



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique

Université Ziane Achour –Djelfa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en biologie

Option : Biotechnologie Microbienne -Microbiologie-

Thème :

Mise en évidence des activités antimicrobienne
et antioxydante des huiles essentielles et des
extraits de *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) de
la région d'El Assafia (W. de Laghouat) Algérie.

Présenté par :

MAIDI Leila

Devant le jury composé de :

Pr. Lahrech Mokhtar Boualem	Professeur	Président	Université de Djelfa
Dr. Dahia Mostefa	Maitre de conférences	Rapporteur	Université de Djelfa
Dr. Gauzi Hicham	Maitre de conférences	Examineur	Université de Laghouat
Dr. Benalia Yabrir	Maitre de conférences	Examineur	Université de Djelfa
Dr. Cherif Kamel	Maitre de conférences	Examineur	Université de M'sila
Mr. Khader M'hammed	Maitre-assistant	Invité	Université de Djelfa

Année universitaire :2013/2014

ملخص

تعتبر دراسة الايضيات الثانوية (الزيوت الاساسية و المواد الفينولية و الصابونين) لدى النباتات الطبية موضوع ذو أهمية لما تحتويه هذه النبات من مركبات ذات نشاطات بيولوجية كبيرة .

في هذا البحث قمنا بدراسة نبتة الحبق *Ocimum basilicum* التي تنتمي الى عائلة Lamiaceae و المزروعة في منطقة الأغواط ، حيث عملنا على دراسة نشاطها المضاد للأكسدة و المضاد للبكتيريا .

كشفت البحث الكيميائي النباتي على وجود الزيوت الاساسية ،المواد الفينولية و الصابونين.

خصت المرحلة الأولى من البحث باستخلاص الزيوت الاساسية حيث كان المردود كبيرا يقدر بـ 2,047 % و قمنا كذلك باستخلاص و تقدير المواد الفينولية (الفلافونويدات و التانات) و الصابونين. تبين النتائج المتحصل عليها أن مستخلص acétate d'éthyle غني بالمركبات الفينولية بنسبة 24,45mg/g و مستخلص butanol غني بالصابونين 18,28mg/g . قمنا في المرحلة الثانية من هذا العمل بدراسة الخاصية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات باستخدام اختبار DPPH وقد أبدت النتائج أن مستخلص acétate d'éthyle يملك فعالية كبيرة جدا و مهمة ،بالنسبة لمستخلص butanol فعاليته متوسطة و سجل للزيت الاساسي فعالية ضعيفة جدا.

و في المرحلة الأخيرة، تمت دراسة النشاط المضاد للمكروبات (بكتيريا و فطريات) و النتائج المحصل أظهرت أن الزيوت الاساسية لها فعالية كبيرة ضد البكتيريا غرام السالبة و سجلت فعالية مهمة أيضا في المواد الفينولية و عليه، تبين أن الفعالية الأكبر عند الزيوت الاساسية و المواد الفينولية و على الفطريات بشكل أكبر في حين أن مستخلص butanol سجل الفعالية الأضعف.

الكلمات المفاتيح: *Ocimum basilicum*، الأغواط، الزيوت الاساسية،المواد الفينولية،الصابونين، مضاد للأكسدة، مضاد للبكتيريا، مضاد للفطريات

Résumé

L'étude des métabolites secondaires (les huiles essentielles, les composés phénoliques et les saponines) des plantes médicinales présentent un sujet d'intérêt scientifique grâce à leurs activités biologiques.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à *Ocimum basilicum* appartenant à la famille des Lamiaceae de la Laghouat, pour objectif d'étude d'activité antioxydante ainsi que l'activité antimicrobienne de certains métabolites secondaires.

Le screening phytochimique a mis en évidence la présence, des flavonoïdes, des tanins condensés, saponines et de l'huile essentielle.

La première partie de cette étude concerne l'extraction et la quantification des huiles essentielles, Les résultats obtenus ont montré que le rendement est estimé à 2,047%, les résultats de l'extraction des composés phénoliques et les saponines montrent la richesse de l'extrait d'acétate d'éthyle en phénol totaux, la teneur est de 24,45 mg /g, l'extrait butanolique est riche en saponines avec une teneur 18,28 mg/g. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié les activités antioxydantes de nos extraits par le test DPPH. Les résultats confirment que nos extraits possèdent des activités antioxydantes intéressante pour l'acétate d'éthyle et modérée pour l'extrait butanolique. Par ailleurs, l'huile essentielle a présenté une activité antioxydante très faible.

Dans la dernière partie nous avons étudié le pouvoir antimicrobien de nos extraits contre quelques bactéries et champignons. Les résultats révèlent que les huiles essentielles sont dotés d'un pouvoir antimicrobien le plus important surtout vis-à-vis les Gram-, une activité importante également enregistrée pour l'extrait d'acétate d'éthyle. Alors que l'extrait butanolique a révélé l'activité la plus faible.

Mots clés : *Ocimum basilicum*, Laghouat, les huiles essentielles, composés phénoliques, saponines, activité antioxydante, activité antibactérienne, activité antifongique.

Abstract

The study of the secondary metabolites (*essential oils*, saponins and polyphenols) in medicinal plants is an important topic exhibiting a lot of scientific attention due to their multiple biological activities.

In this study, we have studied the plant of basil *Ocimum basilicum* belonging to the family of lamiaceae and planted in Laghouat ; where we are interested in vitro study of their antioxidant and antimicrobial activities.

The Phytochemical screening has revealed the presence of *essential oils*, saponins and polyphenols.

The first part of this study concerns the extraction of *essential oil*, where it was a large yield which is estimated as 2.3 % and we have also extract and estimate total phenols (flavonoids and Tannins) and saponins, the results of the extraction of phenolic compounds and saponins show that ethyl acetate is rich in total phenols 24.45 mg/g and the extract of butanol is rich in saponin 18,28 mg/g., In the second part, we studied antioxidant of these extracts using the DPPH radical scavenging. Results have shown that the extract of ethyl acetate has a very large and important efficacy. the extract of butanol has shown a medium powers and it has recorded a very weak efficacy for the essential oil.

In the last part, we studied the antibacterial and antifungal potential against several species (bacteria and fungus) Results revealed that essential oil has a highly efficacy against bacteria gram-, and have recorded also an important efficacy in polyphenols. Moreover, it shown that the most efficacy is in essential oils and polyphenols mainly against fungi while the extract of butanol has recorded the weakest efficacy.

Key-words: *Ocimum basilicum*, *essential oil*, phenolic compounds, saponin, antibacterial activity, antifungal activity, antioxydant Activity.

Dédicaces

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour,
Le respect, la reconnaissance...
Aussi, c'est tout simplement que*

*Je dédie ce
Mémoire ...*

*Aux êtres les plus chers à mon cœur, ma mère et mon père, pour leurs
efforts soutiens et encouragements qui m'ont offert tout au long de
mes études et sans mes parents, je ne serais jamais arrivée ou je suis
aujourd'hui*

A mes sœurs et A mes frères

A Safia

*A mes très chères amies : Saumia ,Toraya, Aicha, Khadija, Souad,
Fatima, Amal, Saliha, Faiza*

*A mes camarades de promotion 2010-2011 de la PG «Biotechnologie
microbienne-microbiologie».*

Remerciements

Je remercie Dieu Tout Puissant de m'avoir permis de mener à terme ce travail.

*Je remercie Monsieur le Docteur **DAHIA Mostefa**, maitre de conférences à l'université de Djelfa pour son encadrement, son encouragement, sa disponibilité et ses conseils qui m'ont été très bénéfiques.*

*Mes remerciements vont à Monsieur le Professeur **Lahrech Mokhtar Boualem** pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant la présidence de ce jury. Qu'il trouve donc ici l'assurance de ma profonde gratitude.*

Je remercie vivement l'ensemble des membres du Jury qui m'ont fait grand honneur d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier également D. Chaibi Rachid chef de Département de Biologie d'avoir allégé certaines de mes tâches d'Ingénieur afin de poursuivre mes études.

J'exprime mes plus vifs remerciements au responsable des laboratoires du Département de Biologie : M. Hadjoudja Mustapha, et aux ingénieures de laboratoires : M. Mohamed Chetitha, Melle Dandane Sihame, Melle Otmani Rekia , Melle Aouissi fatima Z, Melle Ghenam Khadidja et Melle Latrache Aicha , d'avoir mis à mon entière disposition le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail.

Mes remerciements les plus sincères à Mme Elhouiti Fatiha, Melle Boussossa Hadjer, Mme Benarous Khadija, Melle Benabed Hoda et Melle Hamdi Aicha enseignants au Département de Biologie, Université de Laghouat, de m'avoir orienté et conseillé.

Je remercie M. Sifi Ibrahim, enseignant au Département de Biologie, Université de Laghouat, de m'avoir aidé durant la phase de mon travail.

*Je souhaiterais exprimer ma gratitude à monsieur **P. Mohamed Yousfi**, Directeur du laboratoire des sciences fondamentales, Université de Laghouat pour son aide inestimable.*

***Ma gratitude** à mes chères amies et collègues Benhassine Soumia ,Mahfoudi Rekia, Melle Takhi Djalila, Melle Aouissi Hadjer de m'avoir toujours soutenue.*

***Mille et un merci** à mon adorable amie Safia Gasmi, pour tous ce qu'on a partagé ensemble.*

*Mes **profonds remerciements** s'adressent à mes enseignants : Pr. Chelghoum Ch., P. Hassan H., P. Hamdi T., D. Hakem H., D. Benalia Y., D. Boutaiba S., Pr. Azouzi B., M. Imessaoudene et D. Rahou J.*

*Mes **remerciements** vont à tous les enseignants qui m'ont accompagnée tout le long de mon parcours scolaire.*

*Mes **remerciements** à Mme Mme Jradi-Gadouda M, ingénieure de laboratoire au Département de Chimie Industrielle, Laghouat ;*

*Mes **remerciements** à M. Bourahla I., Chef de Service au laboratoire de l'hôpital Benadjila Ahmida, Laghouat, et Hassna Bouchewerab , ingénieure au Laboratoire Vétérinaire Régional, Laghouat.*

Que tous ceux et celles qui m'ont aidée et qui ne sont pas cités ci-dessus, sachent que ma reconnaissance est profonde et que mon respect leur est profondément acquis.

Liste d'abréviations

%	pourcentage
°C	Degré Celsius
Ø	diamètre
µm	micromètre
A.N.I.R.E.F	Agence Nationale d'intermédiation et de régulation foncière, Rubrique
EtOAc	Acétate d'éthyle
ADH	Arginine dihydrolase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bu.OH	Butanol
CEDEF	Auteurs et membres du Collège des enseignants en dermatologie de France
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	concentration minimale bactéricide
CMF	concentration minimale fongicide
CMI	concentration minimale inhibitrice
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
D	diamètre
DMSO	Diméthyle Sulfoxyde
DPPH•	1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl
EC50	concentration équivalente requise pour réduire 50% des radicaux libres initialement présents en solution
EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments

EOR	espèces oxygénées réactives
GAE	acide gallique
Glu	Glucose
GSH	glutathione
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
HE	Huile essentielle
INRA	institut national de recherche agronomique
Lac	lactose
LDC	<i>lysine</i> décarboxylase
LRVL	Laboratoire regional vetrinaire de Laghouat
m	masse
mg	milligramme
ml	millilitre
MRSA	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
MSSA	methicillin sensitive Staphylococcus aureus
ODC	Ornithinine Décarboxylase
OGA	<i>Gélose</i> glucosée à l'oxytétracycline
OH	fonction hydroxyle
OMS	L'organisation mondiale de la santé
ONPG	Orthonitrophényl-β-galactoside
PDA	Potato Dextrose Agar
QE	quercetine

Sac	saccharose
SS	gélose Salmonelle Shigelle
T.D.A	Tryptophane Désaminase
TSI	Triple Sugar Iron
UV	ultra violet
V	volume

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Principaux classes de compose phénolique	18
Tableau 2 :	Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne	21
Tableau 3 :	Les souches microbiennes, leurs références et leurs sources.....	37
Tableau 4 :	La situation géographique et l'étage bioclimatique de la région de collecte.....	38
Tableau 5 :	les milieux de culture utilisés.....	49
Tableau 6 :	Mini galerie biochimique pour l'identification des souches bactériennes	50
Tableau 7 :	les antibiotiques choisi leurs code et leurs concentration.....	52
Tableau 8 :	le rendement des huiles essentielles de différentes espèces de basilic	58
Tableau 9 :	résultats des testes phytochimique	58
Tableau 10 :	les rendement ,couleur et aspect des différents fractions	59
Tableau 11 :	Les teneurs en phénols totaux des deux extraits.....	61
Tableau 12 :	Comparaison de la teneur en phénols totaux de <i>Ocimum basilicum</i> de l'extrait l'acétate d'éthyle avec quelques plantes médicinales de la même espèces.....	61
Tableau 13 :	Les teneurs en flavonoïdes des deux extraits	62
Tableau 14 :	Les teneurs en tanins condensés des deux extraits.....	63
Tableau 15 :	les valeurs des EC ₅₀ des différents extraits.....	69
Tableau 16 :	Comparaison de EC ₅₀ de différents extraits de <i>O basilicum</i> avec quelques travaux.....	71
Tableau 17 :	Les aspects macroscopiques et microscopiques des souches bactériennes.....	73
Tableau 18 :	Caractères biochimiques des souches bactériennes.....	74
Tableau 19 :	Résultats des galerie API20E.....	75
Tableau 20 :	Resultat de API <i>Candida albicans</i>	75

