

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

-----  
UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE  
FILIERE : CHIMIE  
**MEMOIRE DE MASTER**  
SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE  
*THEME*

**Etude analytique et thérapeutique de l'huile essentielle de  
*Laurus nobilis L. (Tigarsalt)***

*Présenté par :*

M<sup>lle</sup> . HADJLOUM Hanane

M<sup>lle</sup> . OULD ALI Thinhinane

*Soutenu publiquement, le 08/07 / 2018, devant le Jury composé de :*

<b>M<sup>r</sup> MECHOUET</b>	<b>Mourad</b>	<b>MCA UMMTO</b>	<b>PRESIDENT.</b>
<b>M<sup>r</sup> RAHAL</b>	<b>Foudil</b>	<b>MAA UMMTO</b>	<b>EXAMINATEUR .</b>
<b>M<sup>me</sup> BELMEHDI</b>	<b>Lila</b>	<b>MAA UMMTO</b>	<b>EXAMINATRICE.</b>
<b>M<sup>r</sup> BENCHOUAK</b>	<b>Mounir</b>	<b>MAA UMMTO</b>	<b>RAPORTEUR .</b>
<b>M<sup>r</sup> ABDOUN</b>	<b>Amar</b>	<b>Pharmacien Microbiologiste</b>	<b>CO-RAPORTEUR.</b>

## Remerciement

Avant toute chose, nous remercions le Dieu tout puissant, pour nous avoir aidées à réaliser ce modeste travail.

Ce travail a été réalisé au département de Chimie, laboratoire de « Chimie Pharmaceutique », sous la direction de Monsieur **BENCHOULEK Mounir**, la partie biologique a été effectuée au niveau la faculté de médecine du laboratoire de microbiologie à la faculté de médecine, sous la direction de **Dr Abdoune Amar**.

Tout d'abord, Nous tenons à remercier du fond du cœur, notre promoteur Monsieur **BENCHOULAK Mounir**, Professeur à l'université Mouloud Mammeri de TIZI-OUZOU, de nous avoir Proposées ce thème et Pour la totale confiance qu'il nous a accordée, son soutien, ses précieux conseils, et ses encouragements qui ont permis le bon déroulement de ce travail.

Nous sommes également sensible à l'honneur que nous fait **Dr Abdoune Amar**, Pharmacien Résidant en Microbiologie à l'hôpital C.H.U de Tizi-Ouzou, en acceptant d'être le co-promoteur de ce travail, Nous aimerions lui adresser notre plus vifs remerciements pour l'attention qu'il a portée à ce mémoire, pour sa confiance, son soutien ,sa disponibilité et sa rigueur dans le travail.

Nous exprimons notre gratitude aux membres de jury, chacun a son nom, d'accepter de juger notre travail :

**M<sup>r</sup> MECHOUET Mourad**

**M<sup>me</sup> BELMAHDI Lila**

**M<sup>r</sup> RAHAL FOUJIL**

On remercie vivement les ingénieures de Laboratoire de Chimie pharmaceutique pour leur aide ainsi que pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Nous remercions **Dr Azzam Amina**, chef d'unité du Laboratoire microbiologie du C.H.U de TIZI-OUZOU , de nous avoir permis de réaliser ce travail au sein du laboratoire de la faculté de médecine et pour les moyens matériels mis à notre disposition.

Nous tenons à remercier **Mr Bensidhoum Massoud**, professeur au département de biologie de nous avoir identifié la plante à étudier à l'université de Tizi -Ouzou.

Un immense merci au personnel du laboratoire de contrôle qualité au sein des laboratoires Frater-Razes au niveau d'Alger pour l'aide qu'il nous a apportée dans la réalisation d'analyse d'huile essentielle par CPG et IR .Nous adressons notre profonde reconnaissance pour leur soutien et leur infinie gentillesse.

Enfin, nous remercions, tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

*Dédicace :*

*Je dédie ce modeste travail*

*Aux êtres les plus chères : Mes PARENTS.  
qui ont été toujours présents pour Me soutenir et m'encourager ;  
A mes chères sœurs et mon frère.*

*A toute ma famille.*

*A mon binôme et toute sa famille.*

*A tous mes amis.*

*A tous ceux qui m'ont encouragé et m'ont apporté leur soutien.*

*A tous mes camarades de la promotion 2018.*

*Hanane*

*Dédicace :*

*Je dédie ce modeste travail*

*Aux êtres les plus chères : Mes PARENTS.  
qui ont été toujours présents pour Me soutenir et m'encourager ;  
A mes chères sœurs et mon frère.*

*A toute ma famille.*

*A mon binôme et toute sa famille.*

*A tous mes amis.*

*A tous ceux qui m'ont encouragé et m'ont apporté leur soutien.*

*A tous mes camarades de la promotion 2018.*

*Thinhinane*

*Sommaire :*

*Liste des abréviations et symbole*

*Liste des figures*

*Liste des tableaux*

Introduction .....	1
<i>Partie 01 : Aperçu bibliographique</i>	
1. <i>Laurus nobilis</i> L. ....	2
1.1. Description botanique .....	2
1.1.1. Espèce <i>Laurus nobilis</i> L. ....	2
1.1.2. Position systématique du laurier noble .....	2
1.2. Répartition géographique de laurier noble .....	3
1.3. Morphologie de laurier .....	3
1.4. Composition chimique.....	4
1.5. Usage et propriétés thérapeutiques .....	4
2. Huiles essentielles .....	4
2.1. Définition de l'huile essentielle .....	4
2.2. Localisation de l'huile essentielle .....	5
2.3. Propriétés physiques et composition chimique des huiles essentielles .....	5
2.4. Critères de qualité des huiles essentielle .....	5
2.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles .....	7
2.5.1. Méthodes d'extraction validées par la pharmacopée .....	7
2.5.1.1. Hydrodistillation .....	7
2.5.1.2. Expression à froid des huiles essentielles .....	8
2.5.1.3. Distillation sèche des huiles essentielles .....	8
2.5.2. Autres méthodes .....	8
2.5.2.1. Méthodes traditionnelles .....	8
2.5.2.2. Méthodes industrielles .....	8
2.6. Toxicité et précaution d'emploi des huiles essentielles .....	9
3. Etude analytique et thérapeutique .....	9
3.1. Contrôles physico-chimiques .....	9
3.1.1. Indice d'acide (I <sub>A</sub> ) .....	9
3.1.2. Indice d'ester (I <sub>E</sub> ) .....	9
3.1.3. Indice de peroxyde (I <sub>P</sub> ) .....	10

3.1.4. Indice de saponification .....	10
3.1.5. Densité relative .....	10
3.1.6. Indice de réfraction .....	10
3.1.7. Miscibilité à l'éthanol .....	10
3.1.8. Détermination de pH.....	10
3.2. Analyse chromatographique en phase gazeuse .....	10
3.3. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge .....	11
3.4. Activité thérapeutique .....	11
3.4.1. Activité antibactérienne .....	11
3.4.2. Activité antioxydante .....	12

### *Partie 02 : Matériels et méthodes*

1. Préparation du matériel végétal .....	13
2. Contrôle de la matière première (perte à la dessiccation) .....	13
3. Méthode d'extraction de l'huile essentielle .....	13
3.1. Planification des expériences.....	14
3.1.1. Réponse étudiée .....	14
3.2. Décantation .....	15
3.3. Evaporation du solvant organique .....	16
4. Etude analytique de l'huile essentielle de <i>Laurus nobilis L.</i> .....	16
4.1. Caractérisation organoleptique de l'huile essentielle .....	16
4.2. Caractérisation physico-chimique .....	16
4.2.1. Potentiel hydrogène .....	16
4.2.2. Densité relative .....	16
4.2.3. Indice de réfraction .....	17
4.2.4. Miscibilité à l'éthanol .....	17
4.2.5. Indice d'acide .....	17
4.2.6. Indice de peroxyde .....	18
4.3. Analyse chromatographie phase gazeuse (CPG) .....	18
4.4. Analyse spectrométrie infrarouge .....	19
5. Activités thérapeutiques .....	19
5.1. Activité antibactérienne .....	19
5.1.1. Les souches bactériennes utilisées .....	19
5.1.2. Purification et identification des souches utilisées .....	20

5.1.3. Méthodes d'étude du pouvoir antibactérien de l'HE de <i>Laurus nobilis L.</i> .....	21
5.1.3.1. Méthode qualitative (la méthode de diffusion en milieu solide) .....	22
5.1.3.2. Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de <i>Laurus nobilis L.</i> .....	23
5.2. Evaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de <i>Laurus nobilis L.</i> .....	23
5.2.1. Test du piégeage du radical libre DPPH• .....	23
5.2.2. Réduction du fer .....	24

### *Partie 03 : Résultats et discussions*

1. Contrôle de la matière première (perte à la dessiccation) .....	25
2. Analyse des résultats du rendement .....	25
2.1. Validation du modèle .....	26
2.2. Analyse de la variance .....	26
2.3. Estimation des coefficients .....	27
2.4. Modèle mathématique retenu .....	27
2.5. Optimisation du rendement en huile essentielle .....	27
3. Etude analytique .....	28
3.1. Caractères Organoleptiques .....	28
3.2. Caractérisation physicochimique .....	29
3.2.1. Détermination du potentiel hydrogène .....	29
3.2.2. Densité relative .....	29
3.2.3. Indice de réfraction .....	29
3.2.4. Miscibilité à l'éthanol .....	30
3.2.5. Indice d'acide .....	30
3.2.6. Indice de peroxyde .....	30
3.3. Résultat de l'analyse chromatographique .....	31
3.4. Résultat de la spectroscopie infrarouge .....	32
4. Evaluation de l'activité thérapeutique de l'huile essentielle de <i>Laurus nobilis L.</i> .....	33
4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne .....	33
4.1.1. Purification et identification des souches bactériennes utilisées .....	33
4.1.2. Aromatogramme .....	34
4.1.3. Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne de l'huile de <i>Laurus nobilis L.</i> .....	35
4.2. Activité antioxydante.....	36

4.2.1. Activité anti radicalaire .....	37
4.2.2. Pouvoir réducteur .....	38
Conclusion .....	39

*Bibliographie*

*Glossaire*

*Annexes*

*Résumé*

*Liste des abréviations et symbole :*

**AFNOR** : Association Française de Normalisation.

**BGN** : Bacilles gram négatives.

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**CMB** : Concentration minimale bactéricide.

**CMF** : Concentration minimale fongicide.

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.

**CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse.

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone.

**D** : Diamètre.

***E.coli*** : *Escherichia coli*

**EOA** : Espèce oxygénée activée.

**F<sub>obs</sub>** : F observé

**F<sub>crit</sub>** : F critique

**g** : Gramme

**h** : Heure

**H.E** : Huile essentielle

**I<sub>A</sub>** : Indice d'acide

**I<sub>E</sub>** : Indice d'ester

**Ip** : Indice de peroxyde

**Is** : Indice de saponification

**IR** : Infrarouge.

**ISO** : International Organisation for Standardisation

**I%** : Pourcentage d'inhibition

**min** : Minute

**mm** : Millimètre

**mg** : Milligramme

**M-H** : Mueller Hinton

***P.aeruginosa*** : *Pseudomonas aeruginosa*

**pH** : Potentiel hydrogène.

**R<sub>HE</sub>** : Rendement en huile essentielle.

**rpm** : Tours par minute.

**RSM** : Méthodologie des surfaces de réponses.

***S.aureus*** : *Staphylococcus aureus*

**Tem** : Température

**T<sub>H</sub>** : Teneur en eau.

**Tr** : Temps de rétention

**(T+)** : Témoins positif

**(T-)** : Témoin négatif

**UFC** : Unité Formant Colonie.

**UMMTO** : Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou

**UV** : Ultra-violet.

**V** : Volume.

**°C** : Degré Celsius.

**%** : Pourcentage

**[*n*]<sub>D</sub>** : Indice de réfraction

## *Liste des figures :*

Figure 1 : Répartition géographique de <i>Laurus nobilis</i> L. ....	3
Figure 2 : Montage de l'hydrodistillation. ....	14
Figure 3 : Teneur en eau de la plante séchée.....	25
Figure 4 : Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées du rendement. ....	26
Figure 5 : pH de l'HE <i>Laurus nobilis</i> L. ....	29
Figure 6 : Profil chromatographique de l'huile essentielle des feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L. ...	31
Figure 7 : Pourcentages des composés majoritaires en fonction des temps de rétentions. ....	31
Figure 8 : Spectre IR de l'huile essentielle de <i>Laurus nobilis</i> L. ....	32
Figure 9 : Résultats galerie API E20. ....	34
Figure 10 : Efficacité de l'huile essentielle à piéger le radical libre en fonction des différentes concentrations.....	37
Figure 11 : Résultats du test pouvoir réducteur.....	38

## *Liste des tableaux :*

Tableau 1 : Position systématique du laurier noble. ....	2
Tableau 2 : Morphologie de <i>Laurus nobilis</i> L. ....	3
Tableau 3 : Avantages et inconvénients de l'hydrodistillation. ....	7
Tableau 4 : Niveaux des facteurs de l'hydrodistillation. ....	14
Tableau 5 : Planification des expériences. ....	15
Tableau 6 : Souches bactériennes et fongique utilisées pour les tests. ....	19
Tableau 7 : Différentes concentration d'HE dans la gélose. ....	23
Tableau 8 : Résultats des rendements. ....	25
Tableau 9 : Tableau de l'analyse de la variance. ....	27
Tableau 10 : Estimation des coefficients. ....	27
Tableau 11 : Optimum. ....	28
Tableau 12 : Caractères organoleptiques. ....	28
Tableau 13: Résultats de l'analyse IR de l'HE <i>Laurus nobilis</i> L. ....	33
Tableau 14 : Résultats du repiquage. ....	33
Tableau 15 : Résultats des tests complémentaires (voir annexe IV). ....	33
Tableau 16 : Résultats galerie API E20 (voir annexe IV). ....	34
Tableau 17 : Résultats de la galerie classique pour <i>E.coli</i> et <i>P.aeruginosa</i> . ....	34
Tableau 18 : Résultats de l'Aromatogramme. ....	34
Tableau 19 : Sensibilité des souches microbiennes en fonction de la zone d'inhibition [34]. ....	35
Tableau 20 : Résultats de la CMI. ....	35
Tableau 21 : Résultats CMB et CMF. ....	36
Tableau 22 : Résultats rapport CMB/CMI et CMF/CMI. ....	36

# *Introduction*

## Introduction

---

L'Algérie possède une richesse non négligeable en plantes aromatiques et médicinales qui est susceptible d'être utilisée dans différents domaines tels qu'en pharmacie, parfumerie, cosmétique et en agro-alimentaire et ce pour leurs propriétés thérapeutiques et odorantes.

A l'heure actuelle, plusieurs travaux ont envisagé l'utilisation des composés bioactifs comme alternatifs aux multiples substances synthétiques. En effet, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques, également la toxicité des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs, sont à l'origine de l'engouement suscité pour les plantes caractérisées par leurs propriétés biologiques.

