



DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Rahou Youcef et Djalloul Daouadji Yamina

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Nutrition et Pathologie

THEME

*Exploration des Activités Biologiques de
l'Extrait des feuilles de Laurus nobilis L. In
vitro et In vivo*

Soutenue publiquement le 11/ 09/2018

DEVANT LE JURY

Présidente	Dr. BOUFADI Yasmina	MCA	U. Mostaganem
Encadreur	Dr. YAHLA Imène	MAB	U. Mostaganem
Examinatrice	Mme. KOUADRI BOUDJELTHIA Nacima	MAA	U. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments fonctionnels et de la Santé (LMBAFS)

DEDICACES

Dieu merci

Je dédie ce modeste travail à toutes les personnes qui ont compté pour moi et qui comptent toujours. à Mon père et à Ma mère qui m'a toujours soutenu et encouragé et surtout d'avoir toujours été à mes côtés.

À mes sœurs et mes frères et à mes amis.

En fin, à toute la famille RAHOU

En témoignage de mon affection

RAHOU Youcef.



DEDICACES

Dieu merci

Je dédie ce modeste travail à toutes les personnes qui ont compté pour moi et qui comptent toujours. à Mon père et à Ma mère qui m'a toujours soutenu et encouragé et surtout d'avoir toujours été à mes côtés.

À mes sœurs et mes frères et à mes amis.

En fin, à toute la famille DJELLOUL DAOUADJI

En témoignage de mon affection

DJELLOUL DAOUADJI.



a

Remerciement

- ♥ *Grace à dieu nous avons terminé ce modeste travail.*
- ♥ *C'est avec un grand plaisir que nous écrivons ces premières Lignes en signe de remerciement et de reconnaissance à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à élaborer*

Ce travail, nos enseignants, et surtout notre

Encadreur

Dr : Yahla Imène

- ♥ *Je tiens également à remercier Docteur Boufadi Yasmiana pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.*
- ♥ *Nous remercions également Dr. Kouadri Boudjelthia d'avoir accepté d'examiner notre travail.*
- ♥ *En fin, je remercie l'ensemble du personnel du département et du laboratoire, pour leur aide, leurs encouragements et l'esprit de travail qui nous a été accordé ainsi que tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire*

Liste des figures

N° de figure	Titre	Page
01	Aspect morphologique de <i>Laurus nobilis</i> Beloued (2005)	05
02	Structure de base des flavonoïdes	09
03	L'étape clé de la formation des flavonoïdes (Bruneton, 1999)	10
04	Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Remesy et al., 1996)	11
05	Piégeage des ROS (R [□]) par les flavonoïdes	12
06	Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Men+) (D' après Van Acker et al., 1996)	13
07	Comparaison entre deux pentahydroxyphénols (Harborne et Williams 2000)	14
08	Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavonols (<i>Rice-Evans, 1996</i>)	14
09	Eléments essentiels pour l'activité anti-oxydante des flavonoïdes (<i>Rice-Evans et al., 1996</i>)	15
10	Inhibition de la lipoxigénases et de la cyclo-oxygénases sous l'action de différents flavonoïdes	16
11	Modèle animal étudié	20
12	Macération des feuilles de <i>Laurus nobulis</i> L	22
13	Appareillage d'extraction sous vide	23
14	Réactivation les souches (Institut Pasteur)	26
15	Injection intra-péritonéale d'acide acétique à 1% chez les souris	28
16	(a) injection sub-plantaire de le carragénine; (b) administration de l'EELS ; (c) Mesure de l'épaisseur de la patte à l'aide d'un pied à coulisse digital	30
17	(a) injection intraveineuse de bleu d'Evans ; (b) injection intra-péritonéal de l'acide acétique	31
18	Dissection des souris et récupération de l'exsudat	31
19	Droite d'étalonnage de l'acide gallique	34
20	Droite d'étalonnage de la quercétine	34
21	une souris avec une crampe	41
22	Les pourcentages d'inhibition des contorsions de l'extrait ethanologique de <i>Laurus nobilis</i> (EELN) et du paracétamol	42
23	Inhibition de l'œdème plantaire (en %) par l'extrait ethanologique de <i>Laurus</i>	43

	(EELN) et le diclofénac (D)	
24	Le pourcentage d'inhibition de l'extrait ethanologique de <i>Laurus nobilis</i> (EELN) et indométacine	44

Liste des tableaux

N° de tableau	Titre	Page
01	Classification botanique de <i>Laurus nobilis</i>	04
02	liste des souches bactériennes et fongiques étudiées ATCC: American Type Culture Collection	25
03	Caractéristiques de l'extrait éthanolique de <i>Laurus nobilis</i>	33
04	Teneur en phénols totaux dans l'extrait éthanolique de <i>Laurus nobilis</i>	35
05	Teneur en flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de <i>Laurus nobilis</i>	35
06	Résultats de l'activité antimicrobienne de l'EELN exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm	36
07	Détermination de la CMI de l'extrait éthanolique de <i>laurus nobilis</i>	39
08	Effets anti inflammatoire de l'EELN <i>in vitro</i>	40

LISTE DES ABREVISATIONS

ATCC : American Type Culture Collection

A : Absorption

ALP : phosphatase alcaline

AST : l'aspartateaminotransférase

ALT : l'alanine aminotransférase

Abs : Absorbance

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CCl₄ : Tetrachloromethane

C : Carbone

DO : la densité optique

DMSO : diméthyl-sulfoxyde

EELN : Extrait éthanolique de *Laurus nobilis*

EAG/g: Equivalent d'acide gallique par gramme

EQ/g : Equivalent de quercétine par gramme de matière sèche

GAE : équivalents d'acide gallique

h : heure

IQ :imidazoquinolin

ip : intra-péritonéale

g : gramme

mm : millimètre

mg : Milligramme

min : Minutes

mL: Millilitre

µg : microgramme

µl : Microlitre

QE : Equivalents de Quercétine

SBA : sérum bovine albumin

UDPG : glucurosyltransferrase

UI : Unité Internationale

Liste des abréviations

v/v : Rapport volume par volume

% : Pourcentage

RESUME

La présente étude visait à explorer les activités biologiques de l'extrait des feuilles de *Laurus nobilis*. L'analyse de cet extrait a révélé la présence de quelques groupes chimiques (polyphénolstotaux et flavonoïdes) susceptibles d'exprimer les activités recherchées et leurs teneurs ont été déterminées par des méthodes spectrophotométriques. L'extrait a été également soumis à un criblage pour son activité antimicrobienne possible *in vitro*, contre huit souches de bactéries pathogènes et deux espèces de levure, l'extrait a réagi positivement sur six souches microbiennes parmi les souches testées et les CMI ont été déterminées.

L'exploration de l'activité anti inflammatoire *in vitro* a montré que l'extrait possède une forte capacité d'inhiber la dénaturation protéique à raison de 94.64%. Comme il a prouvé significativement son efficacité *in vivo* dans la réduction de 98,68% de l'œdème plantaire induit par la carragéninechez la souris.

En outre, l'extrait a prouvé significativement son activité analgésique en réduisant les contorsions induites par l'acide acétique de 40% chez la souris. De même, l'administration de l'extrait a exercé une inhibition de 85.9 % de la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris.

Mots clé : *Laurus nobilis*, extrait éthanolique, effet antibactérien, activité anti-inflammatoire, effet analgésique, perméabilité vasculaire.

ABSTRACT

The present study aimed to highlight the biological activities of *Laurusnobilis* extract. The analysis of this extract revealed the presence of some chemical groups (total polyphenols and flavonoids) capable of expressing the desired activities and their contents were determined by spectrophotometric methods. The extract was been also screened for its possible antimicrobial activity *in vitro*, against eight pathogenic bacteria strains and two yeast species, using the diffusion method from a solid disc. The extract reacted positively on the microbial strains tested. Then, the MICs were determined.

The investigation of the anti-inflammatory activity *in vitro* has shown that the extract has a strong ability to inhibit 94.64% of protein denaturation. As it proved significantly its *in vivo* efficacy in reducing 98.68% of carrageenin-induced plantar edema in mice.

In addition, the extract significantly demonstrated its analgesic activity by reducing acetic acid-induced contortions by 40% in mice. Similarly, administration of the extract exerted a 85.9 % inhibition of acetic acid-induced vascular permeability in mice.

Key words: *Lepidium sativum* seeds, antibacterial effect, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, analgesic effect, vascular permeability.

تلخيص

هدفت الدراسة الحالية إلى استكشاف الأنشطة البيولوجية لمستخلص أوراق (*Laurus nobilis*). وكشف تحليل هذا المستخلص عن وجود بعض المجموعات الكيميائية (*polyphénols total* و *flavonoids*) القادرة على التعبير عن الانشطة المرغوبة و تم تحديد محتوياتها بطرق القياس الطيفي و تم فحص المستخلص أيضا لنشاطه المضاد للمكروبات في المختبر ، مقابل ثمانية سلالات من البكتيريا المسببة للأمراض واثنين من أنواع الخميرة ، تفاعل المستخلص بشكل إيجابي على ستة سلالات ميكروبية بين السلالات التي تم اختبارها وتم تحديد MICs.

وقد أظهر التحقيق في النشاط المضاد للالتهاب في المختبر أن المستخلص له قدرة قوية على منع تمسخ البروتين بنسبة 94.64%. كما أثبتت بشكل كبير في فعالية الجسم الحي في الحد من 98.68% من وذمة أخصي الناجم عن carrageenan في الفئران.

بالإضافة إلى ذلك ، أظهر المستخلص بشكل ملحوظ نشاطه المسكن عن طريق تقليل التشنجات التي يسببها حمض الخلي بنسبة 40% في الفئران. وبالمثل، فإن تعاطي المستخلص قد تسبب في تثبيط 85.9% من نفاذية الأوعية الدموية التي يسببها حمض الأسيتيك في الفئران.

الكلمات المفتاحية : *Laurus nobilis* ، مستخرج إيثانولي ، تأثير مضاد للجراثيم ،

نشاط مضاد للالتهابات ، تأثير مسكن ، نفاذية الأوعية الدموية

Sommaire

SOMMAIRE

Remerciements.....	i
Résumé.....	ii
ملخص	iii
Abstract.....	iv
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Introduction	01
Chapitre I : PARTIE THEORIQUE	
I.1 Généralité	04
I.1.1 Origine et distribution de la plante.....	04
I.1.2 Place dans la systématique.....	04
I.1.3 Description botanique de la plante.....	05
I.1.4 Composition chimique.....	05
I.1.5 Utilisation des feuilles de <i>Laurus nobilis</i>	06
I.1.6 propriétés pharmacologiques et recherche en cours.....	06
I.2. METABOLITES SECONDAIRES	
I.2.1. LES FLAVONOÏDES.....	08
I.2.1.1vue d'ensemble sur les polyphénols.....	08
I.2.1.2 généralités sur les flavonoïdes.....	08
I.2.2 structure chimique et classification.....	09
I.2.3 biosynthèse des flavonoïdes.....	10
I.2.4 localisation et distribution des flavonoïdes.....	11
I.2.5 activités biologiques des flavonoïdes.....	12
a. Effets antioxydants.....	12
b. Effets antimicrobiens.....	15
c. effets anti-inflammatoires.....	16
Chapitre II : Matériel et Méthode	
II.1Matériels	
II.1.1 Matériel végétal	20
II.1.2 Matériel animal.....	20
II.1.3. Réactifs chimiques et instrumentations.....	21
II.1.4. Appareillage utilisé.....	21
II.2. Méthodes	
II.2.1 Méthode d'extraction.....	21
II.2.2 Rendement d'extraction.....	23
II.2.3 Dosage des polyphénols totaux.....	23
II.2.4 Dosage des flavonoïdes.....	24
II.2.5 Détermination de l'activité antimicrobienne.....	25
II.2.6 Détermination de l'activité anti-inflammatoire (in vitro).....	27
II.2.7 Activités biologiques in vivo.....	28
Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION	
III.1 Extraction.....	33
III.2 Etude de l'activité antimicrobienne.....	35
III.3 Etude de l'activité anti-inflammatoire (in vitro).....	40
III.4 Activités biologiques (in vivo).....	42
III.4.1 Etude de l'activité analgésique (Test de torsion).....	41

III.4.2 Etude de l'activité anti-inflammatoire in vivo (teste de l'œdème).....	43
III.4.3 teste de la perméabilité vasculaire.....	44
Conclusion générales	47

Introduction

INTRODUCTION

La valorisation de la filière des Plantes aromatiques et médicinales (PAM) est devenue indispensable dans un pays regorgeant d'une richesse très importante en flore.

La phytothérapie a été utilisée depuis des siècles pour traiter les affections. Tisanes, décoctions, emplâtres ont été utilisés avec succès. En Algérie, les plantes sont utilisées depuis longtemps et leur utilisation s'inspire d'expériences des populations ainsi que de la médecine arabe classique. Cependant, cette utilisation ne suit pas des règles précises et ne tient pas compte des nouvelles nécessités de la thérapeutique actuelle. Beaucoup d'études se sont intéressées à l'étude des plantes utilisées en médecine traditionnelle.

Les plantes renferment des composants chimiques qui se répartissent en des grands groupes: les protides, les glucides, les lipides et les acides nucléiques d'une part, les pigments, les tanins, les polymères, les hormones et les essences végétales dites huiles essentielles d'autre part. Les premiers sont les constituants du métabolisme primaire. Il existe en permanence au sein de la plante. Les autres proviennent du métabolisme secondaire et ne sont pas toujours présents chez les végétaux **(BOUAMER *et al.*, 2005)**.

Quelles que soient les parties et les formes sous lesquelles elles sont utilisées, les plantes sont extrêmement riches, elles contiennent de structures chimiques complexes. Le métabolisme des plantes contient de milliers de différents constituants dont l'effet thérapeutique n'est évidemment pas lié à tous les composés, de même pour ce qui est d'effet nocif ou toxique **(Ahmed et al, 2004)**.

Le choix de notre plante s'est basé sur leur utilisation fréquente dans nos traditions locales culinaires et médicinales, afin de revaloriser et redécouvrir notre patrimoine national.

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence les activités biologiques de l'extrait des feuilles de la plante *Laurus nobilis*L. Etant un épice utilisé surtout dans la cuisson des aliments ou pour l'assaisonnement et elle possède différentes caractéristiques aromatique culinaire et médicales.