Tableau 21 :	La réaction entre les solvants et les souches	76
Tableau 22 :	L'antibiogramme des souches	78
Tableau 23 :	Les diamètres des zones d'inhibition de l'activité antimicrobienne de huile essentielle	81
Tableau 24 :	les diamètre de zone d'inhibition de l'extrait acétate d'éthyle....	87
Tableau 25 :	diamètre des zones d'inhibition des extraits butanolique.....	88
Tableau 26 :	les CMI et le CMB obtenues par la méthode de contact direct	92
Tableau 27 :	Effet de l'huile essentielle de <i>basilic</i> sur le diamètre (mm) des colonies mycéliennes du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Albedinis</i> et <i>Fusarium culmorum</i>	98
Tableau 28 :	CMI et CMF de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> et <i>Fusarium</i> <i>culmorum</i>	99
Tableau 29 :	Effet des extraits (Acétate d'éthyle et Butanol)de <i>basilic</i> sur le diamètre (mm) des colonies mycéliennes du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Albedinis</i> et <i>Fusarium</i> <i>culmorum</i>	101

Liste des figures

Figure 1 :	L'isoprène l'unité de base des terpènes	12
Figure 2 :	Structure de quelques composés des huiles essentielles	14
Figure 3 :	structure de squelette de base de flavonoïde	19
Figure 4 :	Photos illustrant <i>Ocimum basilicum L.</i>	37
Figure 5 :	Carte géographique de la région de Laghouat montrant la station de récolte	39
Figure 6 :	Organigramme expliquant les principales étapes de notre travail.....	40
Figure 7 :	Extraction des huiles essentielles par Clevenger	41
Figure 8:	Organigramme expliquant les étapes d'extraction	44
Figure 9 :	Réduction du radical DPPH	48
Figure 10 :	les valeurs des rendements obtenus pour chaque fraction.....	60
Figure 11 :	La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	61
Figure 12 :	Courbe d'étalonnage de la quercétine	63
Figure 13 :	Courbe d'étalonnage de la catéchine.....	64
Figure 14 :	comparaison entre les composés phénoliques	65
Figure 15 :	Comparaison entre les composés phénoliques et les résidus sec.....	66
Figure 16:	Courbe d'étalonnage de la digitonine	67
Figure 17:	Comparaison entre la teneur de saponine et le résidu sec butanolique.	68
Figure 18:	Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction des concentrations des extraits (Acétate d'éthyle, Butanol)...	69

Figure 19:	Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de l'HE.....	69
Figure 20:	Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration en Vitamine C et en Vitamine E	70
Figure 21 :	l'EC ₅₀ de différents extraits et des antioxydants de référence.....	71
Figure 22 :	L'effet des solvants sur la croissance des bactéries à Gram Positif et Gram négatif.....	78
Figure 23 :	Résultat de l'antibiogramme	80
Figure 24	les résultats des contrôles négatifs.....	81
Figure 25:	Histogramme représente l'action des HEs sur les bactérie Gram et Gram+	84
Figure 26:	l'activité antimicrobienne des huiles essentielles vis-à-vis	86
Figure 27:	l'activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis des souches à Gram positif	87
Figure 28:	comparaison entre l'activité antimicrobienne de l'extrait EtOAc et de Bu.OH	90
Figure 29 :	L'activite antibactérienne de l'extrait d' acétate d'éthyle.....	92
Figure 30 :	L'activite antibactérienne de l'extrait butanolique	92
Figure 31 :	Détermination de la CMI pour l'huile essentielle pour les Gram-..	95
Figure 32 :	Détermination de la CMI pour l'huile essentielle pour les Gram+ et <i>C albicans</i>	95

Figure 33	Détermination de la CMI pour les extraits d'acétate d'éthyle	97
Figure 34	Détermination des CMI pour les extraits butanolique	97
Figure 35	test de contact directe de l'HE sur <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Albedinis</i>	101
Figure 36	Test de contact direct de l'HE sur <i>Fusarium culmorum</i>	102
Figure 37 :	L'histogramme des taux d'inhibitions de la croissance fongique par les extraits (Acétate d'éthyle et butanol).....	103
Figure 38 :	Test de contact direct d'extrait acétate d'éthyle sur <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Albedinis</i>	105
Figure 39 :	Test de contact direct d'extrait acétate d'éthyle sur <i>Fusarium culmorum</i>	105
Figure 40:	Test de contact direct d'extrait butanolique sur <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Albedinis</i>	106
Figure 41 :	Test de contact direct d'extrait butanolique sur <i>Fusarium culmorum</i> ..	106

Table des matières

Liste des abréviations.....	Vii
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xii
Introduction	2
Partie I :Etude bibliographique	
Chapitre I: Les plantes médicinales	5
I.1. Les plantes médicinales.....	6
I. 2.La phytothérapie.....	6
I. 3. Intérêts des plantes médicinales en thérapeutique	6
I.4. La famille des Lamiacées.....	7
I.4.1.Les caractéristiques de la famille.....	7
I.4.2.Principaux genres.....	8
I. 5. <i>Ocimum basilicum</i> (le basilic).....	8
I.5.1. La description botanique.....	9
I.5.2. La systématique.....	9
Chapitre II :Les métabolites secondaires: les huiles essentielles, les Composés phénoliques et les Saponines	10
II.1. Les métabolites secondaires	11
II.1.1.Les huiles essentielles.....	11
II.1.1.1.Définition.....	11
II.1.1.2.Répartition.....	12
II.1.1.3.Rôle physiologique.....	12
II.1.1.4.La composition chimique des huiles essenteilles.....	12
II.1.1.5.La notion du chémotype.....	14
II.1.1.6.Les facteurs de variabilité des huiles essentielles.....	15
II.1.1.7.Les activités biologiques des huiles essentielles.....	15
II.1.1.8.Mode d'extraction des huiles essentielles.....	16
II.2. Les Composés phénoliques	17
II.2.1. La répartition des composés phénoliques.....	17

II.2. 2.Classification.....	17
II.2. 2.1.Formes les plus simples.....	19
II.2. 2.2.Les formes condensées.....	19
II.2. 3.Les propriétés biologiques des composés phénoliques.....	20
II.3. Les saponines.....	22
II.3.1. L' activité biologique des saponines	23
II.4.Extraction de métabolites secondaires	24
II.4.1. L' extraction solide-liquide.....	24
II.4.1.1.Quelques techniques d' extraction.....	24
II.4.2.L' extraction liquide-liquide.....	25
II.4.3.Le choix des solvants d' extraction	25
Chapitre III : Les radicaux libres , les antioxydants et l'activite antimicrobienne	27
III.1.Les radicaux libres et les antioxydant	28
III.1.1.Les radicaux libres	28
III.1.2.Principaux radicaux libres.....	28
III.1.3.Le stress oxydatif.....	28
III.1.4.Les antioxydants.....	29
III.2. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne.....	29
III.2.1.Aromatogramme (méthode de Vincent).....	28
III.2.2.Détermination des CMI et CMB par dispersion des extraits en milieu liquide.....	30
III. 3. Description de certaines souches étudiées.....	30

Partie II Matériel et Méthode

I. Matériel biologique.....	36
I.1. La plante étudiée	36
I.2.Les souches microbiennes.....	36
II. Méthodes.....	37
II.1. Collecte de la plante	37
II.2.Conservation.....	38
II.3. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.....	39

II.4. Les tests phytochimiques.....	40
II.5. Extraction des composés phénoliques, et des Saponines	42
II.6. Dosages et quantification de quelques métabolites secondaires.....	44
II.6. 1. Dosage des composés phénoliques	44
II.6.2. Dosage des flavonoïdes.....	45
II.6.3. Dosage des tanins condensés.....	45
II.6.4. Dosage des saponines.....	46
II.7. L'évaluation de l'activité antioxydante	46
II.7.1. Principe du test DPPH.....	47
II.7.1.1. Le protocole expérimental du test DPPH.....	47
II.8. L'étude de l'activité antimicrobienne.....	48
II.8.1. Les tests préliminaires.....	48
II.8.2. L'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	51

Partie III : Résultats et discussion

I. Résultats de l'étude phytochimique.....	57
I.1. La teneur en huile essentielle.....	57
I.2. Les résultats des Tests photochimiques.....	58
I.3. Les rendement des extraits.....	59
I.4. Les résultats de dosage des composés phénoliques et des saponines	60
I.4.1. Dosage des phénols totaux.....	60
I.4.2. Dosage des flavonoïdes.....	62
I.4.3. Dosage des tanins condensés.....	63
I.4.4. Dosage de saponines.....	66
II. l'activité antioxydante.....	67
III. Résultats de l'activité antimicrobienne.....	72
III.1. résultats de purification des souches microbiennes.....	72
III.2. Le choix de solvant.....	76
III.3. Pouvoir antimicrobien de l'antibiotique.....	78
III.4. Résultats de l'activité antimicrobienne par le méthode de diffusion sur gélose	80
III.5. Les résultats de la détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide	92

IV .L'évaluation du pouvoir antifongique	97
IV .1.L'activité antifongique de l'huile essentielle.....	97
IV .2.Pouvoir antifongique des extraits (Acétate d'éthyle et Butanol).....	101
Conclusion General.....	108
Références bibliographiques.....	111
Annexes	

Introduction

Les plantes médicinales font partie du savoir de base de toutes les sociétés humaines, puisqu'elles s'en servent pour se nourrir, se soigner et parfois dans les rites religieux...l'homme utilise les plantes médicinales pour traiter les maladies depuis des millénaires, et l'histoire des substances naturelles s'identifie en partie à celle de la pharmacie, dont une discipline, la pharmacognosie, qui répertoriait les végétaux dans leurs aspects thérapeutiques et étudie les poisons et les remèdes naturels (Cabalion, 1990).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Parmi ces composés, on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La Pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse (Bahorun, 1997).

Par ailleurs, il y a une préoccupation concernant les infections bactériennes par les espèces pathogènes qui ont acquis une résistance multiple, d'où l'importance d'orienter les recherches vers les phytomolécules issues des plantes médicinales qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments. De plus, la présence des antioxydants naturels dans l'alimentation est devenue essentielle pour la qualité et la sécurité de l'aliment. Les effets négatifs des antioxydants synthétiques encouragent à leur substitution par des agents naturels à partir des plantes médicinales.

Dans le monde, il existe 250 000 à 500 000 espèces de plantes, seul un nombre relativement faible des plantes ont été étudiées pour d'éventuelles applications médicales. Les données relatives à l'innocuité et à l'efficacité sont disponibles pour un nombre encore plus restreint de plantes, leurs extraits et principes actifs et les préparations qui les contiennent (Rates, 2001). Les Lamiaceae, quatrième famille des quatre premières familles importantes pour le pharmacien avec plus de 5000 espèces, sont des plantes aromatiques et ont également donné des huiles essentielles commercialement importantes (Gurib-Fakim, 2006).

L'Algérie, de part sa position biogéographique, et grâce à ses différentes zones bioclimatiques (humide, sub-humide, semi-aride, aride ou désertique), offre une très grande diversité de végétaux (plus de 3000 espèces et 1000 genres) avec un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales spontanées et cultivées (Reguig, 2011 ; Bouabdelli

et al, 2012. Le basilic, *Ocimum basilicum*, classé parmi les plantes les plus utilisées en Algérie (Reguig, 2011), peut offrir des avantages non négligeables, par le fait de sa disponibilité, et sa capacité à fournir des huiles essentielles, ou extraits, largement demandés dans les industries alimentaire ou pharmacologique..

La région de Laghouat à caractéristiques sahariennes et à situation géographique et position climatique (étage bioclimatique aride), offre une richesse floristique considérable. Certaines de ses espèces végétales sont connues par leurs vertus aromatiques et/ou médicinales, alors l'origine géographique de notre plante, la chaleur et l'exposition aux rayons solaires peuvent influencer le développement des mécanismes de protection, basés sur la synthèse de métabolites secondaires spécifiques, avec des caractéristiques et des activités biologiques à rechercher.