L'objectif de notre travail est l'étude de la composition chimique, l'activité antibactérienne, antifongique et antioxydante d'une plante aromatique et médicinale *Laurus nobilis L.*

Notre manuscrit sera scindé en trois parties :

Dans la première partie une recherche bibliographique consacrée à une description de la plante *Laurus nobilis L.* et l'étude des huiles essentielles d'une manière générale suivie de l'étude analytique et thérapeutique.

La deuxième partie représente la partie expérimentale qui porte sur l'extraction et l'amélioration du rendement en huile essentielle en utilisant les plans d'expériences comme outil mathématique, la détermination de ses propriétés physico-chimiques, l'analyse chromatographique et spectroscopique de l'essence extraite ainsi que l'étude de ses activités antibactérienne, antifongique et antioxydante.

Les résultats et la discussion de chaque expérimentation de notre travail, sont présentés dans la troisième partie qui lui est dédiée.

Pour terminer, une conclusion générale sur l'ensemble de cette étude ainsi que les perspectives dégagées.

*Partie 01*  
*Aperçu bibliographique*

## 1. *Laurus nobilis* L.

### 1.1. Description botanique

La famille des lauracées comprend près de 2500 – 3000 espèces regroupées en environ 52 genres. Cette famille est presque présente dans toutes les parties du monde, avec une forte concentration dans les zones subtropicales et dans les régions tempérées. Et parmi ces espèces le laurier noble (*Laurus nobilis* L.) [1].

#### 1.1.1. Espèce *Laurus nobilis* L.

Le laurier noble 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 [2].

#### 1.1.2. Position systématique du laurier noble

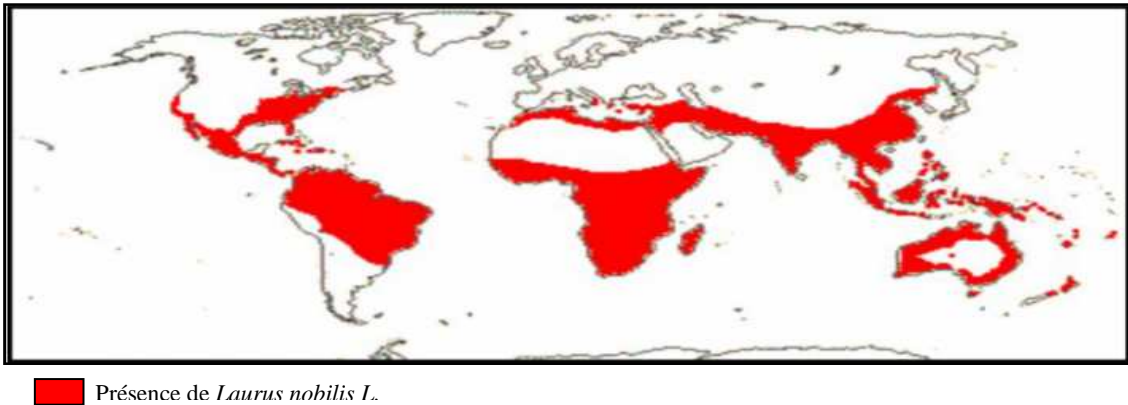
Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure regroupée dans le tableau 1 [3].

**Tableau 1 : Position systématique du laurier noble.**

<b>Règne</b>	Végétale
<b>Sous règne</b>	Plante vasculaire
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Décotylédones
<b>Sous classe</b>	Magnoliidae
<b>Ordre</b>	Lurales
<b>Famille</b>	Lauracées
<b>Genre</b>	<i>Laurus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Nobilis</i>

### 1.2. Répartition géographique de *Laurus nobilis* L.

*Laurus nobilis* L. est la seule espèce des lauracées dans la région méditerranéenne d'où elle est originaire. Actuellement, la plante est largement cultivée comme plante ornementale et pour la production commerciale dans beaucoup de pays tels que l'Algérie, la Turquie, la France, la Grèce, le Maroc, l'Amérique centrale et les Etats-Unis [4].






**Figure 1 : Répartition géographique de *Laurus nobilis* L.**

### 1.3. Morphologie du le laurier

Le tableau ci-dessous résume la morphologie de *Laurus nobilis* L. [6].

**Tableau 2 : Morphologie de *Laurus nobilis* L.**

Parties de la plante	Morphologie
Les feuilles 	persistantes, alternes, allongées à lancéolées, d'environ 10 cm de long sur 3 à 5 cm de large, si la feuille a une couleur brun-vert, il est trop âgés et amer, sans arôme. La feuille a une saveur forte, épicé, amer, piquant et de refroidissement nuances.
Les fleurs 	petites odorantes en forme d'étoile à la fin du printemps de couleur blanchâtre à jaune, les fleurs sont groupées à l'aisselle des feuilles en petits bouquets en forme d'ombelles axillaires ou en courtes panicules
Les fruits 	fruits ou baies de laurier (baies globuleuse, drupe aromatique charnue) ressembler à une petite olive avec la forme ovale ou ellipsoïde. Les fruits sont de couleur verte au début et violets au noir profond à maturité (Septembre). Les fruits secs sont drupacés, ovoïdes, d'environ 15 mm à 2 cm de long et 10 mm de large.

## **1.4. Composition chimique**

Selon une recherche faite par BELOUED Abd alkadar les feuilles de *Laurus nobilis L.* contiennent du tanin, un principe amer, du mucilage, des matières résineuses et pectiques, et une essence aromatique incolore ou jaune pâle, à saveur chaude, constituée par un mélange de 45% de cinéol, de méthylchavicol, de pinène, d'eugénol, de géraniol, de linacol, d'éthers des acides acétiques isobutyrique et valérianiques [5].

## **1.5. Usage et propriétés thérapeutiques**

*Laurus nobilis L.* est une plante médicinale utilisée en raison de ses propriétés pharmacologiques et ses avantages potentiels pour la santé liés à plusieurs composés présents dans la plante.

Les feuilles et les fruits du laurier noble sont stimulants, carminatifs, stomachiques, emménagogues et péculaires ; ils servent d'aromate dans les cuisines. La décoction de feuilles à la dose de 20g par litre d'eau est utile contre les bronchites chroniques, l'hydropisie, les fermentations intestinales, l'insomnie ...

Les baies, s'emploient toujours à l'état sec, jouissent des mêmes propriétés que les feuilles mais avec plus d'énergie. Pour l'usage externe, on emploie les feuilles pour des bains aromatiques antirhumatismaux, en gargarisme et bains de bouche contre les angines, infections bucco-pharyngées, en compresses sur les fronts contre la sinusite.

L'huile essentielle de laurier noble est utilisée en friction comme stimulant local, sur les foulures, les engorgements indolents des articulations, sur les hémorroïdes, les douleurs rhumatismales. L'huile de laurier s'emploie en liquostrie, en parfumerie, dans la fabrication des savons. Elle compte parmi les meilleurs moyens d'éloignement des insectes gênants [5].

## **2. Huiles essentielles**

### **2.1. Définition de l'huile essentielle**

Selon la Commission de la pharmacopée Européenne l'huile essentielle est : « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu 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 » [7].

## **2.2. Localisation de l'huile essentielle**

Selon plusieurs chercheurs, les huiles essentielles ne peuvent être extraites que à partir des végétaux supérieurs réparties sur 60 familles comme par exemples : les Lamiacées (thym, menthe) ; les Myrtacées (le myrte) ; les Lauracées (cannelle).

Les HEs se trouvent dans tous les organes de la plante : feuilles, fleurs, racines, graines, écorces, bois. La composition de l'HE (qualitative et quantitative) peut varier selon sa localisation dans la plante [8,9].

## **2.3. Propriétés physiques et composition chimique des huiles essentielles**

Liquides à température ambiante, les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Solubles dans les solvants organiques usuels, elles sont liposolubles [9].

Les HEs ont une structure chimique très complexe dotées de nombreuses propriétés thérapeutiques et pharmacologiques. Outre que les substances actives, les HEs contiennent des hydrocarbures mono et polyterpéniques ou des composés oxygénés solubles dans l'eau et l'alcool. Ces composés oxygénés déterminent principalement l'odeur et la saveur des HEs [10].

## **2.4. Critères de qualité des huiles essentielles**

Selon plusieurs recherches, six critères doivent être pris en considération pour évaluer la qualité des huiles essentielles :

- **L'espèce botanique**

La certification botanique doit apparaître selon la nomenclature internationale sous son nom latin précisant le genre, l'espèce et la sous-espèce [11].

- **L'organe producteur**

Selon la partie de la plante distillée, il peut exister plusieurs huiles essentielles pour la même plante avec des compositions chimiques et des activités différentes [11].

- **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 [11].

- **Le mode de culture**

Il définit si la plante est cultivée ou sauvage [11].

- **Le chémotype**

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.

Une huile essentielle peut contenir de vingt-cinq à cent molécules biochimiques différentes. Ce qui explique la polyvalence d'action des huiles essentielles [11].

- **Le mode d'extraction**

Le choix de la méthode d'extraction dépend essentiellement de la drogue végétale, de son état, de ses caractéristiques. Ce choix conditionne un grand nombre de caractéristiques de l'huile essentielle: sa viscosité, sa couleur, sa solubilité, sa volatilité mais aussi son enrichissement ou son appauvrissement en certains constituants [11].

## **2.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles**

Le procédé d'extraction est basé sur la différence de solubilité des composés d'un mélange dans un solvant. Le mélange peut être solide ou liquide et le solvant liquide ou fluide supercritique [12].

Selon la neuvième édition de la pharmacopée européenne et les normes AFNOR NF T 75-006 seule l'hydrodistillation, la distillation sèche, les procédés mécaniques sans chauffage peuvent produire des huiles essentielles.

### **2.5.1. Méthodes d'extraction validées par la pharmacopée**

#### **2.5.1.1. Hydrodistillation**

L'hydrodistillation constitue le procédé d'extraction le plus anciens et aussi une des plus simple. Aujourd'hui, c'est une méthode normée, pour l'extraction des huiles essentielles. Elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans l'eau qui est ensuite porté à ébullition. Le chauffage permet de former de la vapeur d'eau qui détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. Le courant de vapeur ainsi crée permet l'entraînement d'un mélange hétérogène d'eau et de molécules organiques. Les principaux composés volatils ne se dissolvent pas dans l'eau et l'HE peut être séparée par décantation après refroidissement [13].

Cette technique d'extraction présente plusieurs avantages et inconvénients (voir tableau 2) [14].

**Tableau 3 : Avantages et inconvénients de l'hydrodistillation.**

Avantages	Inconvénients
Simplicité de mise en œuvre	Procédé lent il peut durer jusqu'à 30h pour certaines plantes. [9]
Faible cout	Méthode ne s'applique qu'à une plus petite échelle que d'autres techniques.
Assure la pénétration de l'eau en cœur de la plante, là où la vapeur d'eau utilisée dans d'autres méthodes, ne peut pénétrer et augmenter le rendement	Dénaturation de quelque constituants de HE thermo ou hydro sensibles.

### **2.5.1.2. Expression à froid des huiles essentielles**

C'est une méthode au cours de laquelle des tissus végétaux très riches en HE sont compressés pour en extraire l'HE. Ce procédé est principalement utilisé pour isoler les HEs à partir des épicarpes (zeste frais) des fruits de Citrus. Cette opération peut se faire à la main ou après scarifications mécaniques [13].

### **2.5.1.3. Distillation sèche des huiles essentielles**

Cette technique, très peu utilisée, consiste en un chauffage doux de la matière première, sans eau ni solvant organique. Les substances volatiles sont ensuite condensées et récupérées [14].

## **2.5.2. Autres méthodes**

L'encyclopédie des huiles essentielles classe les méthodes d'extraction à l'exception des méthodes validées par la pharmacopée, en méthodes traditionnelles et méthodes industrielles.

### **2.5.2.1. Méthodes traditionnelles**

- **Enfleurage**

C'est une technique d'extraction utilisée pour extraire l'huile essentielle de fleurs très délicates comme la rose, la tubéreuse, le jasmin qui ne peuvent pas supporter les hautes températures de l'extraction à la vapeur [10].

- **Coobation**

Il s'agit de la distillation d'un hydrolat (extrait d'une plante aromatique provenant de la distillation) que l'on fait passer à travers la même plante pour la seconde ou la troisième fois selon la méthode classique de la distillation, afin qu'elle s'imprègne toujours plus de l'huile essentielle [10].

### **2.5.2.2. Méthodes industrielles :**

- **Extraction par solvants chimiques**

Consiste à dissoudre la substance contenant l'huile essentielle dans un solvant chimique comme l'alcool, l'hexane, l'éther de pétrole....

Le principal problème de cette méthode c'est qu'à la fin il peut rester des impuretés provenant des solvants et des résidus toxiques contenus dans les végétaux [10].

- **Extraction au CO<sub>2</sub> supercritique**

Est une méthode très moderne qui n'est pas très développée car elle est très coûteuse. le solvant utilisé est le CO<sub>2</sub> qui est d'origine naturelle en phase supercritique. Lorsqu'il est supercritique le CO<sub>2</sub> n'est ni liquide, ni gazeux, ce qui lui confère un excellent pouvoir d'extraction [10].

## **2.6. Toxicité des huiles essentielles**

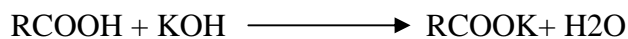
Les études scientifiques montrent que les huiles essentielles peuvent présenter une certaine toxicité. Il faut cependant remarquer que celle-ci varie selon la voie d'exposition et la dose prise. Les huiles essentielles semblent n'être toxiques par ingestion que si celle-ci est faite en de grandes quantités et en dehors du cadre classique d'utilisation. Les huiles ne seront toxiques par contact que si des concentrations importantes sont appliquées [15].

## **3. Etude analytique et thérapeutique**

### **3.1. Contrôles physico-chimiques**

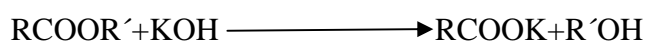
#### **3.1.1. Indice d'acide (I<sub>A</sub>)**

L'indice d'acide est défini comme le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides contenus dans un gramme d'huile essentielle, selon la réaction [16] :



#### **3.1.2. Indice d'ester (I<sub>E</sub>)**

Correspond au nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour saponifier les esters contenus dans un gramme d'HE, selon la réaction [16] :



### **3.1.3. Indice de peroxyde ( $I_p$ )**

C'est un indicateur du degré d'oxydation des huiles essentielles. Il correspond au nombre de milliéquivalents de peroxyde par kilogramme d'échantillon [16].

### **3.1.4. Indice de saponification ( $I_s$ )**

Est défini comme le nombre de KOH nécessaire pour neutraliser l'acide libre et saponifier à chaud les esters de 1g de lipide [16].

### **3.1.5. 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 [16].

### **3.1.6. 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 [17].

### **3.1.7. Miscibilité à l'éthanol**

Une huile essentielle est dite miscible à V volume et plus de l'éthanol de titre alcalimétrique déterminé à la température de 20°C, lorsque le mélange de 1 volume de l'huile essentielle avec V volumes de cet éthanol est limpide, et le reste après addition graduelle d'éthanol de même titre jusqu'à un total de 20 volumes [9].