A golden brain is positioned at the top of a stack of several books. The books are in various colors, including dark brown, light brown, and yellow. A golden ladder leans against the stack of books from the left side. The entire scene is set against a white background with a thin brown border.

Première Partie
Partie
Théorique



Chapitre I
Présentation de la
plante

Laurus nobilis

CHAPITRE I : PARTIE THEORIQUE

I.1.GENERALITES

Laurus nobilis., membre de la famille des lauracées qui renferme 32 genres et environ 2000-2500 espèces (Barla et al., 2007). *Laurus*, nom latin, d'origine celte qui veut dire « toujours vert » allusion au feuillage persistant de la plante (Pariente, 2001).

Les feuilles sont largement appliquées et connues comme assaisonnement et herbe médicinale depuis les périodes antique grec et romain (Demir et al., 2004). Il est intéressant de noter que cette herbe qui était pendant longtemps employée dans la nourriture comme condiment et en médecine traditionnelle a, en fait, des propriétés qui peuvent suggérer de nouvelle application (Ferreira et al., 2006).

I.1.1.ORIGINE ET DISTRIBUTION DE LA PLANTE

Originnaire du bassin méditerranéen, *Lauru snobilis* pousse dans les lieux humides et ombragés, mais également dans les jardins, où elle est cultivée comme condiment (Iserin, 2001). Actuellement, la plante est largement cultivée dans beaucoup de pays comme plante ornementale et pour la production commerciale tels que la Turquie, l'Algérie, la France, la Grèce, le Maroc, l'Amérique centrale et les Etats-Unis Méridionaux (Demir et al., 2004; Barla et al., 2007).

I.1.2. PLACE DANS LA SYSTEMATIQUE

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure (Quezel et santa, 1962)

Synthétisée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Classification botanique de *Laurus nobilis*.

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

I.1.3. DESCRIPTION BOTANIQUE DE LA PLANTE

Laurusnobilis, Arbuste ou arbre aromatique de 2 à 10m de haut à tige droite grise dans sa partie basse et verte en haut. Ses feuilles sont alternés, coriaces, légèrement ondulées sur les bords, longues de 16 cm sur 8 cm de large, persistantes vert foncé et glacés sur leur face supérieure et plus pale en dessous. Les fleurs sont dioïques (petites fleurs mâles et femelles sur des pieds séparés), jaunes, groupées par 4 à 5 en petites ombelles. Le fruit est une petite baieovoïde de 2cm de longueur sur 1cm de largeur, noir vernissé à maturité (Iserin, 2001 ; Demir et al., 2004 ; Beloued 2005).



Figure 1: Aspect morphologique de *Laurus nobilis*
Beloued (2005).

I.1.4.COMPOSITION CHIMIQUE

De nombreuses études ont été réalisées pour la détermination de la composition chimique des feuilles de *Laurus nobilis* et plusieurs ont prouvé la richesse de ses feuilles en substancesactives. Par hydrodistillation les feuilles fournissent environ 10-30 ml/Kg (1-3%) d'huile essentielle (Bruneton 1999, Demir et al., 2004) dont les constituants majoritaires inclut : cinéol, α et β pinène, sabinène, linalol, eugénol, terpinéol, plus d'autres esters et terpenoides, mais dontles proportions varient selon l'origine géographique (Iserin 2001 ; Sayyah et al.,2002 ; Demir etal., 2004).

Les feuilles de *Laurus nobili* scontiennent aussi des flavonoïdes polaires (dérivées glycosylées de quercétine, kaempferol et de catéchine) et apolaires (quatre dérivés acylés de

kaempferol) (Fiorini et al., 1998 ; Kivçak et Mert, 2002), sesquiterpènes lactones, alcaloïdes d'isoquinoline (Kivçak et Mert, 2002 ; Simi et al., 2003), en plus Demo et al. (1998) et Gómez-Coronado et al. (2004) ont montré la richesse de ses feuilles en vitamine E.

I.1.5. UTILISATION DES FEUILLES DE *Laurus nobilis*

Les feuilles de *Laurus nobilis* sont parmi les assaisonnements les plus connus dans tous les pays, elles sont généralement utilisées comme épice valable en culinaire (en potages, ragoûts, sauce,...) et aromatisant en industrie alimentaire. Cette plante a aussi des applications importantes en médecine traditionnelle et représente récemment un sujet de recherche scientifique intéressant (Sini et al., 2003), le laurier est principalement utilisé, par voie orale, dans le traitement symptomatique des troubles de l'appareil digestif supérieur tels que le ballonnement épigastrique, lenteur de la digestion, éructations et flatulence (Iserin, 2001).

L'extrait aqueux est utilisé dans la médecine traditionnelle turque en tant qu'antihémorroïdal, antirhumatismal, diurétique et comme un antidote dans des morsures de serpent et pour le traitement du mal d'estomac (Kivçak et Mert, 2002).

Dans la médecine traditionnelle iranienne, les feuilles de cette plante ont été employées pour traiter l'épilepsie et le parkinsonisme (AqiliKhorasani, 1992).

L'huile essentielle obtenue des feuilles de cette plante a été employée pour le soulagement d'hémorroïdes et des douleurs rhumatismales (Sayyah et al., 2002). En outre, l'huile essentielle est employée par l'industrie cosmétique en parfumerie et dans la fabrication des savons. Elle compte parmi les meilleurs moyens d'éloigner les insectes gênants (Demir et al., 2004 ; Beloued, 2005).

I.1.6. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES ET RECHERCHE EN COURS

a) Effets antioxydants

L'activité anti-oxydante des extraits éthanoliques (bruts et dégraissés) des feuilles, d'écorce et des fruits de *Laurus nobilis* a été étudiée au niveau de la peroxydation des lipides (LP) dans les liposomes, induite par le système Fe^{+2} /ascorbate et mesurée spectrophotométriquement à 533 nm. Les résultats ont montré que tous les extraits de recherche possédaient une activité anti-oxydante.

L'extrait dégraissé des feuilles montre une inhibition plus élevée du LP que l'extrait brut et que tous les autres extraits et le maximum de son activité (68,4%) a été atteint avec une plus petite quantité (2,0 mg) (Simicet al., 2003).

Ferreira et al. (2006) ont étudié l'activité anti-oxydante de trois extraits (huile essentielle, extrait éthanolique et décoction) de dix espèces de plantes médicinales dont *Laurus nobilis*, cette espèce a montré des valeurs élevées pour l'activité anti-oxydante pour chacun des trois extraits et elle est plus haute pour les extraits polaires. Dans le laurier, l'isoquercitrin et les glycosides flavonol peuvent expliquer l'activité exhibée.

Dans une autre étude, Demo et al. (1998) ont démontré la présence des tocophérols (vitamine E), principalement la α - tocophérol, dans les feuilles de *Laurus nobilis* obtenues dans la fraction apolaire par extraction à l'hexane. Dans cette étude on rapporte que le contenu tocophérol est strictement corrélé avec l'activité anti-oxydante de l'extrait hexane des feuilles.

Ces résultats préliminaires ont confirmé que l'utilisation traditionnelle des feuilles de *Laurus nobilis* dans l'industrie alimentaire est reliée non seulement à l'odeur et à l'arôme plaisant, mais probablement aussi a des possibilités préservatives des substances présentes dans les feuilles et d'autres pièces de cette plante.

b) Effet cytotoxique

Certains composés isolés à partir des feuilles et des fruits de *Laurus nobilis* se sont avérés cytotoxiques, il s'agit essentiellement de ces deux sesquiterpènes; lactones et lauroxone pines, qui selon ces expériences sont fortement cytotoxiques vis-à-vis d'une lignée cellulaire cancéreuse ovarienne; la A2780. (Barla et al., 2007).

c) Effet antimicrobien

Des huiles essentielles de plusieurs plantes ont été évaluées pour leur potentiel dans le control du mycète aflatoxino génique *Aspergillus parasiticus* CFR 223 et de la production d'aflatoxine. L'huile des feuilles de laurier a stimulée *in vitro* la croissance des mycéliums du mycète mais a réduit la concentration de son aflatoxine de 55.21% (Atanda et al. 2007).

d) Effet gastroprotectif

Une seule étude a été réalisée à ce sujet par Grbz et al., (2002). Cinq plantes aromatiques dont *Laurus nobilis*, usuellement employées pour traiter le mal d'estomac. Une décoction et un extrait méthanolique ont été préparés à partir des fruits du Laurier pour déterminer leurs effets sur un modèle d'ulcère gastrique induit chez le rat. Les expériences pharmacologiques et les techniques histopathologiques ont clairement montré que ces extraits administrés oralement ont significativement protégé l'estomac contre les ulcérations.

I.2. METABOLITES SECONDAIRES

I.2.1. LES FLAVONOÏDES

I.2.1.1.VUE D'ENSEMBLE SUR LES POLYPHENOLS

Les polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales (Gee et Johnson, 2001).

Les polyphénols, qui forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels, sont divisés en plusieurs catégories : les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols ; les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes ; les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables (Dacosta, 2003).

De nombreuses études sont en faveur d'un impact positif de leur consommation sur la santé. En effet, les polyphénols pourraient permettre de prévenir de nombreuses pathologies comme le cancer (Brown et al., 1998) , les maladies dégénératives et cardio-vasculaires (Paganga et al., 1999). Un encouragement à la consommation d'aliments d'origine végétale riches en polyphénols constitue désormais une des principales recommandations en santé publique. Parmi les antioxydants végétaux, les polyphénols apparaissent parmi les plus efficaces quant à leurs effets protecteurs dans l'organisme (Gee et Johnson, 2001).

L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...) (Bruneton, 1999). Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base (Dacosta, 2003).

Notre intérêt est essentiellement focalisé sur les flavonoïdes, substances que nous avons pu identifier dans tous nos extraits bruts et qui en particulier s'avèrent des composants phénoliques sur possédant une action biologique très diversifiée.

I.2.1.2. GENERALITES SUR LES FLAVONOÏDES

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Ce groupe comprend comme son nom l'indique des composés jaunes mais aussi d'autres couleurs ou incolores. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules. En effet plus de 6500 structures ont été identifiées (Bruneton, 1999 ; Harborne et Williams, 2000).

I.2.2. STRUCTURE CHIMIQUE ET CLASSIFICATION

Leur structure de base est celle d'un diphenylpropane à 15 atome de carbone (C₆-C₃-C₆) constitué de deux noyaux aromatiques (ou anneaux), que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C (Harborne et Williams, 2000) comme le montre la figure 2.

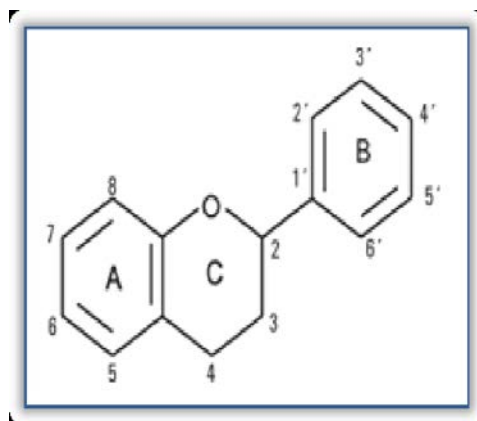


Figure 2 : Structure de base des flavonoïdes.

L'hétérocycle C est attaché au noyau B par une liaison carbone-carbone. De façon générale, les flavonoïdes peuvent être hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4', 5' et/ou 6'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, ou sulfatés (Bruneton, 1999).

Ils existent soit à l'état libre (dans ce cas ils sont dits aglycones ou génines), soit sous forme de C- ou O- glycosides, ce qui tend à les rendre hydrosolubles (ils sont alors liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, le plus souvent aux positions 3 et 7). Ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères (Dacosta, 2003).

Les flavonoïdes se différencient par le degré d'oxydation de l'hétérocycle C et par les modes d'hydroxylation des anneaux A et B. Dans toutes les classes de flavonoïdes mentionnées cidessous, la biosynthèse justifie la présence fréquente d'au moins trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4' de la génine ; cependant, l'un d'entre eux peut être absent. Six grandes classes de flavonoïdes peuvent être mentionnées.

Les flavones et les flavonols sont les composés flavonoïdiques les plus répandus, alors que les flavanones, les flavanols, les chalcones et les anthocyanidines sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires en raison de leur distribution naturelle restreinte (Bruneton, 1999 ; Harborne et Williams, 2000 ; Havsteen, 2002 ; Dacosta, 2003) :

I. 2.3. BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement phényl-2 chromane. L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation, catalysée par la chalcone synthase, d'une unité phényle propanoïde (4-coumaroyl-CoA) avec trois unités malonyl-CoA, la structure de base en C-15 sous forme d'une chalcone soit 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (Bruneton, 1999) **figure 3**.

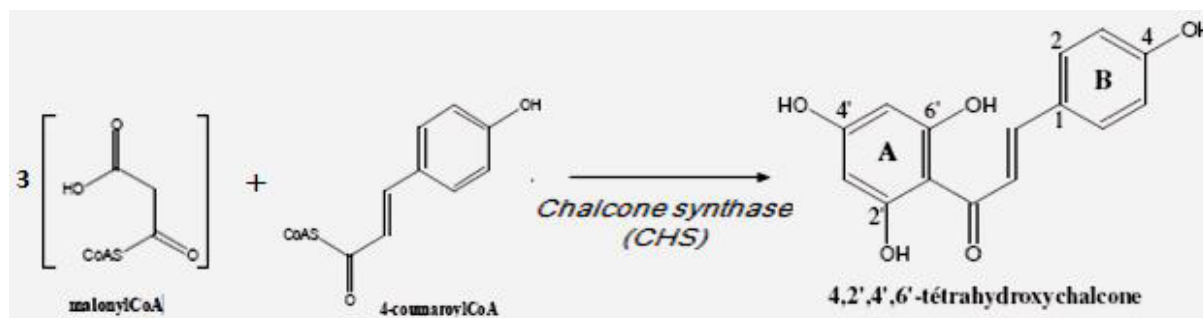


Figure 3 : L'étape clé de la formation des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des divers flavonoïdes. Elle est en équilibre avec les flavonoïdes. Cet équilibre étant contrôlé par une enzyme « la chalcone isomérase », cette dernière induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une flavanone. Il est le précurseur de toutes les classes de flavonoïdes comme le montre la **figure 4**(Remesy et al., 1996).