L'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme les activités antioxydante et antimicrobienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation importantes dans les traditions médicinales. qui représentent une source de composés actifs. En effet, les métabolites secondaires restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels les composés phénoliques, les saponines et les huiles essentielles, qui constituent des produits à forte valeur ajoutée "qui peuvent être par la suite valorisés dans différents domaines d'activités : pharmacie, parfumerie, cosmétique ou agroalimentaire".

La phytothérapie repose sur la tradition. Mais est ce que la tradition produit une connaissance? Elle donne à réfléchir et fournit des pistes de réflexion et son raisonnement s'appuie sur des propriétés biologiques mises en évidence *in vitro* chez les bactéries et champignons. Les données héritées des ancêtres sont souvent obtenues avec des extraits dont la composition n'est pas connue avec précision. Car la seule façon d'évaluer un extrait de plante est de le tester, sur des microbes dans des conditions de rigueur optimales.

Alors sur la base de cette problématique et dans ce contexte que s'inscrit cette étude, nous essayerons d'apporter une contribution à vouloir caractériser et valoriser quelques substances extraites à partir de *Ocimum basilicum L.* locale par une meilleure connaissance des données phytochimiques relatives à ce patrimoine et la mise en évidence des métabolites secondaire de cette plante à savoir les huiles essentielles, les composés

phénoliques et les saponines et l'évaluation de leurs pouvoirs antioxydants et antimicrobiens.

Ce travail a été entrepris sur la base des données de la médecine traditionnelle qui indiquent que le basilic sert au traitement de plusieurs troubles (antispasmodiques, stomachiques, carminatives, sédatives, antiseptiques...)(Bellakhdar, 2006).

De plus, peu de travaux ont été consacrés à l'étude des composés phénoliques et des saponines et leurs pouvoir antioxydant et antimicrobien dans notre région.

Si *Ocimum basilicum L.*, collecté en Algérie, a déjà fait l'objet d'études concernant sa composition chimique et son activité antioxydante (Khelifa et al, 2012) et activité antimicrobienne (Ouibrahim et al, 2013), aucun travail n'a été consacré à l'étude des composés phénoliques et des saponines et à l'évaluation de leur pouvoir antioxydant et antimicrobien sur des échantillons de basilic provenant du sud d'Algérie.

Le mémoire comprend trois parties

Nous présenterons, dans une première partie, quelques généralités sur l'importance des plantes médicinales, les huiles essentielles, ainsi que les composés phénoliques et les saponines et leurs caractéristiques ainsi qu'un rappel sur les antioxydants et quelques souches microbiennes.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons procédé à

- L'extraction et à la détermination du rendement en huiles essentielles ;
- L'extraction des composés phénoliques et les saponines et l'évaluation de leurs rendement dans les l'extraits (acétate d'éthyle et de butanol) ;
- L'évaluation de la teneur en phénols totaux, en flavonoïdes, en tanins et en saponines des extraits phénolique et butanolique ;
- L'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits et des huiles par la méthode de piégeage du radical libre DPPH ;
- L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits et des huiles vis-à-vis de treize microorganismes pathogènes (dix souches bactériennes, une levure et deux champignons phytopathogènes).

La troisième partie du mémoire sera consacrée à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus et aux discussions qui en découlent.

Nous terminerons cette étude par une conclusion et des perspectives de recherche à venir.

Partie I :
Etude Bibliographique

Chapitre I: Les plantes médicinales

I.1. Les plantes médicinales

Une plante dite médicinale est une plante qui a des propriétés thérapeutiques (Catier et Roux, 2007). Ce sont des espèces botaniques utilisés pour très longtemps en phytothérapie et médecine populaire pour traiter les maladies courantes et plus graves. Leurs actions proviennent de leurs composés chimiques: des métabolites primaires et secondaires, et sans doute de la synergie entre les différents composés présents (Reguieg, 2011), ainsi elle constituent un patrimoine précieux pour l'humanité et plus particulièrement pour la majorité des communautés démunies des pays en voie de développement (Salhi et al, 2010).

I. 2. La phytothérapie

C'est l'utilisation des plantes médicinales (ou formes dérivées des plantes) dans un but thérapeutiques (Catier et Roux , 2007), reste la médecine la plus employée dans le monde. Et depuis toujours, certaines plantes possèdent des activités antiseptiques, bactéricides, antifongiques, antivirales, Toutes les civilisations antiques ont développé à côté de l'agriculture, la médecine par les plantes et la plupart des grands médecins du passé ont été des phytothérapeutes (Zhiri et Baudoux , 2005).

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie, vient du grec *aroma*, qui signifie odeur, et de *therapia*, qui signifie soin. Il s'agit donc d'une méthode de soin naturel par les "odeurs"(Couic-Marinier, 2013b), qui utilise des substances aromatiques (les huiles essentielles) secrétées par de nombreuses familles de plantes aromatiques pour traiter un certain nombre de maladies (Buronzo, 2008)

Le recours à la phytothérapie s'est répandu partout dans le monde et a gagné en popularité, non seulement les populations des pays en développement y ont accès mais aussi ceux des pays où la biomédecine occupe une grande place dans le système de santé. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'environ 80% de la population mondiale compte toujours sur l'utilisation des plantes médicinales comme un premier traitement (Khalil et al, 2007).

I. 3. Intérêts des plantes médicinales en thérapeutique

L'homme utilise les plantes médicinales pour traiter les maladies depuis des millénaires, Parmi les médicaments obtenus à partir des plantes, on trouve le Paclitaxel, isolé de l'if de l'Ouest (*Taxus brevifolia*, Taxaceae) qui a sa place dans le traitement des

différents cancers (ovaire, poumon) (Eric et Rowinsky,1997). L'artémisinine, substance isolée d'une armoise chinoise (*Artemisia annua*, Asteraceae) est utilisée dans le traitement de paludisme (Mueller et al, 2003). On peut encore citer la galanthamine, obtenue de la perce-neige (*Galanthus nivalis*, Amaryllidaceae), utilisée depuis peu dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Rizzi et al,1999).

De nombreuses plantes aussi ont un effet bénéfique sous forme de tisanes ou d'extraits de plantes. Le ginkgo (*Ginkgo biloba*, Ginkgoaceae) est certainement la plante réalisant le plus grand chiffre d'affaires. Il est utilisé sous forme d'extrait lors du manque de concentration et les pertes de mémoire (Rigney et al, 1999). Le millepertuis (*Hypericum perforatum*, Hypericaceae) connaît également un très grand succès dans le traitement des états dépressifs (Greeson et al, 2000; Rammal et al, 2009).

La famille la plus représentative des plantes est celle des *Lamiaceae*, elle représente une des familles les plus importantes par ses plantes utilisées dans la médecine traditionnelle (Gurib-Fakim, 2006).

I. 4. La famille des Lamiacées

La famille des Lamiacées (Lamiaceae) ou Labiées (Labiatae) est une importante famille de plantes dicotylédones, qui comprend environ 6970 espèces et 258 genres (Judd et al, 2002) dont l'aire de dispersion est extrêmement étendue, mais avec une prépondérance pour les régions méditerranéennes (Dupont et Guignard, 2012).

L'ancien nom des Lamiaceae : Labiées dérive du nom latin "labium" qui signifie lèvre, en raison de la forme particulière des corolles (Figueredo, 2007 ; Dupont et Guignard, 2012).

Cette famille comporte de nombreuses espèces utilisées comme arômes alimentaires et aussi bien utilisées dans la médecine traditionnelle et dans la médecine moderne (Naghbi et al, 2005).

En Algérie, cette Famille comprend 29 genres et 140 espèces se développant aussi bien dans les zones méditerranéennes que sahariennes (Nouioua, 2012).

I.4.1.Les caractéristiques de la famille

Les Lamiaceae sont des plantes herbacées ou arbustives (Agostini et al, 2009). Ce sont des plantes odorantes à tige quadrangulaire pouvant devenir des arbrisseaux

(Romarin, Thym), en coupe transversale. Poils glanduleux à huiles essentielles et poils simples, non glanduleux. (Judd et al, 2002 ;Hilan et al, 2005 ; Dupont et Guignard, 2012).

***Les feuilles** opposées et simples, parfois verticillées, simples, parfois lobées ou découpées, composées pennées ou palmées, entières à dentées-serrées (Judd et al, 2002)

***Les fleurs** sont hermaphrodites et généralement zygomorphes et la perte de l'étamine supérieure

- La corolle est typequement bilabée; d'où le nom de Labiées :une lèvre est formée des deux pétales supérieurs, l'autre de trois pétales inférieurs.
- L'androcée est composé de 4 étamines, didymes \pm égales, parfois réduites à deux avec filets insérés sur la corolle.
- carpelles (deux) sont soudés ; ovaire supère, style généralement bifurqué au sommet, terminal à gynobasique ; les deux stigmates portés à l'extrémité des branches du style sont minuscules; deux ovules par carpelle et disque nectarifère toujours présents.

***Le fruit** est un tétrakène logé au fond d'un calice persistant, chaque demi carpelle donnant naissance à un akène élémentaire (Judd et al, 2002; Dupont et Guignard, 2012)

I.4.2. Principaux genres

Salvia (800 spp), *Hyptis* (400spp), *Clerodendrum* (400spp), *Thymus* (350spp), *Plectranthus* (300 spp), *Scutellaria* (300spp), *Stachys* (300spp), *Nepeta* (250spp), *Vitex* (250spp), *Teucrium* (200spp), *Premna* (200spp) et *Callicarpa* (140spp), ***Ocimum*** (150spp) (Judd et al, 2002 ;Labra et al, 2004).

I.5. *Ocimum basilicum* (le basilic)

Le **basilic** *Ocimum basilicum* L. est une plante de la famille des Lamiacées (Bruneton, 2009 ; Baba-Aissa, 2011 ; Dupont et Guignard, 2012) cette herbe aromatique annuelle originaire de l'Inde, et très cultivée en Algérie, n'existe pratiquement pas à l'état sauvage (Ali-Delille, 2010) ; elle est morphologiquement très variable, vivace en climat tropicale (Bruneton, 2009) généralement connue sous l'appellation "**Lahbeq**" "**Hamahim**" et aussi "**Hebeq elailaa**" (Ali-Delille, 2010).

Traditionnellement, le basilic a été utilisé comme plante médicinale dans le traitement des maladies nerveuses, les vertiges, les coliques, la constipation, les

ballonnements, la toux, la coqueluche, les migraines d'origine nerveuse ou gastrique et les aphtes (Buronzo, 2008; Ngom *et al*, 2012; Djerroumi et Nacef, 2012).

L'huile essentielle de basilic est connue aussi par son activité antimicrobienne et insecticide (Umerie *et al*, 1997 ; Asha *et al*, 2001 ; Pascual-Villalobos et Ballesta-Acosta, 2003 ;Govindarajan *et al*, 2013).C'est aussi utilisée en cuisine pour sa suave odeur et sa saveur très agréable et mentbolée (Ali-Delille, 2010 ; Ekren *et al*, 2012).

Actuellement, le basilic est donc très répandu à travers le monde. Il reste toutefois profondément ancré la gastronomie méditerranéenne (Benedec *et al*, 2009°) .

I.5.1. La description botanique de *Ocimum basilicum*

C'est un petit buisson de 15 à 50 cm de haut : ses feuilles ovales, finement dentelées, d'un vert clair dégagent une odeur très agréable contiennent des huiles essentielles ; ses fleurs, réunies en épis assez longs sont blanches ou rosées (Baba-Aissa, 2011 ; Djerroumi et Nacef, 2012).

I.5. 2. La systématique

La taxonomie de *Ocimum* est complexe en raison de l'hybridation interspécifique entre les espèces (Labra *et al*, 2004; Pushpangadan et Bradu, 1995 *in* Telci 2006 ; Sajjadi, 2006) ont reconnu plus de 150 espèces, mais Paton *et al*. (1999) ont proposé que *Ocimum* n'avait que 65 espèces et les autres attributions doivent être considérés comme synonymes.

Au moins deux espèces de ce genre *Ocimum L.*, sont présentes dans l'ensemble des pays du Maghreb: *O. basilicum* et *O. minimum* (Aït Youssef, 2006).

Ocimum basilicum L.1753 (Paton *et al*, 1999)

Règne	Végétal
Embranchement	Phanérogames
Classe	Eudicotylédones
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Sous famille	Nepetoideae
Genre	<i>Ocimum</i>

Chapitre II

Les métabolites secondaires: les huiles essentielles, les Composes phénoliques et les Saponines

II.1. Les métabolites secondaires

Ce sont des composés biosynthétisés naturellement par les végétaux mais qui ne participent pas directement au métabolisme végétal (Guillaume et Charrouf, 2005). Ils interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux, la défense contre les prédateurs et les pathogènes, comme agents allélopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits (Judd et *al*, 2002).