### **3.1.8. Détermination de pH**

Le potentiel hydrogène mesure l'activité chimique des ions hydrogènes  $H^+$  en solution [8].

## **3.2. Analyse chromatographique en phase gazeuse**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation chromatographique reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et un gaz vecteur, comme phase mobile, qui traverse cette phase stationnaire. Elle est applicable aux substances, ou

dérivés de substances, qui se volatilisent dans les conditions de température utilisées. La CPG est fondée sur les mécanismes d'adsorption, de distribution de masse ou d'exclusion. Un chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois principales parties : l'injecteur, la colonne, le détecteur [7].

### **3.3. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge**

La spectrophotométrie IR est généralement considérée comme une méthode autosuffisante pour vérifier l'identité des substances organiques non ionisées autres que les sels d'acides ou des bases organiques. Cette méthode nécessite toujours l'utilisation d'une substance de référence ou d'un spectre de référence [7].

### **3.4. Activité thérapeutique**

#### **3.4.1. Activité antibactérienne**

L'activité antibactérienne d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) ou ceux susceptible d'être actif. Mais il est probable que cette activité dépend aussi de composés minoritaires qui agissent d'une manière synergique [18].

- **Mode d'action antimicrobienne et antifongique des huiles essentielles**

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire. Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions ( $K^+$ ) [19].

L'action antifongique des huiles essentielles est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure. En effet, les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les

aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures [20].

### **3.4.2. Activité antioxydante**

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}\bullet$ ) et superoxydes ( $\text{O}\bullet_2$ ) [21].

- **Antioxydants**

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 chaîne 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 de radicaux libres [12].

- **Radicaux libres**

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante en contenant un ou plusieurs électrons célibataire. Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé [22].

- **Stress oxydant**

Correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières. Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des EOA dans notre organisme [23].

*Partie 02*  
*Matériels et méthode*

## **1. Préparation du matériel végétal**

L'échantillonnage a été fait à la période de floraison, dans une région propre, loin de tout impact de pollution. Les feuilles de *Laurus nobilis L.* ont été récoltées à une altitude de 1400m au village d'Ait Allaoua appartient à l'Atlas tellien qui se situe sur le versant nord du Parc National du Djurdjura au mois de mars 2018.

L'identification de l'espèce végétale est réalisée au laboratoire de botanique du département de biologie à l'université de Tizi-Ouzou.

Le matériel végétal recueilli a été séché à une température ambiante et à l'ombre, afin de préserver au maximum l'intégrité de leurs molécules.

Les feuilles ont été conservées jusqu'au moment de l'utilisation à l'abri de la lumière et de l'humidité.

La matière séchée a été broyée dans un broyeur électrique. Au préalable la plante entière a été concassée.

## **2. Contrôle de la matière première (perte à la dessiccation)**

Afin d'assurer la qualité de la drogue végétale, celle-ci a été soumise au test d'humidité : on pèse 1g de la matière végétale dans un verre de montre puis on dessèche dans l'étuve à 103 °C durant 02h par la suite on calcule la perte en masse selon la formule suivante [6] :

$$T_H = \frac{P_f - P_s}{P_f} * 100$$

Avec :

$P_f$ : Poids frais de l'échantillon (g)

$P_s$ : Poids sec de l'échantillon (g).

## **3. Méthode d'extraction de l'huile essentielle**

L'extraction de l'huile essentielle de *Laurus nobilis L.* a été réalisée par hydrodistillation simple au laboratoire chimie pharmaceutique du département de chimie à l'université de Tizi-Ouzou. Le dispositif de l'hydrodistillation est représenté dans la figure 2.

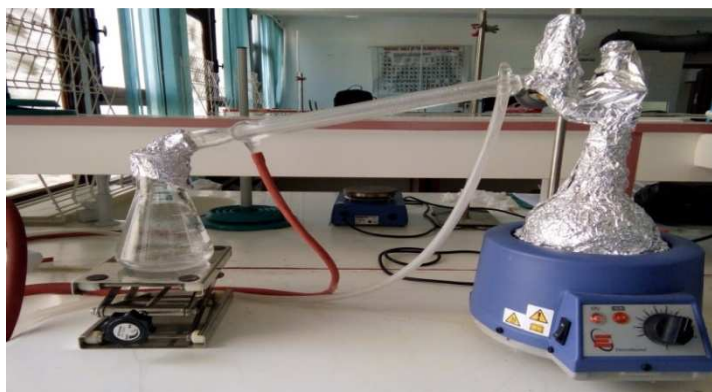


Figure 2 : Montage de l'hydrodistillation.

### 3.1. Planification des expériences

Dans le but d'améliorer le rendement en l'huile essentielle de *Laurus nobilis L.* par hydrodistillation, une étude par plan surface de réponse du type Box – Behnken a été menée. La méthodologie des surfaces de réponses (RSM) permet d'établir un modèle de régression polynomiale d'ordre 2.

Dans ce travail nous avons choisi le plan de Box-Behnken. L'étude d'optimisation a été menée sur les facteurs jugés influents par l'étude de criblage menée par Fadil et al. [25] à savoir le temps de l'hydrodistillation, le rapport eau/matière végétale et la température de chauffage.

Les trois facteurs jugés susceptibles d'affecter l'opération d'hydrodistillation sont tous des facteurs quantitatifs et qui peuvent adopter toutes les valeurs numériques réelles dans l'intervalle choisi, nous avons fait référence aux études de Fadil et al. [26] et Haj Ammar et al. [27] pour déterminer les domaines de variations selon le tableau ci-dessous :

Tableau 4 : Niveaux des facteurs de l'hydrodistillation.

Facteurs	Minimum	Moyen	Maximum
Température (°C)	250	300	350
Temps (min)	150	180	210
Rapport eau/matière végétale (ml/g)	4	6	8

#### 3.1.1. Réponse étudié

La réponse étudiée est le rendement en huile essentielle qui se traduit par l'expression [26] :

$$R_{HE} = \frac{M_{HE}}{M_S} * 100$$

Avec :

$R_{HE}$ : Rendement en huile essentielle (%);

$M_{HE}$ : Masse de l'huile essentielle (g);

$M_S$ : Masse de la matière végétale sèche (g).

Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs donné par le logiciel MODDE 6.0 est composé de quinze essais dont trois au centre du domaine (essais 13, 14 et 15) est représenté ci-après (tableau5).

**Tableau 5 : Planification des expériences.**

N°	Température (°C)	Temps (min)	Rapport(ml/g)
1	250	150	6
2	350	150	6
3	250	210	6
4	350	210	6
5	250	180	4
6	350	180	4
7	250	180	8
8	350	180	8
9	300	150	4
10	300	210	4
11	300	150	8
12	300	210	8
13	300	180	6
14	300	180	6
15	300	180	6

### **3.2. Décantation**

Le distillat obtenu a été introduit dans une ampoule à décanter en ajoutant un solvant organique (éther de pétrole). La phase organique qui contient l'huile essentielle a été récupérée après agitation et dégazage.

Le choix du solvant organique a été fait en se basant sur les études déjà faites sur l'huile essentielle de *Laurus nobilis L.* [6].

### **3.3. Evaporation du solvant organique**

L'élimination du solvant organique a été faite à l'aide d'un évaporateur rotatif du type HEIDOLPH à une température entre 40°C et 60°C comme a été mentionné sur le flacon contenant le solvant.

L'huile essentielle de *Laurus nobilis L.* a été récupérée dans des petits tubes appropriés et conservée à 4°C et à l'abri de la lumière [28].

## **4. Etude analytique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis L.***

### **4.1. Caractérisation organoleptique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis L.***

Les critères organoleptiques sont définis comme les caractéristiques perceptibles par les organes des sens [29]. Ces critères sont : Odeur, Couleur, Aspect.

### **4.2. Caractérisation physico-chimique**

Ces tests ont été réalisés au niveau du laboratoire de Chimie Pharmaceutique du département de Chimie à l'UMMTO.

#### **4.2.1. Potentiel hydrogène (pH)**

Cette mesure a été effectuée à l'aide du papier pH.

#### **4.2.2. Densité relative**

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 rempli d'eau distillée. Après essuyage, on le remplit avec l'HE et on note leurs poids exacts. La densité de l'huile essentielle est calculée par la formule [9] :

$$d = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Avec :

$m_0$  : Masse du pycnomètre vide (g)

$m_1$  : Masse du pycnomètre rempli d'eau distillé (g)

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

### 4.2.3. Indice de réfraction

A l'aide du refractomètre d'Abbe, on mesure l'indice de réfraction de l'HE à une température de 21°C (indiquée par le thermomètre intégré de l'appareil). Pour cela, on place une goutte d'HE sur le prisme du refractomètre, puis on effectue le réglage à l'aide de la micro visse et on lit la valeur.

L'indice de réfraction de l'huile essentielle est donné par la formule [4] :

$$[n]_D^{\circ} = n_D t' + 0,00045(t' - t)$$

Avec :

$n_D t'$  : Indice de réfraction mesuré.

$t$  : Température de référence qui est à 20°C.

$t'$  : Température au moment de la mesure.

### 4.2.4. Miscibilité à l'éthanol

Dans une éprouvette de 25ml, On introduit 1ml de l'huile essentielle à examiner. Puis on la porte à 20°C. A l'aide d'une burette de 20ml, on ajoute par fractions de 0,1ml l'alcool à (96°) jusqu'à dissolution complète, puis on continue à ajouter le solvant par fractions de 0,5ml jusqu'à 20ml, en agitant fréquemment et énergiquement. On note le volume  $n$  d'alcool utilisé lorsqu'une solution limpide a été obtenue, si la solution devient trouble ou opalescente avant que le volume ajouté  $n$  atteigne 20ml, on note le volume  $n_1$  utilisé au moment de l'apparition du trouble ou de l'opalescence [7].

### 4.2.5. Indice d'acide

On introduit 1g d'HE dans une fiole où on ajoute 5mL d'éthanol et environ 5 gouttes de phénolphaléine, puis on agite et on titre avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (KOH) 0,1N. La couleur jaune clair du liquide (la couleur d'HE) vire à la neutralisation vers une couleur rose. Le volume de KOH qui a servi à la neutralisation est lu directement sur la burette. L'indice d'acide est exprimé par la formule [4] :

$$IA = \frac{56,11 * N * V}{m}$$

Avec :

N : normalité de KOH.

V : volume en ml de la solution éthanolique de KOH utilisé pour le titrage.

*m*: Masse en grammes de l'huile essentielle.

#### **4.2.6. Indice de peroxyde**

Dans un erlenmeyer, on introduit 1g de l'huile à examiner. On ajoute 30ml d'un mélange de 2 volumes de chloroforme et de 3 volumes d'acide acétique. On agite jusqu'à dissolution de l'échantillon et on ajoute 1ml de solution saturée d'iodure de potassium. On agite pendant exactement 1min, puis on ajoute 30ml d'eau. On titre par le thiosulfate de sodium 0,01M ajouté lentement, sans cesser d'agiter énergiquement, jusqu'à ce que la coloration jaune ait presque disparu. On ajoute quelques gouttes d'empois d'amidon. On continue le titrage en agitant énergiquement jusqu'à disparition de la coloration. On effectue un essai à blanc dans les mêmes conditions [17]. L'indice de peroxyde est calculé par :

$$I_p = \frac{10(n_1 - n_2)}{m}$$

Avec :

*m*: Masse de la prise d'essai (g) ;

*n*<sub>1</sub>: Volume de thiosulfate de sodium 0,01 M (ml) ;

*n*<sub>2</sub>: Volume de thiosulfate de sodium 0,01 M de l'essai à blanc (ml).

#### **4.3. Analyse chromatographie phase gazeuse (CPG) de *Laurus nobilis* L.**

Afin d'identifier les principaux constituants chimiques de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. on a effectué une analyse par la technique chromatographique en phase gazeuse (CPG) au niveau des laboratoires contrôle qualité FRATER-RAZES. L'échantillon d'HE a été soumis à l'analyse chromatographique en utilisant un appareil du type CG7890B (Agilent Technologies) avec un détecteur du type FID. La colonne capillaire était du type 50% Phenyl Polysilphenylene-siloxane de 30m de longueur, diamètre de 0,25mm. Le débit du gaz porteur (hélium) était de 1ml/ min. 0,2µl d'huile essentielle a été injecté, en utilisant le mode split. La

température de la colonne a été maintenue à 35°C pendant 5 minutes puis augmentée de 6°C par minute jusqu'à 250°C.

#### **4.4. Analyse spectrométrie infrarouge de l'huile essentielle de *Laurus nobilis L***

Afin de mettre en évidence les groupements fonctionnels constitutifs de l'HE testée, on a eu recours à la spectrophotométrie à infrarouge qui est une méthode d'analyse rapide, simple et précise. Ce test a été réalisé au niveau du laboratoire contrôle qualité FRATER-RAZES.

L'appareil utilisé est le spectrophotomètre à transformé de Fourier du type SHIMADZU piloté par le logiciel « LabSolutions » qui fournit un spectre. Pour cela on dépose une goutte d'HE sur le compartiment échantillon après l'avoir bien essuyé et on lance le logiciel pour avoir les spectres d'absorption.

### **5. Activités thérapeutiques**

#### **5.1. L'activité antibactérienne**

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis L.* et ce par deux méthodes : qualitativement par la méthode de diffusion en milieu solide, et quantitativement par la méthode de dilution en milieu solide qui vise à déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

##### **5.1.1. Les souches bactériennes utilisées**

Les souches bactériennes sur lesquelles on a testé l'activité de l'huile essentielle, sont des lots de l'ATCC (American Type Culture Collection), et la levure provient d'un prélèvement clinique elles proviennent du laboratoire de Microbiologie de l'hôpital Nadir Mohammad C.H.U. de Tizi-Ouzou.

**Tableau 6 : Souches bactériennes et fongique utilisées pour les tests.**

Bactéries / levure	Références	Familles
<i>Escherichia coli</i>	ATTC 25922	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATTC 27853	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATTC 25923	<i>Staphylococcaceae</i>
<i>Candida sp</i>	Prélèvement clinique	<i>Saccharomycetaceae</i>

### **5.1.2. Purification et identification des souches utilisées**

Les souches bactériennes utilisées sont déjà identifiées et référencées. Nous avons tenu à vérifier leurs puretés par les tests suivantes :

#### **Etape 01 : le repiquage**

On cultive les souches microbiennes à tester dans des boites de pétrie contenant de la gélose nutritive, et leurs milieux sélectifs comme suite : milieu HEKTOEN pour BGN et milieu CHAPMAN pour le *Staphylococcus aureus* et sabouraud pour la levure et on les incube pendant 24h à 37°C afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées.

#### **Etape 02 : examen macroscopique**

Cet examen vise à déterminer la couleur, la forme et l'aspect des colonies [30].