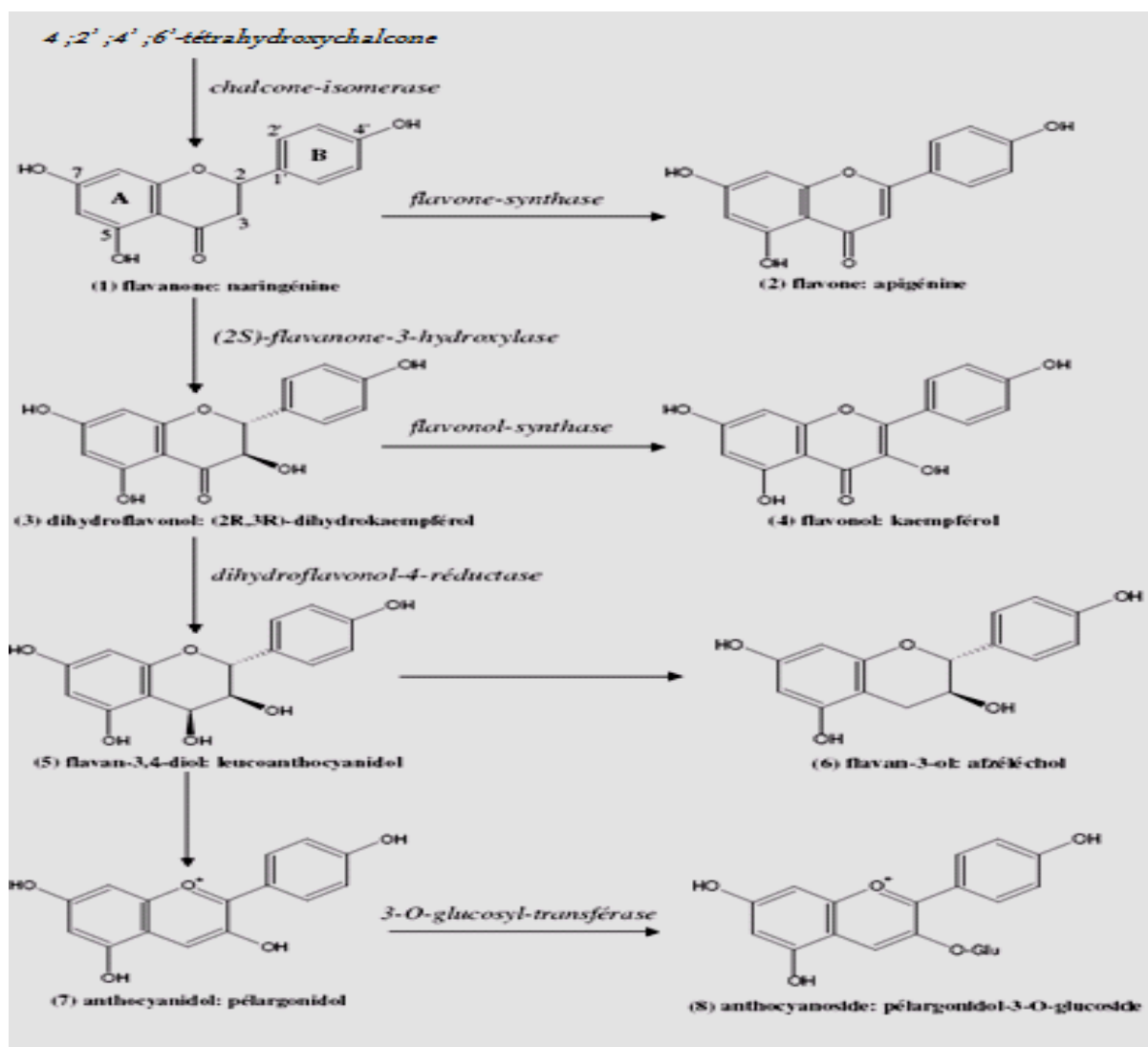


Figure 4 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Remesy et al., 1996)

I.2.4. LOCALISATION ET DISTRIBUTION DES FLAVONOÏDES :

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. On signale environ 2% de la proportion du carbone photosynthétique global incorporé dans la biosynthèse flavonique. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, les flavonoïdes sont omniprésents dans les organes aériens jeunes où ils sont localisés dans les tissus superficiels (Remesy et al., 1996).

Au niveau cellulaire, on a observé que les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux. Lorsque les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles (Brunton, 1993).

En définitive, les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal. Ils sont largement abondants dans les légumes feuilles (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. On les trouve principalement dans les agrumes : citrons, orange, pamplemousses et dans une moindre mesure : abricots, cerises, mûres, raisins, papayes, tomates et sarrasin. On en trouve également en quantité importante dans nombreuses plantes médicinales et très spécifiquement dans les herbes aromatiques comme le thym, le persil, le romarin et le céleri (Bronner et Beecher, 1995 ; Remesy et al, 1996).

I.2.5. ACTIVITES BIOLOGIQUES DES FLAVONOIDES

De nos jours, les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités biologiques et pharmaceutiques :

a. Effets antioxydants

Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels. Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées (Fuhrman et al., 1995).

L'action antioxydante de ces phytonutriments ne s'exerce pas seulement par l'inhibition et la désactivation des radicaux libres, elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation des traces d'ions métalliques responsables de la production de ROS (Halliwell, 1994 ; Cotelle, 2001).

A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants ($R\cdot$), comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle, par transfert d'hydrogène et le radicalflavonoxy (Fl-O \cdot) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (Jovanovic et al.,1998) :

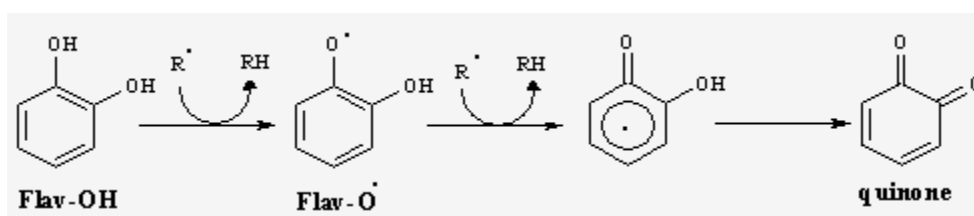


Figure 5 : Piégeage des ROS ($R\cdot$) par les flavonoïdes.

D'autres études ont montré que les flavonoïdes sont des bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la xanthine oxydase qui est une source biologique importante du radical superoxyde (Hansaki et

al., 1994 ; Cos et al., 1998). Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques (Brown et al., 1998 ; Dacosta, 2003), comme les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^+) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



La quercétine est la plus active des flavonoïdes étudiés. La **Fig.6** résume les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques : (a) un noyau catéchol sur le cycle B, (b) les groupes 3- hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et (c) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (Van Acker et al., 1996).

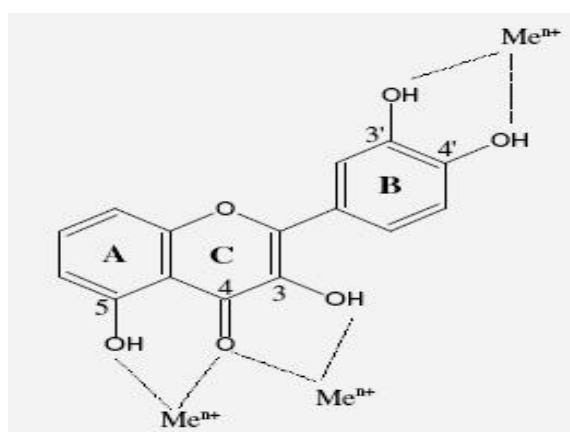


Figure 6 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Me^{n+}) (D'après Van Acker et al., 1996)

Plusieurs travaux décrivent les relations structures-activités des flavonoïdes (Rice-Evans et al., 1996 ; Van Acker et al., 1996 ; Harborne et Williams 2000 ; woodman et al. 2005). Ces travaux permettent de connaître les activités anti-oxydantes de ces molécules en fonction de leurs caractéristiques structurales. En fait, leur activité antiradicalaire nécessite :

a- Les molécules possédant une double liaison entre les carbones C_2 et C_3 et un groupement carbonyle en C_4 sont les flavonoïdes dont les activités anti-oxydantes sont les plus marquées, ainsi l'activité de la quercétine (un flavonol) est deux fois plus élevée que celle de la catéchine (un flavan-3-ol). Ceci est dû au fait que la quercétine possède une double liaison C_2 - C_3 et une fonction 4-oxo (Van Acker et al., 1996 ; Harborne et Williams 2000).

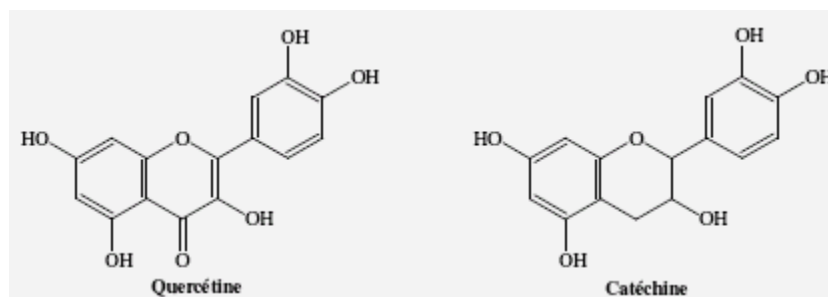


Figure 7 : Comparaison entre deux pentahydroxyphénols (Harborne et Williams 2000).

b- La structure ortho-diphénolique du cycle B (=les groupements hydroxyles en position C3'-C4') ainsi qu'un nombre important de résidus hydroxyles augmenteraient le potentiel antioxydant des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé (Fuhrman et al., 1995 ; woodman et al. 2005). Rice-Evans et ses collaborateurs (1996) ont développé un test basé sur la capacité d'un antioxydant à piéger le radical cation chromophore, l'activité des flavonoïdes est comparée avec celle du Trolox (une forme soluble de l' α -tocophérol), et exprimée en TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Il est à noter que plus la valeur de TEAC est élevée plus la molécule est active. Les résultats de cette étude ont montré que la morine avec deux groupements hydroxyles en méta et le kaempférol avec un seul groupement hydroxyle sont moins actifs que la quercétine (deux groupements hydroxyle en ortho).

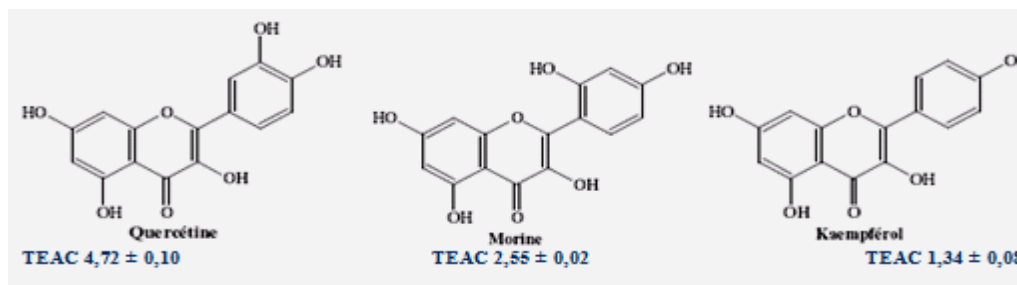


Figure 8: Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavonols (Rice-Evans, 1996).

c- Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif. Rice-Evans et ses collaborateurs (1996) ont démontré l'importance de ce dernier. En effet, La glycosylation du groupe 3-OH de la quercétine (cas de la rutine) ou sa suppression (cas de la lutéoline) diminue l'activité antioxydante.

En analysant tous ces résultats concernant la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres on peut conclure que la quercétine satisfait à tous ces critères, elle dérive du motif flavonol, sa structure particulière lui confère les caractéristiques les plus souvent mises

en avant dans l'activité d'un flavonoïde. Elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (Rice-Evans et al., 1996).

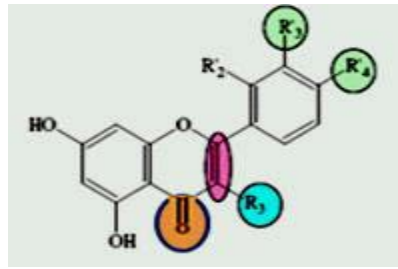


Figure 9: Eléments essentiels pour l'activité anti-oxydante des flavonoïdes (Rice-Evans et al., 1996).

b. Effets antimicrobiens

Les propriétés antimicrobiennes des flavonoïdes vis-à-vis de différents micro-organismes pathogènes ont été mises en évidence (Jassim et Naji, 2003 ; Taguri et al., 2004 ; Takahashi et al., 2004 ; Yadava et Tiwari, 2005). Les extraits de plantes et beaucoup d'autres préparations phytochimiques riches en flavonoïdes ont été rapportés posséder une activité antimicrobienne (Tereschuk et al., 1997 ; Essawi et Srour, 2000). Beaucoup de groupes de recherche ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié la structure des flavonoïdes qui possèdent l'activité antimicrobienne ou ont mesuré l'activité des flavonoïdes disponibles dans le commerce (Sakar 1992 ; Kono et al., 1994 ; Verma et al. 1997 ; Hamilton-Miller et Shah, 2000).

Les propriétés antibactériennes de propolis ont été attribuées à sa teneur élevée en flavonoïdes (Grange et Davey, 1990). Sato et ses collaborateurs (1995), ont démontré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur un *staphylococcus aureus*. Une étude plus récente a montré le pouvoir antibactérien d'un flavonoïde glycoside contre des souches de bactéries gram (+) et gram (-) (Harikrishna et al., 2004),

En raison de la capacité répandue des flavonoïdes d'inhiber la germination des spores pathogènes des plantes, on leur a proposé pour l'usage contre les microbes fongiques pathogènes de l'homme (Harborne et Williams, 2000). Deux nouveaux flavonoïdes, un flavone et un flavanone, respectivement isolés des fruits de *Terminalia bellerica* et de l'arbuste *Eysenhardtia texana* ont été montrés comme posséder l'activité contre le microbe pathogène opportuniste *Candida albicans* (Valsaraj et al., 1997 ; Wachter 1999). Deux autres flavones isolés de la plante *Artemisia giraldii* ont été rapportés exhiber une activité contre l'espèce *Aspergillus flavus*, une espèce de mycète qui cause la maladie envahissante chez les patients

immunosuppresseurs (Zheng, 1996). Galangin, un flavonol généralement trouvé dans des échantillons de propolis a été montré avoir l'activité inhibitrice contre *Aspergillus tamaritii*, *A. flavus*, *Cladosporiumphaerospermum*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* (Afolayan et Meyer, 1997).