Ils sont produits à des différents stades particuliers de développement et produits dans différentes partie de la plante (Raven et *al*, 2007), À ce jour, plus de 100 000 métabolites secondaires ont été identifiés et on estime que chaque végétal produit au moins une centaine de molécules différentes (Ali-Delille, 2010)

Parmi ces substances on trouve: les alcaloïdes (dérivant des acides aminés), les molécules phénoliques (dérivant de la voie des phénylpropanoïdes, issues de l'acide shikimique et de l'acide malonique) et les terpénoïdes (dérivant de l'isopentényl pyrophosphate, issu du (méthylérythritol-4-phosphate ou de l'acide mévalonique), la grande diversité observée dans le métabolisme secondaire résulte des réactions chimiques post-biosynthèse (hydroxylation, glycosylation, carboxylation, condensation) (Wink 2003, Aharoni et Galili 2011 *in* Nacoulma, 2013)

Les métabolites secondaires ont été étudiés dans la plante de basilic : les huiles essentielles, les composés phénoliques et les saponines.

II.1.1.Les huiles essentielles

II.1.1.1.Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés aromatiques des plantes, qui sont extraites par distillation par la vapeur ou des solvants (Smallfield, 2001) et synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques. Celles-ci les conservent dans des poches au niveau de certains organes (Couic-Marinier et Lobstein, 2013b).

Pour la 8^e édition de la pharmacopée française (1965), les huiles essentielles (= essences = huiles volatiles) sont : « des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenu dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation.» (Bruneton, 2009).

Les huiles essentielles se trouvent dans différentes parties des plantes : fleurs, feuille, écorce, et racines (Couic-Marinier et Lobstein, 2013b).

II.1.1.2. Répartition

Les HEs sont largement réparties dans le règne végétal, sont connues sous le nom de plantes aromatiques, réparties dans un nombre limité de familles, ex : Myrtacées, Lauracées, Rutacées, Lamiacées, Astéracées, Apiacées, Cupressacées, Poacées, Zingibéracées, Pipéracées, etc. (Bruneton, 2009).

Tous les organes végétaux peuvent renfermer des huiles essentielles : fleurs (bergamotier, tubéreuse), feuilles (eucalyptus, laurier noble, menthe poivrée) et, dans des écorces (cannelier), des bois (bois de rose, santal blanc), des racines (angélique), des rhizomes (curcuma, gingembre), des fruits (aneth, anis, badiane), des graines (muscade) (Figueredo, 2007).

II.1.1.3. Rôle physiologique

Selon (Rai et *al*, 2003) beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu, généralement les végétaux fabriquent leurs huiles essentielles pour se réparer, attirer les insectes pollinisateurs, se protéger du soleil ou du froid, des prédateurs et des maladies (parasite, bactérie, virus et aussi champignon) (Bakkali, 2008) ou encore à guérir blessures et attaques diverses (Wei et *al*, 2010; Girard, 2010).

II.1.1.4. La composition chimique des HEs:

Les huiles essentielles sont constituées principalement des terpènes volatils, issus de la condensation d'unités isopréniques figure 1, et des dérivés aromatiques dérivés du phénylpropane.

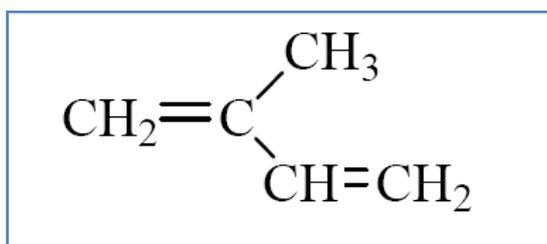


Figure 1 : L'isoprène l'unité de base des terpènes

A. Les composés terpéniques

Les terpènes sont des hydrocarbures de structures cycliques, très diverses (monocyclique, bicycliques ...etc.), contiennent également la plus grande variété de types structuraux, monoterpène (C10), sesquiterpène (C15), diterpène (C20) et triterpène (C30) (Degenhardt et *al*, 2009).

Ils sont classés selon :

- leurs fonctions : alcools (géraniol, linalol), esters (acétate de linalyle), aldéhydes (citral, citronellal), cétones (menthone, camphre, thuyone), éthers-oxydes (cinéole).
- leurs structures : linéaire (farnésène, farnésol), monocyclique (humulène, zingiberène), bicyclique (cadinène, caryophyllène, chamazulène) ou tricyclique (cubébol, patchoulol, viridiflorol) (Couic-Marinier et Lobstein, 2013a).

B. Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane

Il s'agit de noyaux aromatiques couplés de chaînes de 3 carbones (Bruneton, 2009), sont beaucoup moins fréquents dans les huiles essentielles que les monoterpènes et sesquiterpènes, entraînés par la vapeur d'eau et ainsi présentes dans certaines huiles essentielles (Couic-Marinier et Lobstein, 2013a; Bruneton, 2009).

C. Les composés d'origines diverses

Il s'agit là de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles :

- Composés issus de la dégradation d'acides gras ;
- Composés issus de la dégradation des terpènes ;
- Composés azotés et soufrés.

Ces composés contribuent, souvent, aux arômes des fruits. Compte tenu de leur mode de préparation, les concrètes et les absolues peuvent en contenir. Il en est de même pour les huiles essentielles lorsqu'elles sont entraînés par la vapeur d'eau (Bruneton, 2009),

la figure 2 présente quelques composés des huiles essentielles.

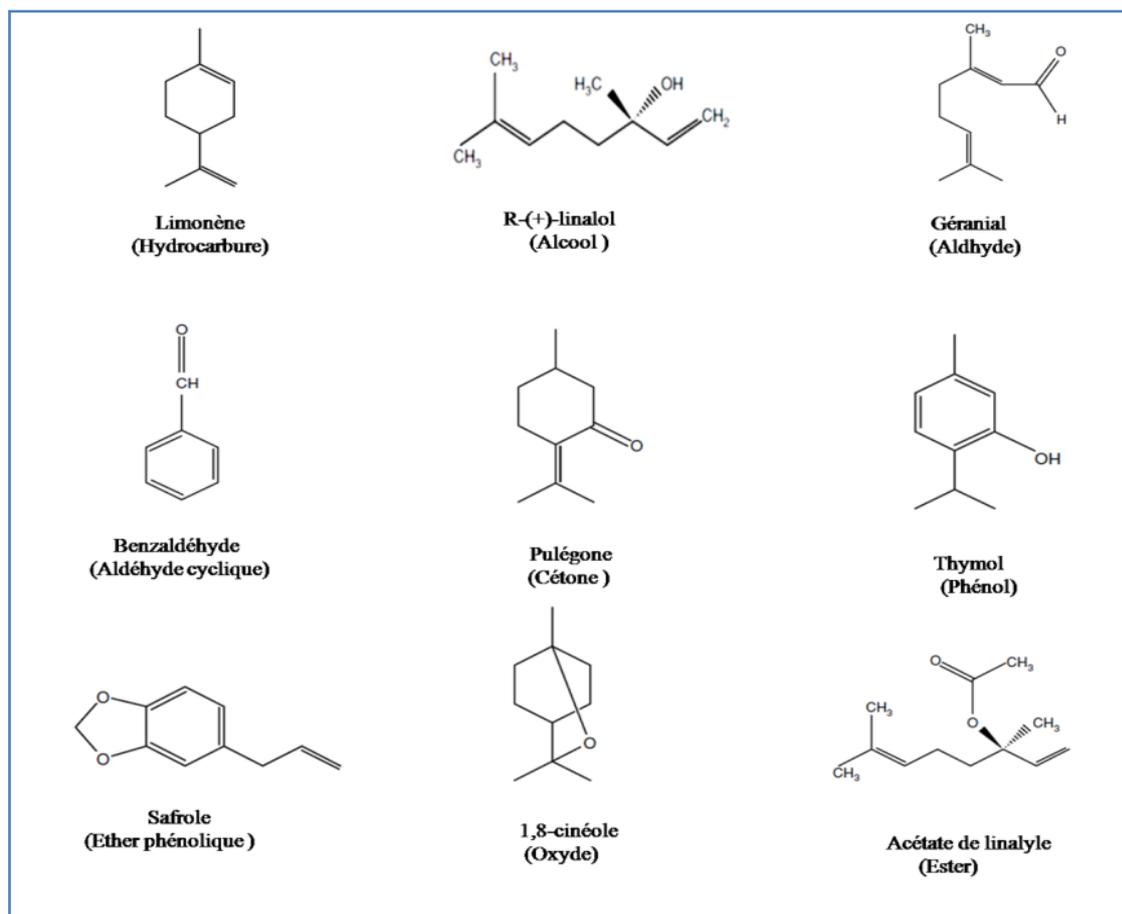


Figure 2: Structure de quelques composés des huiles essentielles (Pengelly, 2004; Bakkali, 2008)

II.1.1.5. La notion de chémotype

Le chémotype, également appelé type chimique de la plante, indique le composant biochimique majoritaire et distinctif présent dans l'HE de la plante (Couic-Marinier et Lobstein, 2013b), qui décrit un ensemble des plantes, appartenant à une même espèce, ayant les mêmes caractéristiques morphologiques mais leur huile essentielle est d'une composition chimique différente. C'est une forme de classification chimique, biologique et botanique (Zhiri et Baudoux, 2005).

Cette situation est très courante dans la famille des Lamiaceae, comportant la lavande, la mélisse, la menthe poivrée, le basilic, le romarin, la sauge et le thym (Clarke, 2008).

Ocimum basilicum L. comporte plusieurs chimiotypes. Son chimiotype à méthylchavicol (ou estragole) est le plus répandu dans le monde: son huile essentielle contient 65 à 80% de méthylchavicol et des petites quantités de cinéole(ou eucalyptol), de linalol, de méthyleugénol (Aït Youssef, 2006).

Le cas aussi de *Ocimum gratissimum L*, qui peut présenter 5 chémotypes : eugénol, méthyl-eugénol, linalol-caryophyllène, et géraniol (Matasyoh et al, 2007).

II.1.1.6. Les facteurs de variabilité des huiles essentielles

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions : l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le séchage, lieu de séchage, la température, durée de séchage, les parasites, les virus et mauvaises herbes (Svoboda et Hampson, 1999 ; Smallfield, 2001).

On ajoute aussi, l'influence du cycle végétatif, l'existence de chémotypes et l'influence du procédé d'obtention des huiles essentielles (Bruneton, 2009).

II.1.1.7. Les activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques, des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectant en tant qu'agents antimicrobiens et sont utilisés ainsi comme antibactériens et antifongiques (Kalamouni, 2010).

A. L'activité antibactérienne

Lorsque l'on parle d'activité antibactérienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique (Buronzo, 2008). Le plus souvent l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique. Cependant, certains de leurs constituants chimiques semblent avoir des propriétés bactéricides (Zhiri, 2006 in Attou, 2011).

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004). Plusieurs travaux montrent que les HEs et leurs composés majoritaires ont un effet antimicrobien (Hussain et al, 2008; Guinoiseau, 2010; Wei et al, 2010; El-Houite, 2010; Kaurinovic et al, 2011; Shafique et al, 2011).

B. Activité antifongique

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'il inhibent la croissance des moisissures et des levures. Leur activité est principalement en fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Elles agissent en

empêchant la multiplication du champignon, la sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudomycelium (Bozin et al, 2006).

C. Pouvoir antioxydant des huiles essentielles

La plante constitue une source importante d'antioxydants. Les chercheurs s'intéressent très particulièrement, aux composés naturels possédant des propriétés antioxydantes, et selon (Stefanovits-Bányai et al, 2003 in Mohammdi, 2006), la capacité antioxydante de l'huile volatile est étroitement liée à tout le contenu phénol.

De nombreuses études ont mis en évidence des composés antioxydants des huiles essentielles dans divers végétaux . Nous pouvons citer à titre d'exemple, *Mosla chinensis Maxim* (Cao et al, 2009), *Origanum vulgare* (Kulisic et al, 2004), *Rosmarinus officinalis L.* (Zaouali et al, 2010)...ect.

Le Carvacrol est un des composants principaux des huiles essentielles de certaines Lamiaceae, comme l'origan et le thym dont la teneur peut atteindre jusqu'à 86%. L'activité antioxydante de ces herbes serait due au Carvacrol, Thymol et un autre phénol non identifié (Schwämmle et al, 2001).

II.1.1.8. Mode d'extraction des huiles essentielles

Parmi les différents procédés d'extraction, nous citons principalement

- **Hydrodistillation simple**

Elle se produit dans l'appareil de Clevenger , Cette méthode consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alombic rempli d'eau distillée qui est ensuite portée à ébullition (Lagunez Rivera, 2006 ; Binello et al, 2014). Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (Bruneton, 2009).

