace pour les plaies, les aphtes et les abcès dentaires **[111-113].**

Dans la médecine traditionnelle iranienne, les feuilles de cette plante ont été employées pour traiter l'épilepsie **[108].**

L'huile essentielle obtenue des feuilles de cette plante a été employée pour le soulagement d'hémorroïdes et des douleurs rhumatismales **[114].**

En outre, l'huile essentielle est employée par l'industrie cosmétique en parfumerie et dans la fabrication des savons. Elle compte parmi les meilleurs moyens d'éloigner les insectes gênants **[91,98].**

Par ailleurs, l'infusion aqueuse obtenue à partir des feuilles de *laurier Noble* a été utilisé pendant de nombreuses années chez les femmes européennes pour soulager les douleurs du placenta. En outre, le laurier favorise l'apparition des règles et agit contre les règles douloureuses **[115].**

II.7. Propriétés pharmacologiques et activités biologiques :

Laurusnobilis L. est une plante médicinale aromatique abondante, bénéficiant de propriétés thérapeutiques qui attribuant à la médecine traditionnelle et la pharmacologie, diverses propriétés anti-inflammatoire et antiseptique grâce à ses composants **[115].**

II.7.1. Activité anti – inflammatoire :

L'extrait méthanolique (80%) des feuilles de laurier séchées, administré par intubation gastrique à des rats à une dose de 100 mg/kg, a entraîné une inhibition de 19% de l'œdème induit. L'acétate d'éthyle et l'extraits d'hexane des feuilles, appliquée extérieurement [inflammation de l'oreille] sur des souris à une dose de 20,0 microlitres /animal, étaient actifs comparativement au tétradécanoyl acétate de phorbol **[116].**

II.7.2. Effet antibactérien :

En général, l'huile essentielle de feuille de laurier de Géorgie a montré une faible activité bactéricide **[117].** Il a également été démontré contre les espèces bactériennes Gram-positives et Gram-négatives **[118].**

II.7.3. Effet antioxydant :

Des recherches faites sur les extraits aqueux et éthanolique ont montré qu'ils présentent une forte activité antioxydant en émulsion d'acide linoléique **[110].**

Aussi dans une autre étude, les extraitsphénoliquesont présenté un pouvoir antioxydant (jusqu'à 75%) dû à l'eugénol et au méthyleugénol. α-terpinol et élémicine étaient également identifié **[119],**les flavonoïdes non polaires, les lactones **[120]**.De plus, les flavonoïdes et leurs dérivés ont été détectés dans des extraits de Laurier comme : O-glycosides, un flavonoïde Cglycoside, catéchine et cinnamtannin B1 **[121].**

II.7.4. Effet antifongique :

Cette activité semble également liée à la teneur du constituant majeur de l'huile essentielle : Le 1,8 cinéol. De cette façon les huiles essentielles à haute teneur en 1,8-cinéol présentant des activités antifongiques plus faibles que les huiles avec de plus petites quantités de cemonoterpène **[122].**

II.7.5. Effet gastro-protectif :

Une seule étude a été réalisée à ce sujet par **[123].** Cinq plantes aromatiques dont *Laurusnobilis L.* usuellement employées pour traiter le mal d'estomac. Une décoction et un extrait méthanolique ont été préparés à partir des fruits du Laurier pour déterminer leurs effets sur un modèle d'ulcère gastrique induit chez le rat. Les expériences pharmacologiques et les techniques histopathologiques ont clairement montré que ces extraits administrés oralement ont significativement protégé l'estomac contre les ulcérations.

II.7.6. Effet de rééquilibrage de la glycémie :

Une étude prouve que l'huile essentielle de *LaurusnobilisL.*à une capacité d'inhiber l'α-glygosidase intestinale (à plus de 90% à la concentration, de 7,5 g/mL par, inhibition compétitive) peut être mise à profil pour réguler la glycémie **[124].**

Les feuilles de *LaurusNobilisL.*ont été rapporté d'avoir un effet antidiabétique et de renforcer en glutathion S-transférase hépatique. L'administration de 200 et 600mg/kg de doses de l'extrait méthanolique des feuilles de *Laurusnobilis L*. produit une diminution significative de la glycémie **[125].**

II.7.7. Autres effets :

L'activité fumigène de certains composés qui se produisent naturellement dans les huiles essentielles des plantes aromatiques dont cinéol, eugénol et linalol, composés principaux de l'huile essentielle de *Laurusnobilis L*, a été évaluée contre espèces d'insectes parasites des produits entreposés (Sitophilusoryzae, RhyzoperthadominicaetTriboliumcastaneum). L'activité insecticide a changé avec l'espèce d'insecte, le composé et le temps d'exposition. Les résultats ont prouvé que ces composés peuvent convenir comme fumigène en raison de leur volatilité élevée, efficacité et leur sureté **[126].**

Deuxième Partie :

Etude Expérimentale



Chapitre III :
Matériels et méthodes

III.1. Introduction :

Notre travail a été réalisé aux endroits suivants :

- Les laboratoires de la faculté de Technologies, Université Yahia farés de Médéa, Algérie ;
- GroupeSaidal de Médéa.

Il a pour objectif la caractérisation de l'huile essentielle du*Laurier Noble*. Pour ce faire, nous avons suit les points suivants :

- Extraction de l'huile essentielle à partir des feuilles de *Laurusnobilis L.* ;
- Analyse physicochimique de l'essence extraite ;
- Analyse microbiologique de l'huile essentielle et de l'extrait brut.

III.2. Matériels et produits utilisés :

III.2.1. Les produits chimiques et appareillages utilisés

Les différents matériels et produits chimiques utilisés sont rassemblés dans les **Tableaux III.1 et III.2.**

Tableau III.1 : Le matériel utilisé.

Matériels	Fournisseurs et caractéristiques
Étuve	MEMMERT
Four à moufle	LINNELEKTROTHERM
Clevenger	JOANCABBORO 3.3
Chauffe ballon	HEATING MENTLES
Ballon	JOANCABBORO 3.3
Réfrigérant	JOANCABBORO 3.3
Refractomètre	SHANGHAI
Spectrophotomètre UV-visible	SHIMADZU, WATERS 2489
Balance électronique	DENVER instrument (max=1000g, d=0.1g)
Burette	SCHNELLERAUSFAUF (max=100ml)
Micro pipette	JOANLAB (max=1000µl)

Centrifugeuse	MIKRO 200
Séparations module	WATERS e2695

Tableau III.2 : Les produits utilisés**.**

Nom	Formule Générale	M (g/mol)	Pureté (%)
Sulfate de sodium anhydre	Na_2SO_4	142,04	99.99
Potasse alcoolique	KOH	56,1056	90
Éthanol	C_2H_6O	46,07	96
Phénophtaléine	$C_{20}H_{14}O_4$	318,32	98.5
Acide chlorhydrique	HCl	36,458	36.46
Hydroxyde de sodium	NaOH	39,997	99
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	394.32	1
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	34,0147	35
Phosphate de potassium monobasique	KH_2PO_4	136,086	85
Chlorure de calcium	$CaCl_2$	110,98	96
Acide trichloracétique	$C_2HCl_3O_2$	163,38	99
Permanganate de potassium	$KMnO_4$	158,034	99
Acide sulfurique	H_2SO_4	98,079	95
Agar	$(C_{12}H_{18}O_9)_x$	306.265g/mol	/
Amoxicilline	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$	365.404g/mol	99
Amidon	$(C_6H_{10}O_5)_n$	/	97

Caséine	/	/	/
Huile d'olive	/	/	/
Extrait de viande	/	/	/
Peptone	/	/	/

III.2.2. Matières biologiques :

Le matériel biologique (bactérie, levure et champignon) utilisé pour la mise en évidence du pouvoir antimicrobien des différents extraits de Laurier Noble ont été fournie par le groupe Saidal de Médéa. Les références des différentes souches avec lesquelles l'activité antimicrobienne ont été évaluées sont représentées dans le tableau ci-contre :

Tableau III.3 : Les souches.

	Espèce	Coloration	Code
Bactéries	*Staphylococcus Epidermidis*	**Gram +**	ATCC 12228
	Staphylococcus aureus	**Gram +**	ATCC 6538
	Bacillus subtilis	**Gram +**	ATCC 6633
	Escherichia Coli	**Gram -**	ATCC 8739
	Pseudomonas Aeruginosa	**Gram -**	ATCC 9027
	Salmonella typhimurium	**Gram -**	ATCC 14028
Champignons	*Aspergillus Brasiliensis*	**/**	ATCC 16404
Levures	*Candidat Albicans*	**/**	ATCC 10231
	Saccharomyces Cerivisiae	**/**	ATCC 9763

III.2.3. Matière végétale :

- **Site d'échantillonnage :**

Nos études ont été réalisées sur des feuilles de *Laurusnobilis L*, récoltées d'un jardin situé dans la région d'**EL-Kouala** de **Médéa** en **février 2023**. La récolte des plantes est effectuée avec beaucoup de soin afin de ne pas détruire les éléments organiques et minérauxprésents.

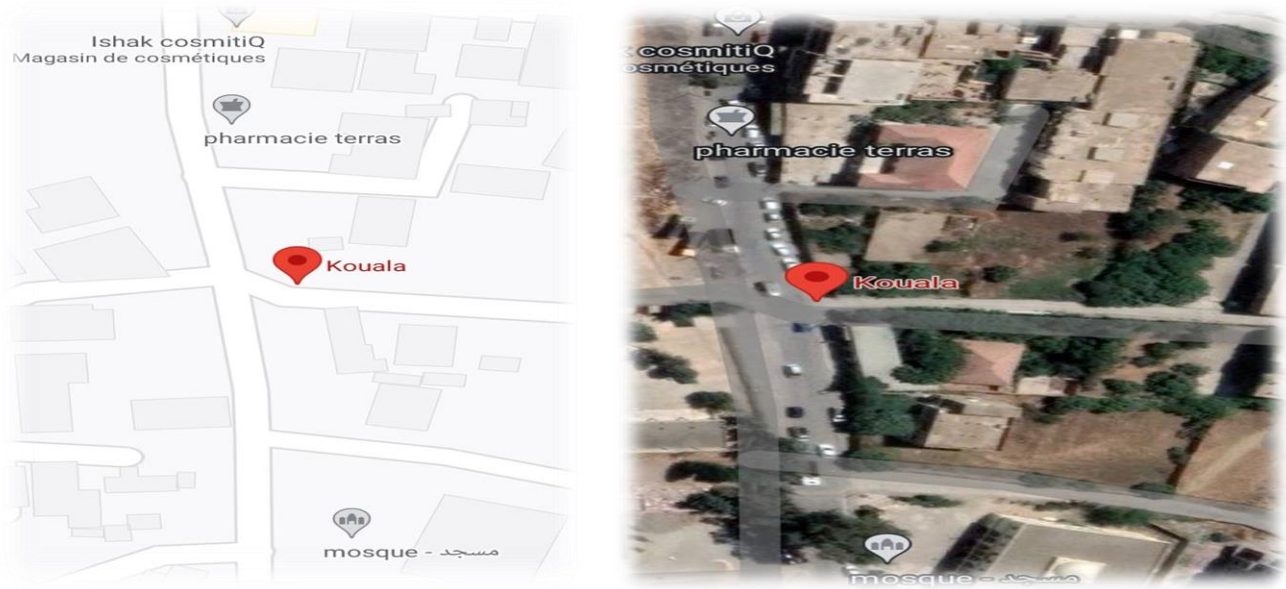


Figure III.1 : Localisation par satellite du lieu de la récolte (Google Maps).

L'identification de la plante a été réalisée au niveau de la Direction des Services Agricoles (DSA) de la Wilaya de Médéa (Algérie), Département des forêts**.**La plante fait partie de la variété du Laurier Noble (*LaurusNobilis L).*

Variété	**Partie utilisé**	**Région et date de récolte**
Laurier Noble	Les feuilles	EL-Kouala Médéa Février 2023

III.3. Caractérisations physiques des feuilles de Laurier Noble.

III.3.1. Taux d'humidité :

Afin de déterminer la teneur en eau (taux d'humidité) du Laurier Noble (*lauriernobilis L*), une quantité de feuilles fraîches de masse m_f a été séchée dans une étuve à 105 °C pendant 24 heures (jusqu'à la fixation de la masse). La masse des feuilles séchées m_s a été mesuré à l'aide d'une balance de précision **[132].** La teneur en eau est donnée par la formule ci-dessous :

$$\boldsymbol{T_{eau}}\,(\%) = \frac{\boldsymbol{m_f - m_s}}{\boldsymbol{m_f}} * \mathbf{100} \qquad \textbf{III.1}$$

Avec :

$\boldsymbol{T_{eau}}$ **:** Taux d'humidité (%) ;

$\boldsymbol{m_f}$**:** Masse végétale fraîche (g) ;

$\boldsymbol{m_s}$ **:** Masse végétale sèche (g).

III.3.2. Taux de cendres :

Une masse de laurier a été incinéré dans un four à moufle à 600°C pendant 4h, puis refroidie et stockée dans un dessiccateur. Le taux de cendre T_C est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante **[133]**:

$$\boldsymbol{T_C}(\%) = \frac{\boldsymbol{P_2}}{\boldsymbol{P_1}} * \mathbf{100} \qquad \textbf{III.2}$$

Avec :

$\mathbf{T_C}$ **:** Taux de cendre (%) ;

$\boldsymbol{P_1}$: Masse initiale de laurier en (g) ;

$\boldsymbol{P_2}$: Masse de laurier après incinération en (g).

III.4. Méthodes utilisées :

III.4.1. Préparation du matériel végétal :

❖ **Séchage :**

Après la récolte, les feuilles de Laurier Noble (*Laurusnobilis L*), sont nettoyées et rincées à l'eau courante pour éliminer toutes les poussières et matières étrangères telles que le sable, la boue, etc. elles sont ensuite séchées pendant 7 jours dans un endroit sec à l'abri de la lumière afin de préserver au maximuml'intégrité moléculaire.



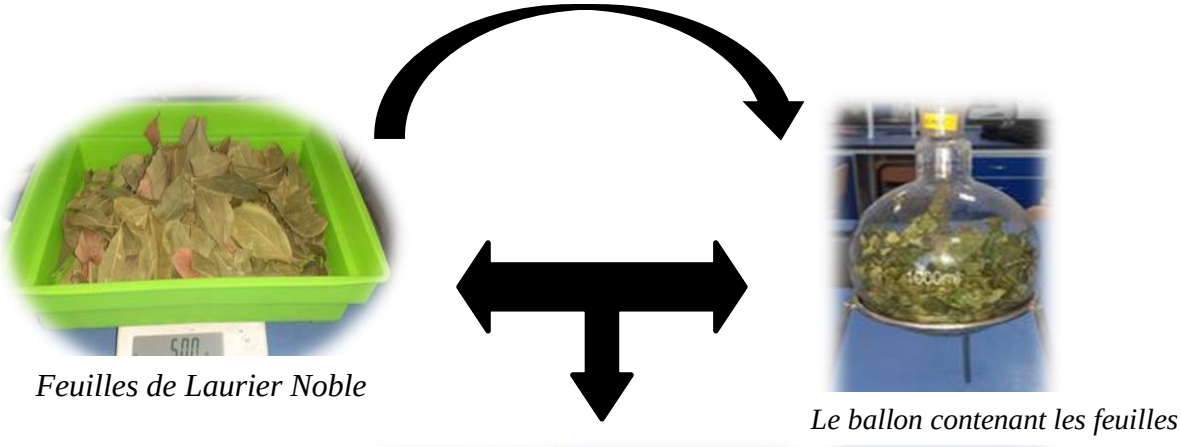
Figure III.2 : Feuilles de laurier séchées

III.4.2. Procédé d'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *Laurier Noble* par Clevenger :

Lamatière végétale séchée a été hydro-distillée à l'aide d'un appareil d'extraction de type Clevenger. Latechnologie d'extraction estbaséesur lacapacitédela vapeur d'eau àdélivrer des huiles essentielles. L'opération consiste à mettre 50 grammes de matière végétale dans un ballon en verre de 1000 mL, puis ajouter 500 mL d'eau distillée sauf qu'il ne faut pasremplir le ballon après immersion de la matière végétale pourévitertoutdébordement. Ensuite, porterlemélangeàébullitionà l'aide d'un chauffe-ballon. Les vapeurs chargées d'huiles essentielles voyagent àtraversdes tuyauxverticaux puis dansdes serpentins derefroidissementoù se produitdela condensation. Les gouttelettes ainsiproduites s'accumulent dansdestubesprémplis d'eau distillée.