#### **Etape 03 : examen microscopique**

Il peut être effectué sans coloration de l'échantillon par observation directe (examen à l'état frais), ou bien après coloration de l'échantillon (coloration de Gram).

L'examen à l'état frais consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne à l'objectif 40 à l'aide d'un microscope optique. Il nous renseigne principalement sur la mobilité des bactéries [31].

L'examen après coloration de Gram permet de distinguer deux types de bactéries : les bactéries Gram négatif (coloration rose) et les bactéries Gram positif (coloration violette). [30] il permet notamment l'observation du mode de regroupement et la forme de cellules bactériennes [17]. (Voir Annexe I)

#### **Etape 04 : examens complémentaires**

- **Recherche de la catalase**

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en  $H_2O$  et  $1/2 O_2$ . Une colonie est mise en suspension avec une goutte d'eau oxygénée sur une lame propre. L'apparition de bulles qui correspond à l'oxygène dégagé indique la présence d'une catalase [32].

- **Recherche de l'oxydase**

Le disque d'oxydase est déposé sur une lame propre. Une colonie est prélevée à partir du milieu gélose nutritive à l'aide d'une pipette pasteur puis déposé sur le disque. En présence de l'oxydase la coloration violet foncé apparaît immédiatement ou en quelques secondes [32].

- **Test de la Coagulase**

La coagulase libre est présente chez *S. aureus*. La détection de cette coagulase s'effectue en ajoutant dans un tube à hémolyse 0.5ml de plasma du lapin et 0.5ml d'une culture *S.aureus* de 24h en bouillon .la lecture s'effectue après 2h, 4h et 24h.Un test positif se traduit par la formation d'un coagulum [31].

### **Etape 05 : identification des bactéries a Gram négatif**

L'identification des souches à Gram négatif a porté sur une série de tests biochimiques. Les tests biochimiques ayant servi à l'identification sont :

- **Galerie API E20**

On a utilisé une plaque API E20 de 20 microtubes permettant de réaliser des tests biochimiques afin d'identifier des bacilles Gram <sup>-</sup> appartenant à la famille des entérobactéries.

- **Test des TSI (Trois Sucres à identifier)**

La souche à étudier est ensemencé sur le milieu TSI, il est incubé à 37°C pendant 24heures. Ce test permet la mise en évidence de la fermentation du glucose, du lactose et du saccharose, la réaction est dite positive si le milieu devient jaune orange [32].

- **Test de Simmons**

Ce test permet la mise en évidence du citrate perméase : enzyme permettant à la souche l'utilisation du citrate comme seule source de carbone ; après incubation à 37°C pendant 24heures, l'utilisation du citrate se traduit par la libération des ions « OH<sup>-</sup> », qui alcalinisent le milieu en se traduisant par une couleur bleue après le virage du vert de bromothymol [32].

### **5.1.3. Méthodes d'étude du pouvoir antibactérien de l'HE de *Laurus nobilis L.***

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Laurus nobilis L.* nous avons utilisé deux méthodes : la méthode de diffusion en milieu solide, et la méthode de dilution en milieu solide.

### **5.1.3.1. Méthode qualitative (la méthode de diffusion en milieu solide)**

La méthode de diffusion sur gélose ou l'aromatogramme est une méthode qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque imprégné d'huile essentielle [18]. Nous avons utilisé la méthode d'aromatogramme pour mentionner la sensibilité ou la résistance du microorganisme vis-à-vis de l'HE testée.

#### **Etape 01 : 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  $10^7$  à  $10^8$  UFC/ml selon Mc Ferland. La standardisation se fait avec spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620nm [33].

#### **Etape 02 : Aromatogramme**

Cette méthode est préconisée par [18,34], consiste à tester la sensibilité des souches bactériennes par la diffusion de l'extrait sur le milieu solide dans une boîte de Pétri, avec la création d'un gradient de concentration entre le composé et le microorganisme cible [35].

Dans des boîtes de Pétri, le milieu de culture gélosé Mueller Hinton en surfusion a été coulé aseptiquement à raison de 20ml par boîte. Après la 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 boîte à environ  $60^\circ$  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 disques stériles de 6mm de papier Whatman n°2 imprégnés de 10 $\mu$ l de l'HE. On dépose des disques d'antibiotiques comme témoins positives. Et des disques imprégnés d'eau physiologique comme témoins négatives. On incube à température ambiante pendant 20min, ensuite dans une étuve à 37 °C /24h.

#### **Etape 03 : Lecture**

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

### 5.1.3.2. Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Laurus nobilis L.*

Cette évaluation 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.

- **Détermination de la CMI**

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en extrait pour laquelle, aucune croissance visible à l'œil nu n'est observée [36]. Cette technique consiste à disperser l'HE 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 20ml dans chaque boîte de pétri (voir tableau 7). Après solidification du milieu, l'ensemencement a été exécuté par des spots à l'aide d'une micropipette. L'ensemble a été incubé 24h à 37°C [35]. L'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

Tableau 7 : Différentes concentration d'HE dans la gélose.

Quantité HE	1ml	0.5ml	0.25ml	0.125ml
Quantité gélose	19ml	19.5ml	19.75ml	19.875ml

- **Détermination de CMB /CMF**

La CMB /CMF est la plus faible concentration d'HE laissant après 16 à 24 heures d'incubation un pourcentage de survivants  $\leq 0,01$  % de l'inoculum de départ [31].

On dépose un disque sur les spots préalablement déposés et qui ne présente pas de croissance bactérienne ou fongique puis on le transfère sur un milieu gélosé M-H neuf pour confirmer s'il s'agit d'un effet fongistatique ou fongicide sur les levures et d'un effet bactériostatique ou bactéricide sur les bactéries.

### 5.2. Evaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Laurus nobilis L.*

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'HE *Laurus nobilis L.* in vitro a été déterminée à travers deux méthodes : test du piégeage du radical libre DPPH• et réduction du fer.

#### 5.2.1. Test du piégeage du radical libre DPPH•

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'effet scavenger de l'huile essentielle de la plante contre le radical DPPH• consiste à introduire 2ml d'huile essentielle à différentes concentrations diluées dans l'éthanol et 2ml de la solution DPPH• préparée à 0,006% dans

l'éthanol. Après 30min d'incubation à l'obscurité, la lecture de l'absorbance à 517nm; le mélange de 2ml de la solution de DPPH• et de 2ml d'éthanol est pris comme témoin.

Le taux réduit du DPPH par ces molécules est exprimé en pourcentage suivant la formule suivante [37] :

$$I\% = \left( A_0 - A_e / A_0 \right) * 100$$

Avec :

$A_0$  : Absorbance du témoin ;

$A_e$  : Absorbance de l'échantillon.

### **5.2.2. Réduction du fer**

On détermine le pouvoir réducteur selon la méthode d'Oyaizu , elle est basée sur la réduction de l'ion ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en ion ferreux ( $Fe^{2+}$ ). Cette réaction se manifeste par l'apparition d'une coloration verte dont l'intensité est proportionnelle au potentiel réducteur. On mélange l'huile essentielle diluée dans l'éthanol (1ml) avec 2,5ml de la solution tampon phosphate (0,2M, pH 6,6) et 2,5ml de ferricyanure de potassium ( $(K_3Fe(CN)_6)$  à 1%). On incube l'ensemble à 50° C pendant 20min. Ensuite, on ajoute 2,5ml d'acide trichloroacétique (TCA) (10%) au mélange, le tout centrifugé pendant 10min à 3000rpm. On additionne l'eau distillée (2,5ml) et le chlorure ferrique ( $FeCl_3$ ) (0,5ml à 0,1%) à 2,5ml du surnageant. On mesure l'absorbance mesurée à 700 nm contre un blanc (en remplaçant le volume de l'HE par l'éthanol) [37].

*Partie 03*  
*Résultats et discussions*

### 1. Contrôle de la matière première (perte a la dessiccation)

La masse de la plante avant séchage : 1,11g

La masse de la plante après séchage : 1,02g

Le taux d'humidité : 8,1%

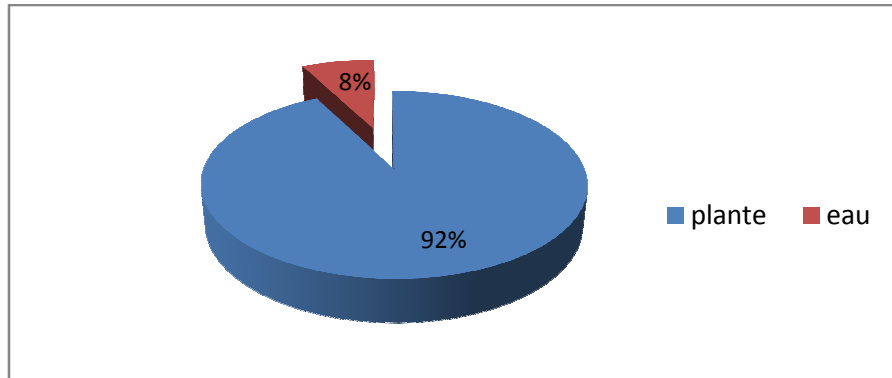


Figure 3 : Teneur en eau de la plante séchée.

### Discussion

Les résultats montrent que la poudre des feuilles de *Laurus nobilis L.* ont perdu 8% de leurs poids massiques lors de la dessiccation. Le résultat est inférieur à 10%, d'où on peut déduire que ce résultat est conforme aux normes exigées par la pharmacopée européenne [6].

### 2. Analyse des résultats du rendement

Tableau 8 : Résultats des rendements.

N°	Température (°C)	Temps (min)	Rapport (ml/g)	Rendement (%)
1	250	150	6	0,51
2	350	150	6	0,62
3	250	210	6	0,57
4	350	210	6	0,73
5	250	180	4	0,42
6	350	180	4	0,6
7	250	180	8	0,55
8	350	180	8	0,65
9	300	150	4	0,48
10	300	210	4	0,54
11	300	150	8	0,53
12	300	210	8	0,61
13	300	180	6	0,68
14	300	180	6	0,66
15	300	180	6	0,72

D'après les résultats (tableau 8) obtenus par le plan réalisé, le rendement varie de 0,42% à 0,73%, ce qui indique l'influence des paramètres optimisés qui sont la température, le temps et le rapport eau / matière végétale, ces résultats sont en accord avec les études réalisées par [25, 26,27], qui confirme l'influence des paramètres optimisés sur le rendement.

### 2.1. Validation du modèle

Selon Goupy, le  $R^2$  est un paramètre qui nous indique la validité du modèle étudié [24], le coefficient de détermination de ce modèle est égal à 0,978, et la valeur du coefficient de détermination ajustée est de  $R^2$  ajustée 0,938. Les résultats obtenus confirment que les valeurs réelles et les valeurs prédites sont corrélées. Cette corrélation peut être aussi illustrée en traçant les réponses mesurées, en fonction des réponses estimées. Ceci est donné par la figure 4, qui montre une forte corrélation entre celles-ci. D'après cette figure, les points sont répartis autour de la droite de régression. Le modèle peut donc être jugé de qualité suffisante, puisqu'il y a 97,8% de chance qu'il explique effectivement les variations mesurées de la réponse. Le modèle rend bien compte du phénomène étudié.

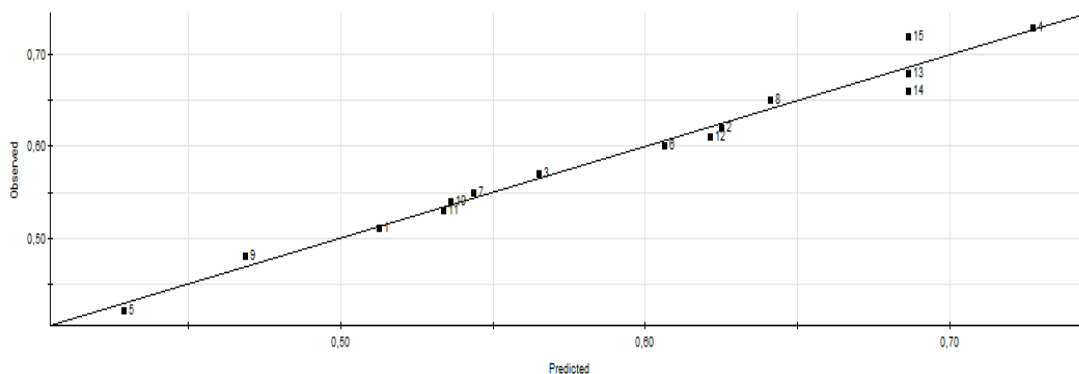


Figure 4 : Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées du rendement.

### 2.2. Analyse de la variance

Les résultats affichés dans le tableau de l'analyse de la variance (Tableau 9) indiquent que l'effet principal de la régression est significatif puisque la probabilité de la signification du risque p-value est inférieure à 0,05. Bien évidemment, la valeur de  $F_{obs}$  (24,4666) a montré qu'il est 5 fois supérieur à la valeur de  $F(0,05 ; 9, 5)$  au niveau de confiance de 95% qui est égale à 4,77. Comme règle pratique, le modèle est statistiquement significatif si la valeur de  $F$  calculée est au moins de trois à cinq fois plus grande que la valeur théorique [24].

**Tableau 9 : Tableau de l'analyse de la variance.**

	Somme des carrés	DDL	Carré moyen	F observé	F critique	P- value
Régression	0,107531	9	0,0119479	24,4666	4,772	<b>0,001</b>
Résidus	0,00244167	5	0,000488334			
Total	0,109972	14	0,00785518			

### 2.3. Estimation des coefficients

D'après le tableau ci-dessous, les coefficients statistiquement significatifs sont :

- La constante  $b_0$  ;
- Les termes linéaires  $b_1, b_2, b_3$  ;
- Les termes quadratiques  $b_{11}, b_{22}, b_{44}$  ;
- Les termes d'interaction  $b_{12}, b_{13}, b_{23}$ .

Ces facteurs ont tous des valeurs de p-value inférieures à 0,05.

**Tableau 10 : Estimation des coefficients.**

	coefficient	Estimation des coefficients	Erreur standard	p-value
<b>Constante</b>	b0	0,686667	0,0127584	4,18752e-008
<b>Temperature</b>	b1	0,06875	0,00781292	0,000314568
<b>Temps</b>	b2	0,03875	0,00781292	0,00424913
<b>Rapport</b>	b3	0,0375	0,00781292	0,00488478
<b>Température*temperature</b>	b11	-0,0320834	0,0115003	0,0384547
<b>Temps*temps</b>	b22	-0,0470833	0,0115003	0,00940904
<b>Rapport *rapport</b>	b33	-0,0995833	0,0115003	0,000339455
<b>Température*temps</b>	b12	0,0124999	0,0110491	<b>0,309252</b>
<b>Température*rapport</b>	b13	-0,02	0,0110491	<b>0,130056</b>
<b>Temps*rapport</b>	b23	0,00500003	0,0110491	<b>0,669848</b>

### 2.4. Modèle mathématique retenu

Le modèle mathématique retenu est donné par l'équation suivante :

$$Y=0,686667+0,06875X_1+0,03875X_2+0,0375X_3-0,0320834X_1^2-0,0470833X_2^2-0,0995833X_3^2.$$

### 2.5. Optimisation du rendement en huile essentielle

Les conditions optimales proposées pour le modèle, ainsi que la valeur prédite de l'activité du rendement, sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 11 : Optimum.**

	<b>Température (°C)</b>	<b>Temps (min)</b>	<b>Rapport (ml/g)</b>	<b>Rendement (%)</b>
1	350	195,46	4,8	0,6893
2	250	156	7,6	0,5138
3	340,002	195,666	6,2499	0,7352
4	349,915	196,517	6,2031	0,7383
5	310	193,273	6,3564	0,7114
6	349,985	196,496	6,4001	0,7373
7	349,945	195,739	6,2189	0,7383
8	349,99	196,339	6,4	0,7373

Après optimisation, le logiciel MODDE 6.0 a donné les optimums présentés dans le tableau ci-dessus.