Autre techniques :

- Distillation à la vapeur saturée
- Hydrodiffusion
- Extraction assistée par micro-ondes
- L'expression à froid
- L'extraction par solvants

II.2. Les Composés phénoliques

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (Bruneton , 2009 ; Rahman et Chung, 2011)

Sont des métabolites secondaires végétaux (Rayan et *al*, 2002). Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (Urquiaga et Leighton, 2000).

En fonction du nombre d'atomes de carbone de squelette de base, la structure de polyphénols naturels varie à partir de molécules simples, comme des acides phénoliques, en des composés hautement polymérisés, tels que les tanins condensés (Harborne, 1980 *in* Urquiaga et Leighton, 2000).

II.2.1. La répartition des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles écorce, bois, embryons de tous les végétaux (Brzozowska et Hanower, 1976 ; Macheix *et al*, 2005), leurs répartition très inégale chez les différentes espèces végétales et pour une même espèce et sont également considérables et inégales selon la nature des tissus .A l'échelle cellulaire, ils s'accumulent principalement dans deux sites :la paroi cellulaire et la vacuole où sont stockés les phénols solubles (comme les tanins), pourraient également être présents au niveau du noyau et de la membrane plasmique. Et les teneurs sont variables en fonction du stade de développement physiologique (Macheix et *al*, 2006).

II.2. 2. Classification

A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés. Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (tableau1). (Urquiaga et Leighton, 2000 ; Hennebelle *et al*, 2004)

Tableau 1 : principaux classes de composés phénolique (Urquiaga et Leighton, 2000)

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	classe	Exemple
6	C6	phénols Simples Benzoquinones	Catéchol, hydroquinone 2,6-imethoxybenzoquinone
7	C6-C1	Acide Phenolic	-Acide Gallic, acide salicylic
8	C6-C2	Acetophenones Les dérivés de tyrosine Acide Phenyl acetique	3-Acetyl-6-methoxybenzaldehyde Tyrosol p-Hydroxyphenylacetic
9	C6-C3	Acides Hhydroxycinnamiques Phénylpropenes Coumarines Isocoumarines Chromones	Acide Caféique, ferulique Myristicin, Eugenol Umbelliferone, Aesculetine Bergenon Eugenine
10	C6-C4	Naphthoquinone	Juglone, Plumbagine
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferine
14	C6-C2-C6	Stilbénes Anthraquinone	Resvératrol Emodine
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercetine, Cyanidine Genisteine
18	(C6-C3)2	Lignanes Neolignanes	Pinorésinol Eusiderine
30	(C6-C3-C6)2	Biflavonoïdes	Amentoflavone
n	C6-C3)n (C6)n (C6-C3-C6)n	Lignines Catéchol melanins Flavolan (les tanins Condensés)	

II.2. 2.1. Formes les plus simples

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6 aux flavonoïdes en C15 et à des molécules proches.

A. Les acides phénoliques

Comme l'acide vanillique, l'acide salicylique, l'acide gallique, l'acide caféique et l'acide férulique (Macheix *et al*, 2006).

B. Les flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration (C6-C3-C6) de type phényl-2-benzopyrane (Isorez, 2007) voir la figure 3.

Sont des pigments quasiment universels des végétaux, presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs (Bruneton, 2009).

La présence des flavonoïdes dans la plante est influencée par des facteurs génétiques et des conditions environnementales, la germination, le degré de maturité, la variété, le traitement, et le stockage ont également une influence sur la teneur des composés phénoliques des plantes (Lugasi *et al*, 2003 ; Kyle et Duthie, 2006).

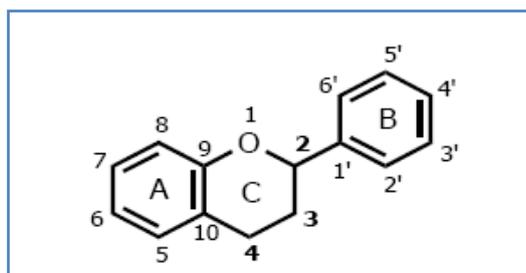


Figure 3 : structure du squelette de base de flavonoïde (Macheix *et al*, 2006)

Les flavonoïdes existent sous différentes classes et ceci en fonction du degré d'oxydation et d'insaturation du cycle C (Chebil, 2006) dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins.

II.2. 2.2. Les formes condensées

Ces composés résultent généralement de la condensation de certaines formes simples.

A. Les tanins

Sont des formes phénoliques condensées de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 KD (Doat, 1978; Cheyner et Sarni-Manchado, 2006) ayant la propriété de tanner la peau c'est-à-dire, de la rendre imputrescible (l'empêche de pourrir) (Khanbabaee et Van Ree, 2001).

Deux grands groupes de tanins, différents à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tanins hydrosolubles et les tanins condensés.

A1. Les tanins hydrosolubles

Ce sont des oligo-ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable de molécules d'acide-phénol (Bruneton, 2009) ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique. Il libèrent par exemple l'acide gallique (cas des gallotanins), ou l'acide ellagique (cas des tanins ellagiques) (Aganga et Mosase, 2001).

A2. Les tanins condensés

Les tanins condensés, appelés proanthocyanidines, sont des polymères flavaniques, ils sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettant de les dégrader et le traitement acide chaud, il se transforment en pigments rougeâtres (Doat, 1978; Vermerris et Nicholson, 2006).

- **Autre formes condensées :** Les lignines et autre formes liées à des macromolécules non phénoliques (l'acide p-coumarique, acide férulique ..)

II.2. 3. Les propriétés biologiques des composés phénoliques

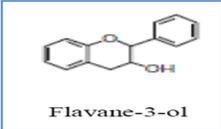
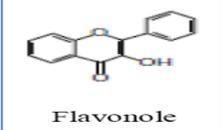
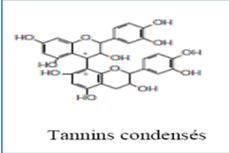
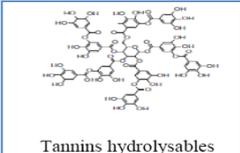
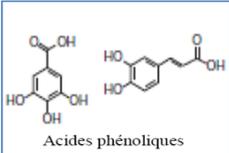
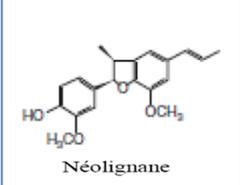
II.2. 3.1. L'activité antimicrobienne

Les composés phénoliques sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement due à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (Cowan, 1999).

Les flavane-3-ols, les flavonols et les tanins ont reçu plus d'attention, ceci est peut être dû à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols à leur

capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telles que l'inhibition de la formation de biofilms, et la neutralisation des toxines bactériennes (tableau 2) (Daglia, 2012).

Tableau 2. Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne (Daglia, 2012).

Composés phénoliques et leurs structures	Microorganismes sensibles	Exemples
 <p>Flavane-3-ol</p>	Bactéries	<i>V.cholerae</i> , <i>S.mutans</i> , <i>C.jejuni</i> , <i>C.perfringes</i> , <i>E.coli</i> , <i>B.Cereus</i> , <i>H.pylori</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>A.naeslundii</i> , <i>P.oralis</i> , <i>P.gingivalis</i> , <i>P.melaninogenica</i> , <i>F.nucleatum</i> , <i>C.pneumonia</i>
 <p>Flavonole</p>	Virus	Adénovirus, Entérovirus, Flu virus
	Champignon	<i>Candida albicans</i> , <i>Microsporium gypseum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> .
 <p>Tannins condensés</p>	Bactéries	<i>S.mutans</i> , <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> .
	Virus	Virus de l'influenza A, type -1 herpes simplex virus (HSV).
 <p>Tannins hydrolysables</p>	Bactéries	Différentes souches de: <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>E.coli</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Listeria</i> .
	Virus	Le virus Epstein-Barr, les virus Herpes HSV-1 et HSV-2.
	Champignon	<i>Candida parapsilosi</i>
 <p>Acides phénoliques</p>	Bactéries	<i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , <i>E.coli</i> , <i>Paeruginosa</i> .
 <p>Néolignane</p>	Bactéries	Différentes souches de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .

II.2. 3.2.L' activité antioxydante

Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les parties des plantes supérieure. Ce sont, pour la plupart, des composés phénoliques (Rolland, 2004).

Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer (Hennebelle *et al*, 2004).

Les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes à la santé et la beauté de la peau (Hennebelle *et al*, 2004).

Selon (Nijveldt *et al*, 2001), les flavones et les catéchines sont les flavonoïdes les plus puissants pour la protection du corps contre les espèces oxygénées réactives (EOR) qui sont toxiques pour les cellules et les tissus corporels, leurs effets antioxydants sont dues à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes .

L'activité antioxydante des tanins est très remarquable comme les tanins catéchiques du thé vert : gallate d'épicatéchine, gallate d'épigallocatechine et l'épicatéchine sont des puissants extracteurs des radicaux libres (Rahman *et al*, 2006 *in* Benhammou, 2011)

II.3. Les saponines

Les saponines constituent un groupe largement répandus dans le règne végétal ou des animaux inférieur marins (Hostettmann et Marston, 1995). La structure chimique des saponines est constituée d'un groupe aglycone de nature triterpénoïdique ou stéroïdique et d'une ou plusieurs chaînes saccharidiques (glycosides) (EFSA, 2009).

Le nom saponine est dérivé du nom latin "*sapo*" qui veut dire "savon" car ces molécules forment des mousses quand elles sont agitées dans de l'eau due à la nature de saponine amphiphilque, par la présence d'une liaison entre la sapogénine lipophilque et les chaînes saccharidiques hydrophilque (Augustin *et al*, 2011).

Structuralement, les saponines peuvent être classés en deux groupes selon la nature de la génine (saponigine): les saponines à génines triterpéniques, de loin les plus nombreux existant chez les angiospermes dicotylédones et chez certains animaux marins et celles à génines stéroïdiques, presque exclusivement présentes chez les angiospermes monocotylédones (Bruneton, 2009).

Le rôle physiologique des saponines n'est pas complètement compris dans les plantes, ils sont généralement considérés comme faisant partie des systèmes de défense par leurs activités anti-microbienne, fongicide, allélopathique, insecticide et molluscicide, etc (Sparg *et al*, 2004 ; Lanzotti *et al*, 2012 ; Yoong Cheok *et al*, 2014).

II.3.1. L'activité biologique des saponines

Des travaux scientifiques sur les saponines, il ressort que cette classe de molécules possède des propriétés biologiques et pharmacologiques diverses.

III.3. 1.1.L' activité antimicrobienne

Les Saponines ont été recherchées comme des détergents (Sparg *et al.* 2004) et aussi ont été recherchées par l'industrie pharmaceutique parce qu'elles forment le point de départ de l'hémi-synthèse des médicaments stéroïdiens.

Elles présentent plusieurs propriétés pharmacologiques et sont employées dans la phytothérapie et dans l'industrie cosmétique (Yoong Cheok *et al.*, 2014).

Diverses saponines ont révélé une certaine activité pour lutter contre les infections d'origine bactérienne et virale (Ben Hadda *et al.*, 2011 ; Chan *et al.*, 2013).

Deux nouvelles saponines triterpéniques (glinoside A et B), isolés à partir des parties aériennes de *Glinus oppositifolius L.* (Molluginaceae) ont montré une activité anti-parasitaire contre *Plasmodium falciparum* (Traore *et al.*, 2000 *in* Sparg *et al.*, 2004)

Li *et al.*, (1999) ont examiné l'activité antifongique de trois saponines isolé de *Colubrina retusa L.* (Rhamnaceae) contre *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*. Ils ont montré une activité légère avec des effets inhibiteurs de croissance seulement contre *Cryptococcus neoformans*.

L'utilisation de saponines comme une substance biochimique naturelle dans l'inactivation des virus d'origine alimentaire a été examinée par Li *et al.* (2013).

II.3.1.2.L'activité antioxydante

Les saponines sont des composés glycosides contenant un noyau d'un stéroïde ou triterpénoïde aglycone lié à une ou plusieurs unités de sucres. Ils sont donc caractérisés par des activités antioxydantes (Man *et al.*, 2010 *in* Chan *et al.*, 2014).

Un certain nombre d'études antérieures indique que les saponines ont des propriétés antioxydantes, citons les travaux de (Bi *et al.*, 2012) concernent le saponine extrait à partir de l'écorce de racine de *Aralia taibaiensis*, ainsi que les études de Chan *et al.* (2013) sur le saponine de son de riz dégraisse et l'activité antioxydante de corne jaune (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge) ont été étudié par (Li Zu, *et al.*, 2010).

Les saponines du tourteau d'arganier, plus leur activité molluscicide et antifongiques et anti-inflammatoire, elles possèdent également une activité antioxydante (Charrouf, 2007).