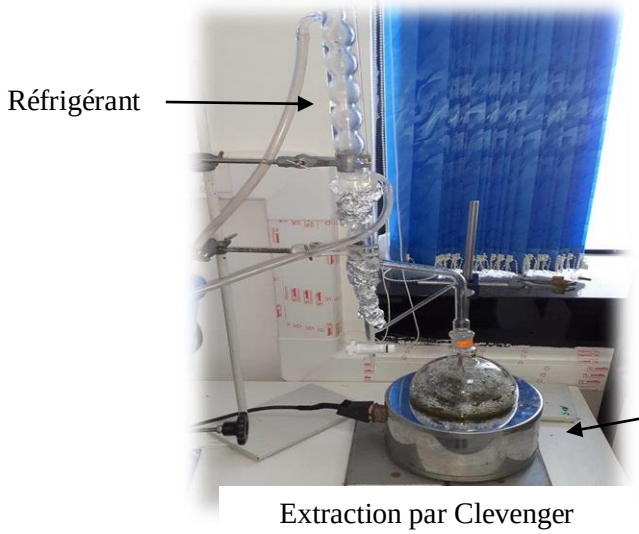
L'huileessentielle, moins denses que l'eau, flotte àlasurfacede celle-ci. L'huile ainsiobtenueest récupérée puis traitée avec lesulfate desodium anhydre pouréliminerlespetitesquantités d'humidité quipeuventresterdans l'huile etenfinla stocker àbasse température (4 – 5°C) dansdes flacons opaques hermétiquement fermés pour éviter

toute dégradation. Une huile altérée perd ses caractéristiques. L'opération d'extraction dure trois heures après ébullition **[127].**



Feuilles de Laurier Noble

Le ballon contenant les feuilles



Extraction par Clevenger

Figure III.3: Photo du montage d'extraction de l'huile essentielle du Laurier Noble.

III.4.3. Détermination du rendement :

Lerendement en huile essentielle **(RHE)** est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après l'extraction (m) et la masse de la matière végétale utilisée (m_0). Le rendement est exprimé en pourcentage, et il est calculé par la formule suivante **[128] :**

$$\boldsymbol{RHE}(\%) = \frac{\boldsymbol{m}}{\boldsymbol{m_0}} * \mathbf{100} \quad \textbf{III.3}$$

III.4.4. Les méthodes de caractérisation d'une huile essentielle :

II.4.4.1. Les critères organoleptiques :

Les huiles essentielles ont des propriétés organoleptiques :

- **La couleur :** généralement incolore ou jaune pâle à l'exception de quelques huiles essentielles telles que l'huile de l'Achillée et l'huile de la Matricaire. Ces dernières se caractérisent par une coloration bleue à bleue verdâtre, due à la présence de l'azulène et du cham azulène **[129] ;**

- **L'odeur :** Les huiles essentielles sont aisément remarquables par leur odeur qui peut être très agréable (Lavande, Romarin…) ou repoussante (Barbote dite « Fétide ») **[130] ;**

- **L'aspect :** Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool **[131].**

III.4.4.2. Caractérisations physico-chimiques d'une huile essentielle :

- **L'indice de réfraction :**

La réfraction est le changement de direction subi par un rayon lumineux lorsqu'il passe d'un milieu optique donné (l'air) à un autre milieu (HE). L'indice de réfraction d'un milieu est le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide et dans la substance à analyser, il n'a donc pas d'unité**[134].**

Mode opératoire

- MettreenplaceunréfractomètreSHANGHAIpourmesurerl'indicederéfractiondel'eaudistillée. Il devraitêtrede1.333à 20 °C ;

- Ouvrez le prisme secondaire et placez 2 à 3 gouttes de l'échantillon liquide sur la partie centrale du prisme primaire ;

- Fermez en suites soigneusement le prisme secondaire ;

- ❖ L'échantillon s'étale comme un film mince entre le prisme principal et le sous-prisme ;
- ❖ Attendez que la température se stabilise avant de mesurer **[134].**

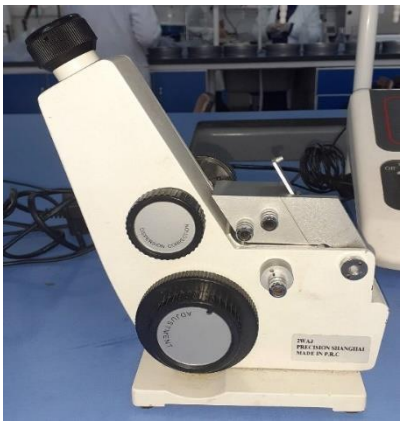


Figure III.4: Réfractomètre

Selon la norme AFNOR **(AFNOR : NF T 75 – 112. 2000)[135],** l'indice de réfraction est calculé par la relation suivante :

$$\eta D_{20} = \eta D_T + 0.00045\,(T - 20) \qquad \textbf{III.4}$$

Avec :

ηD_{20}: Indice de réfraction à 20 °C ;

ηD_T : Indice de réfraction à la température de mesure ;

T : Température de mesure (°C)**.**

- ❖ **Densité relative :**

La densité relative est le rapport de la masse d'un volume de liquide par la masse du même volume d'eau. La densité n'a pas d'unité, elle varie avec la température **[136].**

Mode opératoire

A une température de 20°C, on pèse à l'aide d'un pycnomètre, des volumes égaux d'HE et d'eau distillée : on pèse successivement le flacon vide, puis le flacon remplie d'eau distillée. Après essuyage, on le remplit avec l'HE et on note leurs poids exacts **[15].**

La densité de l'huile essentielle est calculée par la formule **(III.5) :**

$$d = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \qquad \text{III.5}$$

m_0: Masse du pycnomètre vide (g).

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

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

❖ **Potentiel d'hydrogène pH :**

Le potentiel hydrogène pH mesure l'activité chimique des ions hydrogènes H^+ en solution. Il traduit ainsi la balance entre acides et base sur une échelle de 0 à 14**[14].**

Mode opératoire

La mesure du Ph est effectuée à l'aide d'un papier de pH. Quelques gouttes d'HE sur un côté de la bande et comparer l'apparence de la couleur à un nuancier audossuffisent.

❖ **Indice d'acide :**

L'indice d'acide I_A représente le nombre en milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle **[136],** selon la réaction :

$$\text{RCOOH + KOH} \longrightarrow \text{RCOOK+ } H_2O$$

Mode opératoire

❖ On pèse 280 µL de corps gras, et on l'introduit dans un Erlen Meyer en verre ;

❖ On ajoute 1.25mL d'éthanol à 95% et 5 gouttes de phénolphtaléine (PP) ;

❖ On neutralise en ajoutant grâce à une burette la solution éthanolique de KOH (0.1 mol/L) jusqu'à l'obtention d'une couleur rose **[137].**

Le calcul de l'I_A est donné par la formule ci-contre :

$$\mathbf{I_A = \frac{N * V * 56.11}{M}} \qquad \textbf{III.6}$$

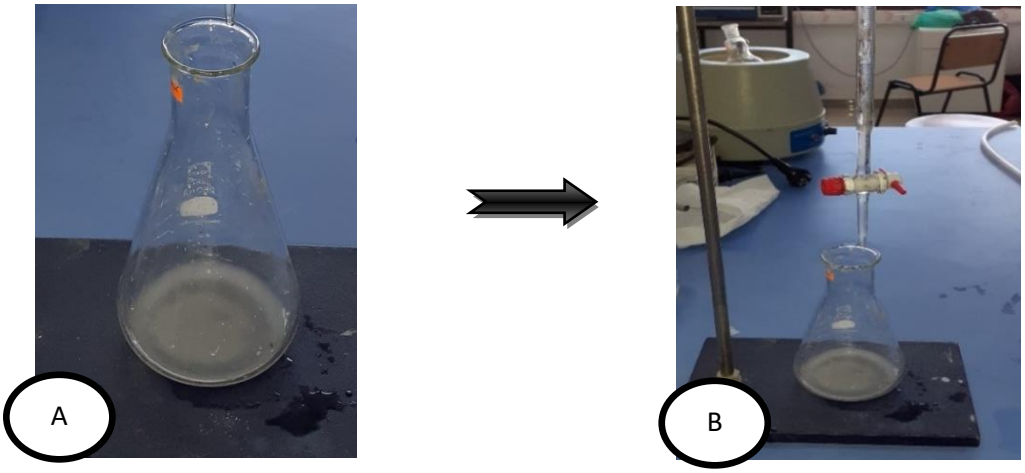
Avec :

I_A : Indice d'acide ;

N : Normalité de KOH ;

V : Volume de la solution de KOH (mL) ;

56,11 : Masse molaire du KOH



Le milieu réactionnel Le titrage

Figure III.5 : Protocole de l'indice d'acide.

❖ **Indice de saponification :**

L'indice de saponification I_S correspond à la masse d'hydroxyde de potassium KOH (exprimée en milligrammes) nécessaire pour saponifier les esters et neutraliser les acides non estérifiés contenus dans un gramme de l'huile essentielle **[138].**

Mode opératoire

❖ Peser 280 µL de corps gras dans un ballon ;

❖ Ajouter 6.25mL de potasse alcoolique de concentration 0.5 mol/L ;

❖ Mettre au bain marie bouillant pendant 30 min ;

❖ Ajouter 0.25 mL de solution de phénolphtaléine ;

❖ Doser l'excès de potasse par l'acide chlorhydrique de concentration 0.5 mol/L en agitant constamment jusqu'au virage à l'incolore de la phénolphtaléine ;

❖ Effectuer dans les mêmes conditions un essai à blanc **[137].**

Le calcul de l'I_S est donné par la formule suivante :

$$I_S = \left[\frac{(V_0 - V_1) * C_{HCl} * M_{KOH}}{m}\right] \qquad \textbf{III.7}$$

Avec :

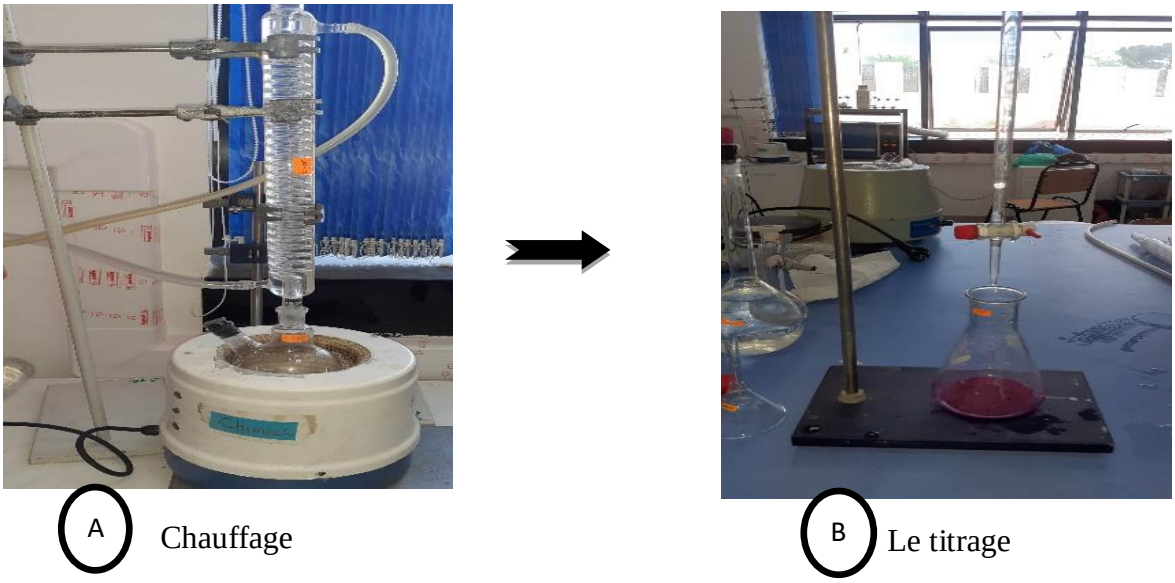
V_0 : Volume versé au témoin en mL ;

V_1 : Volume de l'essai en mL ;

m : Masse de l'huile exactement pesée en g ;

$\mathbf{C_{HCl}}$**:** Concentration de la solution d'acide chlorhydrique en mol/L ;

$\mathbf{M_{KOH}}$: Masse molaire du KOH en g/mol.



A Chauffage

B Le titrage

Figure III.6: Protocole d'indice de saponification.

❖ **Indice d'ester :**

Il correspond au nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium KOH nécessaire pour saponifier les esters contenus dans un gramme d'HE **[136],** selon la réaction :

$$RCOOR' + KOH \rightarrow RCOOK + R'OH$$

Le calcul de l'I_E est donné par la formule III.8:

$$I_E = I_S - I_A \qquad \textbf{III.8}$$

❖ **Activité anti-oxydante :**

Les antioxydants sont des substances permettant de prévenir ou de retarder l'oxydation catalytique**.** Par conséquent, les antioxydants aident à contrôler les niveaux d'espèces réactives pour minimiser les dommages oxydatifs**.** Même si les antioxydants de synthèse sont efficaces

et que leurs doses autorisées sont largement limitées pour éviter tout problème de toxicité, on a assisté depuis les années 1980 à un engouement pour les produits naturels, et au développement d'extraits végétaux à usage antioxydant, qui auraient des propriétés biologiques pouvant contribuer à réduire le risque de certaines pathologies.

Pour évaluer l'activité anti-oxydante des extraits naturels in vitro, différentes méthodes ont été utilisées. Ces procédés font intervenir des mélanges d'espèces oxydantes telles que les radicaux libres ou les complexes métalliques oxydés, et des échantillons contenant l'antioxydant qui inhibe la production de radicaux libres**[139].**

Méthode de DPPH

Cette méthode utilise le 2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH·), un radical libre, coloré, stable, facile à doser et capable d'arracher les atomes hydrogène labiles des groupements OH les plus réactifs. Il présente un maximum d'absorption à 517 nm. En présence d'un antioxydant, le DPPH* est piégé et donc réduit en DPPH. Cette réduction se traduit par le passage de la couleur violette de la solution à la couleur jaune. Ceci conduit à la diminution de l'absorbance du radical libre à 517nm. La structure ainsi que la réaction impliquant le DPPH se résument dans la **Figure III.7[139].**

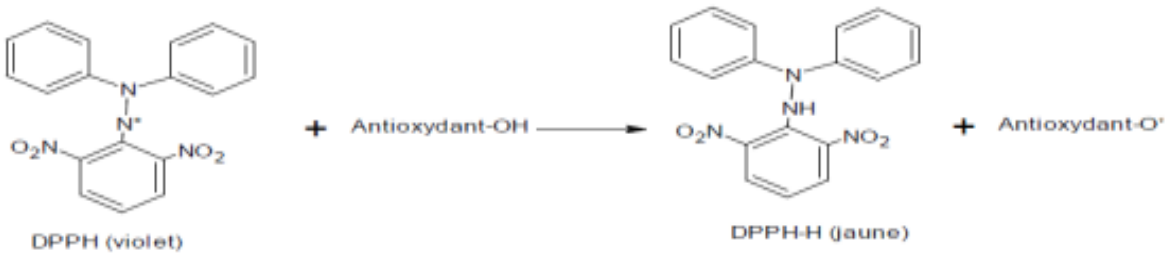


Figure III.7: Réaction d'une molécule anti-oxydante avec le radical DPPH **[140].**

Mode opératoire

❖ **Préparation de DPPH.**

Dissoudre 39.4 mg de DPPH dans 100mL de méthanol absolu pour obtenir une solution mère de DPPH de concentration 1mM **(voir figure III.8).** La solution doit être conservée à une température de 4°C et à l'abri de la lumière pour éviter sa dégradation.



Figure III.8 : Préparation de la solution de DPPH.

❖ **Préparation du blanc :**

Mélanger 3mL de méthanol absolu avec 1mLde solution DPPH.