La 7<sup>ème</sup> proposition a donné le meilleur rendement de 0,7383%, faute de temps et de manque de matière première cette valeur n'a pas pu être confirmée. Le rendement énoncé par la littérature pour *Laurus nobilis L.* varie de 0,63 à 0,7% [6]. En réalisant le plan d'expérience relatif à cette plante, nous avons remarqué que l'obtention d'un rendement qui dépasse 0,73% est possible ce qui montre l'intérêt de cette étude.

### 3. Etude analytique

#### 3.1. Caractères Organoleptiques

L'huile essentielle de la plante étudiée est très aromatique. Elle est liquide et d'une couleur jaune clair. Les caractères organoleptiques sont rapportés dans le tableau 12.

**Tableau 12 : Caractères organoleptiques.**

<b>Le caractère</b>	<b>HE de <i>Laurus nobilis L.</i></b>	
<b>Odeur</b>	Forte épicée	
<b>Couleur</b>	Jaune claire	
<b>Aspect</b>	Liquide mobile	

#### Discussion

Selon Afnor (2000), les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, elles sont plus ou moins colorées [4].

### 3.2. Caractérisation physico-chimique

#### 3.2.1. Détermination du potentiel hydrogène (pH)

Le résultat montre que le pH de notre huile essentielle est compris entre 6-6,5.

##### Discussion

Selon les normes AFNOR, le pH des HEs est compris entre 5-6,5 et nôtre huile est conforme à cette exigence [4].



Figure 5 : pH de l'HE *Laurus nobilis L.*

#### 3.2.2. Densité relative

Masse pycnomètre vide : 9,8689g

Masse pycnomètre + eau : 14,9121g

Masse pycnomètre + huile : 14,4693g

Densité d'HE : 0,9121

##### Discussion

Selon AFNOR (2000), la densité des HEs est en général inférieure à celle de l'eau. Notre résultat est proche de ceux trouvé par d'autres auteurs : 0,924 et 0,915 pour la même huile essentielle [4,6].

#### 3.2. 3. Indice de réfraction

$n_D t'$  : Indice de réfraction mesuré : 1,49045

$t'$  : Température au moment de la mesure : 21°C

$[n]_D^\circ$  : Indice de réfraction : 1,4909

##### Discussion

L'indice de réfraction de notre huile essentielle est de 1,4909. Il est normatif selon les standards français des huiles essentielles. Cet indice dépend de la composition chimique qui augmente en fonction des longueurs des chaînes d'acides, de leurs degrés d'insaturation et de la température [4].

### **3.2.4. Miscibilité à l'éthanol**

Après l'ajout de l'alcool 96° par fraction de 0,1ml puis 0,5ml la solution reste limpide jusqu'à 20ml. Donc notre huile est soluble dans n ml d'éthanol avec n compris entre 0 ml et 20ml.

#### **Discussion**

La bonne miscibilité des HEs montre la possibilité de l'utiliser dans les préparations pharmaceutiques [9].

### **3.2.5. Indice d'acide**

Volume de KOH utilisé : 0,2 ml

Indice d'acide : 1,12

#### **Discussion**

L'indice d'acide indique d'une part le degré de conservation d'une huile, et d'une autre part la qualité d'huile alimentaire [4] ; la norme pharmacopée a fixé cet indice à une valeur inférieure ou égale à 2, l'indice de notre huile est conforme à cette norme.

### **3.2.6. Indice de peroxyde**

Volume à blanc : 0,1ml

Volume de l'essai : 2,2ml

L'indice de peroxyde : 21

#### **Discussion**

La mauvaise conservation d'une HE induit son vieillissement par la formation de peroxydes toxiques et instables. Le "Code of Practice" de l'IFRA (International Fragrance Association), 38ème Amendement recommande que l'indice de peroxyde ne doit pas dépasser 20mEqO<sub>2</sub>/L [17], donc l'indice trouvé est proche des normes.

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape primordiale mais non suffisante pour caractériser les huiles essentielles. Il est donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques, et spectrophotométrie.

### 3.3. Résultat de l'analyse chromatographique

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis L.* a permis d'identifier 56 composés à des temps de retentions (tr) allant de 3 à 40min qui nous a permis d'identifier 8 composés majoritaires selon leurs pourcentages. Les résultats obtenus lors de cette analyse CPG sont représenté dans le chromatogramme ci-dessous (voir figure 7)

Résultats :

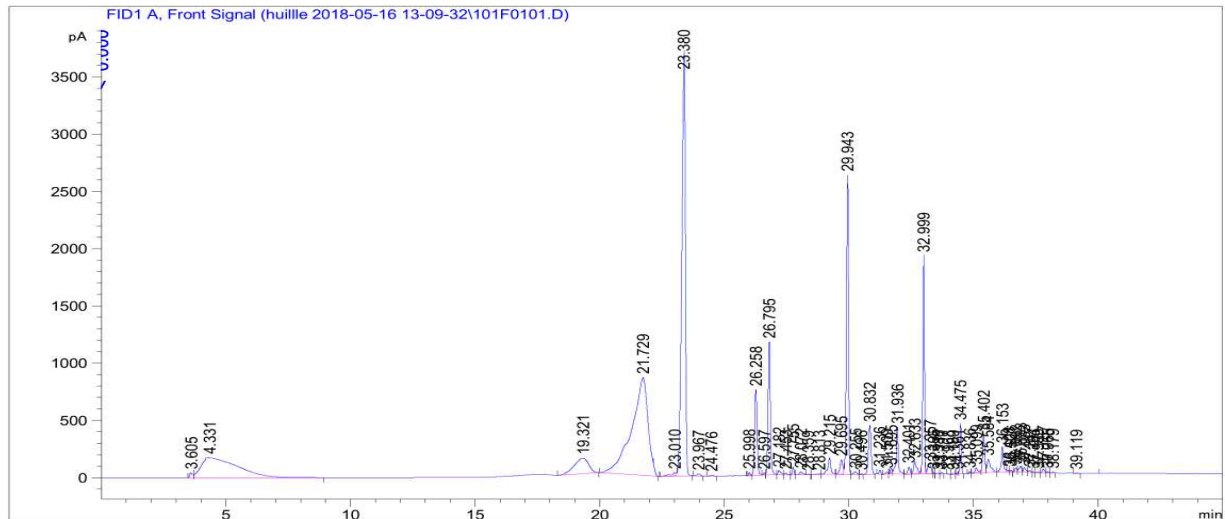


Figure 6 : Profil chromatographique de l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis L.*

Les pourcentages des composés majoritaires ainsi que leurs temps de rétentions sont représentés dans le graphe suivant :

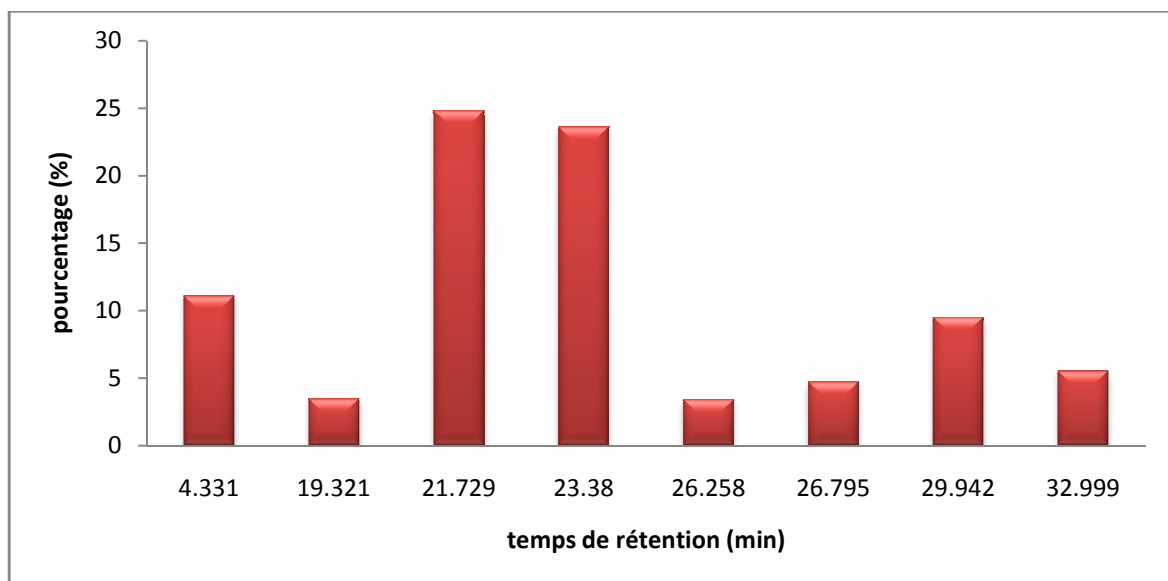


Figure 7 : Pourcentages des composés majoritaires en fonction des temps de rétentions.

## Discussion

D'après les résultats obtenus (voir figure 7), on constate que l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis L.* est constituée de huit composés majoritaires qui représentent 86% de la composition générale. Les chercheurs ont rapporté que qualitativement les huiles essentielles de *Laurus nobilis L.* provenant de 3 pays nord africains, l'Algérie, le Maroc et la Tunisie, ont des compositions chimiques proches et que les composés majoritaires communs sont le 1,8-cinéole et le linalool [38].

De ce fait on suppose que les deux composés majoritaires sont 1,8-cinéole et le linalool qui correspondent probablement aux pourcentages les plus élevés sur le chromatogramme (24,82% et 23,60%).

Il est toutefois à signaler que la composition chimique des huiles essentielles d'une plante dépend de plusieurs facteurs tels que : l'origine géographique, la période de récolte, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage et la méthode d'extraction [4].

### 3.4. Résultat de la spectroscopie infrarouge

L'observation générale de ce spectre permet de remarquer la présence d'un nombre relativement important de bandes d'absorption, révélant une structure d'un produit assez complexe. Les structures chimiques qui sont à l'origine de ces absorptions seront déterminées à partir du tableau de l'annexe III. Les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous.

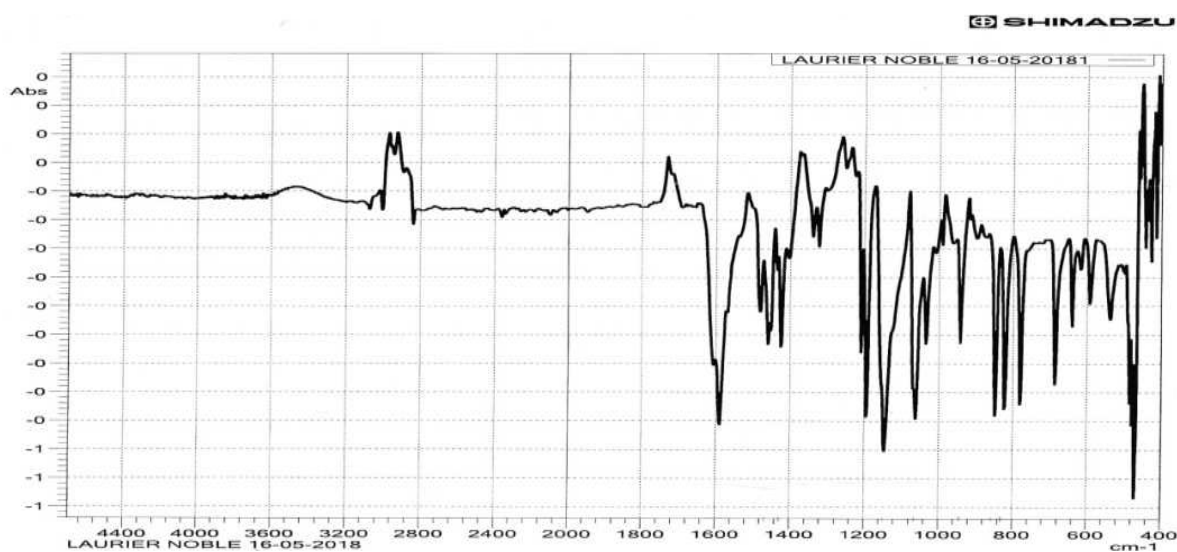


Figure 8 : Spectre IR de l'huile essentielle de *Laurus nobilis L.*

Tableau 13: Résultats de l'analyse IR de l'HE *Laurus nobilis L.*

Fréquences (cm <sup>-1</sup> )	Groupements
[3500 ; 3000]	C=C-H des alcènes, =C-H des composés aromatiques -O-H des alcools
[1600 ; 1400]	-CH <sub>2</sub> alcanes -C=C alcènes, aromatique -OH alcools / phénols, acides
[1300;1000]	-C-O éthers, acides , alcools
] 1000 ; 700]	hydrogènes libres et adjacent

Les résultats précédents montrent que l'HE étudiée renferme probablement les groupements suivants : alcools, alcanes, alcènes, aromatique, éthers et acides.

#### 4. Evaluation de l'activité thérapeutique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis L.*

##### 4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne

##### 4.1.1. Purification et identification des souches bactériennes utilisées

- **Résultats du repiquage**

Les résultats du repiquage et l'aspect micro et macroscopique sont présentés dans le tableau suivant (les figures des différents résultats sont regroupées dans l'annexe IV) :

Tableau 14 : Résultats du repiquage.

Les bactéries	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>Candida sp</i>
Aspect Macroscopique	Colonies rondes lisse	Colonies fines vertes	Colonies grandes rondes régulières Bombées lisses brillantes entourée d'une auréole jaune	Colonies blanchâtre, crémeuses, brillantes
Aspect Microscopique	Mobile, coccobacilles, Gram <sup>-</sup>	Très mobile, bacilles fines Gram <sup>-</sup>	Immobile, cocci en aman, Gram <sup>+</sup>	

- **Résultats des tests complémentaires**

Tableau 15 : Résultats des tests complémentaires (voir annexe IV).

	E.coli	p.aeruginosa	S.aureus
Catalase	+	+	+
Oxydase	-	+	-
Coagulase			+

• **Résultat de la galerie API E20 pour *E.coli***

Tableau 16 : Résultats galerie API E20 (voir annexe IV).