II.4.Extraction de métabolites secondaires

II.4.1. L'extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est l'opération fondamentale qui a pour but d'extraire, de séparer, un ou plusieurs composants (liquide ou solide) mélangés à un solide. C'est une opération de transfert ou d'échange de matière entre une phase solide, qui contient la matière à extraire et une phase liquide, le solvant d'extraction (Ribeiro et *al*, 2001 in Poirot,2007)

Le choix de la procédure d'extraction dépend de la nature de l'espèce végétale et de composés à isoler.

II.4.1.1.Quelques techniques d'extraction

Plusieurs techniques d'extraction peuvent être mises en oeuvre pour extraire les principes actifs des plantes, toujours très recherchés pour toutes sortes d'application en alimentaire, cosmétique et pharmacie, ...

A. La macération

On laisse séjourner, à froid, le matériel végétal dans un liquide pour en extraire les constituants solubles...ce sont les premières extraction par solvant.

L'extraction s'arrête finalement lorsque l'équilibre est atteint entre la concentration en métabolites dans l'extrait et que dans le matériel végétal (Seidel, 2008).

B. Infusion

De l'eau bouillante est versée sur la plante finement broyée.

C. Décoction

La plante est mise dans l'eau froide. Porter à l'ébullition quelques temps. Cette méthode de transformation ne permet pas d'extraire autant de principes actifs que l'infusion, mais elle est adaptée aux racines, écorces pour lesquelles l'extraction est difficile (Handa et *al*, 2008)

D. Percolation

La plante est extraite à l'aide d'un percolateur (comme pour faire du café filtré) la matière végétale en poudre est d'abord trempée dans un percolateur (un récipient cylindrique ou conique

avec un robinet), le Solvant est ensuite versé sur le dessus du poudre et laissé percoler lentement (goutte à goutte) sur le fond de le percolateur (Seidel, 2008).

E. Extraction par Soxhlet

Le Soxhlet est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide. La poudre de la plante est placée dans une cartouche en cellulose dans une chambre d'extraction, l'avantage du Soxhlet ce que l'échantillon entre rapidement en contact avec une portion fraîche de solvant, donc aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant (Grigonis et *al*, 2005 in Penchev, 2010).

Autre technique

- ❖ L'extraction accélérée par solvants
- ❖ Extraction solvant ultrasons assistée

II.4.2. L'extraction liquide-liquide

Est une méthode de purification basée sur la différence de solubilité d'un soluté dans deux phases non miscibles. L'extraction liquide/liquide est réalisée par le contact intime du solvant avec la solution (on utilise habituellement une phase aqueuse et une phase organique) dans des appareils destinés à mélanger les deux phases (ampoules, colonnes, mélangeurs). La séparation des phases s'obtient par décantation gravimétrique ou centrifuge (Gamse, 2002).

II.4.3. Le choix des solvants d'extraction

Le solvant extracteur est choisi de telle sorte que l'espèce chimique à extraire y soit le plus soluble possible.

A- Solvants plus polaires (l'eau, l'éthanol, le méthanol), sont utilisés pour extraire les composés plus polaires (par exemple, des flavonoïdes glycosides, des tanins, des alcaloïdes).

B. Solvants de moyenne polarité (acétate d'éthyle, le dichlorométhane) sont utilisés pour extraire des composés de polarité intermédiaire (par exemple, certains alcaloïdes, flavonoïdes).

C. Les solvants non polaires (n-hexane, l'éther de pétrole, le chloroforme) sont utilisés pour solubiliser la plupart des composés lipophiles par exemple, des acides gras, des cires, des pigments, des stérols, une certaine terpénoïdes, alcaloïdes, et des coumarines).

D'autres critères de choix:

Le solvant choisi, doit être caractérisé par une faible toxicité, une faible inflammabilité et un faible risque d'explosion . En outre, il doit être économique et facilement recyclé par évaporation (soit volatil et température d'ébullition faible) (Seidel, 2008) .

Chapitre III :

Les radicaux libres, les
antioxydants et l'activité
antimicrobienne

III.1. Les radicaux libres et les antioxydants

III.1.1. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer (Halliwell *et al*, 1993 *in* Amzal, 2010).

Sont très instables et réagissent rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir de la stabilité. Une «réaction en chaîne» débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui «volant» son électron, et «la molécule attaquée» devient alors elle-même un radical libre. Leur principal danger vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN ou la membrane cellulaire suite à une exposition aux radicaux libres (Pelli et Lyly, 2003 ; Tanguy et Begué-Simon, 2009), et contribuent à plus d'une certaine des désordres chez l'homme comprenant l'athérosclérose, l'arthrite, les dommages d'ischémie et de ré-perfusion de beaucoup de tissus, les dommages du système nerveux central, la gastrite, le cancer et les sidas (Kumpulainen et Salonen, 1999 *in* Pourmorad *et al*, 2006).

III.1.2. Principaux radicaux libres

Des radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\bullet} . D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs sont souvent appelés espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

III.1.3. Le stress oxydatif

En conditions normales, le métabolisme aérobie chez les mammifères génère des substances réactives de l'oxygène, lesquelles sont susceptibles de créer d'importants préjudices à l'organisme. Le stress oxydatif est impliqué dans un large spectre de maladies qui ont un impact énorme sur la santé des populations. Il est souvent initié et propagé par une surproduction d' O_2 et de H_2O_2 et par leur conversion en de puissants oxydants qui sont très dommageables pour les cellules (Amzal, 2010).

Ainsi, le terme général de stress oxydatif est utilisé pour décrire une situation de dommages causés par les radicaux libres (Favier, 2003;Tanguy et Begué-Simon, 2009)

III.1.4.Les antioxydants

Les antioxydants sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs et de mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. Chaque molécule antioxydante ne peut réagir qu'avec un seul radical libre, et par conséquent, il faut constamment refaire le plein de ressources antioxydantes.

Les mécanismes de défense antioxydante du corps humain peuvent être divisés en deux catégories différentes.

- ❖ par un certain nombre d'enzymes telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion (GSH) peroxydase sont synthétisées (Amzal, 2010).
- ❖ à partir de l'alimentation, puisque ces derniers ne peuvent être synthétisés par l'être humain. Ils comprennent les nutriments et les métabolites végétaux mentionnés plus haut : les vitamines E et C, les caroténoïdes, le sélénium, les folates, les flavonoïdes, les phytoestrogènes, les glucosinolates l'albumine, l'acide urique, les oestrogènes et les polyamines (Svoboda et Hampson, 1999 ; Pelli et Lyly, 2003 ; Rolland, 2004).

III.2. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne

A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. Le choix de la méthode est conditionné par l'insolubilité des substances dans les milieux aqueux, leur volatilité, et la nécessité de les tester à de faibles concentrations ...ect

Parmi les différents procédés, nous citons principalement deux méthodes dans laquelle nous avons appliqué pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne de notre plante.

III.2.1.Aromatogramme (méthode de Vincent)

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode de disques ou méthode par diffusion en milieu gélosé. La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelée zone d'inhibition, On peut exprimer cette activité en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre (Rios et al, 1988 ; CLSI, 2006).

III.2.2. Détermination des CMI et CMB par dispersion des extraits en milieu liquide

Consiste à disperser l'agent antimicrobien en concentration variable de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié (exige la dispersion homogène par un émulsifiant). Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture. La lecture peut-être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre, le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu, Cette technique est très fiable et reproductible pour les agents antimicrobiens hydrosolubles (Janssen et al, 1986 ; Rios et al, 1988).

III.3. Description de certaines souches étudiées

III.3.1. Les bactéries

- ***Escherichia coli***

Famille des *Enterobacteriaceae*. Bactérie asporulée mesurant 2 à 4 µm de long sur 0,4 à 0,6 µm de large, fine et allongée à extrémités arrondies, mobile grâce à une ciliature péritriche. Ce germe non exigeant, sur gélose ordinaire donne des colonies lisses, brillantes et homogènes (Lobril, 1998 in Gueye, 2007) aérobic, oxydase négatif, nitrate positif et qui fermente le glucose (Brooks et al, 2001).

La plupart des souches de *Escherichia coli* sont des bactéries de la microflore commensale et sa présence dans l'eau est un indice de contamination fécale (Kayser et al, 2005)

- ***Klebsiella pneumonia***

Bacille à Gram négatif de la Famille des *Enterobacteriaceae* court et trapu, mesurant habituellement (0.3–1.0 x 0.6–6.0 µm) (Brenner et al, 2005) et encapsulée, donnant des colonies d'aspect muqueux (Gueye, 2007 ; Gavaret et Briffaud, 2009). Immobile, aéro-anaérobie, oxydase négatif, et qui fermente le glucose, c'est un germe opportuniste provoque 10% des infections nosocomiales (Kayser et al, 2005).

Les souches se trouvent dans les eaux de surface, les eaux usées, les sols et les plantes. Elles colonisent les surfaces muqueuses des humains, des animaux (Brenner et al, 2005), généralement elles sont responsables d'infections opportunistes chez les malades hospitalisés des infections broncho-pulmonaires, urinaires, bactériémies, infections méningées post-traumatiques ou post-chirurgicales, des pneumopathies et des septicémies, (Brooks et al, 2001 ; Gavaret et Briffaud, 2009).

- ***Pseudomonas aeruginosa***

Famille des *Pseudomonadaceae*, bacille à Gram négatif ne fermentant pas le glucose, mesurant habituellement (0.5–1.0 X 1.5–5.0 µm) (Brenner et al, 2005), Largement présent dans l'environnement (eau, sol, végétaux). Bactérie aérobie stricte, mobile (Bousseboua, 2005), elle peut produire deux pigments : la pyocyanine, de couleur bleue verdâtre, et la fluorescéine, de couleur jaune verdâtre. L'espèce se caractérise par l'odeur particulière que dégagent après la culture (Kayser et al, 2005).

La bactérie est invasive et cytotoxique. Elle produit une grande quantité de facteurs de virulence et lié aussi à la présence de biofilm, (Al-Dahmoshi, 2013 ; Chaker, 2006) est une bactérie pathogène opportuniste à large spectre d'hôtes, responsable de nombreuses infections nosocomiales chez l'homme et représente aujourd'hui un véritable problème de santé publique surtout par l'apparition des souches multi résistantes (Hota et al, 2009 ; Mahmoud et al, 2013).

- ***Salmonella typhi* et *Salmonella enteridis***

Bacille Gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae (0.7–1.5 x 2.0–5.0 µm) de diamètre, mobile avec une ciliature péritriche, oxydase négatif, ne fermentant pas le lactose et la pulpart des salmonelles ce sont de producteur d'H₂S (Brenner et al, 2005). *Salmonella enteridis* constitue la cause majeure des infections du tractus digestif humain, liées à la consommation de denrées alimentaires d'origine animaux (Van Immerseel et al, 2005).

Les espèces appartenant à ce genre provoquent diverses maladies humaines (la fièvre typhoïde, la gastro-entérite et bactériémie). La gastro-entérite associée à des éclosions d'origine alimentaire est probablement la manifestation clinique la plus commune de l'infection (Morello et al, 2003).

- ***Bacillus cereus*:**

C'est une bactérie appartenant à la famille des *Bacillaceae*. Gram positif, aéro-anaérobie facultatif, et mobile (±), habituellement les bactéries sont observés en paires ou en chaînettes courtes et capable de former des endospores (Morello et al, 2003 ; Brenner et al, 2005)., capable d'élaborer plusieurs toxines, y compris un nécrosante entérotoxine, une toxine émétiques, phospholipases, protéases, et hémolysines. Ils sont des facteurs déterminants pathogènes importants (Drobniewski, 1993).

Généralement sont largement répandues dans l'environnement est fréquemment responsable d'intoxications alimentaires et contaminer les aliments par ses spores. (Bottone, 2010).

- ***Staphylococcus aureus* :**

Staphylococcus aureus est une coccobactérie Gram positif, catalase positive appartenant à la famille des *Staphylococcaceae* (Becker et al, 2004). Il a un diamètre d'environ (0,5 à 1,5 µm), est immobile, asporulé et facultativement anaérobique il est habituellement disposé en grappes. De nombreuses souches produisent des entérotoxines staphylococciques, et font partie de la flore humaine et est surtout présent dans le nez et sur la peau (Kluytmans et al, 1997 ; Le Loir, 2003 ; Benhamou et al, 2005)

- **MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*):**

Est un *Staphylococcus aureus* couramment appelé « Staphylocoque doré » caractérisé par sa résistance à un antibiotique, la méticilline (ou méthicilline). Elles peuvent causer des épidémies d'infections (Tremblay, 2008 ;Gould, 2013). C'est un agent pathogène des malades nosocomial (Benhamou et al, 2005 ; Hawkey, 2008) et reste le principal agent causal de l'infection de l'articulation osseuse (Valour et al, 2013) et aussi un agent important de l'infection chez les patients blessés et brûlés (Huang et al, 2013; Abbasi-Montazeri et al, 2013).