❖ **Préparation des extraits :**

Introduire 3 mL d'huile essentielle, d'hydrolat et d'extrait brut à différentes concentrations (1,2,3,4,5,6,7,8,9 µL/mL) diluées dans le méthanol, et 1mL de la solution DPPH• préparée à 1mM dans le méthanol dans les tubes à essai, ensuite mettre les solutions en l'obscurité pendant 30min **(voir figure III.9 et III.10).**



Figure III.9 : Préparation des dilutions de l'huile essentielle du *Laurier Noble.*

Le taux du DPPH est exprimé en pourcentage suivant la formule suivante **[103] :**

$$\mathbf{I}(\%) = \frac{\mathbf{A_0 - A_e}}{\mathbf{A_0}} * \mathbf{100} \qquad \textbf{III.11}$$

Avec :

A_0 : Absorbance du blanc ;

A_e : Absorbance de l'échantillon.

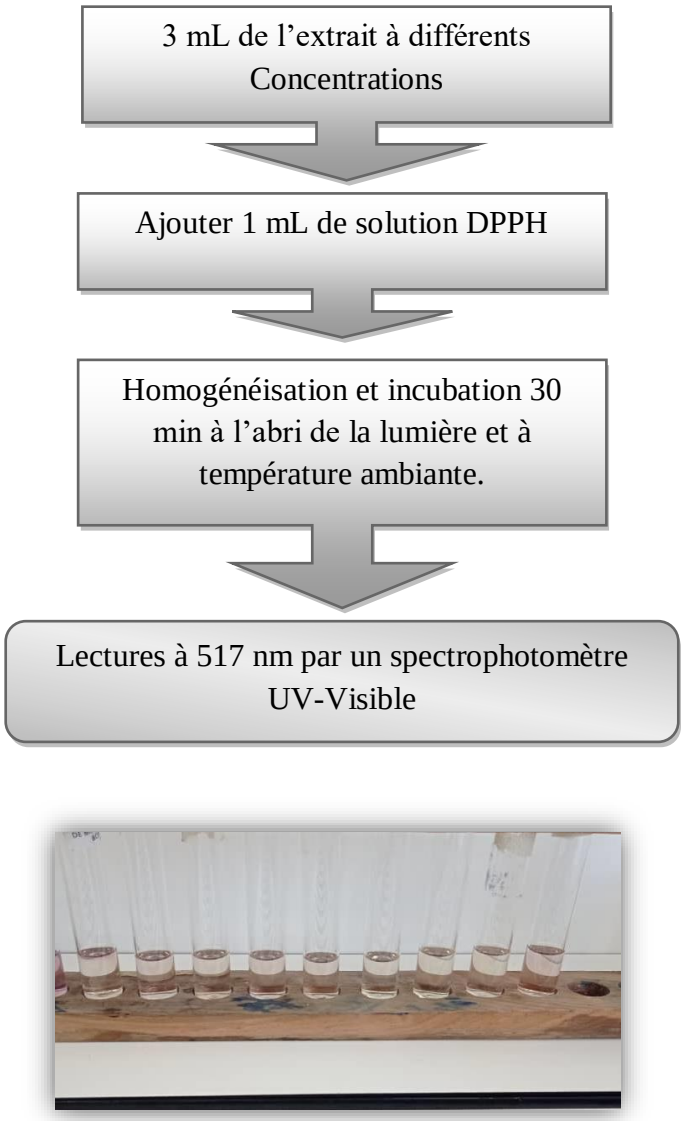


Figure III.10: Schéma représentatif du protocole expérimental de l'activité antioxydant

❖ **Activité enzymatique :**

Les activités enzymatiques recherchées et caractérisées incluent les activités : lipasique, protéolytique et catalasique. Cette caractérisation enzymatique a été effectuée en utilisant des extraits bruts obtenus à partir du broyage des feuilles de Laurier Noble homogénéiser dans un tampon phosphate (0.5 M, pH = 6). Le mélange obtenu subie une centrifugation à 4 °C pendant 10 min à 5000 rpm. Le surnageant obtenu est conservé dans des flacons opaques à 4 °C pour des études ultérieures (**figure III.11**).



Figure III.11 : L'extrait brut.

Recherche de l'activité lipasique

Dans cette étude la recherche de l'activité lipasique est effectuée par quantification des acides gras libérés sous l'action des lipases (présentent au niveau des feuilles de Laurier Noble) sur l'huile d'olive, en se basant sur la méthode de titration Acide (les acides gras) /Base (NaOH) **[141].**

Les lipases catalysent la réaction suivante :

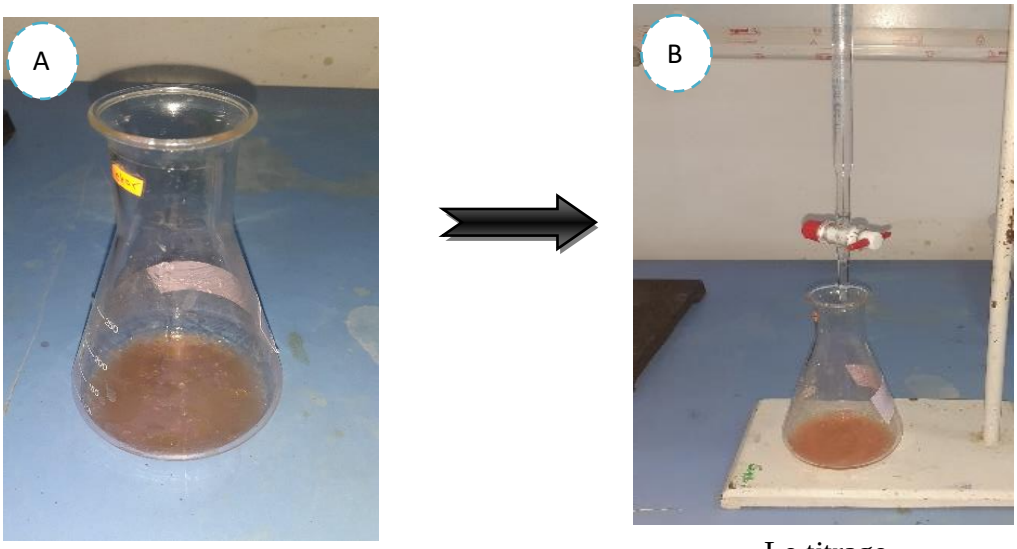
$$Triglycéride + H_2O \xrightarrow{Lipase} Diglycéride + acide\ gras$$

Le milieu réactionnel est constitué de 3 mL huile d'olive, 2,5 mL d'eau distillée, 1mL de tampon phosphate à 0,2 M et pH 7,0 et 1mL de la solution de l'extrait brut. Le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 30 min. Après incubation, 3mL d'éthanol à 95 % (v/v) sont ajoutés pour stopper la réaction. La quantité des acides gras libérés sous l'action des lipases est déterminée par titration avec du NaOH à 200 mM, jusqu'au virage de l'indicateur de pH, le volume du NaOH alors ajouté va servir à quantifier les acides présents dans le milieu réactionnel **[141].**

Dans cette expérience le NaOH va servir à neutraliser les acides gras (observée par virage de couleur). La phénolphtaléine est utilisée comme indicateur de virage de pH **(Figure III.12)[142].**

Les mêmes conditions sont réalisées pour le blanc, sauf que l'enzyme estajoutée après que la réaction soit stoppée. La titration est effectuée (comme décris précédemment), jusqu'au

virage de l'indicateur de pH. Le volume du NaOH alors ajouté va servir à quantifier les acides présents dans le milieu réactionnel.



Le milieu réactionnel

Le titrage

Figure III.12: Protocole de l'activité lipasique.

L'activité lipasique est calculée par la formule ci-dessous **[141] :**

$$\boldsymbol{Activité\ lipasique}(\mu\boldsymbol{mol/min/mL\ d'extrait}) = \frac{(V_2 - V_1) * 0.02 * 10^6}{30 * V_{enz}} \quad \textbf{III.9}$$

Avec

$\boldsymbol{V_2}$: Volume versé au témoin en L.

$\boldsymbol{V_1}$: Volume de l'essai en L.

$\boldsymbol{V_{enz}}$: Volume de l'extrait brut mL.

Recherche de l'activité protéolytique

La plus connue est l'hydrolyse enzymatique de la caséine permettant la libération d'acides aminés aromatiques détectés sous UV à 280 nm. L'activité est évaluée comme étant la quantité d'équivalent Tyrosine libérée par unité de temps. L'activité protéolytique a été mesurée dans l'extrait brut, en déterminant la concentration des peptides solubles dans l'acide trichloro-acétique (TCA) à la concentration finale de 6,6%. L'activité protéolytique est estimée selon la méthode de Kembhavi.Elle est évaluée selon le protocole suivant **[143]** :

- Mélanger 0,5 mL d'une solution de caséine (1% p/v) dans un tampon désiré en présence de 2 mM $CaCl_2$ avec 0,5 mL de l'extrait brut préalablement diluée ;
- Incuber, la réaction enzymatique, à une température appropriée pendant 15 min ;
- Arrêter la réaction par addition de 0,5 mL de TCA à 6.6% (p/v) (le TCA précipite la caséine non hydrolysée) ;
- Incuber à température ambiante pendant 15 min ;
- Centrifuger le milieu réactionnel à 15000 rpm pendant 15 min ;
- Mesurer l'absorbance à 280 nm (correspond au maximum d'absorbance des Aa).

L'activité protéasique (U/mL) est déduite à partir de l'équation ci-dessous **[143]** :

$$\textbf{Activité protéolytique } (U/mL) = \frac{DO*D*d}{t*0.0055} \quad \textbf{III.10}$$

Avec :

DO : Densité optique ;
D : Dilution de l'enzyme.
d : Dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel.
t : Temps de la réaction en minute.

Recherche de l'activité catalasique

La catalase est une enzyme qui catalyse la réaction de la dégradation du peroxyde d'Hydrogène en eau et en oxygène **[144],** Pour mesurer cette activité nous allons mettre l'extrait brut en contact avec de l'eau oxygénée pendant une durée déterminée. Nous évaluerons alors l'activité enzymatique de la catalase en déterminant la quantité restante d'eau oxygénée. Pour cela, nous effectuerons un dosage au permanganate de potassium en milieu acide suivant les réactions suivantes :

$$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^-$$

$$Mno_4^- + 8H^+ + 5e^- \rightarrow Mn^{2+} + 4H_20$$

L'ion permanganate ainsi obtenu (Mn^{2+}) est de couleur rose. Il permet donc de déterminer l'équilibre au moment du dosage. Cette coloration n'est pas stable car il se suit une autreréaction :

$$2Mno_4^- + 3Mn_2^+ + 2H_20 \quad \rightarrow \quad 5Mno_2 + 4H^+$$

Mais toutefois la coloration reste une période de 15 secondes au moment de l'équilibre.

Pour la mesure de l'activité de la catalase nous allons à température ambiante, mettre 1mL d'extrait brut dans 10mL d'H_2O_2 à 0.01N (solution qui est tamponnée) pendant 5minutes. Nous arrêterons la réaction en introduisant 25mL de H_2SO_4 à 2% puis nous effectuerons le dosage pour mesurer l'H_2O_2 restant. Nous allons effectuer un témoin qui permet d'obtenir le volume de permanganate sans réaction enzymatique pour cela nous allons mesurer l'H_2O_2 dans une solution comprenant 10 mL d'eau oxygénée à 0.01N et 25mL d'H_2SO_4 à 2%**(Figure III.13)[144].**

L'activité catalasique (µ Kat/g) est déduite à partir de l'équation ci-dessous **[144]** :

$$\textbf{\textit{Activité catalisique}}\left(\frac{\mu Kat}{g}\right) = \frac{n\times(V_t - V_X)\times V_E}{t\times P_E\times M_F} \qquad \textbf{III.11}$$

Avec :

n : Nombre de moles de H_2O_2 oxydées par 1mL de $KMnO_4$

$\boldsymbol{V_t}$: Volume moyen de permanganate de potassium pour le dosage de témoins (en mL).

$\boldsymbol{V_X}$: Volume moyen de permanganate de potassium pour le dosage des extraits bruts (en mL).

$\boldsymbol{V_E}$: Volume de l'extrait brut.

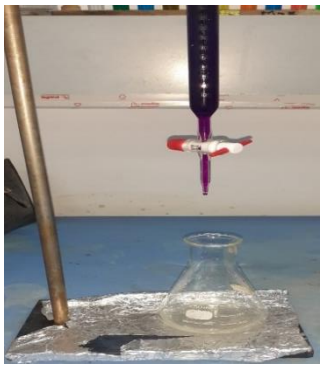
$\boldsymbol{P_E}$: Volume d'extrait brut qui est introduit dans la réaction mesurée.

t : Temps de réaction.

$\boldsymbol{M_F}$ **:** Masse de matière fraiche en grammes.



Le milieu réactionnel



Le titrage

Figure III.13: Protocole de l'activité catalasique.

III.4.4.3. Caractérisations microbiologiques :

❖ **Activité antimicrobienne :**

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et l'extrait brutde *Laurusnobilis L.* nousavons utilisé la méthode de diffusion en milieu solide.

La méthode de diffusion sur gélose solide ou l'aromatogramme est une méthode qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles et de l'extrait brutpar la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque imprégné des solutions à explorer **[145]**. Nous avons utilisé la méthode d'aromatogramme pour mettre en évidence la sensibilité ou la résistance du microorganisme vis-à-vis de l'HE testée. Cette méthode regroupe les étapes suivantes :

❖ ***Préparation de l'inoculum :***

Une colonie bien isolée issue d'une culture de 18-24 heures a été introduite dans 5mL d'eau physiologique contenue dans un tube à essai. La densité optique obtenue doit être comprise entre 0,08 et 0,1 ce qui correspond à une concentration de 107 à 108 UFC/mL selon Mc Ferland. La standardisation se fait avec spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm **[146].**

❖ ***Aromatogramme :***

Cette méthode est préconisée par Kheyar et al. et Mouaset al., elle consiste à tester la sensibilité des souches bactériennes par la diffusion de l'extrait sur le milieu solide dans une boite de Pétri **[145,147].**

Dans des boîtes de Pétri, le milieu de culture gélosé (Mueller Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures et les champignons) en surfusion a été coulé aseptiquement à raison de 20mL par boite. Après sa solidification, un écouvillon stérile a été imbibé dans la suspension bactérienne et étalé à la surface de la gélose à trois reprises, en tournant la boite à environ 60° après chaque application dans le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum. On dépose, à l'aide d'une pince stérile, sur la surface des géloses des disques stériles de 6mm de papier Whatman n°2 imprégnés de 50 µL de l'HE. Et on dépose des disques d'antibiotiques comme témoins positifs. Et des disques imprégnés d'eau physiologique comme témoins négatifs. On incube à température ambiante pendant 20 min, ensuite dans une étuve à 37 °C pendant 24h**[145,147] (voir figure III.14 etIII.15).**