ON PG	A D H	L D C	O D C	C IT	H <sub>2</sub> S	U R E	T D A	IN D	V P	G E L	G L U	M A N	IN O	S O R	R H A	S A C	AM EL	A N Y	A R A
+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+



Figure 9 : Résultats galerie API E20.

• **Résultats de la galerie classique pour *E.coli* et *P.aeruginosa***

Les résultats de la galerie classique sont présentés comme suite :

Tableau 17 : Résultats de la galerie classique pour *E.coli* et *P.aeruginosa*.

	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
TSI	Glu + Sac + Lac +	Glu - Sac - Lac -
Test de citrate de Simmons	-	+/-

**4.1.2. Aromatogramme**

Tableau 18 : Résultats de l'Aromatogramme.

<i>P.aeruginosa</i> D(HE) :13mm D(T <sup>+</sup> ) :20 mm	<i>S.aurieus</i> D(HE) :20mm D(T <sup>+</sup> ) :32mm	<i>E.coli</i> D(HE) :17mm D(T <sup>+</sup> ) : 25mm	<i>Candida sp</i> D(HE) :23mm

**Discussion**

Après mesure des diamètres des différentes souches vis-à-vis de l'huile testée, nous constatons que l'efficacité de cet huile diffère d'une bactérie à une autre. *Pseudomonas*

*aeruginosa* est la plus résistante, cependant, *Staphylococcus aureus* est la plus sensible à l'huile testée selon le tableau cité par Mouas et al. (Voir tableau 19). Nos résultats sont en accord avec la littérature selon laquelle les bactéries à Gram positif montrent la plus grande sensibilité vis-à-vis l'huile essentielle [18,39].

Il est probable que ce résultat soit dû à une différence dans la capacité de pénétration des composés actifs présents dans les huiles essentielles. Chez les bactéries à Gram négatif, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace ; le lipopolysaccharide, grâce à ses charges négatives de surface empêche la diffusion des molécules hydrophobes. Les bactéries à Gram positif sont moins protégées contre les agents antibactériens [18].

La levure (*candida sp*) s'est révélée sensible vis-à-vis de l'huile testée avec un diamètre d'inhibition de 23 mm. Ce résultat est en accord avec la littérature [4,6].

**Tableau 19 : Sensibilité des souches microbiennes en fonction de la zone d'inhibition [34].**

Le diameter	Sensibilité du germe
<8 mm	Résistant
9-14mm	Sensible
15-19mm	Très sensible
>20mm	Extrêmement sensible

#### 4.1.3. Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne de l'huile de *Laurus nobilis L.*

- **Lecture de la CMI**

**Tableau 20 : Résultats de la CMI.**

La concentration (%)	5%	2,5%	1,25%	0,625%
<b>Bacilles Gram negative</b>				
<i>E.coli</i>	-	-	- (CMI)	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+
<b>Gram positif</b>				
<i>S.aureus</i>	-	-	- (CMI)	+
<b>Levure</b>				
<i>Candida sp</i>	-	- (CMI)	+	+
- absence de colonies			+ presence des colonies	

L'huile essentielle des feuilles du *Laurus nobilis L.* a exercé une activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries et de la levure testées, sauf les souches *Pseudomonas aeruginosa* qui se révèle résistantes, et cela malgré l'utilisation d'une concentration de 5%. *Staphylococcus aureus* et

*Escherichia coli* ont été inhibé à partir de la concentration minimale de 1,25%. La levure a montré une sensibilité à l'huile essentielle à partir d'une concentration de 2,5%.

- **Lecture de la CMB et la CMF**

**Tableau 21 : Résultats CMB et CMF.**

La concentration (%)	5%	2,5%	1,25%
<i>E.coli</i>	-	-	- (CMB)
<i>S.aureus</i>	-	-	- (CMB)
<i>Candida sp</i>	-	- (CMF)	

- **Calcul de rapport CMB/CMI et CMF/CMI**

Les résultats de la nature de l'activité sont regroupés dans ce tableau :

**Tableau 22 : Résultats rapport CMB/CMI et CMF/CMI.**

	CMB/CMI et CMF/CMI	Interprétation
<i>E.coli</i>	1	Bactéricide
<i>S.aureus</i>	1	Bactéricide
<i>Candida sp</i>	1	Fongicide

D'après le tableau 22, nous pouvons dire que notre huile essentielle testée a un pouvoir bactéricide et fongicide sur la plus part des souches testées sauf *Pseudomonas aeruginosa*, Ce comportement n'est pas surprenant car les souches de *Pseudomonas aeruginosa* possèdent une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides, associée à la nature de sa membrane externe. Cette barrière a une capacité de synthétiser et sécréter des agrégats structurés appelés biofilms. Ces biofilms forment une barrière physique contre l'entrée d'agents antimicrobiens et elle secrète aussi un complexe enzymatique extracellulaire qui peut dégrader les huiles essentielles [18].

#### **4.2. Activité antioxydante**

Dans la présente étude, deux méthodes complémentaires ont été utilisées afin de d'évaluer l'activité antioxydante de notre huile essentielle : le piégeage du radical libre DPPH• et la réduction du fer.

#### 4.2.1. Activité antiradicalaire

Les résultats ont montré que notre huile essentielle réduit le radical libre DPPH•. La figure suivante éclaire l'efficacité de l'huile essentielle à piéger les radicaux libres traduits par le taux d'inhibition (I %) en fonction des différentes concentrations.

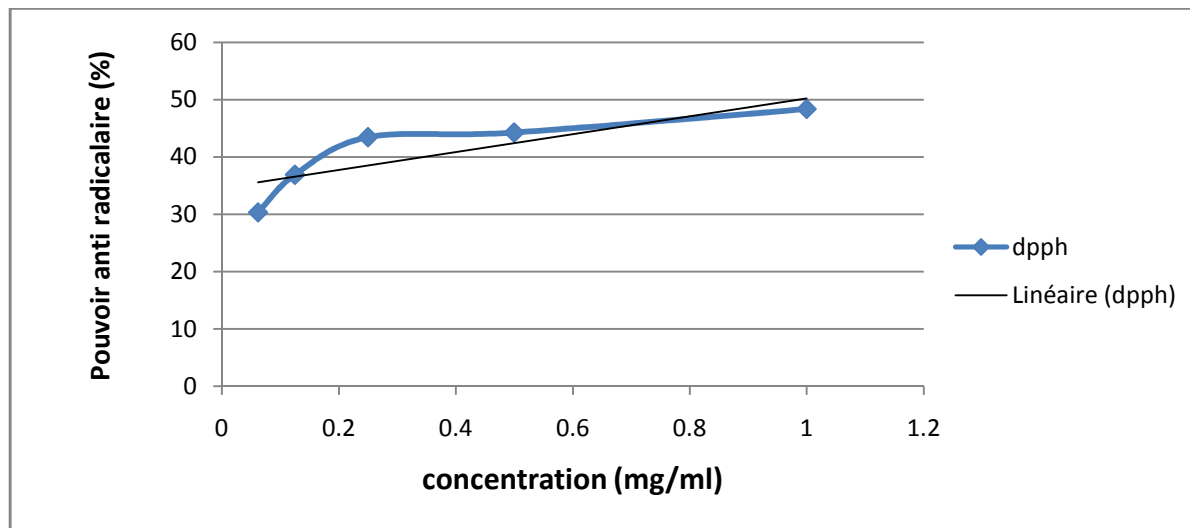


Figure 10 : Efficacité de l'huile essentielle à piéger le radical libre en fonction des différentes concentrations.

#### Discussion

Le pourcentage d'inhibition augmente avec la concentration. A partir de la courbe ci-dessus la valeur d'IC<sub>50</sub> est représentative de l'efficacité de l'huile essentielle à piéger le radical DPPH•; elle correspond à la concentration d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu. Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est faible, plus l'activité antiradicalaire d'un composé est appréciable. IC<sub>50</sub> de notre huile est déterminé à partir de la courbe linéaire d'IC<sub>50</sub> (voir figure 10) par extrapolation. La valeur d'IC<sub>50</sub> de notre huile a été estimée à 1,01 mg/ml. Le modeste résultat de l'activité antiradicalaire qu'a présenté le laurier est compatible avec ceux trouvés par GOUDJIL et OUIBRAHIM [4,36].

#### 4.2.2. Pouvoir réducteur du fer

Les résultats de l'activité réductrice de l'huile essentielle sont représentés dans la figure

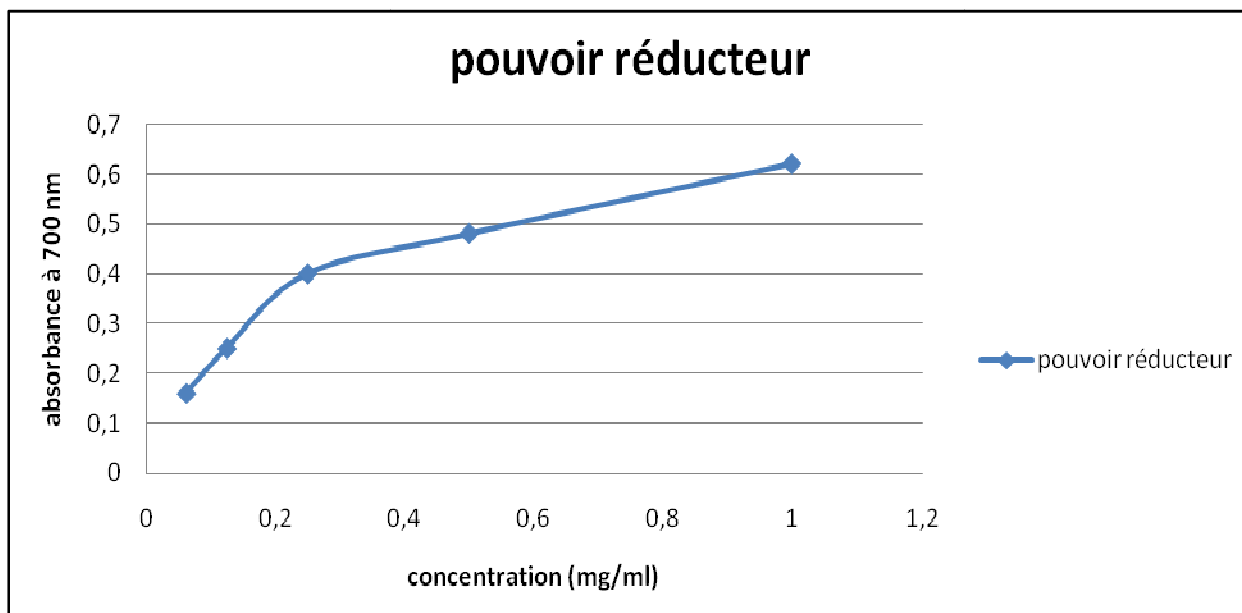


Figure 11 : Résultats du test pouvoir réducteur.

#### Discussion

L'activité réductrice des huiles essentielles consiste à déterminer la capacité des HEs à apporter des électrons. Les antioxydants réducteurs déclenchent la transformation de l'ion ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en ion ferreux ( $Fe^{2+}$ ) présent dans le complexe  $K_3Fe(CN)_6$  fournissant des électrons. Le pouvoir réducteur de l'huile essentielle a été évalué et représenté par les absorbances notées (voir figure 11), on a enregistré une absorbance de 0,61 à la concentration 1mg/ml pour l'HE du laurier noble. D'après les résultats obtenus, nous pouvons déduire que l'essence isolée à partir de la plante *Laurus nobilis L.* est pourvue d'une activité réductrice modérée. Ce résultat est proche de ceux trouvés par OUIBRAHIM [36].

## *Conclusion générale*

Dans le présent travail on s'est intéressé à extraire l'huile essentielle de *Laurus nobilis L.* par la méthode d'hydrodistillation et d'avoir les conditions optimales pour améliorer le rendement de l'extraction en utilisant un plan d'expérience du type Box-Benhken qui nous a permis d'estimer un rendement qui varie de 0,42% à 0,73%.

L'étude des caractéristiques physicochimiques de notre huile essentielle a permis de mettre en évidence sa conformité aux normes établies, elle se distingue par une densité relative, un indice de réfraction, et un indice d'acide globalement comparable à ceux donnés par la pharmacopée française, en revanche l'indice de peroxyde est révélé légèrement en dehors de la norme.

Afin de mettre en évidence les groupements fonctionnels constitutifs de l'huile essentielle testée, on a eu recours à la spectrophotométrie infrarouge. Nous avons également réalisé une chromatographie en phase gazeuse, afin d'identifier certains constituants de l'huile essentielle étudiée, cependant les résultats obtenus n'ont pas pu être interprétés en raison de l'absence de témoins.

L'évaluation qualitative de l'effet antimicrobien montre que la plupart des souches utilisées sont sensibles à l'huile essentielle. L'inhibition de la croissance a varié en fonction de l'espèce bactérienne et de la concentration de l'huile volatile testée, les résultats de la CMB et CMF ont montrés que l'huile essentielle de *Laurus nobilis L.* peut être qualifiée de bactéricide et fongicide sur la plupart des souches testées.

L'activité antioxydante a été réalisée en employant le test du piégeage du radical libre DPPH•, et la réduction du fer. Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle testée possède un potentiel antiradicalaire appréciable avec un IC50 de 1,01mg/ml, et un pouvoir réducteur représenté par l'absorbance notée 0,61 à la concentration 1mg/ml d'où nous pouvons déduire que l'essence isolée à partir de la plante *Laurus nobilis L.*, est pourvue d'une activité antioxydante modérée.

Afin d'approfondir les aspects entrevus dans ce travail, un certain nombre de perspectives peuvent être envisagées :

- ✓ Procéder à une séparation par des méthodes avancées telles que CPG couplé à la spectrométrie de masse, et la RMN afin d'identifier la composition de huile essentielle de *Laurus nobilis L.*

## *Conclusion générale*

---

- ✓ Exploiter le pouvoir antimicrobien dans l'industrie pharmaceutique pour enrichir l'arsenal thérapeutique.
- ✓ Evaluation de l'activité antioxydante *in vivo* sur un système d'essai biologique.

Au final, les résultats obtenus ainsi que les perspectives proposées vont permettre d'ouvrir de nouvelles voies dans le domaine thérapeutique.