Des travaux ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Récemment, des chercheurs ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV, empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte (Mahmood et al., 1993).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des flavonoïdes est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, on va citer :

- Inhibition de la synthèse d'acide nucléique (Hilliard, 1995),
- Inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique (Tsuchiya et Inuma, 2000),
- Séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne,
- Inhibition du métabolisme énergétique microbien (Haraguchi et al., 1998).

c. effets anti-inflammatoires

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique (acide gras C₂₀ : 4) se métabolise respectivement en prostaglandines + thromboxane et en leucotriènes, molécules fortement impliquées dans le processus inflammatoires. *In vitro*, plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire (Middleton, 1998 ; Pelzer et al., 1998 ; Yeon, 2001). Ils ont même reporté que les effets de la quercétine et la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipooxygénase. Cependant à de faibles concentrations, seule la lipooxygénase est affectée. En outre, d'autres flavonoïdes tels que la lutéoline, la morine, l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase (Laughton, 1991 ; Read, 1995 ; Sánchez de Medina et al., 2002).

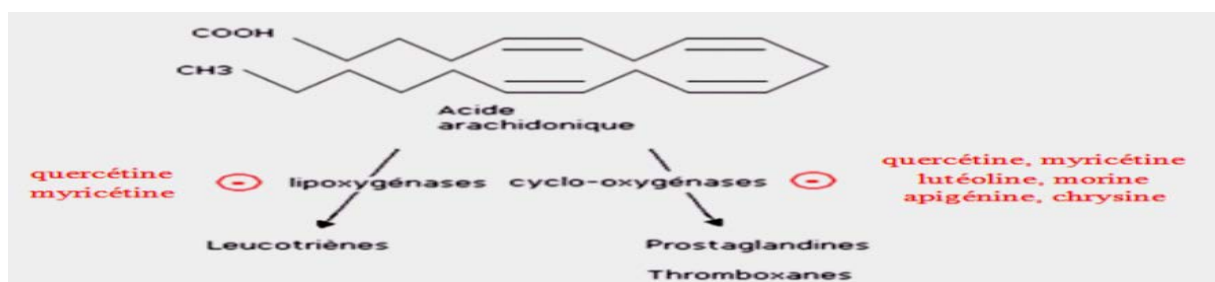


Figure 10 : Inhibition de la lipooxygénases et de la cyclo-oxygénases sous l'action de différents flavonoïdes.

d. Autres effets biologiques

Les flavonoïdes sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire, mais leur action est complexe et demeure encore mal élucidé. A doses élevées, les flavones et flavonols sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T, mais, à concentrations plus faibles, ils pourraient agir comme immunostimulants chez les sujets immunodéprimés (Namgoong et al., 1994 ; Middleton, 1998).

Les flavonoïdes peuvent prévenir le diabète ou au moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase. Une étude récente montrée que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques (Ong et Khoo, 2000).

Les flavonoïdes ont été également étudiées pour leurs propriétés anti-tumorales (Birt et al., 2001). Parmi les flavonoïdes naturels anticancéreux, la catéchine témoigne d'une activité remarquable (Bracke,1991).

Les flavonoïdes sont capables de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes. La naringine et la quercétine exercent également une activité anti-ulcérogène mise en évidence chez le rat dont l'ulcère gastrique a été induit par l'éthanol (Martin et al., 1994).



Deuxième Partie
Partie
Expérimentale

Chapitre II

Matériel Et Méthode

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

L'ensemble de ce travail a été réalisé au laboratoire des micro-organismes bénéfique, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS, site INES), de l'université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.

II.1. Matériels

II.1.1. Matériel végétal

Les feuilles (sèches) d'espèces de la plante *Laurus nobilis* L. ont été achetées au marché local de Mostaganem (marché couvert), en février 2018.

Les feuilles ont été nettoyées, lavées avec de l'eau du robinet et séchées à l'ombre. Elles ont été ensuite pesées, broyées grossièrement et récupérées dans des sacs propres

II .1.2. Modèle animal

Des souris Swiss albinos mâles adultes fournies par l'Institut Pasteur d'Alger ont été utilisées dans cette expérimentation. Leurs poids corporel moyen est de 20 à 30g.

Les cages métaboliques abritant les souris ont été placées dans des conditions favorables d'élevage à un cycle de lumière/ obscurité de 12 h, une température constante à 25°C et un taux d'humidité de 55± 10%. L'accès à la nourriture et à l'eau était ad libitum. L'éthique générale d'utilisation des animaux de laboratoire a été respectée (ECRA/AIBUM) (figure 11).



Figure 11: Modèle animal étudié

II.1.3. Réactifs chimiques et instrumentations

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits : acide chlorhydrique(HCl), acide acétique(CH₃COOH),Hydroxyde de sodium(NaOH),Chlorure de sodium(NaCl), dimethylsulphoxide (DMSO),éthanol (C₂H₆O), méthanol (CH₃OH), eau distillé, 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl(DPPH), Diclofénac sodique, papier filtre, Boites pétris, Bovine sérum albumine (BSA), Hydrogène-phosphate de sodium (Na₂HPO₄), Phosphate de potassium monobasique (KH₂PO₄), Peptone, Diméthyle sulfoxyde (C₂H₆OS), Extrait de viande,Chlorure de potassium (KCl), Foline-ciocalteu(FCR), Carbonate de sodium (Na₂CO₃), gélose nutritive (GN), Formol, bleu d'Evans, Hydroxytoluènebutylé (BHT), Chlorure de fer II (FeCl₂), Chlorure de fer III (FeCl₃), Magnesium (Mg²⁺), Trichlorure d'aluminium (AlCl₃), Carraghénane.

II .1.4. Appareillage utilisé

Spectrophotomètre UV-Visible double faisceau (JENWAY 7305 UV/VIS), Chambre D'observation UV « 264/3645 nm »(VILBERCOURMAT), Bain Marie (KOTTERMANN), Etuve universelle de 5 à220°C, Agitateur magnétique (VELP scientifica), vortex (Stuart), Balance (KERN) Max 421g d= 0.01g, Balance (KERN) Max 6100g d= 0.1g PH mètre (WTW Ph 330), Micro pipette (Smart) « 100 -1000 µl », Micro pipette (Unique) « 10 – 50 µL », Centrifugeuse (ROTOFIX 32 A), Évaporateur rotatif (HAHN SHIN SH-3001).

II.2. Méthodes

II.2.1. Méthode d'extraction

II.2.1.1. Principe

La méthode d'extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée, en continu, semi-continu ou en discontinu. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants. Un autre désavantage de cette extraction par les solvants est leur manque de sélectivité ; de ce fait, de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires,

coumarines, etc.) peuvent se retrouver dans le mélange pâteux et imposer une purification ultérieure (Brian, 1995)

II.2.1.2. Protocole

Une prise d'essai de 9.19 g de poudre des feuilles a été mise à macérer dans 950 ml d'éthanol absolu dans un récipient en verre fermé et a été recouverte d'une feuille d'aluminium et maintenue dans un agitateur à mouvement alternatif pendant 24 heures pour une agitation continue à 150 tr / min pour un mélange complet et également une élucidation complète des matières actives à dissoudre dans le solvant respectif. Ensuite, l'extrait a été filtré en utilisant un tissu de mousseline suivi de papier filtre Wattman n ° 1 et finalement filtré 3 fois et en utilisant une pompe à vide et à pression (AP-9925 Auto Science) (figure 11). Le solvant de l'extrait a été éliminé en utilisant l'évaporateur sous vide rotatif (HAHN SHIN SH-3001) avec la température du bain-marie de 50 ° C (figure 12). Finalement, l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis* (EELN) obtenu a été conservé à 4°C jusqu'à utilisation (Nagappan, 2012).

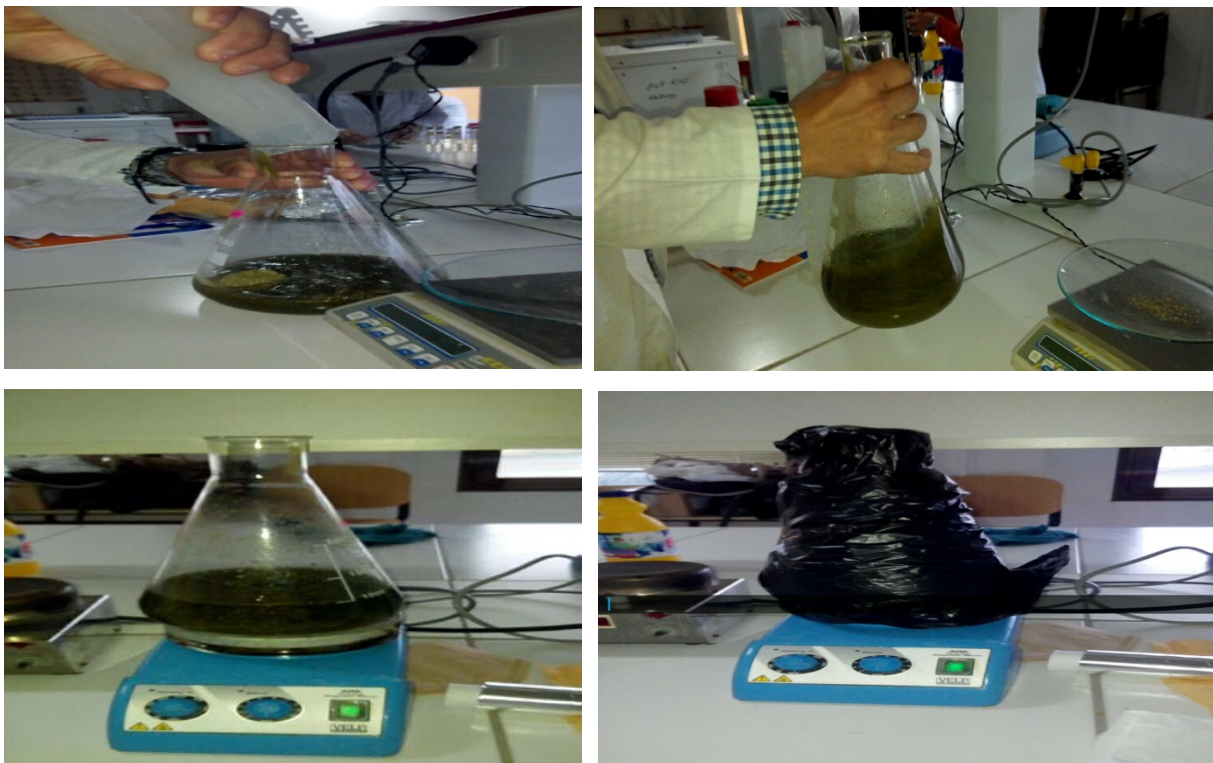


Figure 12 : Macération des feuilles de *Laurus nobilis* L.

II.2.2. Rendement d'extraction

Nous pouvons déterminer le rendement de l'extrait éthanolique des feuilles broyées de *Laurus nobilis* en calculant le rapport suivant :

$$\text{Rdt (\%)} = (P1-P2) / P3 \times 100$$

P1 : Poids du ballon après évaporation ;

P2 : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide) ;

P3 : Poids de la matière végétale de départ.

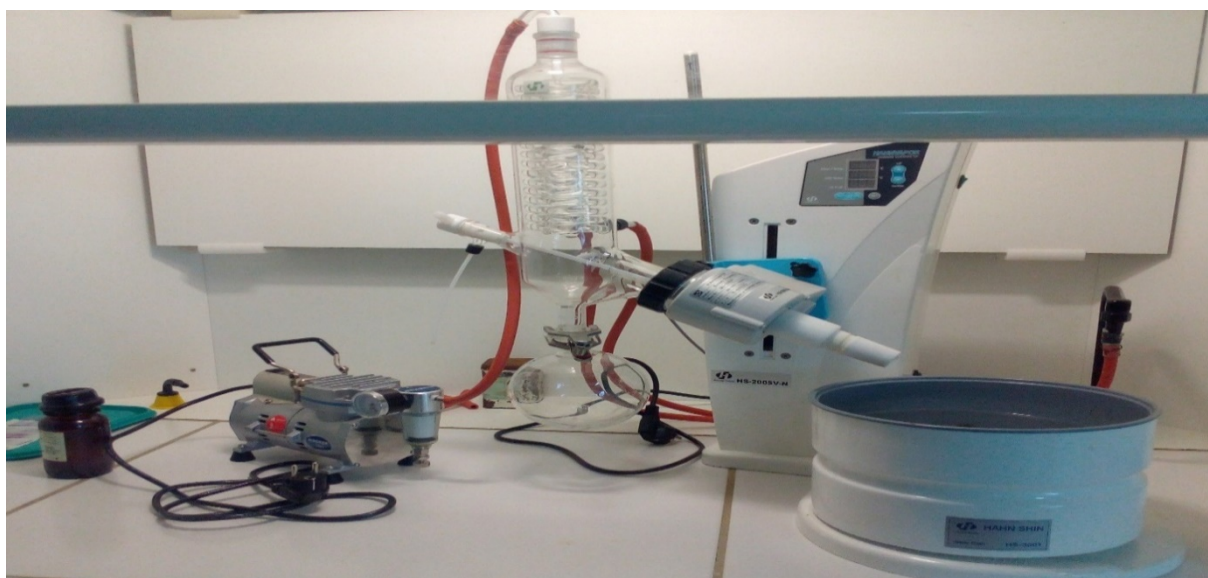


Figure 13 : Appareillage d'extraction sous vide

II.2. 3. Dosage des polyphénols totaux

II.2.3.1. Principe

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec un spectrophotomètre en utilisant l'essai de Folin-Ciocalteu. Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de folin-ciocalteu. Le mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phospho-molybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) est réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et molybdène (MO_8O_{23}). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans l'extrait végétal (**Boizot et Charpentier, 2006**).

II.2.3.2. Protocole

Un volume de 0,2 mL d'extrait pur a été mélangé avec 1,5 mL de Folin-Ciocalteu (10 %).