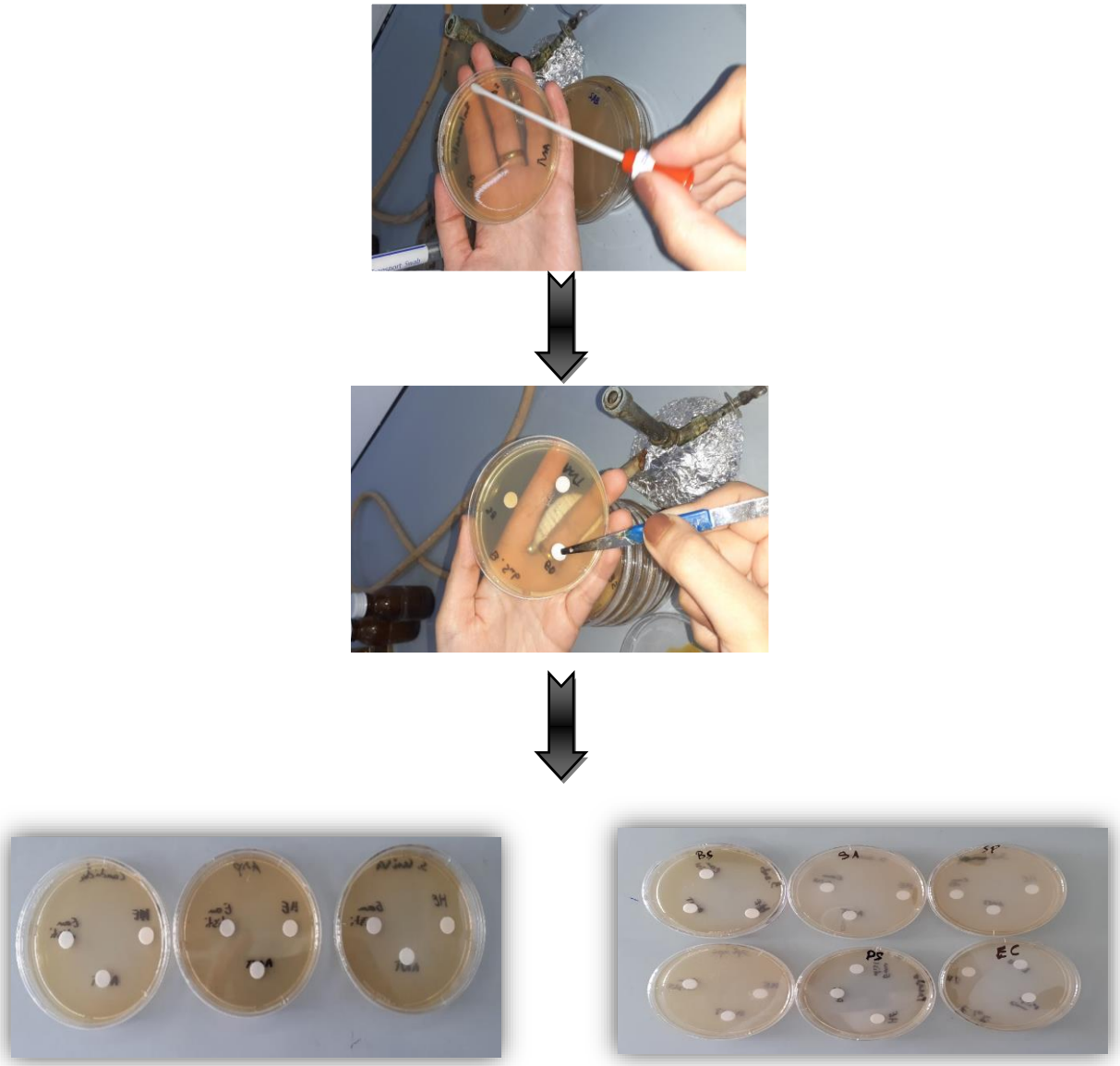


Figure III.14 : Evaluation de l'activité antibactérienne d'HE de Laurier Noble L sur les bactéries, les champignons et les levures avant l'incubation.

❖ ***Lecture***

A l'aide d'un pied à coulisse, on mesure les diamètres des zones d'inhibition autour desdisques imprégnés d'HE et d'extrait brut pour toutes les souches testées et le résultat sera exprimé en mm.

❖ ***Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI :***

Elle consiste à déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF) en utilisant la technique de dilution en milieu solide.

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en extrait pour laquelle, aucune croissance visible à l'œil nu n'est observée **[148]**. Cette technique consiste à disperser l'HE et les extraits bruts à des concentrations variables dans le milieu gélosé avant sa solidification, donc une gamme de concentrations de l'huile essentielle diluée dans le milieu MH est obtenue à raison de 20mLdans chaque boite de pétri (voir tableau III.4 et figure III.15). Après solidification du milieu, l'ensemencement aété exécuté par des spots à l'aide d'une micropipette. L'ensemble a été incubé à 37°C pendant 24h **[149]**. L'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

Tableau III.4 : Différentes concentration d'HE dans la gélose.

Volume de l'HE mL	1	0.5	0.25	0.125
Volume de la gélose en mL	19	19.5	19.75	19.875

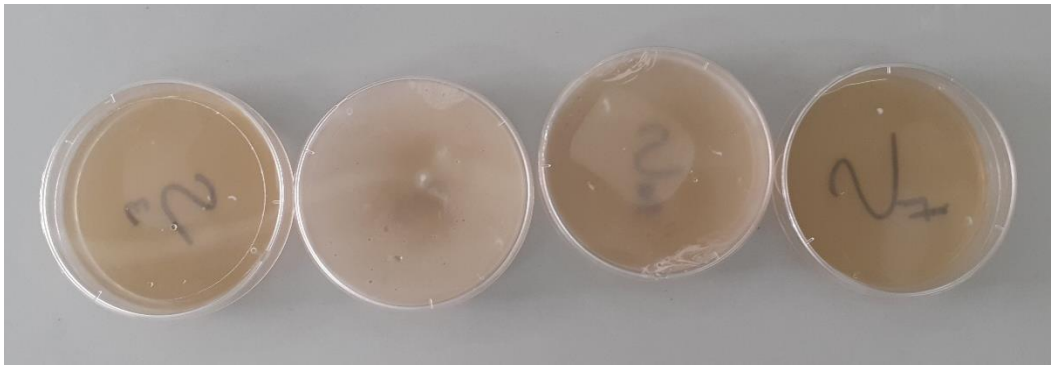


Figure III.15 : Détermination de la CMI sur *Staphylococcus Epidermidis.*

III.4.4.4. Identification de la présence des polyphénols et les Flavonoïdes par HPLC :

La chromatographie est un procédé de séparation des constituants d'un mélange. Elle permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification, Elle est devenue une méthode analytique de tout premier plan pour identifier et quantifier les composés d'une phase liquide ou gazeuse homogène **[150].**

❖ **Principe**

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté est donc soumis

à une force de rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme **[150].**

❖ **Mode opératoire**

La détermination qualitative et quantitative des acides phénoliques et les flavonoïdesest réalisée par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) en utilisant une colonne standard C8 (25 cm x 4.6mm, 5µm) à 25°C.La composition de la phase mobile et le programme d'élution est similaire à celui proposé par Marchev et al. Ainsi que Ivanov et al. **[151,152].**

Détermination des acides phénoliques

Pour la détermination des acides phénoliques, la phase mobile contient deux solvants :

❖ Solvant (A) : est composé de l'acide acétique 2% (v/v) ;

❖ Solvant (B) : est composé de 0.5% (v/v) acide acétique : acétonitrile (1 :1) (v/v).

Le programme d'élution de la phase mobile est le suivant :

❖ 1-30min : 95% de solvant A + 5%de solvant B, le débit est de 0.8mL/min ;

❖ 30-45min : 65% de solvant A+ 35% de solvant B, le débit est de 0.4mL/min ;

❖ 45-50 min : 30% de solvant A+ 70% de solvant B, le débit est de 0.4mL/min ;

❖ 50-60 min : 20% de solvant A+ 80% de solvant B, le débit est de 1.2mL/min ;

❖ 60-65 min : 100% solvant B, débit de 1.2mL/min ;

❖ 65-70min : 95% solvant A+ 5% solvant B, débit 0.8 mL/min.

La longueur d'onde pour la détection des acides phénoliques est de 280nm.

Détermination des flavonoïdes

Pour la détermination des flavonoïdes, la phase mobile contient deux solvants :

- Solvant (A) : est composé de l'acide acétique 2% (v/v) ;
- Solvant (B) : est composé de méthanol.

Le programme d'élution de la phase mobile est le suivant :

- 1-10min : 70% de solvant A + 30%de solvant B, le débit est de 1mL/min ;
- 10-16min : 50% de solvant A+ 50% de solvant B, le débit est de 1mL/min ;
- 16-30 min : 48% de solvant A+ 52% de solvant B, le débit est de 0.8mL/min ;
- 30-35 min : 20% de solvant A+ 80% de solvant B, le débit est de 0.8mL/min ;
- 35-40 min : 70% solvant A+ 30% solvant B, débit de 1mL/min.

La longueur d'onde de détection des flavonoïdes est de 380nm.

Résultats et Discussions

« Ce que voient les yeux n'est pas le remède ; lorsque la distillation aura transformé le végétal, alors le remède deviendra manifeste »

Paracelse (1493 – 1541)

IV.1. Introduction :

Les feuilles de *Laurier Noble* sont caractérisées pardes propriétés physicochimiques et enzymatiques. Dans cette étude, les feuilles ont été collectées de la ville de Médéa précisément de la région d'El Kouala.

Pour cela, nous présentons dans ce chapitre, le procédé d'extraction de l'huile essentielle ainsi que les résultats obtenus après sa caractérisation. En plus, une étude comparative caractéristique de l'activité anti-oxydante et antibactérienne a été réalisée sur : l'huile essentielle, l'hydrolat et brut.

IV.2. La zone de récolte de la matière végétale :

La wilaya de Médéa se situe dans l'Atlas tellien, à environ 88 km au sud d'Alger, entre la latitude nord 35°25'28" et les longitudes est 2°07'54" et 3°42'13"et occupe une superficie de 8700 km², à une altitude de 900 m du niveau de la mer.

Le relief de Médéa est diversifié, la situation géographique de la région lui confère un climat humide caractérisé par des précipitations importantes, plus de 600 mm par an, assez bien reparties sur toute l'année avec un nombre de jours supérieur à 75 jours, une saison sèche de trois (03) à quatre (4) mois, l'enneigement persiste environ 20 jours, durant la période hivernale. Cet étage humide est caractérisé par un hiver froid et humide à hiver frais **[153].** En plus, l'étude pédologique de cette région montre que son sol est caractérisé par un horizon de surface à texture équilibrée, poreux et riche en matière organique. Le taux d'humus est relativement satisfaisant **[153].**

IV.3. Caractérisation physiques des feuilles du Laurier Noble.

❖ Taux d'humidité de la matière végétale :

Le taux d'humidité correspond à la fraction massique de la quantité d'eau perdue après la dessiccation complète à 105 °C pendant 3 h de l'échantillon. Les feuilles fraîches de Laurier Noble renferment une quantité importante d'eau. Elle est estimée à 47.36 % **(Figure IV.2),** le reste représente l'extrait sec de la matière végétale.

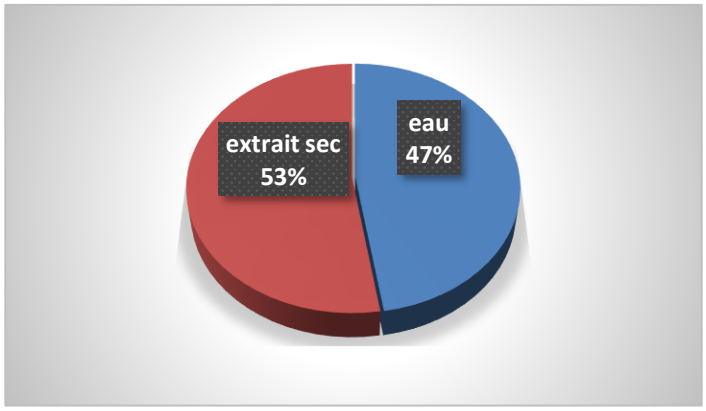
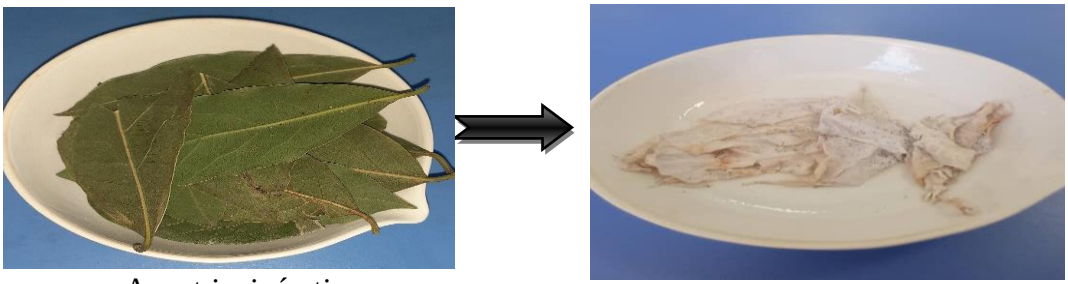


Figure IV.1: Taux d'humidité des feuilles du Laurier Noble.

Des travaux dans ce contexte ont été déterminés par GOUDJIL.M**[103].** Ce ci exprime que les feuilles de Laurier Noble perdaient 47 % de leur poids au cours du séchage. Donc ce dernier est préconisé avant le procédé d'extraction à fin d'augmenter le rendement en huile essentielle. Sauf qu'il faut tenir compte que le séchage à haute température peut altérer les propriétés des huiles essentielles.

❖ **Taux de cendre de la matière végétale :**

L'extrait sec est constitué de matière organique et minérale. Après incinération à 600 °C dans un four à moufle, la partie organique est perdue sous forme de gaz (CO_2 *et* H_2O). Quant à la partie minérale, elle subit une calcination. Cette dernière nous permet de déterminer le taux des cendres dans la matière végétale qui est de 2.35 %. Ce qui inclut que les feuilles de Laurier Noble sont pauvres en minéraux.



Avant incinération. Après incinération.

Figure IV.2: Incinération des feuilles de LaurierNoble.

IV.4. Rendement :

L'extraction des huiles essentielles des feuilles de Laurier Noble (*Laurusnobilis L)* par Clevenger, après séchage a l'air libre et à l'abri de la lumière, a permis d'avoir une huile liquide d'odeur caractéristique du Laurier. Le rendement obtenu en HEest de l'ordre de 1 %. Les résultats obtenus dans ce travail sont similaires aux résultats cités dans la littérature scientifique. En effet,Ouledtaarab et al ont rapporté une teneur moyenne de (1.7%) par rapport à la matière sèche**[154],**Ferhat et al ont obtenu un rendement de 0.7% par hydro distillation **[155].**Il est à signaler que les rendements en huiles essentielles dépendent de plusieurs paramètres notamment : la nature de l'espèce, l'endroit de culture (région géographique et climat), la période de la récolte, le procédé de nettoyage et d'extraction.

IV.5. Caractérisation des huiles essentielles du Laurier Noble :

IV.5.1. Critères organoleptiques :

L'huile essentielle obtenue par extraction au clevenger a été soumise à un examen visuel et organoleptique tel que : l'aspect, la couleur, l'odeur et l'homogénéité. La **figure IV.1** montre que l'huile essentielle obtenue est homogène et constituée d'un liquide de nature visqueuse, de couleur jaune pâle à jaune très claire avec une odeur épicée et cinéolée. Les critères organoleptiques de notre huile coïncident avec ceux trouvés par Camille Briot **[94].**



Figure IV.3: Huile essentielle du *laurier noble*

IV.5.2. Caractérisation physicochimique :

❖ L'indice de réfraction de l'huile essentielle :

C'est la déviation de la direction de propagation d'une onde lorsque celle-ci change de milieu. Plus précisement, la réfraction a lieu lors d'un changement de l'impédance du milieu. Donc chaque milieu transparent est caractérisé par son indice de réfraction.

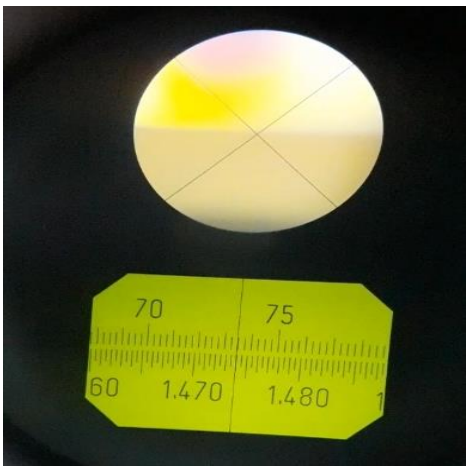


Figure IV.4: Indice de réfraction de l'huile essentielle de Laurier Noble.

La figure IV.4 montre que l'indice de réfraction de l'huile essentielle de Laurier Noble mesuré à 19°C est de 1.4744. Et d'après la formule III.4, l'indice de réfraction est estimé à 1.4739, ceci à 20°C. Les résultats trouvés sont compatibles avec les normes françaises relatives aux huiles essentielles **[103].** En plus, la propriété d'un liquide qui contient du sucre à dévier de la lumière est utilisée pour estimer la teneur en sucre. De ce fait, on confirme la présence de sucre dans les feuilles de laurier Noble.