*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

- [1] **Babba Aissa F.** 2000. Encyclopédie des plantes utiles : flore d'Algérie et du Maghreb substances végétales d'Afrique d'orient et d'occident. Alger :EDAS .
- [2] **Ouibrahim A., Tlili-Ait Kaki Y., Bennadja S., Mansouri R., Ait Kaki S., Khbizi S., Djebbar M.** 2015. Activité antioxydante et anti-candidosique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L provenant de la région d'El Kala (Nord–Est Algérien). Algerian J. Nat. Products, 3:3 pp 209-216.
- [3] **OuldYerou K., Meddah B., TirTouil A.** 2015. Etude de l'effet d'huile essentielle de laurier noble de l'ouest algérien sur salmonella spp. *in vitro* et *in vivo*. European Scientific Journal. 11:33 pp 311-318.
- [4] **Goudjil M.** 2016. Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de trois plantes aromatiques. [These] :Genie des procedés et environnement :Universite Kasdi Merbah Ouargla .
- [5] **Beloued A.** 2003. Plantes medicinales d'Algerie. Alger : Office des publications universitaires.
- [6] **Guedouari R.** 2012. Etude comparative de la pharmacognosie des differentes parties du *Laurus nobilis* L. essais de formulations therapeutiques. [Mémoire de Magister] : Génie des Procédés Chimiques et Pharmaceutiques : Universite Mohamed Bougara Boumerdes.
- [7] Pharmacopée européenne. 2008. 6ème édition.
- [8] **Ouis N.** 2015. Etude chimique et biologique des huiles essentielle de coriandre, de fenouil et de persil. [These] : Chimie organique : Université Oran.
- [9] **Chouitah O.** 2012. Composition chimique et activité antibacterienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra*. [These] : Biochimie : Univercité Oran.
- [10] **Toninoli F., Meglioli V.** 2013. Huilles essentielles l' encyclopedie. JUDENA.
- [11] **Mayer F.** 2012. Utilisations therapeutiques des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite. [THESE] : Pharmacie : Université de Lorraine.
- [12] **Penchev P.** 2010. Purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. [These] : Génie des Procédés et de l'Environnement : Univercité Toulouse.
- [13] **Benadelkader T.** 2012. Biodiversité, bioactivité et biosynthese des composés terpénique volatils des lavandes ailées, *lavandula stoechas* sensu lato, un complexe d'espèces méditerranéennes d'interet pharmacologique. [These] : Biologie et ecophysiologie végétale : Université Jean-Monnet de Saint-Etienne, France.
- [14] **Deschepper R.** 2017. Huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. [These] : Pharmacie : Univercité de Marseille.

## Références bibliographiques

- [15] **Merzougui I., Tadj H.** 2012. Etude de l'effet antibactérien et antioxydant d'*Ammoides verticillata* de la région de Tlemcen. [Mémoire Ingénieurat ]: Technologie des Industries Agro-Alimentaires : Université Abou-Bakr Belkaïd - Tlemcen.
- [16] **Kaloustian J, Hadji-Minaglou F.** 2012. La connaissance des huiles essentielles qualilogie et aromathérapie. Paris : Edition Springer.
- [17] **Haddad D, Haddji D.** 2016. Contribution à l'Etude de L'Huile Essentielle de *Myrtus communis* L. [Thèse] : Pharmacie : Université Mouloud Mammeri : Faculté de Médecine.
- [18] **Kheyar, N., Meridja, D.,** 2014, Belhamel, K., Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia, Algerian J. Nat. Products, 2:1 .pp. 18- 26.
- [19] **EL AmriJ., ElbadaouiK., Touria Z., BouharbH., ChakirS., AlaouiT.** 2014. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées. Journal of Applied Biosciences., Vol. 82.pp 7481– 7492.
- [20] **R. Giordani, J. Kaloustian.** 2006. Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *Phytotherapie*. 3 pp121-124.
- [21] **Fekih, N.** 2015. Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *Pinus* poussant en Algérie. [Thèse] : Chimie Organique Appliquée : Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen.
- [22] **Goudable J., Favier A.** 1997. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *NutrClinMdtabol* .11 pp115-120.
- [23] **Aleng J., Incemail J., Efraigne J. Harlier C. Hapelle J.,** 2007. Le stress oxydant. *Rev Med Liege*. 62: 10 pp 628-638.
- [24] **Goupy J., Creighton L.** 2006. Introduction aux plans d'expériences. 3<sup>e</sup> édition : DUNOD.
- [25] **Fadil M., Farah A., Ihssane B., Haloui T., Rachiq S.** 2014. Application de plan de Plackett Et Burman dans le criblage des paramètres agissant sur le processus d'hydrodistillation de Thym du Maroc (*Thymus vulgaris* L.). *International Journal of Innovation and Applied*. 6: 3:pp. 530-540 Studies.
- [26] **Fadil M., Farah A., Ihssane B., Haloui T., Rachiq S.** 2015. Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. par la méthodologie de surface de réponse. *J. Mater. Environ. Sci.* 6 :8 pp.2346-2357.
- [27] **Haj Ammar A., Zagrouba F., RomdhaneM.** 2010. Optimization of operating conditions of Tunisian myrtle (*Myrtus communis* L.) essential oil extraction by a hydrodistillation process using a 2<sup>4</sup> complete factorial design. *Flavour Fragr. J.* 25.pp. 503–507

## Références bibliographiques

- [28]**Goudjil M., Bencheikh S., Zighmi S., Ladjel S.** Détermination expérimentale de la cinétique de séchage à l'ombre des huiles essentielles de laurus nobilis Lauraceae.2015. Annales des Sciences et Technologie.7 :1.pp.53-57.
- [29]**Muther L.** 2015.Utilisation des huiles essentielles chez l'enfant. [Thèse] : pharmacie : Université d'auvergne.
- [30]**Hansal N.**2015. Isolement, purification, identification et étude des caractéristiques biotechnologique de leuconostoc mesenteroides isolé à partir du lait cru de chèvre. [Mémoire de Magister] : Microbiologie fondamentale et appliquée : Université d'Oran.
- [31]**Denis F., Poly M.C.** 2007. Bactériologie médicale : Techniques usuelles Elsevier Masson, pp 573.
- [32]**Bey F.,** 2009. Etude de l'interaction antagoniste entre Lactibacillus sp.et quelques souches d'entérobactéries. [Mémoire magister] : Microbiologie alimentaire : Université d'Oran Es-Senia.
- [33]**Ouibrahim A., Tlili-Ait-kaki Y., Bennadja S., Amrouni S.,Djahoudi A., Djebar M.** 2013. Evaluation of antibacterial activity of Laurus nobilis L., Rosmarinus officinalis L. and Ocimum basilicum L. from Northeast of Algeria. African Journal of Microbiology Research. 7:42, pp. 4968-4973.
- [34]**Mouas Y., Benrebiha F., Chaouia C.** 2017. Evaluation de l'activité antibacterienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin rosmarinus officinalis l. Revue Agrobiologia : 7 :1.pp.363-370
- [35]**Ouibrahim A.**2015. Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de troispantes aromatiques (Laurus nobilis L., Ocimum basilicum L. et Rosmarinus officinalis L.) de l'Est Algérien. [These] : Toxicologie : Université Badji Mokhtar – Annaba.
- [36]**Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L., Vergnes M.**2008.Etude de six huiles essentielles : Composition chimique et activité antibactérienne. Phytothérapie. 6. pp. 160–164.
- [37]**Goudjil M., Bencheikh S., Zighmi S., Ladjel S., Hamada D.** 2015.Study of the chemical composition ,antibacterial and antioxydant activities of the essential oil extracted from the leaves of Algerian laurus nobiles lauraceae. journal of chemical and pharmaceutical research.7:1.pp.379-385.
- [38]**Mediouni- Ben Jemâa, J., Tersim, N., Taleb-Toudert K.,Khouja M.L.** 2012.Insecticidal activities oils from leaves of Laurus nobilis L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and Comparative chemical composition. Journal of Stored Products Research.48.pp.97-104.

## *Références bibliographiques*

[39] **Russel A.** 1991. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*. 71, pp .191-201

# *GLOSSAIRE*

**Analyse de la variance :** L'analyse de la variance (ANOVA) est un outil essentiel dans la détermination de la signification d'un effet ou d'un modèle mathématique. Le principe de l'analyse de la variance est basé sur le calcul de l'écart total entre les différentes mesures  $y_i$  du plan d'expériences et la moyenne de ces mesures.

**Angiosperme :** Se dit des graines recouvertes d'un péricarpe.

**Antibactérienne :** est une substance possédant la capacité de tuer des bactéries.

**Antifongique :** Se dit d'une substance qui agit contre les infections provoquées par les champignons ou les levures parasites.

**Aromatogrammes :** est une méthode de mesure in vitro du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. Cet examen est donc l'équivalent d'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des huiles essentielles.

**Carminatif :** Se dit des médicaments qui ont la propriété d'expulser les gaz intestinaux.

**Chromatogramme:** c'est l'image ou le diagramme obtenu par chromatographie.

**Emménagogues :** Se dit des substances qui favorisent l'écoulement des menstrues.

**Escherichia coli :** est un bacille gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae. Également appelée colibacille et abrégée en E. coli, est une bactérie intestinale des Mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie

**Facteur :** Les facteurs sont les variables que l'on désire étudier et qui sont supposées avoir une influence sur le système. Ils peuvent être quantitatifs ou qualitatifs, continues ou discrets, contrôlables ou non contrôlables.

**Hydropisie :** Accumulation de sérosité dans une partie du corps, œdème.

**Inoculum :** Échantillon contenant des germes vivants, destiné à être introduit au sein d'un milieu favorable à sa multiplication, afin de l'identifier, de l'étudier ou d'en produire une quantité supérieure.

**Optimisation :** Déterminer quelles conditions expérimentales (les valeurs prises par les facteurs influents) permettent d'obtenir le meilleur résultat pour la réponse.

**Plan d'expériences :** Un plan d'expériences est une méthode pour planifier ou organiser les expériences scientifiques et industrielles dans le but de retirer l'information correspondante à l'objectif fixé préalablement.

**Réponse :** Une réponse expérimentale est une manifestation mesurable que l'on observe lorsque l'on fait varier les paramètres étudiés. Un phénomène peut être éventuellement décrit par plusieurs réponses expérimentales l'objectif fixé préalablement. Leur but est d'obtenir un

maximum d'informations avec un minimum d'expérimentations par rapport à l'objectif que l'on s'est fixé.

**Spermaphyte** : plante qui se reproduit par des graines.

**Stomachique** : qui est bon pour l'estomac.

**Temps de rétention (Tr)** : C'est le temps que met le soluté à sortir de la colonne c'est à dire le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué.

**Test de Fisher** ou **Test F** : est un test d'hypothèse statistique qui permet de tester l'égalité de deux variances en faisant le rapport des deux variances et en vérifiant que ce rapport ne dépasse pas une certaine valeur théorique que l'on cherche dans la table de Fisher .

**valeur-p (en anglais p-value)** : parfois aussi appelée **p-valeur**, est la probabilité d'obtenir la même valeur (ou une valeur encore plus extrême) du test si l'hypothèse nulle était vraie.

# *Annexes*

## *Annexe I :*

### **Coloration de gram :**

On prépare un frottis de la souche test : pour cela, on racle une petite colonie bactérienne bien isolée à partir d'une culture jeune à l'aide d'une pipette pasteur que l'on dépose sur une lame avec une petite goutte d'eau physiologique stérile, On étale l'échantillon en couche mince et régulière. Le frottis est ensuite séché au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen puis fixé avant coloration.

- On recouvre le frottis avec le violet de gentiane qui pénètre dans le cytoplasme de toutes les bactéries , on le laisse agir pendant 1 minute puis on rince à l'eau distillée ;
- On verse du lugol qui facilite la fixation du colorant qu'on laisse agir pendant 1 minute puis on rince à l'eau distillée ;
- On décolore à l'alcool absolu pendant 15 secondes et on rince abondamment à l'eau distillée la paroi des bactéries Gram<sup>+</sup> s'oppose à la pénétration de l'alcool alors que celle des bactéries Gram<sup>-</sup> autorise son passage.
- On recolore avec de la fuchsine pendant 30 secondes et on rince encore une fois a l'eau distillée ;
- Après séchage des lames colorées au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen, on passe à l'observation au microscope optique à l'objectif 100 les observations sont photographiées. Les bactéries colorées en violet sont des bactéries à Gram positif et celles colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif.