Après 5 minutes, on rajoute 1,5 mL d'une solution de carbonate de sodium (6 %). Le mélange est incubé à température ambiante à l'obscurité pendant 2h et l'absorbance est lue à 765nm sur un spectrophotomètre. L'acide gallique est utilisé comme standard de référence. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec ($\mu\text{g EAA/g ES}$) (**Singleton et Rossi ,1965**)

II 2.3.3 Expression des résultats

L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans la méthode au Folin-Ciocalteu (**Maisuthisakul et al., 2008**). La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, cette dernière est établie avec le standard étalon d'acide gallique (0,01-0,1 mg/ml), les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g).

II .2.4. Dosage des flavonoïdes

II .2.4.1 Principe

La formation d'un complexe jaunâtre, lors de l'ajout du chlorure d'aluminium, est due à la fixation des ions Al_3^+ sur les atomes d'oxygène, présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes. La quantité de flavonoïdes dans un extrait devrait être déterminée selon le flavonoïde prédominant, cependant la quercétine est largement utilisée comme standard pour la détermination de la teneur des flavonoïdes dans un échantillon (**Bahorun et al.,1996**).

II.2.4.2 Protocole

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) cité par (**Chang et al., 2002 et Djerdane et al., 2006**) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits. Le protocole du dosage consiste à mélanger, dans des tubes à essai, 1000 μL d'extrait dilué avec 1000 μL de solution d' AlCl_3 (2%). Après 10 mn d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, la lecture des absorbances est faite à 430 nm. Le témoin est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par 1000 μL d'éthanol.

II.2.4.3 Expression des résultats

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire réalisée par la quercétine à différentes concentrations (0,001-0,01mg/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g).

II .2.5 Détermination de l'activité antimicrobienne

L'étude de l'activité antimicrobienne de l'EELN a été effectuée par les méthodes suivantes :

- Technique de diffusion en puits
- Détermination minimale inhibitrice (CMI)

II.2.5.1 Milieux de culture et conditions d'incubation

Les milieux de culture utilisés sont:

- Bouillon nutritif (BN) et Mueller Hinton (MH).

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 H (**Remmal et al., 1993**).

II.2.5.2 Souches bactériennes et fongiques utilisées

Les 10 souches pathogènes utilisées sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 2 : liste des souches bactériennes et fongiques étudiées

ATCC: American Type Culture Collection.

Souches	Code	Famille
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 106404	<i>Trichocomaceae</i>
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862	<i>Staphylococcaceae</i>
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	<i>Bacillaceae</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	<i>Bacillaceae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	<i>Saccharomycetaceae</i>
<i>Shigellaboydii</i>	ATCC 8700	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Carnobacterium Maltoaromaticum</i>	ATCC 35586	<i>Carnobacteriaceae</i>

II.2.5.3 Réactivations et l'inoculum les souches bactériennes

100 µL de chaque souche ont été inoculés dans 10 mL de bouillon nutritif (figure 6). Après 24h d'incubation à 37°C, les inoculums ont été ajustés à 0,5 MC Ferland (10^7 UFC/ml) soit à une D.O qui s'étend de 0,08 à 0,10 à 620 nm.

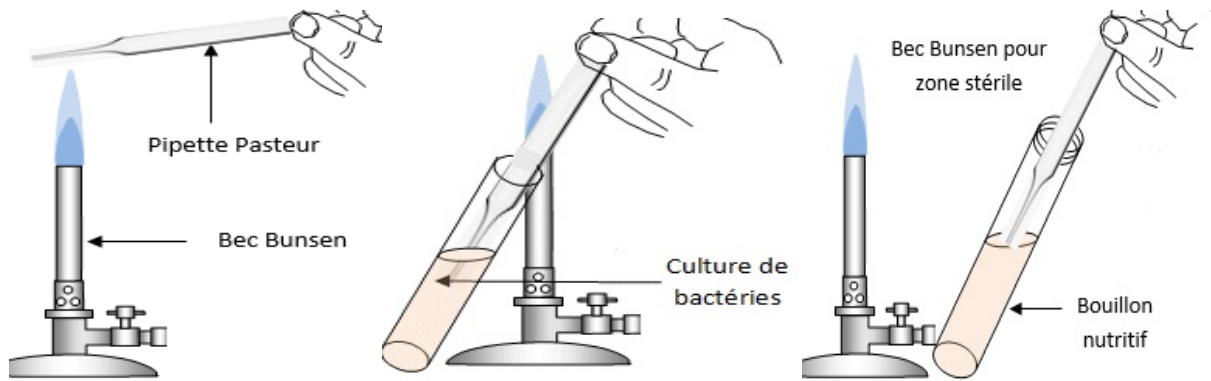


Figure 14: Réactivation des souches (Institut Pasteur)

II.2.5.4 Technique de diffusion en milieu solide (méthode de puits)

II.2.5.4.1 Méthode de diffusion en puits :

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongogramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu semi solide (gélose molle), l'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit testé (Broadsky et al, 1976)

II.2.5.4.2 Ensemencement :

15 ml de la gélose MH ont été coulés dans des boîtes de Pétri. Après le refroidissement et solidification du milieu de culture sur la paillasse, 100µl de suspension bactérienne à tester ont été étalées en surface de la gélose pour chaque boîte par la méthode de versement d'un tapis puis les boîtes ont été laissées sur la paillasse pendant 30 minutes. Des puits ont été creusés à l'aide d'un embout stérile. Des puits de 6mm de diamètre ont été réalisés. Un volume de 80µl de l'extrait brut est mis dans les puits.

Les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C pendant 24h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (pré-diffusion) (Doumandji et al, 2010). La présence de zone d'inhibition formée autour des puits est examinée après 18 à 24h d'incubation (Hwanhlem et al, 2011)

La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition apparaissant.

II.2.5.5 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

Pour l'extrait, on prépare par la méthode de double dilution, une gamme de concentrations stérile, allant de 80 à 1,25 mg/mL avec l'eau distillée. On prépare également pour chaque souche bactérienne ou fongique, un inoculum dont la turbidité est ajustée à 0,5 Mc Farland (soit 10⁸ UFC/mL) et ramené à 10⁶ UFC/mL dans du bouillon Mueller-Hinton deux fois concentré. Ensuite, on ajoute dans des tubes à hémolyse, 1 mL de chaque concentration et 1 mL d'inoculum bactérien. La gamme de concentration de chaque extrait subit alors une dilution de moitié et s'étale comme suit : 40 ; 20 ; 10 ; 5 ; 2,5 ; 1,25 et 0,625 mg/mL. On prépare également un tube témoin de croissance contenant 1 mL d'eau distillée stérile et 1 mL d'inoculum ; puis un tube témoin de stérilité contenant 1 mL d'eau distillée stérile et 1 mL de bouillon stérile. Ainsi que les deux témoins sont incubés à 37 °C pendant 24 heures. Après l'incubation, on examine la croissance bactérienne, dans chaque tube, qui se traduit par une turbidité. La CMI d'un extrait vis-à-vis d'une souche donnée sera la plus petite des concentrations ne montrant aucune croissance visible de germe (Bolou et al., 2011)

II.2.6 Détermination de l'activité anti-inflammatoire (*in vitro*)

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'EELN a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines. La méthode consiste à préparer trois solutions.

- La solution d'échantillon : (0,5 mL) composé de 0,45 mL de la solution aqueuse de sérum bovine albumine (SBA) 5 % et 0,05 mL d'extrait éthanolique.
- La solution témoin : (0,5 mL) composé de 0,45 mL de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 mL d'eau distillé.
- La solution standard (0,5 mL) compose de 0,45 mL de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 mL de la solution de standard diclofénac sodium avec une concentration de 100mg.

Toutes les solutions ont été ajustées à un pH de 6,3 par une solution d'HCl (1N). Les échantillons ont été incubés à 37 ° C pendant 20 min, ensuite la température était augmentée pour garder les échantillons à 57° pendant 3 min, après refroidissement des tubes, 2,5mL de la solution tampon phosphate saline (PBS) à (pH=6,3) ont été ajoutés aux solutions préparées. L'absorbance a été lue par le spectrophotomètre à 660 nm

. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - [(D.O \text{ de l'échantillon} - D.O \text{ du témoin}) / D.O \text{ du témoin}] \times 100$$

II.2.7 Activités biologiques *in vivo*

II.2.7.1 Etude de l'activité analgésique (Test de torsion)

Les expériences ont été réalisées sur un modèle de douleur induit par l'acide acétique chez des souris mises à jeun 16 heures avant l'expérimentation. L'injection intra-péritonéale (ip) d'acide acétique à 1% chez la souris provoque un syndrome douloureux qui se manifeste par des contorsions caractéristiques avec étirement des pattes postérieures et de la musculature dorso-ventrale. Le nombre d'étirements est comptabilisé 20 minutes après injection de l'acide acétique (Sy et al, 2009).



Figure 15 : Injection intra-péritonéale d'acide acétique à 1% chez les souris.

- **Lot témoin** : Les souris de ce lot ont reçu 1mL de l'eau physiologique par voie orale .
- **Lot référence** : Les souris de ce lot ont reçu un analgésique utilisé en thérapeutique le paracétamol à la dose de 200 mg/ kg, 30 minutes avant l'injection orale de l'acide acétique.
- **Le lot essai** : Les souris reçoivent, par voie ip 0,5mL d'EELN à raison de 780mg/kg, et ceci 30 minutes avant l'injection de l'acide acétique.

Le pourcentage d'inhibition des crampes est calculé selon la formule suivante :

Avec :

$$\% \text{ d'inhibition des crampes} = [(N_{\text{Cte}} - N_{\text{CTr}}) / N_{\text{Cte}}] \times 100$$

N_{Cte} : nombre moyen des contorsions dans le lot témoin.

N_{CTr} : nombre moyen des contorsions dans le lot traité.

II.2.7.2 Etude de l'activité anti-inflammatoire in vivo

II.2.7.2.1 Test de l'œdème plantaire induit par carragénine

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée selon la méthode décrite par **Winter et al. (1962)**. Pour ce faire, les souris ont été soumises à un jeun 16 heures avant l'expérimentation avec un accès libre à l'eau. Elles ont été réparties en 3 lots de 3 animaux chacun.

- **Le Lot témoin** : Les souris de ce lot ont reçu la solution véhicule (eau physiologique) par voie oral, 30 mn avant l'injection de carragénine.
- **Le Lot référence** : Les souris de ce lot ont été traités par voie oral (le diclofénac dose 50 µL/kg.) un anti-inflammatoire utilisé en thérapeutique, 30 mn avant l'injection de carragénine.
- **Le Lot essai** : L'EELN à tester a été administré aux souris par voie (ip) à raison de 780 mg/kg ; 30 mn avant l'injection de carragénine.

Trente minutes après le traitement par administration orale, l'œdème a été induit par injection de 50 µL de carragénine (1% p/v) au niveau de la voute plantaire de la patte postérieure droite (figure 15).

L'épaisseur de la patte (mm) a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse digital avant injection (V_0) et toutes les 60 min pendant 6 H après induction de l'inflammation (figure 16) (**Vasudevan et al., 2006**).

Le pourcentage d'inhibition de l'œdème a été calculé selon la formule suivante (**Lanhers et al., 1992**):

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [(V_t - V_0)_{\text{témoin}} - (V_t - V_0)_{\text{traité}}] \times 100 / (V_t - V_0)_{\text{témoin}}$$

Nous considérons :

V_0 : Volume de la patte avant injection de la carragénine ;

V_t : Volume de la patte à un intervalle de temps déterminé après injection de la carragénine.

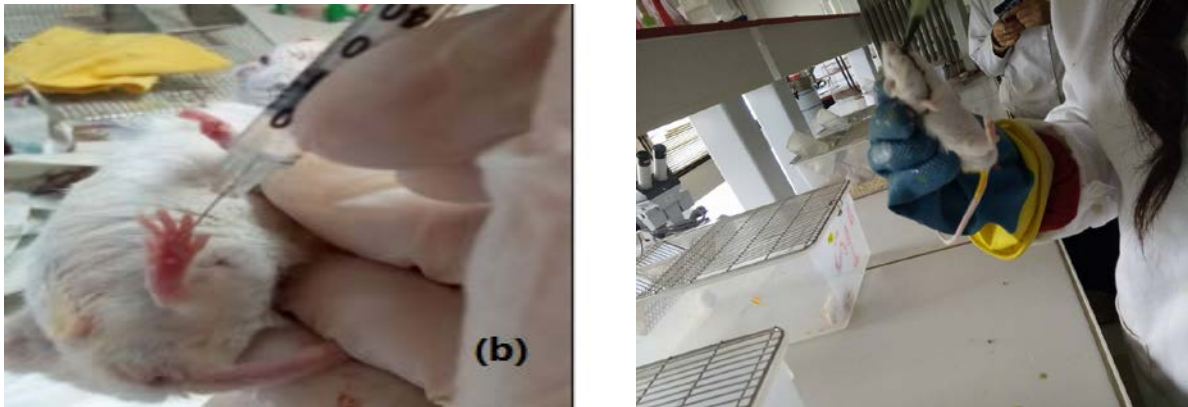


Figure 16 : (a) injection sub-plantaire de la carragénine; (b) administration de l'EELS



Figure 16 : (c) Mesure de l'épaisseur de la patte à l'aide d'un pied à coulisse digital

II.2.7.3 Perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique

La perméabilité vasculaire chez la souris a été évaluée selon la méthode de **Kou et ses collaborateurs (2006)**. Trois groupes de neuf souris sont utilisés.

- **Le Lot témoin** : Les souris du groupe témoin ont reçu 0,2 mL d'une solution de NaCl 0,9 %.
- **Le Lot référence** : Les souris de ce lot ont été traitées par 50 mg/Kg d'indométacine, par voie orale.
- **Le Lot essais** : L'EELN à tester a été administré aux souris par voie (ip) à raison de 780 mg/kg.

Une heure après, les souris ont une injection intraveineuse de 10 mL/kg d'une solution de bleu d'Evans 1%, suivie d'une injection intra-péritonéal de 10 mL/kg d'acide acétique 0,7% (figure 17).