❖ Densité relative :

La densité est un critère très important pour évaluer la qualité d'une huile essentielle dans différents domaines de vie (cosmétique, pharmacie, agroalimentaire, chimie, etc.) **[156].** L'huile essentielle du Laurier Noble a une densité moyenne égale à 0.918. Selon l'AFNOR 2000, la densité des huiles essentielles est généralement inférieure à celle de l'eau(d'eau=1) **[135]**. De plus, Hadjloum H **[157]** et Goudjil M **[103]** ont trouvés des valeurs de 0.912 et 0.924 respectivement pour l'HE de la même plante.

❖ **Le potentiel d'hydrogène :**

Les résultats de mesures du pH de l'huile essentielle montrent qu'il tend vers la neutralité. Il est de 6.5. D'après la norme AFNOR 2000**[135],** le pH des huiles essentielles varie entre 5 et 6.5. Donc notre huile essentielle répond aux normes.



Figure IV.5: pH de l'huile essentielle du Laurier Noble.

❖ **L'indice d'acide :**

L'indice d'acide représente la quantité en mg de KOH nécessaire pour neutraliser les acides gras libres présents dans 1g de corps gras. Il permet de reconnaitre la qualité du produit et la conservation des huiles. Une huile à faible indice d'acide est une huile fraiche. En plus, il peut aussi nous renseigner sur la susceptibilité de l'huile à subir des altérations, notamment l'oxydation **[13].**

Dans notre cas, la valeur de l'indice d'acide est de 2.24mg KOH/g. Notre résultat confirme l'étude de Haddadi. I qui a démontré que ce dernier ne peut pas être supérieur à 2.5 ce qui renforce notre étude **[137]**.

❖ **L'indice de saponification :**

Il indique combien de milligrammes de KOH sont nécessaires pour saponifier complètement 1g d'un acide gras. Dans notre étude, il faut 22.44 mg KOH/g HE de soude pour saponifier 1 g d'huile essentielle de Laurier Noble. Haddadi. Ia trouvé des valeurs de

19.635 et 23 mg KOH/g HE pour l'HE de la même plante **[137]**, notre huile essentielle répond à cette étude.

❖ **L'indice d'ester :**

Les esters sont des molécules à faible toxicité aux doses physiologiques normales. D'après les résultats obtenus, notre huile essentielle contient 20.20mg KOH/g HE d'ester. Par contre, Haddadi. I ont trouvé des indices d'ester de 20.75 mg KOH/g HE **[137].** Ce qui traduit que notre HE à un indice d'ester inférieur aux résultats précédemment obtenus. Ce qui signifie que notre huile a un faible pouvoir de toxicité.

Tableau IV.1 : Tableau récapitulatif des indices d'HE du Laurier noble

Huile	I_A**(**mg KOH/g HE**)**	I_E **(**mg KOH/g HE**)**	I_S **(**mg KOH/ g HE**)**
Laurier Noble	2.24	20.20	22.44

❖ **Activité anti-oxydante :**

Dans cette étude, la méthode de piégeage des radicaux par DPPH*a été utilisée pour évaluer l'activité anti-oxydante des différents extraits des feuilles de Laurier Noble (huiles essentielles, l'hydrolat et l'extrait brut). L'activité anti-oxydante du radical DPPH a été évaluée par un spectrophotomètre UV-Visible en suivant la réduction du radical DPPH qui se manifeste par le changement de la couleur violette (correspond au DPPH*) à la couleur jaune (correspond au DPPH-H) et ceci à 517 nm. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure IV.6.

L'analyse de la figure IV.6 montre que l'extrait brut et l'hydrolat des feuilles de Laurier Noble ont présenté un pouvoir antioxydant moins important par rapport à celui de l'huile essentielle. Ces résultats préliminaires ont confirmé que l'utilisation traditionnelle des feuilles de *Lauru nobilis* dans l'industrie alimentaire est reliée non seulement à l'odeur et à l'arôme plaisant, mais probablement aussi à des possibilités préservatives des substances présentes dans les feuilles ; et d'autres parties de cette plante.

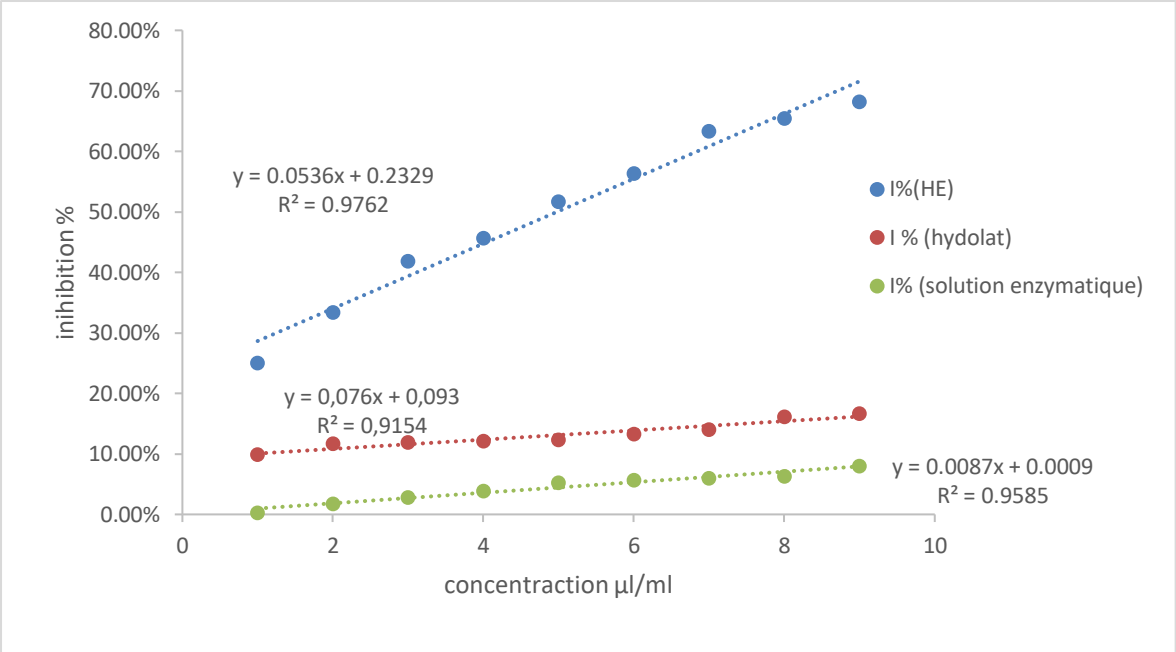


Figure IV.6 : Efficacité des extraits naturels (*laurusnobilis L*) à piéger le radical libre de DPPH en fonction de la concentration.

❖ ***Calcul d'IC50 :***

Les courbes de tendances pour les trois échantillons : HE, hydrolat et l'extrait brut possèdent une forme linéaire (équation IV.1) avec des coefficients de R^2 de 0.9762, 0.9154 et 0.9585 respectivement.

$$y = aX + b \qquad \textbf{IV.1}$$

Avec :

Y : pourcentage de réduction des radicaux DPPH

X : concentration de l'échantillon

Les résultats du test DPPH sont exprimés en IC50. La valeur IC50 est définie comme étant la concentration du substrat nécessaire à diminuer de 50% l'absorbance de la solution initiale du DPPH. Les IC 50sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet anti-radicalaire important. L'huile essentielle présente une activité anti-oxydante plus importante que celle de l'hydrolat et l'extrait brut, avec des IC50 de 4.98, 5.39 et 5.73µL/mL respectivement. Le modeste résultat de l'activité antiradicalaire qu'a présenté le laurier est compatible avec ceux trouvés par GOUDJIL**[103].**

Des travaux antérieurs réalisé par Dammak et al **[158]**ont montré une importante activité anti-oxydante de l'HE de Laurier Noble (IC50 =0.35 mg/mL). Cette activité peut être expliquée par la présence d'une quantité importante de composés cineolé qui renferme des radicaux libres de scavenger. En plus, cette activité est liée aussi à l'existence des composés phénoliques.

Il est à signaler que la composition des huiles essentielles varie selon le lieu géographique d'implantation, les conditions climatiques, l'espèce, l'âge de la plante, les méthodes de séchage et d'extraction **[159,160].**

❖ **Activité enzymatique :**

Le Laurier Noble est caractérisé par ses activités enzymatiques. Dans cette étude, les activités enzymatiques recherchées sont celles des lipases, des protéases et des catalases (les oxydoréductases).

Activité lipasique :

Les lipases (tri acyle glycérol acyle hydrolase) font partie de la famille des hydrolases qui agissent sur les liaisons esters carboxyliques **[161].** Elles permettent l'hydrolyse des triglycérides en acides gras et glycérol **[141].** Selon l'équation suivante :

$$Triglycérides + H_2O \xrightarrow{lipase} Diglycéride + acide\ gras$$

L'activité lipasique est recherchée dans les extraits de feuilles de Laurier Noble par la méthode de titration des acides gras libérés lors de la réaction de lipolyse. La quantité des acides gras (acide) libérés est déterminée par le NaOH (base) selon le principe de la réaction de neutralisation d'un acide par une base. Après virage de la couleur vers le rose, le volume du NaOH ajouté va nous permettre de calculer la concentration d'acide gras libéré.

Après calcul, la valeur de l'activité lipasique dans l'extrait brut est de 2866.66µmol/min.mL d'extrait. Ceci confirme que les lipases sont omniprésentes dans la nature et sont produites par les différents organismes vivants (plantes, animaux et microorganismes). Ces enzymes présentent plusieurs caractéristiques très intéressantes, telles qu'un faible coût de production et une purification facile **[162].** Aussi leurs caractéristiques comme par exemple, leur efficacité, leur stabilité **[162]** et leur spécificité **[163]**, leur

permettent d'être utilisées en industries des aliments, des détergents, du cuir, du textile, du cosmétique, et des industries pharmaceutiques **[164].**

Activité protéolytique :

Il existe plusieurs préparations coagulantes (coagulation de la caséine) provenant du règne végétal. Elles sont extraites par macération de divers organes de plantes supérieures. Les protéases sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons peptidiques d'une protéine pour donner des acides aminés et des peptides. L'activité protéolytique est recherchée dans les extraits enzymatiques des feuilles de Laurier Noble selon la méthode Kembhavi.

Les résultats obtenus révèlent une activité protéolytique des extraits bruts traduits par la dégradation de la caséine. Cette activité est de l'ordre de 0.84 U/mL. Ceci nous permet de constater que notre extrait contient des protéases mais à faible activité, cela nous laisse penser que le substrat d'étude n'est pas adéquat ou bien il faut revoir les conditions d'étude. Puisque chaque enzyme naturel (qui est en réalité un complexe enzymatique) exerce son action dans des conditions différentes de pH et de température, et sur des substrats dont la constitution des protéines n'est pas toujours identique.

Activité catalasique :

Les dosages ainsi réalisés donnent la valeur du permanganate de potassium sans réaction enzymatique (témoins) et la valeur de l'apport enzymatique. En calculant la différence entre la valeur du témoin et la valeur de l'extrait brut, on obtient le volume de permanganate de potassium qui correspond à la quantité de peroxyde d'hydrogène qui a disparu après l'action de la catalase. Par conséquent, il suffit de calculer l'activité enzymatique de la catalase en unité (µKat) par gramme de solution enzymatique, tel que l'activitécatalysique0.1µ Kat/g.

L'étude que nous avons faite montre une capacité pour Laurier Noble à catalyser l'eau oxygénée. Ce phénomène traduit la production d'H_2O_2durant la photosynthèse des plantes. En effet l'eau oxygénée étant toxique pour la plante il faut qu'elle soit catalysée rapidement. On retrouve néanmoins en plus une production d' H_2O_2 des plantes lors de la respiration mitochondriale qui doit comme pour la photosynthèse être liminée. Nous avons donc une activité enzymatique de la catalase pour les feuilles de Laurier Noble.

L'activité des catalases peut être affectée comme toutes les protéines enzymatiques, par, entre autres, la température, le pH et les ions métalliques **[165].**

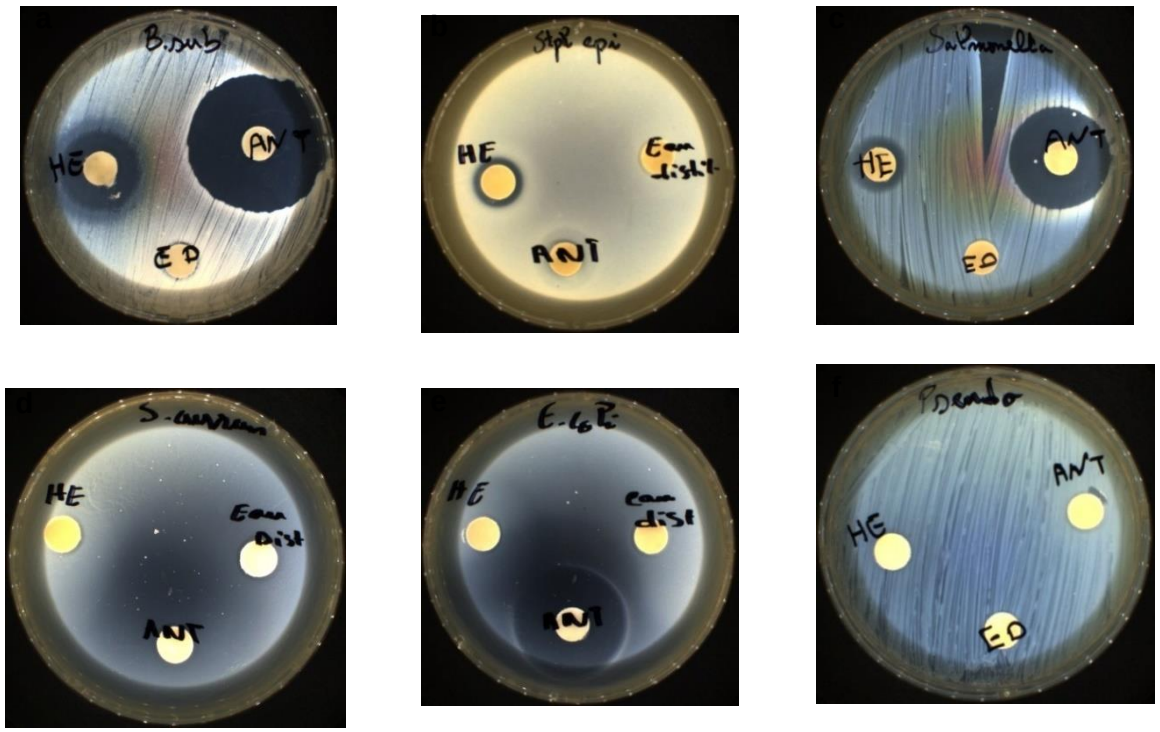
La catalase est une enzyme commune présente dans tous les organismes vivants. Les catalases ont été exploitées dans de nombreuses applications telles que la transformation des aliments, le textile, le papier, l'industrie pharmaceutique **[144…168]** et ceci grâce à leurs caractéristiques : haute spécificité **[169],** mécanismes de réaction bien définis **[170]**, ne nécessitant pas de réducteur **[169].**

IV.5.3. Caractérisation microbiologique :

❖ **Activité antimicrobienne :**

L'activité antimicrobienne se traduit *in vitro* par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des puits imprégnés de l'agent antimicrobien étudié sur culture microbienne menée dans une boite de Pétri. Le diamètre des zones d'inhibition autour de ces puits détermine l'action antimicrobienne. Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait brut de *Laurusnobilis L* sont illustrés dans la figure IV.7 et IV.8.