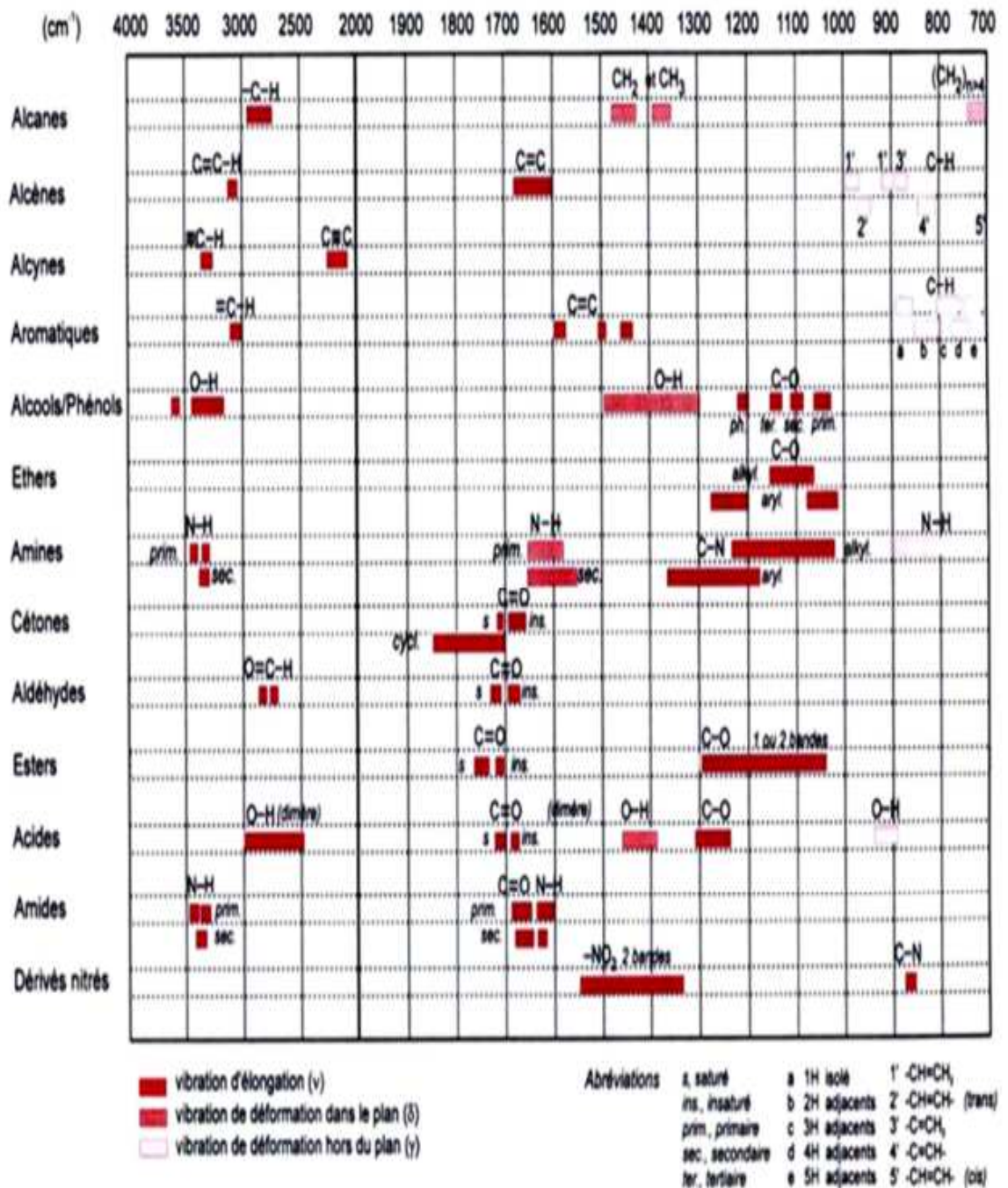
*Annexe II :*

Quantiles d'ordre 0.95 de la loi de Fisher

<b>m \ n</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>1</b>	161,448	199,500	215,707	224,583	230,162	233,986	236,768	238,883	240,543	241,882
<b>2</b>	18,513	19,000	19,164	19,247	19,296	19,330	19,353	19,371	19,385	19,396
<b>3</b>	10,128	9,552	9,277	9,117	9,013	8,941	8,887	8,845	8,812	8,786
<b>4</b>	7,709	6,944	6,591	6,388	6,256	6,163	6,094	6,041	5,999	5,964
<b>5</b>	6,608	5,786	5,409	5,192	5,050	4,950	4,876	4,818	4,772	4,735
<b>6</b>	5,987	5,143	4,757	4,534	4,387	4,284	4,207	4,147	4,099	4,060
<b>7</b>	5,591	4,737	4,347	4,120	3,972	3,866	3,787	3,726	3,677	3,637
<b>8</b>	5,318	4,459	4,066	3,838	3,687	3,581	3,500	3,438	3,388	3,347
<b>9</b>	5,117	4,256	3,863	3,633	3,482	3,374	3,293	3,230	3,179	3,137
<b>10</b>	4,965	4,103	3,708	3,478	3,326	3,217	3,135	3,072	3,020	2,978
<b>11</b>	4,844	3,982	3,587	3,357	3,204	3,095	3,012	2,948	2,896	2,854
<b>12</b>	4,747	3,885	3,490	3,259	3,106	2,996	2,913	2,849	2,796	2,753
<b>13</b>	4,667	3,806	3,411	3,179	3,025	2,915	2,832	2,767	2,714	2,671
<b>14</b>	4,600	3,739	3,344	3,112	2,958	2,848	2,764	2,699	2,646	2,602
<b>15</b>	4,543	3,682	3,287	3,056	2,901	2,790	2,707	2,641	2,588	2,544
<b>16</b>	4,494	3,634	3,239	3,007	2,852	2,741	2,657	2,591	2,538	2,494
<b>17</b>	4,451	3,592	3,197	2,965	2,810	2,699	2,614	2,548	2,494	2,450
<b>18</b>	4,414	3,555	3,160	2,928	2,773	2,661	2,577	2,510	2,456	2,412
<b>19</b>	4,381	3,522	3,127	2,895	2,740	2,628	2,544	2,477	2,423	2,378
<b>20</b>	4,351	3,493	3,098	2,866	2,711	2,599	2,514	2,447	2,393	2,348
<b>21</b>	4,325	3,467	3,072	2,840	2,685	2,573	2,488	2,420	2,366	2,321
<b>22</b>	4,301	3,443	3,049	2,817	2,661	2,549	2,464	2,397	2,342	2,297
<b>23</b>	4,279	3,422	3,028	2,796	2,640	2,528	2,442	2,375	2,320	2,275
<b>24</b>	4,260	3,403	3,009	2,776	2,621	2,508	2,423	2,355	2,300	2,255
<b>25</b>	4,242	3,385	2,991	2,759	2,603	2,490	2,405	2,337	2,282	2,236
<b>26</b>	4,225	3,369	2,975	2,743	2,587	2,474	2,388	2,321	2,265	2,220
<b>27</b>	4,210	3,354	2,960	2,728	2,572	2,459	2,373	2,305	2,250	2,204
<b>28</b>	4,196	3,340	2,947	2,714	2,558	2,445	2,359	2,291	2,236	2,190
<b>29</b>	4,183	3,328	2,934	2,701	2,545	2,432	2,346	2,278	2,223	2,177
<b>30</b>	4,171	3,316	2,922	2,690	2,534	2,421	2,334	2,266	2,211	2,165
<b>40</b>	4,085	3,232	2,839	2,606	2,449	2,336	2,249	2,180	2,124	2,077
<b>50</b>	4,034	3,183	2,790	2,557	2,400	2,286	2,199	2,130	2,073	2,026
<b>60</b>	4,001	3,150	2,758	2,525	2,368	2,254	2,167	2,097	2,040	1,993
<b>70</b>	3,978	3,128	2,736	2,503	2,346	2,231	2,143	2,074	2,017	1,969
<b>80</b>	3,960	3,111	2,719	2,486	2,329	2,214	2,126	2,056	1,999	1,951
<b>90</b>	3,947	3,098	2,706	2,473	2,316	2,201	2,113	2,043	1,986	1,938
<b>100</b>	3,936	3,087	2,696	2,463	2,305	2,191	2,103	2,032	1,975	1,927
<b>150</b>	3,904	3,056	2,665	2,432	2,274	2,160	2,071	2,001	1,943	1,894
<b>200</b>	3,888	3,041	2,650	2,417	2,259	2,144	2,056	1,985	1,927	1,878
<b>250</b>	3,879	3,032	2,641	2,408	2,250	2,135	2,046	1,976	1,917	1,869
<b>300</b>	3,873	3,026	2,635	2,402	2,244	2,129	2,040	1,969	1,911	1,862


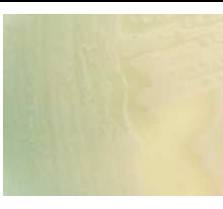

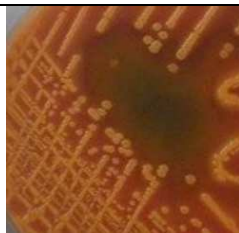



### Annexe III :

Table de corrélation dans le moyen infrarouge entre groupes fonctionnels et bandes d'absorption

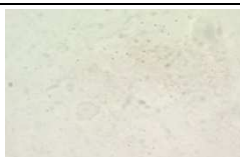

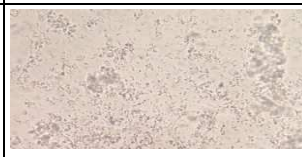
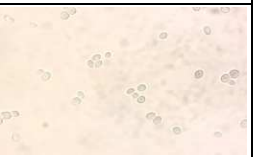

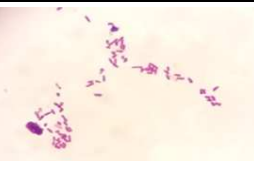
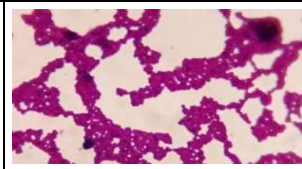


Annexe IV :

1. Résultats de l'examen macroscopique :

		Bactéries			
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida sp</i>
Milieux	Gélose nutritive				
	HEKTOEN				
	CHAPMAN				
	Sabouraud chlorophenecol				

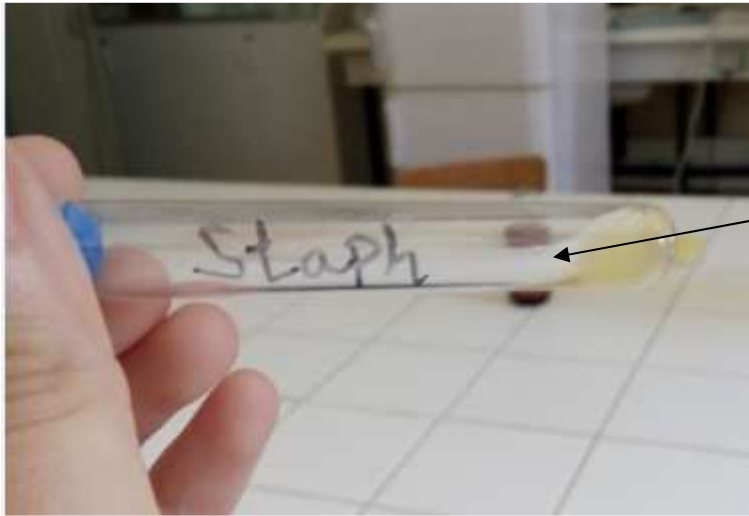
2. Résultats de l'examen a l'état frais

		Examen microscopique			
		<i>E.coli</i>	<i>p.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>Candida sp</i>
Etat frais					
Coloration de gram				X	

### 3. Lecture de la galerie Api 20E

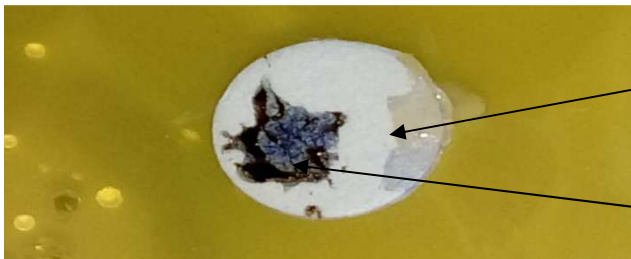
Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats négative	Résultats positive
ONPG	Ortho-niroyphenylgalactoside	Beta-galactosidase	incolore	jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	Lysine	Lysine dicarboxylase	Jaune	orangé
ODC	Omithine	Omithine décarboxylase	jaune	Rouge orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétonie	incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine de khon	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noire
GLU Jaune	Glucose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	Manitole	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation /oxidation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation /oxidation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation /oxidation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	Saccharose	Fermentation /oxidation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	Mélibiose	Fermentation /oxidation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation /oxidation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation /oxidation	Bleu/bleu-vert	Jaune
Ox	Sur papier filter	Cytochrome-oxydase	incolore	Anneau violet
NO <sub>3</sub> - NO <sub>2</sub>	Tube GLU	Production de NO <sub>2</sub>	Jaune	Rouge
N <sub>2</sub>	Tube GLU	Production au stade N <sub>2</sub>	rouge	Jaune

**4. Résultat du test de coagulase :**



Coagulase +

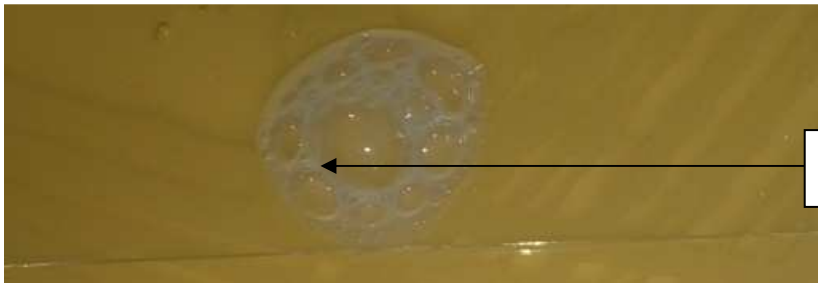
**5. Résultats test oxydase :**



Oxydase -

Oxydase +

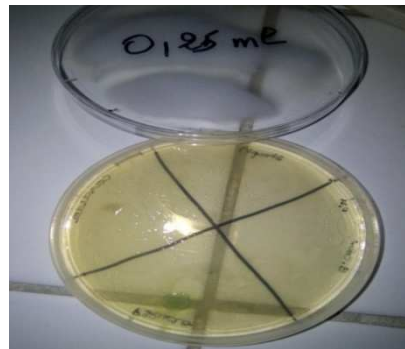
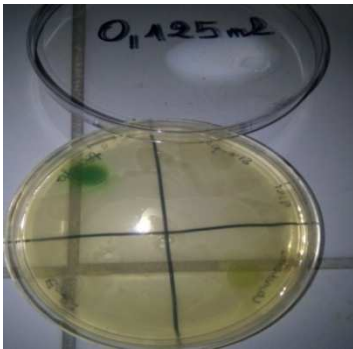
**6. Résultats test catalase :**



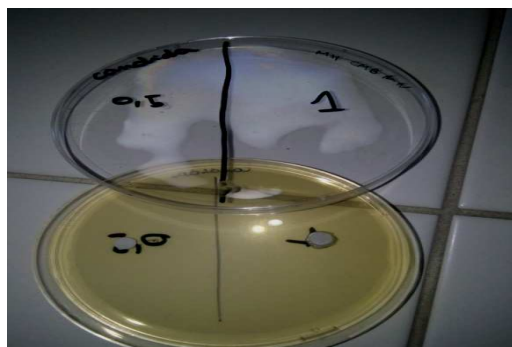
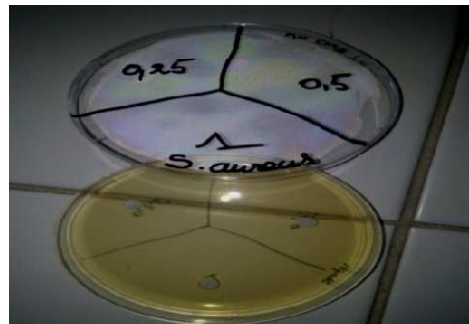
Catalase +

Annexe V :

1. Résultats de la CMI :



2. Résultat de la CMB et CMF :



**Résumé :**

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de la composition chimique, l'activité antibactérienne, antifongique et antioxydante d'une plante aromatique et médicinale ; *Laurus nobilis* L. L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation. Les conditions ont été optimisées selon un plan d'expériences de type Box-Benhken qui nous a donné les meilleures conditions avec un rendement qui atteint 0.73%. L'essence extraite a été caractérisées par les contrôles physico-chimiques suivi de l'analyse chromatographique par CPG et spectroscopique par IR qui nous a permis de supposé la présence de certains groupements fonctionnels et un nombre de composés majoritaires. par la suite la capacité de l'huile essentielle à inhiber les micro-organismes a été testé sur trois souches bactériennes et une levure cette activité s'est révélée variable selon la nature de la souche testé et enfin l'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée à travers deux méthodes : le test de piégeage du radical libre DPPH• avec un IC50 de 1.01mg/ml, et le test de réduction du fer qui s'est avéré avec un potentiel réducteur modéré.

**Mots clés :** Hydrodistillation, plan d'expériences, huile essentielle, *Laurus nobilis* L, CPG et IR, activité antimicrobienne, activité antioxydante.

**Abstract:**

The objectives of our work are study of the chemical composition, antibacterial, antifungal and antioxidant activity of an aromatic and medicinal plant; *Laurus nobilis* L. Extraction of the essential oil was carried out by hydrodistillation. The conditions have been optimized according to a box-Benhken type of experiment which gives us the best conditions with a yield of 0.73%. The extracted oil was characterized by physico-chemical controls followed by GPC and IR spectroscopic analysis, which allowed us to assume the presence of certain functional groups and a number of major compounds. Thereafter the ability of the essential oil to inhibit microorganisms was tested on three bacterial strains and yeast this activity was found to vary depending on the nature of the strain tested and finally the *in vitro* antioxidant activity was evaluated by two methods: the DPPH• free radical scavenger assay with an IC50 of 1.01 mg / ml, and the iron reduction test which was found to have a moderate reducing potential.

**Key words:** Hydrodistillation, experimental design, essential oil, *Laurus nobilis* L, GC and IR, antimicrobial activity, antioxidant activity.