Figure 17: (a) injection intraveineuse de bleu d'Evans ; (b) injection intra-péritonéal de l'acide acétique

Trente minutes après, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Après lavage de la cavité péritonéale par 3 mL d'une solution physiologique. L'exsudat a été récupéré puis centrifugé et l'absorbance du surnageant a été mesurée à 610 nm contre une solution NaCl 0,9% (blanc) **Kou et ses collaborateurs (2006)** (figure 18).

Le pourcentage d'inhibition de la perméabilité vasculaire est calculé selon la formule :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(A_{\text{témoin}} - A_{\text{traité}}) / A_{\text{témoin}}] \times 100$$

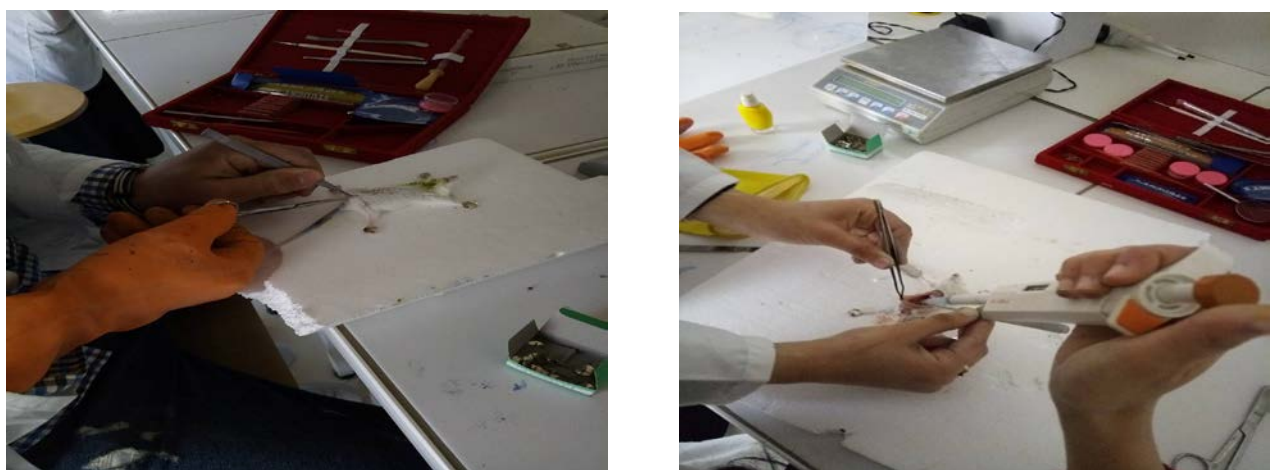


Figure 18 : Dissection des souris et récupération de l'exsudat

Chapitre III

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Extraction

La préparation de l'extrait à partir des feuilles du laurier (*Laurus nobilis*) broyées été effectuée par l'éthanol. Cette extraction a permis d'obtenir un extrait brut : l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis*(EELN).

Après extraction et récupération del'extrait, le rendement, la couleur et l'aspect physique sont déterminés et représentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Caractéristiques de l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis*

Extrait	Aspect	Couleur
EELN	Pâteux	Vertfoncé

III.1.1 Teneur en polyphénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique adaptée de **Singleton et Ross (1965)** avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

Afin de caractériser l'extrait préparé à partir des feuilles de *Laurus nobilis*, la quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax$) réalisé par une solution étalon (l'acide gallique) à différentes concentrations (figure 19).

La quantité des polyphénols correspondante à l'extrait étudié a été rapportée en milligramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (tableau 4).

Le résultat obtenu indique que la quantité des composés phénoliques est de $35,86 \pm 0.05$ mg d'acide gallique/mg d'extrait. La teneur en polyphénols est relativement grande dans notre extrait.

Ce taux est significativement plus élevé que celui obtenu par **Muñiz-Márquez et al. (2014)** qui ont comparé les teneurs en phénols totaux des extraits de feuilles de *Laurus nobilis* obtenus par différentes méthodes d'extraction.

De nombreux rapports indiquent que les paramètres d'extraction ont une forte influence sur la récupération de composés bioactifs (**Muñiz-Márquez et al.,2014**).

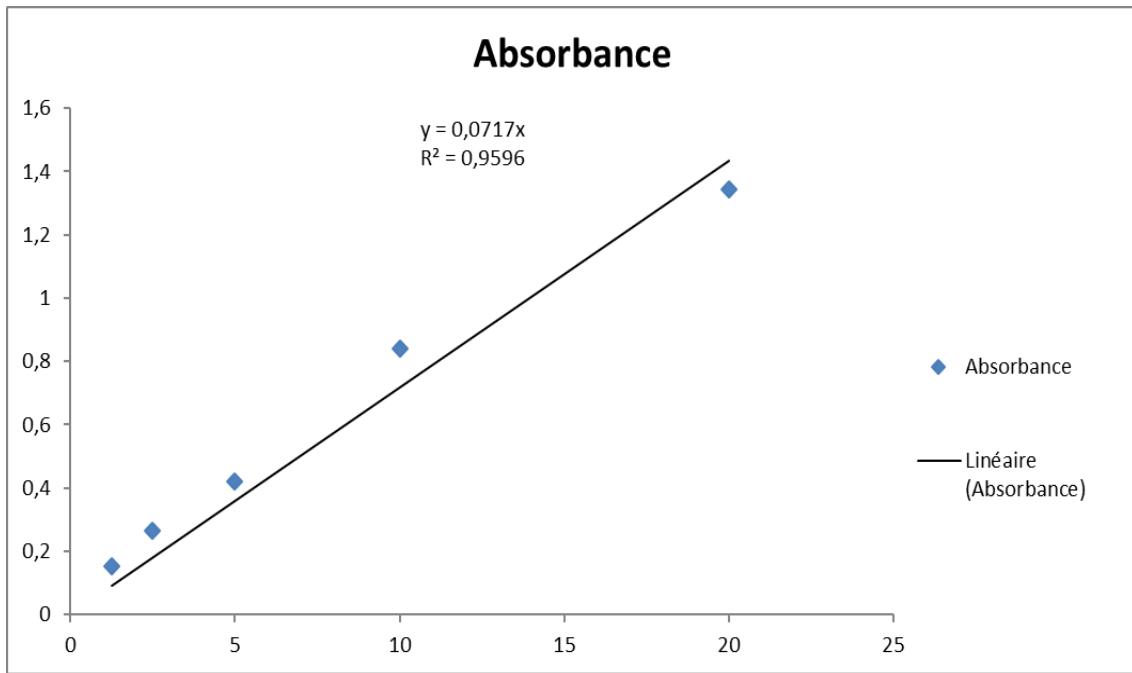


Figure 19 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

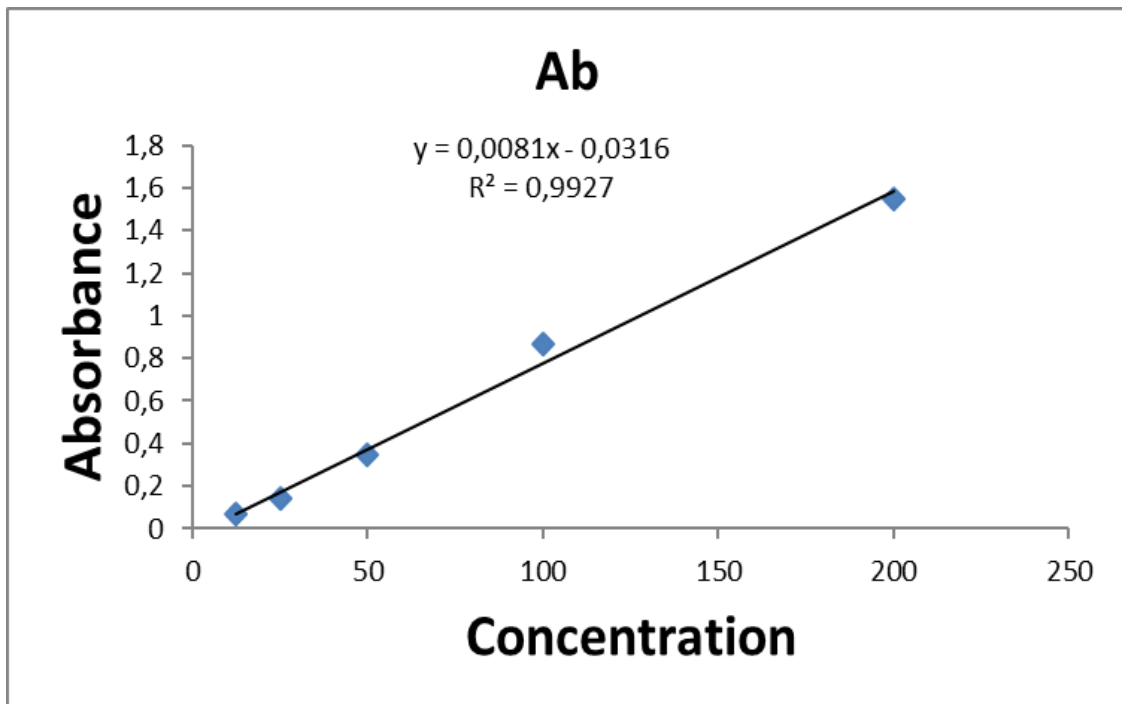


Figure 20 : Droite d'étalonnage de la quercétine.

Tableau 4 : Teneur en phénols totaux dans l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis*

Echantillon dosé	Teneurs en phénols totaux (Mg d'Equivalent d'Acide Gallique par Gramme d'Extrait)
L'extrait éthanolique de <i>Laurus nobilis</i>	35,86±0.05

III.1.2. Teneur en flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) (Chang et al., 2002). La quercétine a été utilisée comme étalon. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 430 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, d'où on a calculé la teneur en flavonoïdes de l'extrait éthanolique qui est exprimée en mg équivalent de la quercétine (EQ) par gramme d'extrait (Figure 20).

Tableau 5 : Teneur en flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis*

Echantillon dosé	Teneurs en Flavonoïdes (Mg d'Equivalent de la Quercétine par Gramme d'Extrait)
L'extrait éthanolique de <i>Lepidium sativum</i>	122,25±0.02

La teneur en flavonoïdes de l'extrait de *Laurus nobilis* étudié est égale à 122,25±0.02 mg EQ/g d'extrait. Ce résultat est comparable à d'autres études qui s'intéressent à la détermination des teneurs en flavonoïdes et les profils phénolique des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* à savoir l'étude de Škerget et al. (2005) *Laurus nobilis* de la Slovénie, Dall'acqua et al. (2009) qui ont identifié les flavonoïdes de l'infusion de *L. nobilis* de l'Italie. De même pour l'étude de Lu et al. (2011) qui ont déterminé la teneur des flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis* de la Chine.


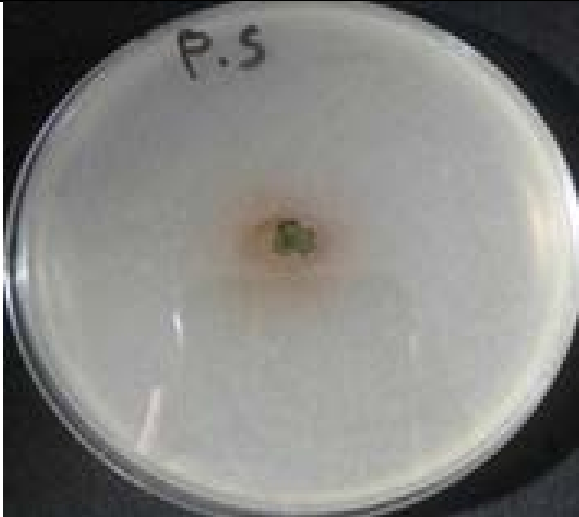
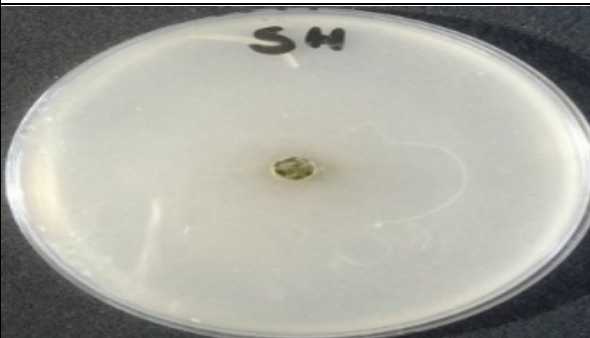
III.2 Etude de l'activité antimicrobienne

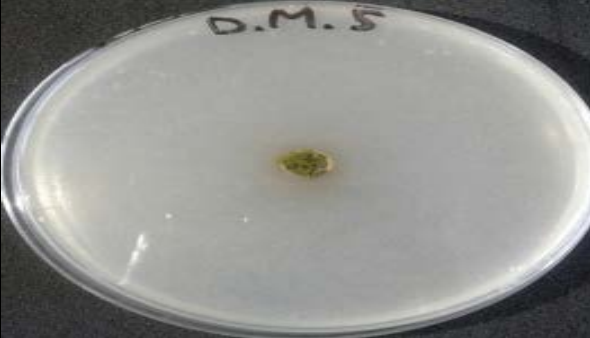




III.2.1 Méthode des puits


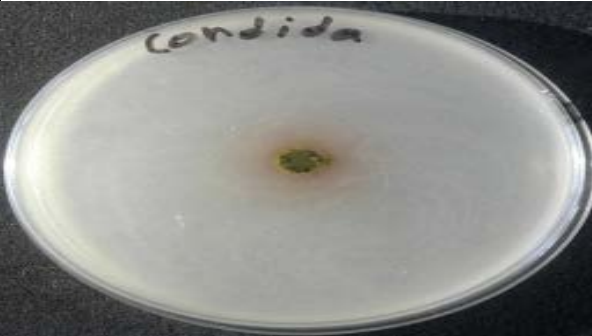
L'activité antibactérienne se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du puit contenant l'EELN étudié. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre. D'après le tableau 6 qui présente les résultats, nous remarquons que la souche la plus

sensible à l'extrait est *Staphylococcus aureus* par un diamètre d'inhibition de 16mm, suivie de *Bacillus subtilis*, *Carnobacterium maltoaromaticum*, *Bacillus serius*, *Shigella boydii* et la levure *Candida albicans* qui ont affichés des diamètres d'inhibition de 10mm. Une sensibilité moins importante a été affichée par *Aspergillus niger*. Tant dis que les deux souches *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* n'ont pas affichées une sensibilité pour l'extrait.