Figure IV.7 : Pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de *Laurusnobilis* sur :
a:*Bacilus subtilis ;* **b**:*Staphylococcus Epidermidis ;* **c:** *Salmonella Typhimurium ;*
d:*Staphylococcus aureues ;***e:***Escherichia Coli ;* **f:***Pseudomonas Aeruginosa.*



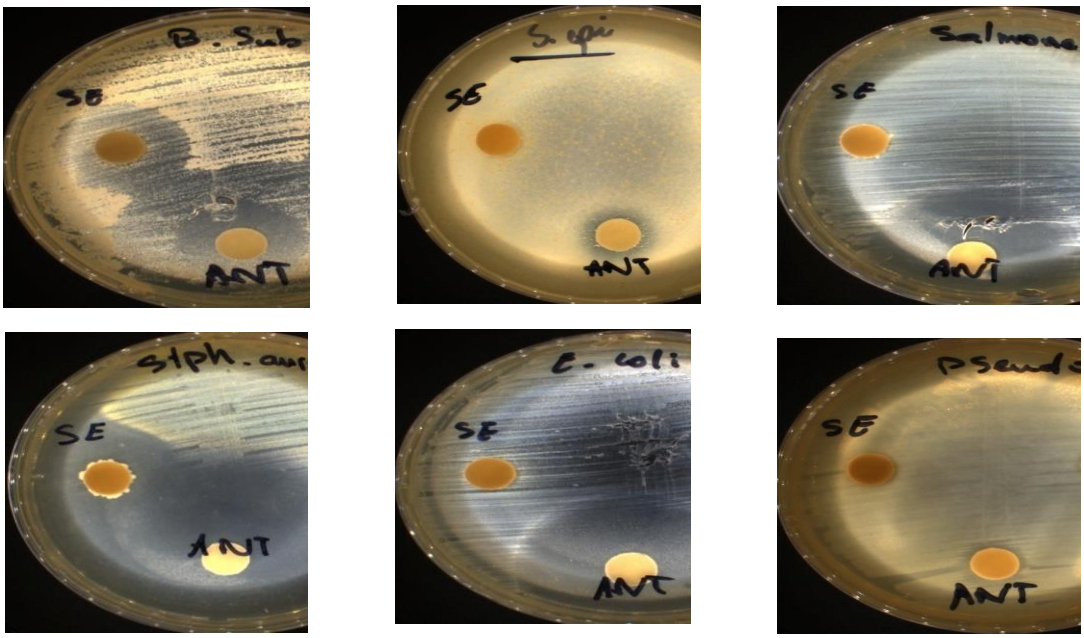


Figure IV.8 : Pouvoir antibactérien de l'extrait brut de *Laurusnobilis* sur :
a:*Bacilus subtilis ;* **b**:*Staphylococcus Epidermidis ;* **c:** *Salmonella Typhimurium ;*
d:*Staphylococcus aureues ;* **e:***Escherichia Coli ;* **f:***Pseudomonas Aeruginosa*

L'examen des photos du pouvoir antibactérien après incubation a permis de constater que les boites de Pétri contenant des puits imprégnés d'antibiotique (Amoxicilline) et d'HE ne montrent pas de zone d'inhibition de la croissance bactériennes au tour des disques imprégnés d'huile essentielle ce qui montre la présence d'un pouvoir inhibiteur de l'antibiotique, ce qui n'est pas le cas pour l'HE sur *Staphylococcus aureues, Escherichia Coli et Pseudomonas Aeruginosa.* Ainsi, l'effet antimicrobien éventuel est positif sur le reste des bactéries avec des pourcentages de 65.45, 112.40 et 50 %.

Par contre, on observe une activité antibactérienne différente de celle de l'huile essentielle par rapport à celle de l'extrait brut. On a un effet positif seulement sur *Bacilus subtilis* et *Staphylococcus aureues* avec des pourcentages de 56.5 % et 62.32 % respectivement. Tandis que l'effet est négatif sur le reste des bactéries.

L'évaluation du pouvoir antibactérien des deux solutions, nous permet de conclure qu'elles ont un effet différent sur certaines bactéries. L'huile essentielle a un effet positif sur *Bacilus subtilis, Staphylococcus Epidermidis, Salmonella Typhimurium* et *Staphylococcus aureues* par contre l'extrait brut a un effet positif seulement sur *Bacilus subtilis* et *Staphylococcus aureues.* Ceci peut être expliqué par une différence au niveau de la composition ou bien au niveau de la concentration des deux solutions.

En plus, l'activité antimicrobienne a prouvé un effet sur la croissance et le développement des levures. On remarque que l'huile essentielle a un effet positif sur *Candidat Albicans et Aspergillus Brasiliensis*avec des taux d'inhibition de 90.2 et 109.1 % (Figure IV.9).

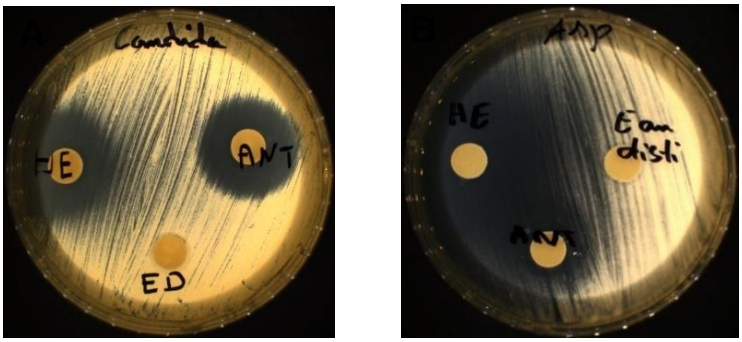


Figure IV.9 : Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Laurusnobilis* sur les levures :
A:*Candidat Albicans*et,**B :** *Aspergillus Brasiliensis*

L'examen de la figure IV.10 montre que l'extrait brut n'a pas d'effet positif sur les levures. Ce qui prouve l'inexistence de substance inhibitrice de développement et de croissance de levures.

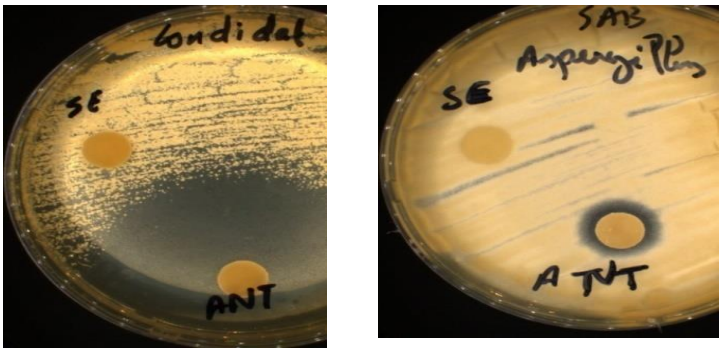


Figure IV.10 : Pouvoir antimicrobien de l'extrait brut sur les levures :
A : *Candidat Albicans*et**B** *Aspergillus Brasiliensis.*

De même pour le champignon, on observe une zone d'inhibition autour du disque imprégné de l'HE avec une efficacité de 100% (Figure IV.11)

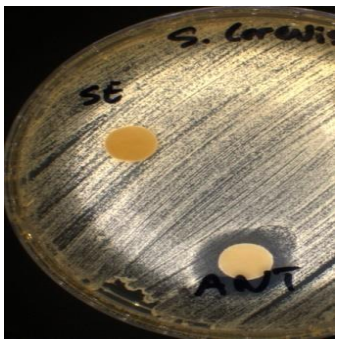


Figure IV.11: Pouvoir antiphonique de l'huile essentielle de *Laurusnobilis* sur *Saccharomyces*



Figure IV.12 : Pouvoir antiphonique de l'extrait brut de *Laurusnobilis* sur : *Saccharomyces*

L'extrait brut ne représente aucune activité antiphongique.

Suite à l'ensemble des tests d'activité antimicrobienne effectués, on constate que l'huile essentielle du Laurier Noble possède un pouvoir antibactérien important qui inhibe la croissance et le développement de bactéries et levures dont nous avons cité quelques-unes précédemment. Ce pouvoir est dû à la présence des monoterpènes qui sont responsables de l'activité antimicrobienne. De même, les cinéolés qui représentent la fraction majoritaire des huiles essentielles, en association avec d'autres composés en faible quantité ont une action aussi efficace voire meilleur que les monoterpènes et les cinéolés seules. Ce qui leur confère la qualité de synergique ou antagoniste.

La détermination de la CMI est basée sur l'observation de la présence ou absence d'une croissance microbienne dans le milieu Muller Hinton enrichi d'agent antimicrobien à différentes concentrations, étant donné que la CMI est la plus petite concentration du produit testé qui présente une inhibition significative de développement de microorganismes. La meilleure activité antimicrobienne obtenue est celle réalisée sur *Staphylococcus Epidermidis*. Les résultats dégagés sont rapportés dans le tableau IV.2.

Tbleau IV.2 : Valeurs des CMI pour la souche*Staphylococcus Epidermidis.*

	CMI Laurier Noble			
Volume de l'HE en mL	1	0.5	0.25	0.125
Staphylococcus Epidermidis	+	-	-	-

Les valeurs de la CMI varient en fonction de la souche testée. Les *Staphylococcus Epidermidis*sont inhibées à des concentrations de 1 %. Donc la plus petite valeur de la CMI est enregistrée chez *Staphylococcus Epidermidis* est 1 %. Au-delà de cette valeur, on remarque une croissance sur le milieu de culture.

IV.3.4. Détermination de la composition chimique de l'HE par HPLC

La réalisation des analyses par HPLC a été effectuée au niveau du complexe AntibioticalSaidal de Médéa, les chromatogrammes obtenus sont traités en utilisant le logiciel Empower 2 Software avec un volume d'injection de 100 µL et un temps d'analyse de 70 min. Les figures IV.13 et IV.14 présentent les résultats obtenus. Ces derniers sont inexploitables car les chromatogrammes obtenus présentent un chevauchement des pics ce qui rends leur identification difficile. Ce chevauchement revient à la présence de plusieurs fonctions chimiques induisant plusieurs composés chimiques qui possèdent des valeurs de temps de rétention très proches. Afin de déterminer avec précision la composition de l'HE de Laurier en polyphénols et en Flavonoïdes, on suggère de faire une analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse CG-MS.

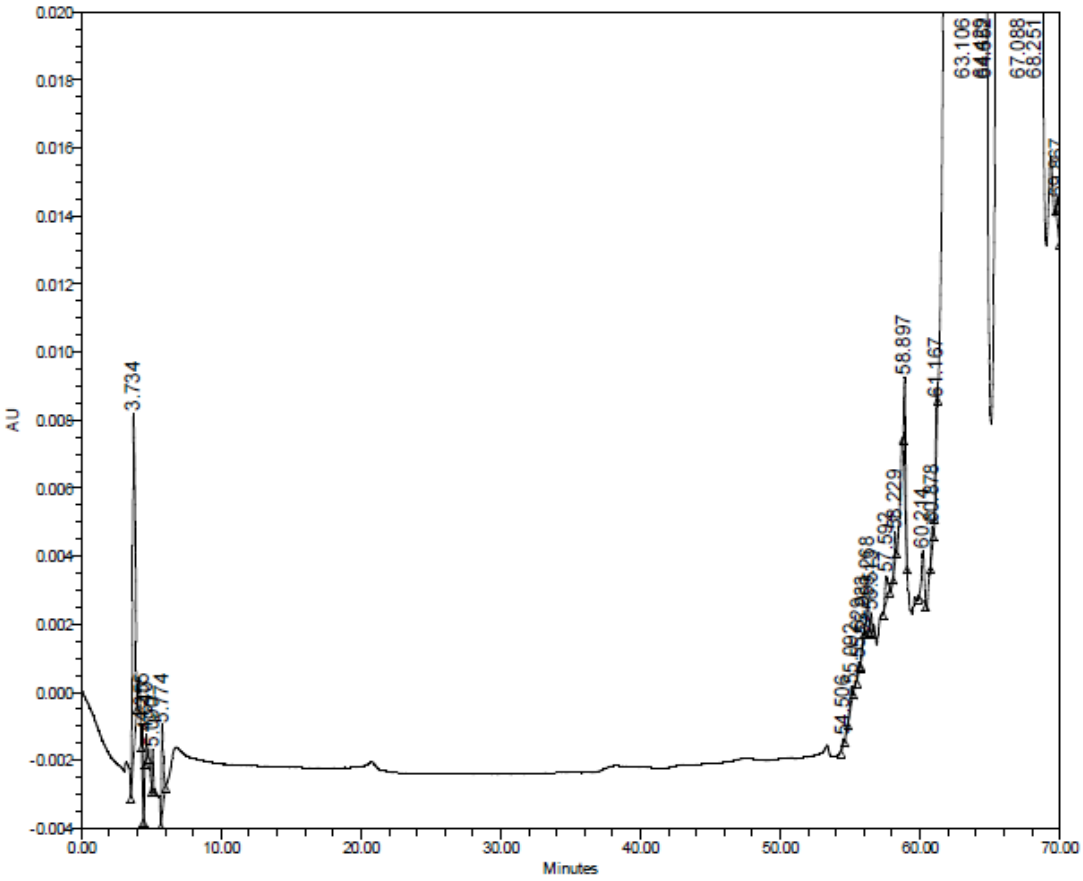


Figure IV.13 : Chromatogramme des Polyphénols

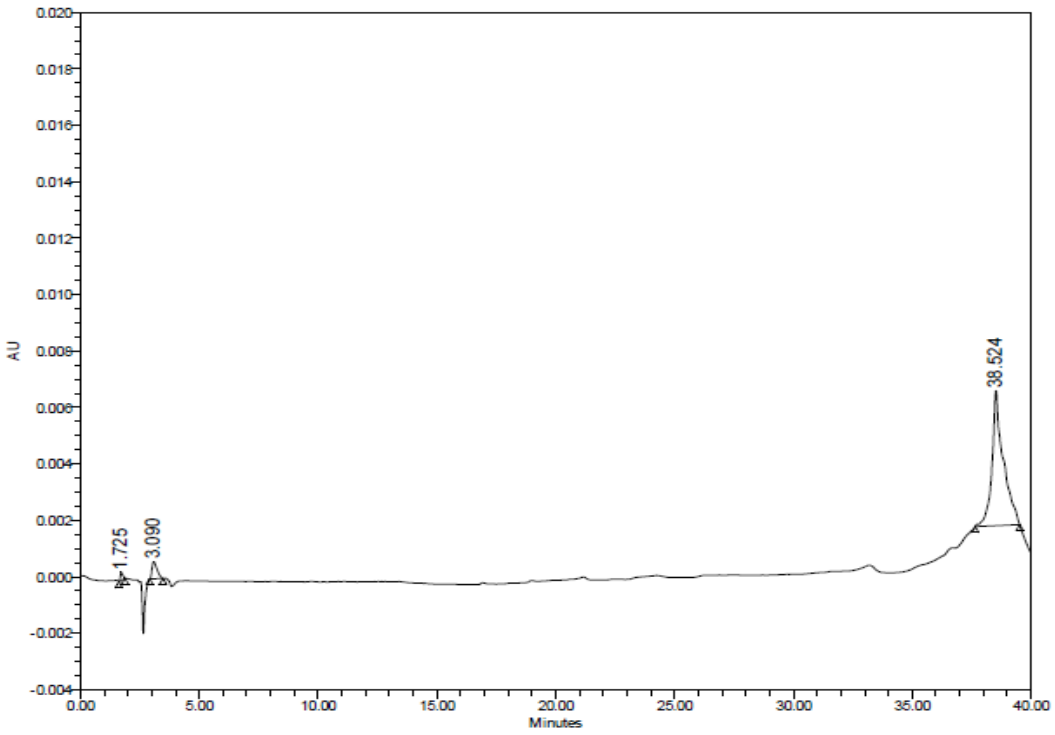


Figure IV.14 : Chromatogramme des Flavonoïdes

Conclusion Générale

Conclusion générale

La phytothérapie a tellement pris de l'envergure dans les temps actuels au point d'attirer sérieusement l'intention des scientifiques et des chercheurs en les induisant dans des explorations importantes et pas minimes des plantes médicinales et aromatiques dans le domaine pharmaceutique.

L'objectif de ce travail s'articule autour de l'extraction de l'huile essentielle des feuilles de Laurier Noble par hydro-distillation et leurs caractérisations physicochimiques et biologiques ainsi que l'évaluation du pouvoir enzymatique et antimicrobien d'un extrait brut.

Par l'utilisation du Clevenger le rendement obtenu en huile essentielle est de 1%. La qualité de l'huile essentielle repose sur trois critères :

- Les propriétés organoleptiques (aspect, consistance, couleur et odeur) .
- Les propriétés physico chimiques (taux d'humidité, taux des cendres, indice de réfraction, densité relative, indice d'acide, indice de saponification et indice d'ester).
- Les propriétés microbiologiques (activité anti oxydante, activités enzymatiques et activité anti microbienne).