Le MRSA_ a été également considéré comme un problème à été posée chez les vétérinaires (Aklilu et al, 2013). Les infections à MRSA sont généralement plus graves, avec une mortalité plus élevée (Klevens et al, 2007 ; Abbasi-Montazeri et al, 2013).

- **MSSA (methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*)**

Les infections à *S. aureus* MSSA (méticilline *Staphylococcus aureus* sensible) sont très fréquentes et apparaissent sous des aspects cliniques très variés. Ce sont des souches généralement produisaient une pénicillinase.

La plupart des souches de *S. aureus* sont sensibles aux antibiotiques les plus couramment utilisés, et les infections peuvent être traitées efficacement. Contrairement à MRSA, elles nécessitent souvent différents types d'antibiotiques pour les traiter.

Le MRSA et le MSSA seulement diffèrent par leur degré de résistance aux antibiotiques: autre que qu'il n'ya pas de réelle différence entre eux (Dupont, 2000).

- ***Enterococcus faecalis***

Les espèces du genre *Enterococcus* (anciennement streptocoques de groupe D) (Giraffa, 2002) sont des coques Gram positif, anaérobies facultatifs, catalase négatifs, se présentant de

manière isolée, en paires ou en courtes chaînes et font partie de la flore normale du tractus gastro-intestinal (Kayser *et al*, 2005) et peut coloniser diverses niches et peut alors servir d'indicateurs de la qualité sanitaire des aliments (Giraffa, 2002).

C'est la cause fréquente de nombreuses infections humaines graves, y compris les infections des voies urinaires (Riegel, 2003), l'endocardite, la bactériémie et des infections de plaies (Kau *et al*, 2005 ; Lopez-Salas *et al*, 2013). Les facteurs de virulence de cette souche représentent par production de la toxine (des toxines cytolytiques, gélatinase et hémolysine (Lopez-Salas *et al*, 2013).

III.3.2..La levure:

- ***Candida albicans*:**

Il s'agit d'un champignon unicellulaire (une espèce de levure), appartenant à la famille des *Saccharomycetaceae* avec un diamètre d'environ 5 µm.

elle provoque des infections fongiques (candidiase ou candidose) (Abdul Murad *et al*, 2000) essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique, les phanères (essentiellement les ongles, exceptionnellement les poils) (CEDEF, 2012) .

Les candidoses sont une cause majeure de morbidité et de mortalité chez les patients immunodéprimés comme les patients atteints du SIDA, les patients cancéreux sous chimiothérapie ou après transplantation de moelle osseuse (Dupont, 2002).

III.3.3..Les souches phytopathogènes (les champignons filamenteux)

- ***Fusarium oxysporum f. sp. Albedinis***

Le champignon *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* fait partie des champignons imparfaits "fungi imperfect" (Mehdi, 2011) les mycelium apparus fins, frisés, arbustifs et d'aspect gras, Ce sont des champignons telluriques, phytopathogènes. Ils causent de sérieuses maladies à travers le monde, provoquent principalement des flétrissements vasculaires aux plantes infectées (Fernandez *et al*, 1998).

La maladie du Bayoud due au *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*, a causé le dépérissement de palmiers dattiers est la maladie la plus destructive et la plus menaçante dans l'Afrique du nord. Elle est répandue surtout au Maroc et dans une grande partie des palmeraies de l'Algérie (Tantaou et Boisson, 1991 ; Sedra et Besri, 1994 ; Fernandez *et al*, 1998 ; Daayf *et al*, 2002)

- ***Fusarium culmorum***

Est une espèce de champignon tellurique ubiquitaire ascomycète de la famille des Nectriaceae. Agent phytopathogène, responsable de divers symptômes tels que fonte des semis, pourriture racinaire, fusariose de l'épi, pourriture de la tige... etc. chez de nombreuses espèces de plantes mono- et dicotylédones, en particulier chez les céréales surtout le blé et l'orge.

La contamination par les mycotoxines de *Fusarium* cause des pertes significatives de rendement et de qualité des céréales (Scherm et al, 2012). Les principales mycotoxines produites par *F. culmorum* sont le déoxynivalénol , la zéaralénone et nivalenol, qui constituent un danger potentiel pour la santé des humains et des animaux (Wagacha et Muthomi, 2007 ;Atoui et al, 2011 ; Pasquali et al, 2013).

Partie III

Matériel et Méthode

La plante *Ocimum basilicum* sujette de l'étude, a fait l'objet de plusieurs manipulations (extraction , dosage, activité antioxydante et antimicrobienne des extraits et de l'huile essentielle), la présente partie décrit les méthodes et le matériel utilisés.

I. Matériel biologique

I.1. La plante étudiée

Dans ce travail, nous avons étudié une seule espèce de la famille des *Lamiaceae* , il s'agit de *Ocimum basilicum* L (Le **basilic**) (figure 4) récoltée de la region d'El Assafia , Wilaya de Laghouat.



Figure 4 : Photos illustrant *Ocimum basilicum* L

I.2. Les souches microbiennes

Les souches microbiennes ayant fait l'objet de cette étude font parties de trois groupes de microorganismes et ont été fournies par différents laboratoires (tableau 3).

Le choix des microorganismes a été porté sur Treize souches microbiennes. Onze d'entre-elles sont fréquentes en pathologies humaine et animale, appartenant à différentes familles (Cinq bactéries à Gram négatif, Cinq bactéries à Gram positif et une levure) et deux champignon phytopathogènes ; un champignon isolé d'un rachis de palmier dattier atteint de la maladie Bayoud qui nous a été fourni par la Station Régionale de la Protection des Végétaux de Ghardaïa et l'autre, isolé de la graine de Blé tendre et nous à été fourni par l'Institut Nationale de Recherche Agronomique (INRA) Bourdeaux (France) .

Nous avons choisi de tester nos extraits sur ces souches bactériennes parce qu'elles sont les agents pathogènes les plus fréquemment impliquées dans les infections humaines,

Tableau 3 : Les souches microbiennes, leurs références et leurs sources.

Les souches teste	Référence	Source
Gram-		
<i>Echerichia coli</i>	ATCC 25922	Institut Pasteur d'Alger
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25853	Institut Pasteur d'Alger
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	ATCC 700603	Institut pasteur d'Alger
<i>Salmonella enteritidis</i>	Isolat	laboratoire régional vétérinaire de Laghouat (LRVL)
<i>Salmonella typhi</i>	Isolat	LRVL
Gram+		
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	d'Alger Pasteur Institut
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	d'Alger Pasteur Institut
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Institut Pasteur d'Alger
MRSA	ATCC 43300	Institut Pasteur d'Alger
MSSA	ATCC 29213	Institut Pasteur d'Alger
Levure		
<i>Candida albicans</i>	Isolat	LRVL
Champignons		
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> .	Isolat	SRPVG (Ghardaïa)
<i>Fusarium culmorum</i>	124	INRA Bourdeaux (France)

II. Méthodes

II.1. Collecte de la plante

Le plante a été récoltée en Automne de l'an 2013, de la région d'El Assafia comme le montre la figure 5.

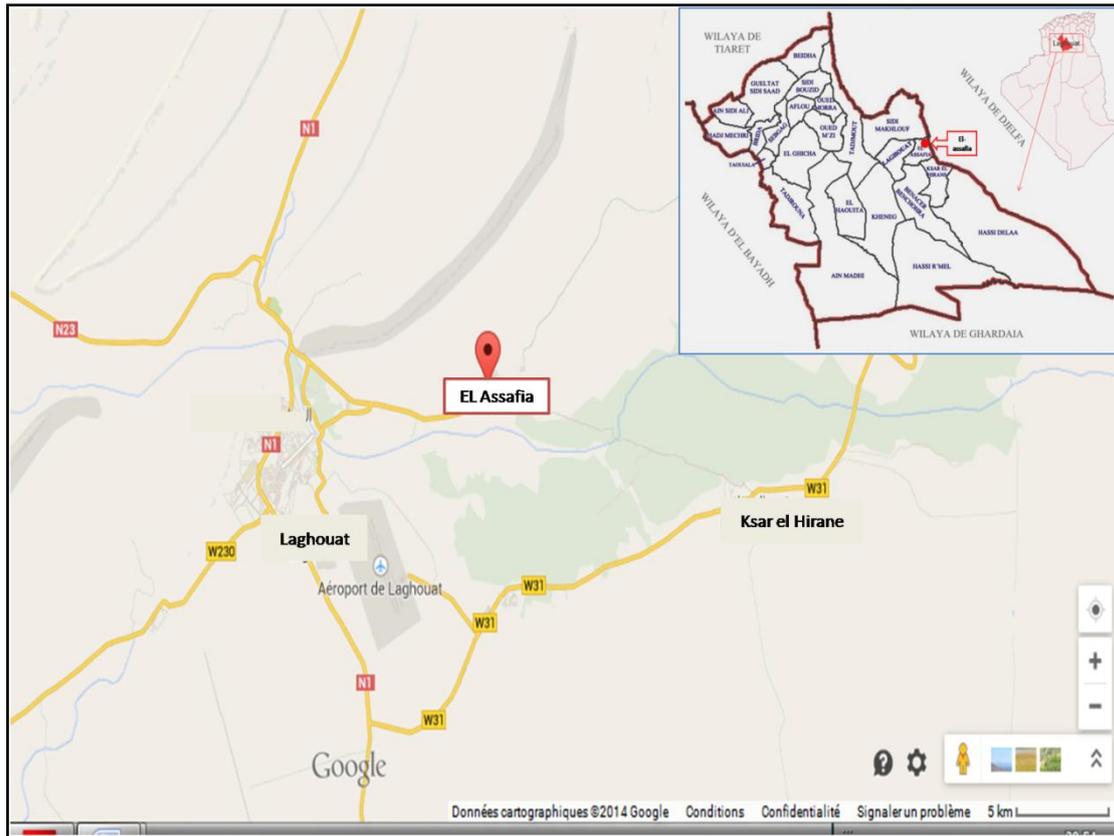


Figure 5 : Carte géographique de la région de Laghouat montrant le site de récolte (A.N.I.R.E.F, 2011;Google maps, 2014).

La situation géographique et l'étage bioclimatique de la région de collecte sont consignés dans le tableau (4) suivant.

Tableau 4. La situation géographique et l'étage bioclimatique de la région de collecte.

Region	Altitude	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Elassafia	829m	33.883°	3.067°	Aride

Seule la partie aérienne (feuilles, et tiges) a été collectée.

II.2. Conservation

Les quantités fraîchement collectés ont été séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité, dans un endroit sec et aéré. Une quantité a été broyée manuellement avec un mortier pour la préparation à l'hydrodistillation.

Une autre quantité désignée pour l'extraction liquide liquide, est finement broyée., puis stockée dans des sacs en papier jusqu'à utilisation.

L'ensemble du travail que nous avons mené dans cette étude se structure comme illustré dans l'organigramme de la figure 6.