Tableau 6 : Résultats de l'activité antimicrobienne de l'EELN exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm

Souches	diamètres	Aspects
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10876	10 mm	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	4 mm	
<i>Shigella boydii</i> ATCC 8700	10 mm	

<p><i>Carnobacterium maltoaromaticum</i> ATCC 35586</p>	<p>10 mm</p>	
<p><i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047</p>	<p>10 mm</p>	
<p><i>Aspergillus niger</i> ATCC 106404</p>	<p>09 mm</p>	
<p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p>	<p>01 mm</p>	
<p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862</p>	<p>16 mm</p>	

<p><i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876</p>	<p>10 mm</p>	
<p><i>Candida albicans</i> ATCC10231</p>	<p>10 mm</p>	

III.2.2 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La détermination du paramètre antimicrobien (CMI) de l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis* a été effectuée sur les mêmes souches qui ont été utilisées dans la méthode de disque. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 7 en terme de (+) et (-) :

(+) : Présence des bactéries.

(-) : Absence des bactéries.

Nous remarquons que l'extrait de *Laurus nobilis* a exercé une grande activité contre 8 des souches testées. Les valeurs ont été obtenues à une gamme allant de 0,08 à 3,12 µl/ml de CMI. Par contre les souches les moins sensibles à l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis* sont *Candida albicans* ATCC10231, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 et *Escherichia coli* ATCC 25922 (CMI= 0,08).

Tableau 7 : Détermination de la CMI de l'extrait éthanolique de *laurus nobilis*

Les concentrations \ Les souches	1/200	1/100	1/50	1/25	1/12,5	1/6,25	1/3,12	1/1,56	1/0,78	1/0,39	1/0,19	1/0,09	CMI
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	0.08
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	0.08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	0.16
<i>Shigella boydii</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	0.04
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	0.16
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	0.08
<i>Carnobacterium Maltoaromaticum</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	0.16
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	0.08
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	0.16
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	0.08

III.3 Etude de l'activité anti-inflammatoire (*in vitro*)

III.3.1 Test de dénaturation des protéines

Le tableau 9 montre les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis* qui consiste à évaluer les pourcentages d'inhibition de la dénaturation de sérum albumine bovin (BSA).

Tableau 8: Effets anti inflammatoire de l'EELN *in vitro*

	EELS	Diclofenac
Concentration (µg/ml)	1000	1000
% d'inhibition	94,64	118,4

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation l'EELN était efficace avec une inhibition égale à 94,64%. Les résultats obtenus pour cet extrait sont comparables à ceux obtenus pour le diclofenac, un médicament anti-inflammatoire utilisé comme standard qui exerce un pourcentage d'inhibition à la même concentration.

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (**Barros et al., 2008**) (**Bagad et al., 2011**). La production d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoires peut être due à la dénaturation des protéines *in vivo*. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintient la structure tridimensionnelle des protéines (**Barros et al., 2008 ; Mizushima et Kobayashi., 1968**).

Il est prouvé que les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme le phénylbutazone et L'indométhazine inhibent pas seulement la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, mais inhibent aussi la dénaturation des protéines (**Mizushima et Kobayashi., 1968**).

D'après les résultats, on constate que l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis* est capable de contrôler la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation des protéines.

L'activité inhibitrice de la dénaturation de BSA est peut être attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes dans l'EELN trouvés lors des criblages phytochimiques. De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différents extraits de

plantes sur l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par la méthode de la dénaturation des protéines (Sangeetha et al., 2011 ; Barros et al., 2008 ; Mizushima et Kobayashi., 1968).

III.4 Activités biologiques (*in vivo*)

III.4.1 Etude de l'activité analgésique (Test de torsion)

Le criblage de l'effet analgésique est réalisé par le test de l'acide acétique, très répandu pour sa haute sensibilité et sa capacité de mettre en évidence les molécules aussi bien à effet périphérique que central. On injecte une solution d'acide acétique à 1% par voie ip, 5min après, on compte pour chaque souris le nombre de contorsion (NC) sur une durée de 20 minutes (figure 19).

- Le groupe témoin ayant reçu de l'eau physiologique présente après injection intrapéritonéale de l'acide acétique à 1%, une moyenne de contorsions de 15 fois pendant 15 secondes.
- L'administration par intrapéritonéale de Paracétamol à la dose de 200 mg/kg, présente un nombre de contorsions qui est égale à 2 fois lié à l'administration de l'acide acétique.
- Après l'administration de l'acide acétique et l'extrait de *Laurus nobilis* à 780mg/kg par voie ip, présente un nombre de contorsions qui est égale à 9 fois.



Figure 21 : une souris avec une crampe.

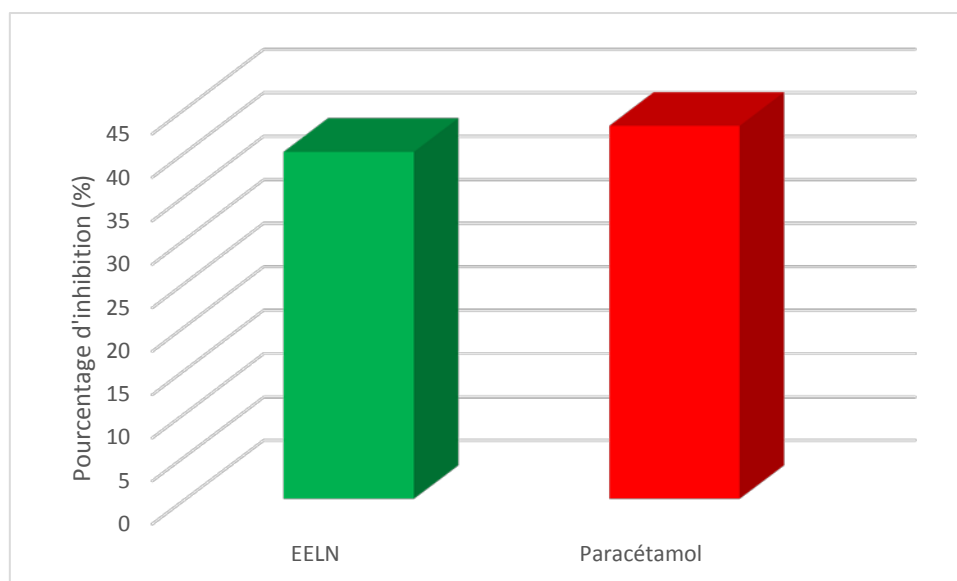


Figure 22: Les pourcentages d'inhibition des contorsions de l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis*(EELN) et du paracétamol

Les résultats obtenus montrent que l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis* présente un effet analgésique en réduisant le nombre de contorsions abdominales. Ceci suggère que l'extrait posséderait des composés qui agiraient selon le même mécanisme que le paracétamol, et par ce fait, inhiberait la COX-1 et la COX-2, empêchant la synthèse des prostaglandines (Le Bars et al, 2001).

A l'issue de ces résultats, il ressort que l'extrait éthanolique de *L.nobilis* posséderait des propriétés analgésiques.

III.4.2 Etude de l'activité anti-inflammatoire in vivo

III 4.2.1 Test de l'œdème plantaire induit par la carragénine

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de *Laurus nobilis* a été réalisée par le test de l'œdème plantaire induit par injection de la carragénine chez les souris. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 21.

La figure 21 montre l'effet inhibiteur exercé par l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis* et le diclofénac sur le développement de l'inflammation en fonction des heures. Nous remarquons que le seuil maximal a été atteint à 6 heures. En effet, le pourcentage d'inhibition obtenue a été à raison de 98,6817% pour l'EELN à la dose de 780 mg/kg. L'œdème plantaire est l'un des principaux facteurs utilisés pour l'évaluation du degré d'une inflammation aiguë et de l'efficacité des nouveaux médicaments anti-inflammatoires (Begum et Sadique, 1988). Son induction par injection de la carragénine est utilisée comme modèle expérimental standard

(Banerjee et al., 2000). Ce phénomène se caractérise habituellement par une réponse biphasique. La première phase (1 - 2 heures) dépend de la libération de médiateurs chimiques tels que, l’histamine, la sérotonine et la bradykinine. La deuxième phase (3 – 6 heures) est soutenue par la libération de prostaglandines, leucotriènes, lysozymes, protéases et oxyde nitrique (NO) (DiRosa et al., 1971; Olajide et al., 1999; Posadas et al., 2004).

A travers nos résultats, nous avons constaté que l'extrait de *Laurus nobilis*, possédait un effet anti-inflammatoire considérable, ce qui lui a permis, à partir des premières heures, d’inhiber l’inflammation de façon hautement significative par rapport au groupe témoin.

On conclue que l'extrait de *Laurus nobilis* auraient empêché la libération des médiateurs pro-inflammatoires de la phase tardive (3 – 6 heures) en inhibant l’expression des principaux précurseurs (iNOS et COX-2)(Vigo et al., 2004).

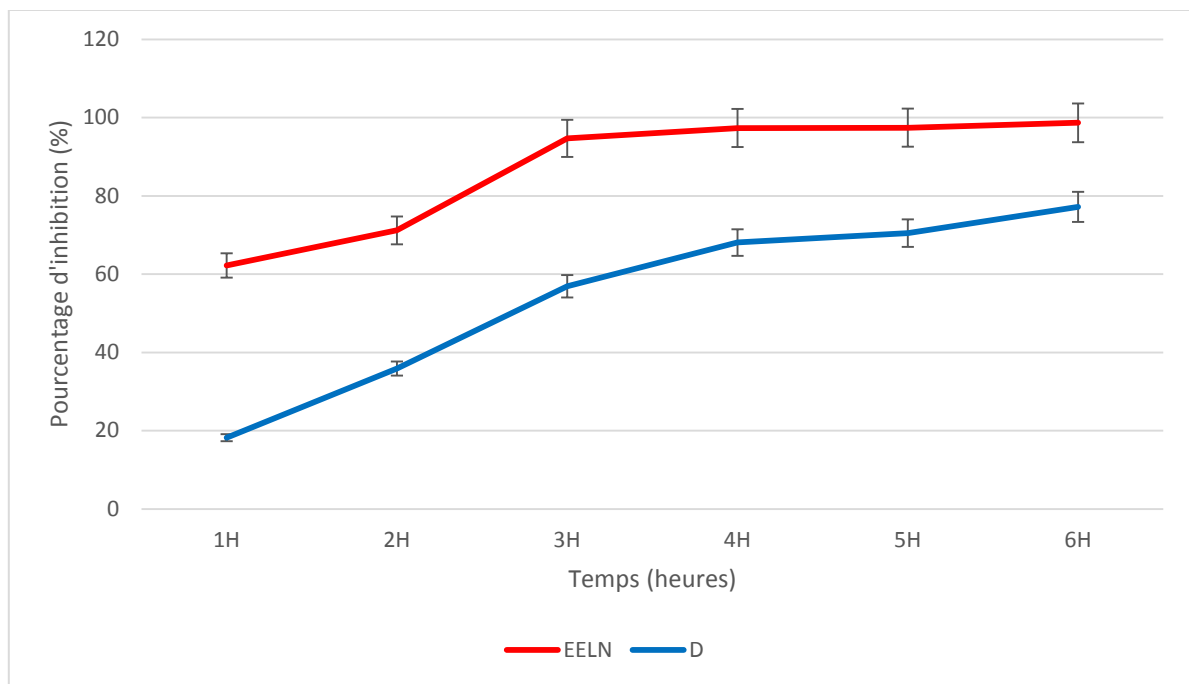


Figure 23 : Inhibition de l’œdème plantaire (en %) par l’extrait ethanolique de *Laurus* (EELN) et le diclofénac (D)

II 4.2.2. Perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'EELNa a été déterminée aussi par l'effet de l'extrait de *Laurus nobilis* sur la perméabilité vasculaire induite au niveau péritonéal par l'acide acétique chez les souris (Kou et al., 2006). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 22.

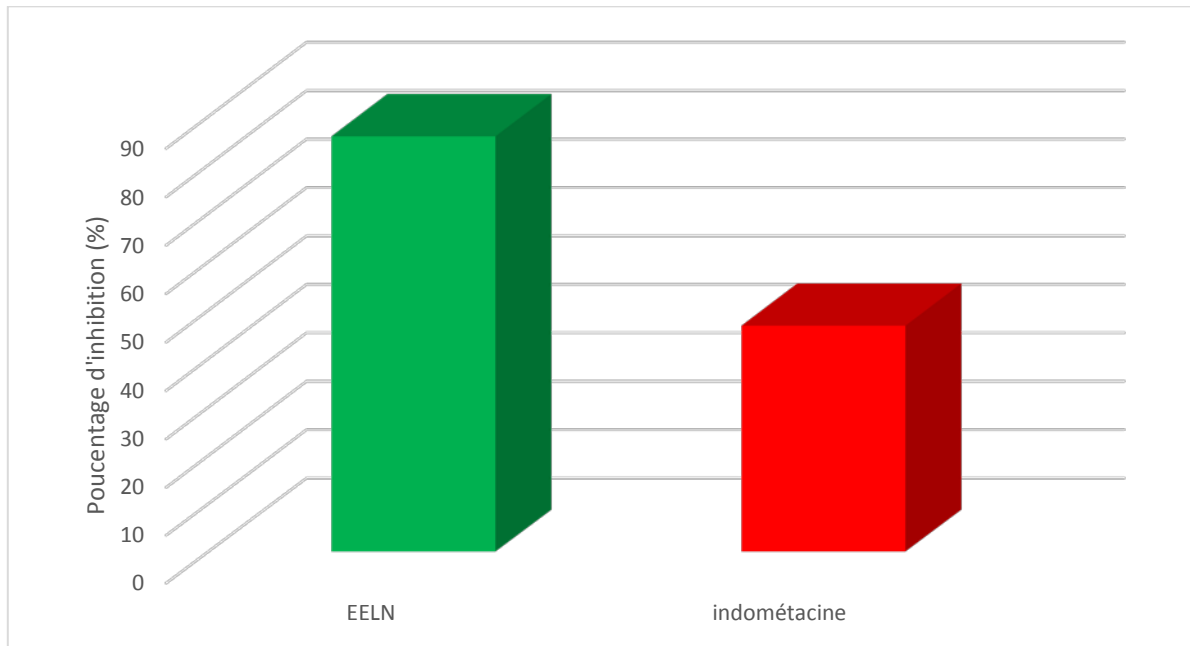


Figure 24: Le pourcentage d'inhibition de l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis*(EELN) et indométhacine.