Les résultats obtenus se rapprochent de ceux trouvés par Mr.Goudjil.

Les feuilles de Laurier récoltées de la région d'El Kouala Médéa ont un taux d'humidité de 47.36 % et un taux de cendre de 2.35 %.

L'huile essentielle extraite de ces dernières est d'un aspect homogène de couleur jaune pâle et d'odeur épicée et cinéolé caractéristique du Laurier Noble. L'indice de réfraction de HE et sa densité son relatifs aux normes, quant aux indices d'acide et de saponification dépendent de la région géographique d'implantation, les conditions climatiques, l'espèce …

L'analyse microbiologique de l'extrait brut a montré la présence de lipases, de protéases et de catalases ; ainsi qu'un pouvoir anti oxydant et anti microbien, aussi bien pour l'HE et l'extrait brut, impliquant la présence des composés phénoliques, céniolés et monoterpènes. Ces derniers nécessitent des analyses plus approfondies afin de déterminer leur présence et leur teneur dans l'HE et l'extrait brut.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

[1] Ould,K., Meddah,B., Tirtouil,A.,"Proprieties of Laurusnobilisfrom Mascara (Algeria)", International Journal of Multidisciplinary and CurrentResearch,4(2016) 2321- 3124.

[2] Kaurinovic,B., Popovic,M., Vlaisavljevic,S.,"In vitro and in vivo effects of Laurus nobilis L. leaf extracts",Molecules,15(2010)3378-3390.

[3] Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.,"Freeradicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer",Chemico-Biological Interactions,160(2006)1–40.

[4] Aruoma, O.I.,"Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods", Mutation Research,(2003) 9-20.

[5] Kala, C.,"Medicinal and aromatic plants: Boon for enterprise development", Journal of AppliedResearch on Medicinal and Aromatic Plants,2(2015) 134-139.

[6]Hellal,Z.,"Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (Sardina pilchardus)", Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Mémoire de Magister(2011), p : 76-82.

[7]Gandhi S.G., Mahajan V., Bedi Y.S.,"Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants", Planta, 241(2015) 303-31.

[8] Boudoumi, K., "Etude de l'Influence du lieu et de la période de récolte de l'espèce «Thymus vulgaris L.» sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles". Université de Djelfa, Mémoire de Master, (2014), p: 5.

[9] Bakkali, F., averbeck, S., averbeck, D., Idoamar, M., "Biological effects of essential oils – A review", Food and Chemical Toxicology,46(2008), 446–475.

[10] Lafon, J.P., Tharaud-Prayer, C., Lévy, G.,"Biologie des plantes cultivées. Tome 1 : organisation/ Physiologie de la nutrition",Edition Lavoisier (1996), p : 22-26.

[11] El Abed,D.,Kambouche, N.Les Huiles essentielles, Editions Dar El Gharb,(2003), p :13-16.

[12] Bontemps,M,Catégorie Aromathérapie. Les huiles essentielles, leur culture, leur histoire,(https://vk.com/wall-202507722_384 dernière consultation 01 juin 2023)

[13] Padrini F.,LucheroniM.T.,"Le grande livre des huiles essentielles". Edition de Vecchi.(2003), P:115.

[14] Ouis, N.,"Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil.", Université d'Oran,Thèse de Doctorat, (2015),p : 112-126.

[15] ChouitahO.,"Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de Glycyrrhizaglabra". Université d'Oran, Thèse de Doctorat,(2012),p : 15.

[16] Bouamer A.,Bellaghit, M., Mollay, A.,"Etude comparative entre l'huile essentielle de la menthe vert et la menthe poivrée de la région de Ouargla" ; Université de Ouargla, Mémoire de Master,(2004), pp 2-5 ; 10 ; 19 ; 21-22.

[17] Belkou H., Beyoud F., Taleb BahmedZ.,"Approche de la composition biochimique de la menthe vert (menthe spicata L.) dans la région de Ouargla", Mémoire DES, UniversitéOuargla, (2005),p :2,61.

[18] Franchomme, P., Jollois, R., Penoe,L. "L'aromathérapieexactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles". Editions Jollois,(2001), p : 33-35.

[19]Mayer, F., "Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite",Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie, Thèse de Doctorat, (2012), pp :102-110.

[20] Vangelder, V."L'aromathérapie dans la prise en charge des troubles de Sante mineurs chez l'adulte à l'officine", Université de Lille 2, France,Thèse de Doctorat, (2017), pp :232.239.

[21]Jouault, S., La quantité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité",Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie, Thèse de Doctorat,(2012), pp :44-49.

[22] Kaloustain,J., Hadji-Minaglou,F.,"La Connaissance des Huiles Essentielles : Qualitologie et Aromathérapie : Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée". Collection Phytothérapie Pratique. Springer-Verlag. Paris,(2013), pp :55-56.

[23] Rahal, S.,"Chimie des Produits Naturels et des Etres Vivants", O.P.U. Edition. Alger,(2004), p : 45.

[24]Deschepper, R., "Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en Aromathérapie", Université de Marseille, Faculté de Pharmacie, Thèse de Doctorat, (2017), p:65.

[25] Laurent, J.,"Conseils et utilisations des huiles essentielles les plus courantes en officine.", Université Paul Sabatier Toulouse, France, Thèse de Doctorat (2017), p : 18.

[26] Padua L.S., Bunyapraphatsara,N.Lemmens, R.H.M.J.,"Plant Resources of SouthEast Asia",Backhuys Publishers, Leiden 1(1999), p: 12.

[27]Abed,S.,Messaadiam, B.,Djessas,M., Etude des propriétés physicochimiques et biologiques de Thymus vulgaris L, Université de Constantine, Faculté de la Science de la Nature et la vie, Mémoire de Master, (2021), pp :6-7.

[28] Hurtel, J.M., Noix de muscade, Myristicafragrans, fiche médicale sur cette épice Aphrodisiaque et son huile essentielle antiseptique, phytomania : phytotherapie, plantes médicinales, aromathérapie, huiles essentielles. Phytomania. Com,(2006), p : n5.(https://www.phytomania.com/muscade.htm dernière consultation 01 juin 2023)

[29]Alili,Z., Amrouche, T.,Tantar,O.,"Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de laurier noble et du thym à linalol testées individuellement et en combinaison",(2006), p:23-30.

[30]BenjilaliB.,"Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements". Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation,(2004), p : 17-59.

[31] Echchaoui, M.,"Le Pouvoir antibactérien des huiles essentielles", Université Mohammed V-Rabat, Maroc, Thèse de Doctorat, (2018), p : 22.

[32] Benouali, D.,"Extraction et identification des huiles essentielles", Université des sciences et de la technologie d'Oran, Mémoire de Master,(2016), p : 45.

[33] Figueredo, G.,"Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne", Université Blaise Pascal, France, Thèse de Doctorat (2007), p :145.

[34] Zerbani, G.,"Caractéristiques physico-chimiques antimicrobiennes d'un savon additionné à l'huile essentielle de citron (Citrus limon)", Université de Ghardaïa, Algérie, Mémoire de Master, (2020), pp :12-15.

[35] El kalamouni, C.,"Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées", Université de Toulouse. France, Thèse de Doctorat (2010), p : 34.

[36] Sarni, T., Yelles, D.,"Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de Cedrusatlantica et Origanumcompactum : application sur la tomate", Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Mémoire de master, (2017), p : 19-45.

[37] Marie Elisabeth, L.,"Extraction sans solvantassistée par Microondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles", Université de la Réunion, Faculté des Sciences et de la Technologie, Thèse de Doctorat, (2005), p : 14-15.

[38] Mansard,M.,"Le camphrier : étude botanique, chimique et biologique de ses huiles essentielles". Thèse Doctorat. Université Lorraine, (2016), p :110-120.

[39]Belaiche P., Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1: l'aromatogramme. Éd. Maloine. Paris, (1979), pp :8-17.

[40] Duraffourd, C., D'Hervicourt, L., Lapraz,J., Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galéniques. Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème éd. Masson, Paris, (1990), pp : 337-340.

[41] Bruneton, J.,Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, techniques et documentation, Edition Lavoisier, 3rd édition, (1999), pp 315-320.

[42] Viaud, H., Les huiles essentielles, qualité distillation.gnoma, Revue électronique, (1993) (http://nature-helps.com/France/viaud2.htm dernière consultation juin 2023).

[43] Paré J., Procédé assisté par micro-ondes. Info-essences, Bulletin sur les huiles essentielles, (1997), p : 4.

[44] France-Ida J., (1996) - Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. Info-essence, 3, pp: 5-6.

[45] Scheffer, J.J.C., Various methods for the isolation of essential oils,Phytotherapy Research, 10(1996) 118-200.

[46] Lagunez-Rivera,L., Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe, Institut National Polytechnique de Toulouse, Thèse de Doctorat (2006), pp :20-23.

[47] Elhaib, A.,Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformation catalytique, Université de Toulouse. Thèse de Doctorat, (2011), pp : 13-14.

[48]Lamamra,M, Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de Tinguarrasicula (L.) Parl. et de FilipendulahexapetalaGibb, Université Ferhat Abbas-Sétif, Mémoire de Magister (2018),p : 9.

[49] Valnet, J., Aromathérapie, Traitement des maladies par les essences des plantes, Maloine S.A. éditeur. Paris, (1984), p : 544.

[50] Salle J.L., Pelletier, J., Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche, (1991), p : 19-45.

[51] Teuscher, E., Anton, R., Lobstein A., Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et leurs huiles essentielles, Paris : Ed. Tec&Doc, (2005), pp16-18.

[52] Merzougui, I., Tadj, H., Etude de l'effet antibactérien et antioxydant d'Ammoidesverticillata de la région de Tlemcen,Universite Abou-Bakr Belkaïd – Tlemcen,MémoireIngénieurat (2012), pp :145-147.

[53] Nowicki, J., Les dangers de l'utilisation abusive des huiles essentielles, Université de Lille 2, Faculté de Pharmacie, Thèse de Doctorat (2019), pp : 39-51.

[54] Hessas, T.,Simoud, S.,Contribution à l'étude de la composition chimique et à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de thymus sp., Université Mouloud Mameri Tizi-Ouzou, Thèse de Doctorat, (2018), p : 5.

[55] Veyrune, P., Place des huiles essentielles en dermo-cosmetique, Université de Marseille, France, Thèse de Doctorat (2019), pp : 46-48.

[56] Turek, C., Stintzing, F.C., Stability of essential oils: a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, (2013), 40-53.

[57] Kettenging, M., Geeganage, V.,Aroma-vital cuisine, Chapter 18 in Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications, 1st Edition, CRC Press, (2009), pp: 863–880.

[58]Ali, B., Al-wabel, N., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S., Anwar, F., Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,5(2015) 601–611.

[59] Guesmi, A., Boudabous, A., Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie. Revue des Régions Arides, (2006) 224-230.

[60] Chagra, K., Etude les propriétés physico-chimiques et biologique de clou du girofle (Syzygium aromaticum L.), Université Mohamed Khider, Biskra, Mémoire de Master (2019), pp :22-26.

[61] Ait Salem, L., Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de Pinus sylvestris et Pelargoniumasperum en combinaison avec la nisine sur des bactéries pathogènes, Université MoulodMameri, TiziOuzou, Mémoire de Master (2016), pp :43-44.

[62] Harris., Phytotherapeutic uses of essential oils In: Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications. CRC Press, (2009), pp : 315–352.

[63] Samate, A., Compositions chimiques d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone Soljdanienne du Burkina Faso : valorisation, Université de Ouagadougou, Burkina Faso, Thèse de Doctorat (2002), pp :2-5.

[64] Boyle, W., Spices and essential oils as preservatives. The American Perfumer and Essential Oil Review,66 (1995) 25-28.

[65] Burt,S.,Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology,94(2004) 223-253.

[66] Kalemba, D., Kunicka, A., Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry, 10(2003), 813-829.

[67] Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R., Takahara, Y., Antifungal Activity of Components of Essential Oils,Agricutural and BiologicalChemestry, 45(1981) 945-953.

[68] Ultree, A., Slump, R.A., Steging, G., Smid, J., Antimicrobial activity of carvacroltoward Bacillus cereus on rice. Journal of food protection,63 (200) 620-624.

[69] Janssen, M.A., Scheffer, C., Parhan-van Atten, A.W., Baerheim Svendsen A., Screening of some essential oils for their activities on dermatophytes, PharmaceutischeWeekblad Scientific Edition,10(1988), 277–280.

[70] Cox, S., Mann C., Markham, J., Interactions between components of the essential oil of Melaleuca alternifolia. Journal of AppliedMicrobiology, 91(2001), 492–497.

[71] Penchev,P., Purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Univercité de Toulouse,Thèse de Doctorat (2010), pp :2-10.

[72] Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Bahloul, N., Mnif, W., Essential Oils, Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. Medicines, 3(2016), 1-16.

[73] Aruoma, O.,Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. Journal of the American Oil Chemists' Society, 75(1988), 199- 212.

[74] Miguel, M., Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review, Molecules15(2010),9252-9287.

[75] Santos F., Roa, V., Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8- cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. Phytotherapy 14(2000), 240-244.

[76] Sharifi-rad J., Sureda, A., Tenore, G., Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems Review,Molecules,22(2017), 1-55.

[77] Bayala, B., Bassole, I., Scifo, R., Gnoula, C., Morel, L., Lobaccaro, J., Simpore, J.,Anticancer activity of essential oils and their chemical components A review. American Journal of Cancer research, 4(2014) 591–607.

[78] Chabrie J. Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie : Diplôme d'etatde docteur : pharmacie : Université Henri Poincaré Nancy ;(2010), p : 165.

[79] Sofowora, A., Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Edition: de Karthala, (2010), p : 22.

[80] Iserin P., Encyclopédie des plantes médicinales, Tome 2. Ed. Larousse. Londres,(2011) pp : 10-143- 225-226-335.

[81] Lahsissen, H., Kahouaji, A., tijane M., Hsseini, S.,Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de zaër (Maroc Occidental),Lejeunia, Revue Botanique (2009) 5-12.

[82] Yvonne et Chadouli.Les plantes aromatiques et médicinales. Un exemple de développement humain au Maroc la coopérative féminine de Ben Karrich – Tétouan (https://www.latitude21.fr/les-plantes-aromatiques-et-medicinales-un-exemple-de-developpement-humain-au-maroc-la-cooperative-feminine-de-ben-karrich-tetouan/)

[83] Geerts P., Rammeloo J., Van Cauteren G., Et Al.,Laurusnobilis : le livre du laurier. Gand : Ed. Ludion, (2002), p : 131.

[84] Collognat, A., Dictionnaire de la mythologie gréco-romaine : illustrée par les récits de l'Antiquité. Paris : Ed. Omnibus, (2012), p : 1003.

[85] Spichiger, R., Savolainen, V., Figeat, M., Jeanmonod, D., BotaniqueSystématiquedes plantes à fleurs. Edition. : Presses polytechniques et universitaires romandes, (2002),P : 413.

[86] Barla, A., Topçu, G., Oksuz, S., Tumen, G., Kingston, D.,Identificationof cytotoxic sesquiterpene from Laurus nobilis L., Food chemistry, 104 (2007) 1478- 1484.

[87] Vetvicka V.,Matousova V., Arbres et Arbustes : 256 illustrations en couleurs. Ed GRÜND. (1991), p :112.

[88] Pariente L., Dictionnaire des sciences pharmaceutiques et biologiques. 2ème Ed Académie nationale de pharmacie. Paris. (2001),p : 1643.

[89] Zhiri A., BaudouxD.,Essentielleschémotypées et leurs synergies : aromathérapie scientifique, Edition InspirDevelopment,(2005), pp :2-9-27.

[90] Quezel P. et Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I. Ed CNRS. Paris. (1962),p: 565.

[91] Demir V., Guhan T., Yagcioglu A, Degirmencioglu A. Mathematical modeling and the Determination of some Quality Paramaters of Air-dried Bay leaves, (2004), p:12-25.

[92] Steven P.,AngiospermPhylogenywebsite, 2001 (http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/ dernière consultation juin 2023)

[93] Quezel P., Santa, S., La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II. Ed CNRS. Paris, (1963), pp : 360-361.

[94] Briot C., Le laurier noble, plante des héros : aspects historiques, botaniques et thérapeutiques, Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie, Thèse de Doctorat (2016), pp :21-30.

[95] Myose M., Paris R., Précis de matières médicales. Edition. Paris de Masson, (1976), pp : 161-162.

[96] Botineau M., Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Paris : Ed. Tec&Doc,(2010), pp :35-41.

[97] Reynaud J., La flore du pharmacien. In : solanacées. Edition : tec et doc. (2002), p 200.

[98] Beloud A., Plantes médicinales d'Algérie, OPU, (1ère Edition 1998) Numérisée en 2011, pp :124-125.

[99] Ballabio R., Goetz P., Huile de graine/fruit de laurier Laurusnobilis L., Laurusazorica (Seub.) Franco, Laurusnovocanariensis Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J.C. Costa et C. Aguiar. Phytothérapie, 8(2010) 141-144.

[100] Abu-Dahab, R., Kasabri, V., Afifi, F.,Evaluation of the Volatile Oil Composition and Antiproliferative Activity of Laurus nobilis L. (Lauraceae) on Breast Cancer Cell Line Models, Record Nat. Prod, 2(2014) 136–147.

[101] Bahmanzadegan, A., Rowshan, V., Zareian, F., Alizaden, R., Bahmanzadegan, M. Seasonal Variation in Volatile Oil, Polyphenol Content and Antioxidant Activity in Extract of Laurus nobilis Grown in Iran. Journal of Pharmacy and Pharmacology 3(2015)223–231.

[102] Fidan, H., Stefanova, G., Kostova, I., Stankov, S., Damyanova, S., Stoyanova, A., Zheljazkov, V.D. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Laurus nobilis L. Essential Oils from Bulgaria. Molecules, 24(2019) 804-814.

[103] Goudjil, M., Ladjel, S., Bencheikh, S., Zighmi, S., Hamada, D.,Study of the chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil extracted from the leaves of Laurus nobilis Lauraceae from Algeria, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research71(2015) 379–385.

[104] Shokoohinna, Y., Yegdaneh, A., Amin, G., Ghannadi, A., Seasonal variations of Laurus nobilis L. leaves volatile oil component in Isfahan, Iran. Research Journal of Pharmacognosy. 1(2014) 1-6.

[105] Vasundhara, M., Gujaran, S.R., Jayaram, A., Priyanka, R., Sweet bay (Laurusnobilis L.) essential oil: astudy on its application in dentistry. World Journal of Pharmaceutical research 5(2016) 2049–2057.

[106]Simic M., Kundakovic T., Kovacevic N., Preliminary assay on the antioxidative activity of Laurus nobilis extracts. Fitoterapia, 4(2013)613–616.

[107] Zargari, U.,(in Persian),” Tehran University Press, Tehran, 4(1990) 28 – 42.

[108] Aqilikhorasani M., Collection of drugs (Materia media). Enqelab-e-Eslami Publishing and Educational Organization, Tehran (1992)624–630.

[109] Duke, J.A., La pharmacie verte : Nouvelles découvertes dans les remèdes à base de plantes pour les maladies et conditions courantes de la plus grande autorité mondiale sur les herbes médicinales. New York, NY: Rodale Press (1997),p:501.

[110] Elmastasa, M., Isildaka, O., Turkekulb, I., Temura, N., Determination ofantioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms.Journal of Food Composition and Analysis 20(2007) 337–345.

[111]Eugenio,V., Encyclopédie de médecine naturelle (Français) Relié (1976)pp822-824.

[112] Qamar S., Chaudhary F. M., Antifungal activity of some essential oils from local plants, Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, 34(1991) 30-31.

[113] Seyed M., Riaz M., Chaudhary F.M., Theantibacterial activity of the essential oil of the PakistaniAcotuscalmus, Callistemon lanceolatusandLaurusnobilis.Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research (1991) 34.

[114] Sayyah M., Valizadeh J., Kamalinejad M., Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of Laurus nobilis against pentylenetetrazole,Phytomedicine, 9(2002) 212-216.

[115] Bouchaale I., Kahalerras A., Zouaoui S.,Etude comparative de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de Laurusnobilis de deux régions (Algérie et Tunisie), Université de Guelma (2015), p :17.

[116] Gnankiné, O., Nestor Bassolé I.H., Essential Oils as an Alternative to Pyrethroids' Resistance againstAnophelesSpeciesComplex Giles (Diptera:Culicidae), Molecules 10(2017) 1321-1343.

[117] Stefanova G., Girova T., Gochev V., Stoyanova M., Petkova Z., Stoyanova A., Zheljazkov V.D., Comparative study on the chemical composition of laurel (Laurus nobilis L.) leaves from Greece and Georgia and the antibacterial activity of their essential oil. Heliyon, 6(2020) 6-12.

[118] El Malti J.,Amarouch H., Antibacterial effect, histological impact and oxidative stress studies from Laurus nobilis extract, Journal of foodquality, 32(2009) 190-208.

[119]Rincón E., Balu A.M., Luque R., Serrano L., Mechanochemical extraction of antioxidant phenolic compounds from Mediterranean and medicinal Laurus nobilis: A comparative study with other traditional and green novel techniques. IndustrialCrops and Products, 141(2019) 111845.

[120]Muñiz-Márquez D.B., Martínez-Ávila G.C., Wong-Paz J.E., Belmares-Cerda R., Rodríguez Herrera R., Aguilar C.N. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Laurus nobilis L. and their antioxidant activity. Ultrasonics Sonochemistry, 20(2013) 1149-1154.

[121] Dall'Acqua S., Cervellati R., Speroni E., Costa S., Guerra M. C., Stella L., Greco E., InnocentiG.,Phytochemical composition and antioxidant activity of Laurus nobilis L. leaf infusion. Journal of Medicinal Food, 12(2009) 869-876.

[122] Al-Hussaini R., Mahasneh A.M. Microbial growth and quorum sensing antagonist activities of herbal plants extracts, Molecules, 14(2009) 3425-3435.

[123] Gürbüz I., Üstün O., Yeşilada E., Sezik E., AkyürekN.,In vivo gastroprotective effects of five Turkish folk remedies against ethanol-induced lesions, Journal of ethnopharmacology, 83(2002) 45-47

[124] Sghirbouali H., zegrari A., Contribution à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante chez l'espèce (laurusnobilis L.), Université de Constantine, Faculté de la Science de la Nature et de la Vie, Mémoire de Master (2022), pp :20-26

[125] Bechkri C., MeslemB.,L'évaluation de l'activité anticoagulante des polysaccharides isolés de feuille de Laurusnobilis L, Université de Constantine, Faculté de la Science de la Nature et de la Vie, Mémoire de Master (2018),pp : 55-60.

[126] Rozman V., Kalinovic I., KorunicZ.,Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. Journal of StoredProductsResearch, 43(2007) 349-355.

[127]Hessas T., Simoud S., Contribution à l'étude de la composition chimique et à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Thymussp, Université de Tizi Ouzou, Mémoire de Master (2018) 50-53.

[128] Chaoui, M., Chegroune, S., Contribution à la caractérisation chimique des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales de la steppe du sud-algérois,Université de Djelfa, Mémoire de Master (2019), pp :2-5.

[129] Lamamra, M. Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de Tinguarrasicula (L.) Parl Et de Filipendulahexapetala Gibb. Université de Sétif, Mémoire de Magistère (2007), p : 20.

[130] Rahmouni, M., Contribution à l'étude de l'activité biologique et la composition chimique des huiles essentielles de deux Apiacées (FerulavesceritensisCoss et DR et BalanseaglaberrimaDesf.) Lange,Université de Sétif, Mémoire de Magistère, (2018).

[131] Lakhder L., Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur aggregatibacteractinomycetemcomitans : Etude in vitro. Université Mohamed V de Rebat, Thèse de Doctorat (2015).

[132] Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M., Chaouch A., SatraniB.,Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de Tetraclinisarticulata (Vahl) Masters, Agrosolutions20(2009) 44-48.

[133] kar F., Arslan N.; Characterization of orange peel and effect of sugars, L-ascorbic acid, ammonium persulfate,salts on viscosity of orange peel pectin solutions, Carbohydrate Polymers, 40(1999) 285-291.

[134] Haddad D., Haddji D., Contribution à l'Etude de L'Huile Essentielle de Myrtuscommunis L., Université Mouloud Mammeri, Mémoire de Master (2016) 82-90.

[135]Assosiation Française de Normalisation, Huiles essentielles, Monographies relatives aux huiles essentielles, Tome 2, 6ème Edition,Paris La Défense : AFNOR(2000), pp15-20.

[136] Kaloustian J., Hadji-Minaglou F., La connaissance des huiles essentielles qualitologie et aromathérapie, Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Paris : Edition Springer, (2012), p : 23-25.

[137]Haddadi I.,Caractérisation et valorisation de quelques populations de Laurier noble du Nord Algérien, Université de Tlemcen, Département de Biologie (2021), p : 25-42.

[138] Fernandez X, Chemat F., La chimie des huiles essentielles:Tradition et innovation. Edition Vuilbert. Paris, (2012), p : 354.

[139]Zarrour B., Etude phytochimique de quelques extraits obtenus de le plante Matricariapubescens (Astéracéas) et Evaluation de leur activité antioxydante, Université de Ourgla, Mémoire de Master, 2009.

[140]Terkmane, N., Modification et fonctionnalisation des polymères en vue de leurs applications dans des formulations aqueuses, Université de Méeéa, Thèse de doctorat : génies des procédés, 2017, p : 48.

[141] Houde, A., Kademi, A. et Leblanc, D. Lipases and their industrial applications, Applied Biochemistry and Biotechnology,118(2004), 155-170**.**

[142]Frankel,E., Tarassuk,N.,An Extraction –Titration methodFor The determination of Free Fatty Acids In arancid Milk And Cream. journal of dairy science, 26(1954) 751-763.

[143]Kembhavi, A.A., Buttle D.J., Knight C.G., BarrettA.J., The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays, Archives of Biochemistry and Biophysics, 303(1993) 208-213.

[144]Beers, R.F., Sizer, I.W., A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, Journal of Biological Chemistry, 195(1952)133–140.

[145]Kheyar N., Meridja D., Belhamel K., Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'Inulaviscosa, Salvia officinalis et Laurusnobilis de la région de Bejaia, Algerian Journal of NaturalProducts, 2(2014) 18- 26.

[146]Ouibrahim A., Tlili-Ait-kaki Y., Bennadja S., AmrouniS.,Djahoudi A., Djebar M. Evaluation of antibacterial activity of Laurus nobilis L., Rosmarinus officinalis L. and Ocimumbasilicum L. from Northeast of Algeria. African Journal of MicrobiologyResearch, 7(2013)4968-4973.

[147]Mouas Y., Benrebiha F., Chaouia C., Evaluation de l'activité antibacterienne de L'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin rosmarinusofficinalisL. Revue Agrobiologia, (2017) 363-370.

[148]Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L., Vergnes M.Etude de six huiles essentielles: Composition chimique et activité antibactérienne, Phytothérapie, 6(2008) 160–164.

[149]Ouibrahim A., Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de troisplantes aromatiques (Laurusnobilis L., Ocimum basilicum L. et Rosmarinusofficinalis L.) de l'Est Algérien. Université de Annaba, Faculté des Sciences, Thèse de Doctorat, (2015).

[150] Jean-Louis Cuq. Cours chromatographie liquide, Université Montpellier (2001), p :4.

[151] Andrey M., Vasil G.,Ivan I., Ilian B., Atanas P., Two-phase temporary immersion system for Agrobacterium rhizogenes genetic transformation of sage(Salvia tomentosa Mill.), Biotechnology Letter,33(2011)1873–1878.

[152]Ivanov I.G., Vrancheva R.Z., Marchev A.S., Petkova N.T., Aneva I.Y., Denev P.P., Georgiev V.G., Pavlov A.I., Antioxidant activities and phenolic compounds in Bulgarian *Fumaria* species, International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences,3(2014) 296-306.

[153]Halfaoui F.,Application du SIG dans la cartographie des formation végétales de la région de Tamezguida, wilaya de Médéa, Université de Blida, Mémoire de Master, (2017) pp 25-29.

[154]OuledTaarabt K., Tayeb K., AlfeddyM., Caractéristiques physicochimiques et activité antimicrobienne de l'huile essentielle du Laurusnobilis L. au Maroc, Afrique SCIENCE, 13(2017) 349-359.

[155]Ferhat Z., Houacine S.,Yessad M., Huiles essentielles de Laurusnobilis L. et de FoeniculumvulgareMill: Composition chimique et activités antimicrobienne et antioxydante, Algerian Annals of Agronomy – ex. Annales de l'Institut National Agronomique El-Harrach, 30 (2018) 19-30.

[156]Boughendjioua, H., DjeddiS.Quality Attributes of the Thyme (Thymus numidicus Poiret.) Essential Oil. Journal of Plant Sciences, 6(2018) 12-15.

[157]Hadjloum H., Ould A.T., Etude analytique et thérapeutique de l'huile essentielle de Laurusnobilis L. (Tigarsalt), Mémoire de Master, (2018) pp55-57.

[**158]** DammakaI., Hamdib Z., Kammoun S., El Euchcd., Zemnib H., Mlikib A., Mnasser H., LasrambS.,Evaluation of antifungal and anti-ochratoxigenic activities of Salvia officinalis, Lavandula dentata and Laurus nobilis essential oils and a major monoterpene constituent 1,8-cineole against Aspergillus carbonarius, Industrial Crops & Products 128(2019) 85–93.

[**159]**Morcia, C., Malnati, M., Terzi, V., In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, 29(2012) 415–422.

[160] Prakash, B., Shukla, R., Singh, P., Mishra, P.K., Dubey, N.K., Kharwar, R.N., Efficacy of chemically characterized Ocimumgratissimum L. essential oil as an antioxidant and a safe plant-based antimicrobial against fungal and aflatoxin B1 contamination of spices. Food Research, 44(2011) 385–390.

[161]Rohit, S., Yusuf, C., Uttam, C.B., Production, purification, characterization, and applications of lipases. BiotechnologyAdvances,19(2001) 627 – 662.

[162]Barros M., Fleuri L., MaedoG., Lipases de graines : sources, applications etpropriétés - une revue, Journal brésilien de génie chimique, 27(2010) 15-29.

[163]Marcio D.B., Fleuri L., Gabriela A.M., Lipases aux graines: sources, applications et propriétés - Un examen. Journal brésilien de génie chimique, 27(2010) 15-29.

[164]Hasan F., Shah A.A., Hameed A., industriel Applications ofMicrobialLipases. Enzyme andMicrobialTechnology, 39(2006)235-251.

[165]TadayukiI., AkikoT., Shinya S., KenO., IppeiH., YukoK., KojiT.,YoshimitsuM. Un test simple pour mesurer l'activité de la catalase: une approche visuelle. Rapportscientifique, 3(2013)(3081),1-4.

[166] GromadaA.,FiedurekJ. Optimization of catalase biosynthesis in submerged cultures of Aspergillus niger mutant". J. Basic Microbiol. 37 (1997) 85–91

[167] HusseinA. Purification and characterization of thermo-alkali stable catalase from Bacillus sp,J Int Res Biotechnol. 3(2012) 207-214.

[168] Youn, H.D., Yim Y.I., KimK., Hah Y.C et Kang S.O. Spectral characterization and chemical modification of catalase–peroxidase from Streptomyces sp. J. Biol. Chem. 270 ((1995) 13740–13747.

[169] AmnaM.,GuillaumeQ.,SejirC.,SandyV.,Frank V et GrahamN.Fonction de la catalase dans les plantes: un focus sur les mutants d'Arabidopsis en tant que modèles simulant le stress. Journal Of ExperimentalBotany, 61(2010), 4197 – 4220.

[170] BaezaS., Vejar N., GulppiM., AzocarM., MeloF et Monsalve, A. New evidenceon the role of catalase in Escherichia coli mediated biocorrosion. Corros. Sci.(2013) 32-67.