Les résultats obtenus montrent que les groupes ayant reçu un traitement avec l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis*, ou l'indométhacine une heure avant l'induction de l'inflammation par l'acide acétique affichent une réduction significative ($p < 0.05$) dans la perméabilité vasculaire au niveau péritonéal. Le traitement par 50 mg/kg d'indométhacine induit une inhibition de la perméabilité vasculaire de 46 %. Le traitement par 780 mg/kg d'extrait éthanolique de *Laurus nobilis* par voie orale provoque une inhibition de 85.9 % de la perméabilité vasculaire, cette inhibition est supérieure à celle obtenue avec l'indométhacine.

Le prétraitement des souris par l'extrait éthanolique entraîne une inhibition significative de la perméabilité vasculaire. Cette inhibition est statistiquement supérieure à celle exercée par l'indométhacine.

La perméabilité vasculaire est derrière l'exsudation plasmatique qui contribue à enrichir le milieu extravasculaire en facteurs destinés à entretenir et à amplifier la réponse inflammatoire (**Regnault, 1992**). La capacité de l'extrait d'inhiber la perméabilité vasculaire indique qu'il peut moduler l'amplitude de la réaction inflammatoire, ce qui peut expliquer l'effet anti-œdémateux observé dans le test précédent.

Conclusion

CONCLUSION

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a suscité un grand intérêt dans la recherche biomédicale, une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique.

Le présent travail vise à l'évaluation des effets antibactériens, antioxydant et anti-inflammatoire *in vivo* et *in vitro*, et analgésique de l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis* (EELN).

Tout d'abord, nous avons commencé par l'estimation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux dans l'extrait, les résultats obtenus montrent qu'il est riche par ces métabolites. La teneur en polyphénols est égale à $35,86 \pm 0.05$ mg d'acide gallique/mg d'extrait, et celle des flavonoïdes est égale à $122,25 \pm 0.02$ mgd'Equivalent de quercetine/g d'extrait.

Après l'étude de l'activité antimicrobienne par la technique des puits, les diamètres des zones d'inhibition affichés varient entre 00 et 16 mm. La comparaison entre les souches, les souches les moins sensibles à l'extrait éthanolique de *laurus nobilis* sont *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922. Tandis que le plus grand diamètre d'inhibition a été affiché par la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 33862.

En outre, la méthode de macrodilution en milieu liquide a permis d'obtenir les concentrations minimales inhibitrices dont les valeurs varient entre 0,08 à 3,12 μ l/ml.

L'activité anti-inflammatoire (*in vitro*) d'EELN à été effectuée par la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines. Les résultats obtenus montrent quel pourcentage d'inhibition de la dénaturation l'EELN était significativement très efficace avec une inhibition égale à 94.64%. Les résultats obtenus pour cet extrait sont comparables à ceux obtenus pour le diclofenac.

Par ailleurs, l'activité anti-inflammatoire a été réalisée *in vivo* via le test d'œdème plantaire induit par injection de la carragénine. Les souris ont été réparties en trois lots recevant de l'EELN (780 mg/kg), le diclofénac (50 μ l/kg) et le groupe témoin, les résultats obtenus montrent que l'EELN possède un effet anti inflammatoire considérablement significatif qui s'est manifesté par une réduction de 98,68% d'œdème .

Quant à l'activité analgésique, les souris ont été réparties en trois lots recevant de l'EELN (780 mg/kg), le paracétamol (200 mg/kg) respectivement, et le groupe témoin ayant reçu de l'eau physiologique. Après 20 min injection intrapéritonéale de l'acide acétique à 1%, Les résultats obtenus montrent que l'EELN présente un effet analgésique comparable à celui du paracétamol qui s'est prononcé par la réduction de 40% des torsions.

Dernièrement, l'effet de l'EELN sur la perméabilité vasculaire induite au niveau péritonéal par l'acide acétique a été exploré. Les souris ont été réparties aussi en trois lots recevant de l'EELN (780 mg/kg), l'indométacine (50 mg/kg), et le groupe témoin ayant reçu de l'eau physiologique. Une heure après, les souris des trois derniers lots ont reçu une injection intraveineuse de 10 ml/kg d'une solution de bleu d'Evans 1%, suivie d'une injection intrapéritonéale de 10 ml/Kg d'acide acétique 0,7%. Les résultats obtenus montrent que l'EELS possède une inhibition de 85.9 % de la perméabilité vasculaire, cette inhibition est supérieure à celle obtenue avec l'indométacine.

En fin, L'ensemble des résultats obtenus au cours de notre investigation, constitue une première étape dans la recherche des substances de source naturelle biologiquement active

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- Barla A.**, Topçu G., Öksüz S., Tümen G., Kingston D.G.I., (2007) Identification of cytotoxic sesquiterpènes from *Laurus nobilis* L., *Food chemistry* **104** : 1487-1484.
- Demir V.**, Guhan T., Yagcioglu A.K., Ddegirmencioglu A., (2004) Mathematical modeling and the Determination of some Quality Paramaters of Air-dried Bay leaves. *Biosystems Engineering*. **88** (3) : 325-335.
- Ferreira A.**, Proença C., Serralheiro M.L.M., Araújo M.E.M. (2006) The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J. Ethnopharmacology*. **108**: 31-37.
- Iserin P.** (2001) Encyclopédie des plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Larousse. Londres Pp : 143 et 225-226.
- Quezel P.** et Santa S. (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales Ed C.N.R.S. Tome I. 565 p.
- Beloued A.** (2005) Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires. Alger. Pp : 124.
- Bruneton J.** (1999) Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3^{ème} Ed Tec&Doc. Paris.
- Sayyah M.**, Valizadeh J., Kamalinejad M. (2002) Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole. *Phytomedicine*. **9** : 212-216.
- Fiorini C.**, David B., Fourastét I., Vercauteren J. (1998) Acylated Kaempferol glycosides from *Laurus nobilis* leaves, *J. Phtochemistry*. **47** (5) : 821-824.
- Kivçak B.**, Mert T. (2002) Preliminary evaluation of cytotoxic properties of *Laurus nobilis* leaf extracts. *Fitoterapia*. **73**: 242-243.
- Simi M.**, Kundakovi T., Kovaevi N. (2003) Preliminary assay on the antioxidant activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitoterapia*. **74**: 613-616.
- Demo A.**, Petrakis C., Kefalas P., Bosliou D., 1998, Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plans leaves. *Food Research international*. **31** (5) : 351-354.
- Gómez-Coronado D.J.M.**, Ibañez E., Rupêrez F.J., Barbas C. (2004) Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin, *Journal chromatography*. **1054**: 227-233.
- Aqili khorasani M.S.** (1992) Collection of drugs. Educational Organization, Tehran. Pp : 624-630.
- Atanda O.O.**, Akpan I., Oluwafemi F. (2007) The potential of some spice essential oil in the control of *A.parasiticus* CFR 223 and aflatoscin production, *Food Control* **18**: 601-607.
- Gee J.M.**, Johnson I.T. (2001) Polyphenolic compounds : interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*. **8** : 1-182.
- Dacosta, Y.** (2003) Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317 p.

- Paganga G.**, Miller N., Rice-Evans C. A. (1999) The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. *Free Radic Res.* **30** : 62-153.
- Harborne J. B.**, Williams C. A. (2000) advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* **55** : 481-504.
- Havsteen B. H.** (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therap.* **96**: 67-202.
- Remesy C.**, Manach C., Demigne C., Texier O., Regerat F. (1996) Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Méd. Nut.* **32** : 17-27.
- Bronner W.E.**, Beecher G. R. (1995) Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *Journal of chromatography A.*, **705** : 247-256.
- Fuhrman B.**, Lavy A., Aviram M. (1995) Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* **61** : 549-554.
- Halliwel B.** (1994) Free radicals and antioxidants. *Nutr. Rev.* **52** : 253-265.
- Cotelle, N.** (2001) Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem.* **1**: 569-590.
- Jovanovic S.V.**, Steenken S., Simic M.G., Hara Y. (1998) Antioxidant properties of flavonoids. *AHDIEQ Journal.* **7** : 137-161.
- Hanasaki, Y.**, Ogawa, S., Fukui, S. (1994) The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **16**: 845-850.
- Cos P.**, Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K. et autre (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* **61**: 71-76.
- Brown J. E.**, Khodr H., Hider R. C., Rice-Evans C. (1998) Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions. *Biochem. J.* **330** : 1173-1178.
- Van Acker S.A.B.E.**, van den Berg D.J., Tromp M.N.J.L., et al. (1996) Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* **20**: 331-342.
- Rice-Evans, C.A.**, Miller, N.J., Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20** : 933-956.
- Woodman O. L.**, Meeker W. F., Boujaoude M. (2005) Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones. *J. Cardiovasc.Pharmacol.* **46** : 302-309.
- Jassim S.A.**, **Naji M.A.** (2003) Novell antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Appl. Microbiol.* **95** (3) : 412-27.
- Takahashi T**, Kokubo R, Sakaino M (2004) Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. *Lett. Appl. Microbiol.* **39** (1) : 60-4
- Yadava R.N.**, Tiwari L. (2005) A potential antiviral flavone glycoside from the seeds of *Butea monosperma*. *O. Kuntze. J. Asian. Nat. Prod. Res.* **7** (2) : 185-188.

- Tereschuk** M. L., Riera M.V., Castro G.R., Abdala L. R. (1997) Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *J. Ethnopharmacol.* **56** : 227–232.
- Essawi** T. et **Srouf** M. (2000) Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharm.* **70** : 343-349.
- Sakar** M.K., Engelshowe R., Tamer A.U. (1992) Isolation and antimicrobial activity of flavonoids from *Prunus spinosa* L. flowers. *Hacettepe Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi.***12** : 59-63.
- Verma** D. K., Singh S. K., Tripathi V. (1997) A rare antibacterial flavone glucoside from *Lantana camara*. *Indian Drugs.* **34** : 32–35.
- Hamilton-Miller** J. M. T., Shah S. (2000) Activity of the tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46** : 852-853.
- Grange** J. M., Davey R. W. (1990) Antibacterial properties of propolis. *J. R. Soc. Med.* **83** : 159–160.
- Harikrishna** D., Appa Rao A. V. N., Prabhakar M. C. (2004) Pharmacological investigation of a flavonoid glycoside. *Indian. J. Pharmacol.* **36** : 244-250.
- Valsaraj** R., Pushpangadan P., Smitt U. W ., et al. (1997) New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*. *J. Nat. Prod.* **60** : 739-742.
- Wachter** G. A., Hoffmann J. J., Furbacher T., Blake M. E., Timmermann B. N. (1999) Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry* **52** : 1469-1471.
- Zheng** W. F., Tan R. X., Yang L., Liu Z. L. (1996) Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. *Planta. Med.***62** :160-162.
- Afolayan** A. J. et Meyer J. J. (1997) The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *J. Ethnopharmacol.* **57**:177-1781.
- Mahmood** N., Pizza C., Aquino R. et autre (1993) Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antivir. Res.* **46** (7) : 1257-1271.
- Tsuchiya** H. et Inuma M. (2000) Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine* **7**:161–5.
- Haraguchi** H., Tanimoto K., Tamura Y., Mizutani K., Kinoshita T. (1998) Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry.* **48** : 125-129
- Middleton** E. J. (1998) Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **439**: 175-182.
- Pelzer** L. E., Guardia T., Juarez A. O., et al. (1998) Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Farmaco.* **53** (6): 421-424.
- Yeon**, S.C., Hyon, G.J., Kun, H. S., et al. (2001) Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: Cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochem. Pharmacol.* **62** : 1185-1191.

Laughton M. J., Evans P.J., Moroney M. A. et autre (1991) Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochem. Pharmacol.* **42** : 1673-1681.

Read M. A., (1995) Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents *Vascular. Am. J. Pathol.* **147** (2) : 235-237.

Sánchez de Medina F., Vera B., Gálvez J., et al. (2002) Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sci.* **70** (26): 3097-3108.

Namgoong S. Y., Son K. H., Chang H. W., Kang, S. S., Kim H. P. (1994) Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci.* **54** (5) : 313-320.

Ong K.C. , Khoo H.E. (2000) Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci.* **67** : 1695-1705.

Birt D. F., Hendrich, S., Weiqun, W. (2001) Dietary agents in cancer prevention : flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Therap.* **90** : 157-177.

Bracke M., Vyncke B., Opdenakker G., et al. (1991) Effect of catechins and citrus flavonoids on invasion *in vitro*. *Clin. Exp. Metastasis.* **9** :13-25.

Martin M. J., Marhuenda E., Perez-Guerrero C., et al. (1994) Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats. *Pharmacology* **49** (3) : 144-150.

ANNEXE N° 01

1 - Bouillon nutritif (BN)

- 1000 mL d'eau distillée
- 100 g de peptone
- 05 g d'extrait de viande
- 0.5 g de chlorure de sodium

2 – Milieu Mueller Hinton (MH)

Les proportions ci-dessous sont calculées pour 1000 mL d'eau distillée.

- Infusion de 300 grammes de viande de bœuf déshydratée.
- Hydrolysate acide de caséine : 17,5 g
- Amidon de maïs : 1,5 g
- Agar : 10 à 15 g
- pH final du milieu : 7,4

Porter le tout à ébullition et verser le milieu dans les tubes avant qu'il ne se solidifie.

3 - Tampon PBS

- 1000 ml d'eau distillée
- 8 g NaCl
- 0.2 g KCl
- 1.44 g Na₂ HPO₄
- 0.24 g KH₂ PO₄
- pH à 7, 4.

ANNEXE N°02

Tableau : Détermination de la CMI de l'extrait éthanolique de *laurus nobilis*

Les concentrations Les souches bactériennes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
(1) <i>Enterobacter cloacae</i>												
(2) <i>Bacillus subtilis</i>												
(3) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>												
(4) <i>Shigella</i>												
(5) <i>Aspergillus niger</i>												
(6) <i>Candida albicans</i>												
(7) <i>Carnobacterium maltoaromaticum</i>												
(8) <i>Staphylococcus aureus</i>												
(9) <i>Bacillus cereus</i>												
(10) <i>Escherichia coli</i>												