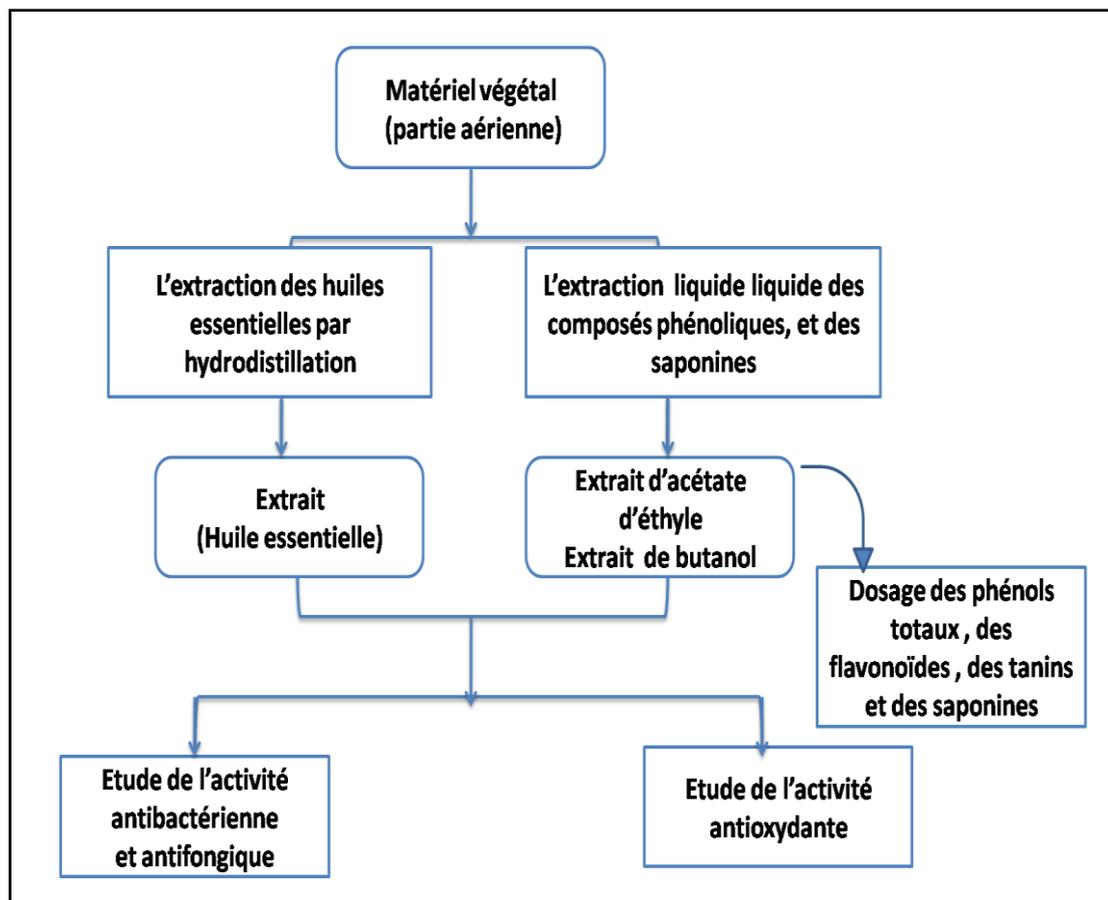


Figure 6: Organigramme expliquant les principales étapes du travail

II.3. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

Les huiles essentielles sont obtenues par hydrodistillation avec un appareil de type « Clevenger » la figure 7, pendant une durée de trois à quatre heures, et l'hydrodistillat obtenu est séché par du Na_2SO_4 . Elles sont conservées dans des tubes en verre fumé à l'abri de la lumière et à une température de 4 °C (El Ajjouri et al, 2007 ; Bekhechi et al, 2008 ; Joshi, 2013).



Figure 7: Extraction des huiles essentielles par Clevenger

II.3.1. Calcul du rendement

Le rendement en huiles essentielles est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter (Carré, 1953; In Mohammadi, 2006). Le rendement est exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$T = P_b / P_a \times 100.$$

T: Rendement de l'huile en %.

P_b: masse de l'huile en g.

P_a : masse de la plante en g

La teneur, en ml/kg, est définie comme étant la quantité d' huile essentielle extraite (en ml) à partir d'un kilogramme de la plante. Cette teneur est calculée par la formule utilisée par Hilan *et al*, (2005) :

$$T' = V/m$$

T': teneur (ml/Kg)

V: volume d'huiles essentielles (ml)

m: masse de la plante (Kg)

II.4. Les tests phytochimiques

- Les Flavonoides

Dans 10 ml d'un mélange hydro-méthanolique (20/ 80 v/v), on fait la macération d'une quantité de 1 g de la plante broyée pendant une nuit, ensuite le mélange est filtré. Le filtrat est mélangé avec quelques millilitres de chlorure d'aluminium (AlCl₃). L'apparition d'une couleur jaune foncée indique la présence des flavonoïdes (Quettier-Deleu, 2000).

- **Les tanins**

Une quantité de 1 g de la poudre végétale est macérée dans 50 ml d'un mélange hydro-méthanolique (50/50 v/v) pendant une nuit, ensuite le mélange est filtré. Nous avons pris quelques millilitres du filtrat et nous avons ajouté quelques gouttes de chlorure ferrique (FeCl₃). L'apparition d'une couleur vert foncée indique la présence des tanins (Békro et *al*, 2007 ;Vijay et *al* , 2013).

- **Les alcaloïdes**

Une quantité de 1 g de la poudre est macérée dans 20 ml d'éthanol absolu pendant une nuit. Après filtration, le mélange est évaporé à sec à l'aide d'un rotavapeur, le résidu est solubilisé dans 5 ml d'acide chlorhydrique 2N, puis il est chauffé dans un bain marie à 100 °C pendant 5 min.

- 1 ml du filtrat + 5 gouttes du réactif de MAYER (voir annexe G), si un précipité blanc-jaunâtre apparaît, ceci indique la présence d'alcaloïdes.
- 1 ml du filtrat + 5 gouttes du réactif de WAGNER (voir annexe G) si un précipité brun apparaît , c'est un indice de la présence d'alcaloïdes (Samseny, 2003 ; Attou ,2011 ;Vijay et *al*, 2013).

- **Les Saponines**

Une quantité de 2 g de la poudre végétale est chauffée avec 40 ml d'eau distillée jusqu'à ébullition, après refroidissement et filtration, nous avons agité les filtrats. L'apparition de mousses stables après 15 min indique la présence des saponines (Békro et *al*, 2007).

II.5. Extraction des composés phénoliques et saponines

II.5.1. Macération

Une quantité de 5 g de chaque poudre de plante est macérée dans un mélange hydro alcoolique (éthanol /méthanol/eau 50/40/10 : v/v/v) pendant 30 h à température ambiante et à l'obscurité (Benarous et *al*, 2013).

II.5.2.Extraction

L'extrait brut obtenu après la macération est filtré et soumis à une évaporation sous vide, à la température de 55°C et ensuite subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante.

La phase aqueuse restante après l'évaporation est lavée plusieurs fois avec un volume de l'éther de pétrole dans une ampoule à décanter (figure 8) afin d'éliminer toutes traces de composés apolaires (pigments, lipides, etc.).

La phase aqueuse ainsi obtenue est ensuite lavée une ou plusieurs fois avec un même volume d'acétate d'éthyle. La phase organique obtenue est séchée par le sulfate de sodium anhydre Na₂SO₄ pour éliminer toutes traces d'eau. Après filtration, le solvant est évaporé à sec sous pression réduite à 55°C. On obtient l'extrait phénolique brut puis , il est conservé à +4°C.

La phase aqueuse restante est aussi extraite avec le même volume de n-butanol saturé avec de l'eau distillée, puis le solvant est évaporé sous pression réduite à 55°C. Le résidu est repris dans 10 ml de méthanol et conservé à +4°C donnant l'extrait brut des saponines (Benarous, 2010).

L'organigramme suivante (figure 8) résumé les étapes de l'extraction

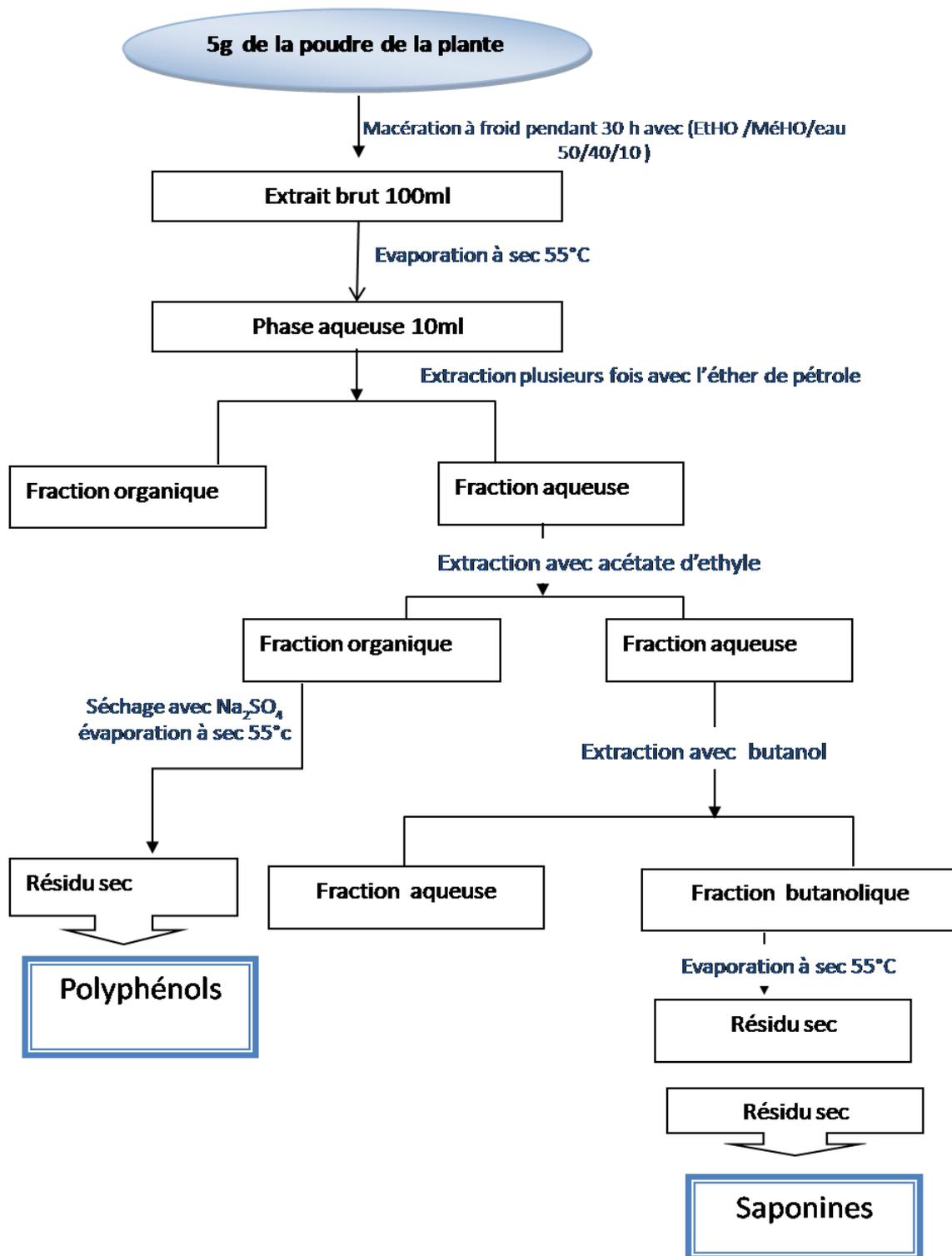


Figure 8: Organigramme expliquant les étapes d'extraction (Benarous et *al*,2013)

II.5.3.Calcul du rendement

Le pourcentage en extrait a été calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = M / M_0 \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

M: Masse en gramme de l'extrait sec résultant

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

II.6. Dosage et quantification de quelques métabolites secondaires

II.6. 1. Dosage des composés phénoliques

La quantité de phénols contenue dans les extraits est mesurée par la méthode de Folin Ciocalteu. Le principe de ce dosage est adapté par Singleton et Ross avec le réactif de Folin - Ciocalteu (Vermerris et Nicholson, 2006).

- **Principe**

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène.

La coloration produite, dont l'absorption maximum à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux, le phénol standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage est l'acide gallique .

- **Le protocole**

Pour établir la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, une gamme de solutions diluées à été préparée.

100 µL de chaque solution diluée ont été suivis par l'ajout de 500 µL du réactif de Folin-Ciocalteu dix fois dilué. Après deux minutes, 2 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium Na₂CO₃ à 2% (m/v) sont ajoutés, les solutions ainsi obtenues ont été maintenues à l'obscurité pendant 30 min.

L'absorbance de chaque solution préparée est mesurée par un spectrophotomètre UV Visible de type Jenway 6405, à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc.

II.6. 2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Lamaison et Carnat (1991) en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif (Quettier-Deleu, 2000).

- **Principe**

Le tri chlorure d'aluminium forme un complexe acide stable avec les groupements hydroxyles des flavonoïdes. Ce complexe de coloration jaune, absorbe à une longueur d'onde de 430 nm.

Pour établir une courbe d'étalonnage, nous avons choisi la quercétine comme standard pour quantifier les teneurs en flavonoïdes dans nos extraits (Djeridane et *al*, 2006).

- **Le protocole**

À partir d'une solution méthanolique de la quercétine, des solutions diluées ont été préparées .1 ml de chaque solution diluée ou de l'extrait dilué est mélangé avec 1 ml de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) 2 % (m/v), ensuite, les solutions ont été maintenues à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre de Jenway 6405 à une longueur d'onde de 430 nm contre un blanc.

Les valeurs ainsi obtenues, nous ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de la quercétine.

II.6. 3. Dosage des tanins condensés

Les quantités de tanins condensés sont estimées en utilisant la méthode à vanilline en milieu acide (Hagerman, 2002).

- **Principe**

La vanilline réagit avec les flavan 3-ols libres et les unités terminales des proanthocyanidines (tanins condensés) donnant un complexe de coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle aux taux de flavanols présents dans le milieu et qui présente un maximum d'absorption à 500 nm.

- **Le protocole**

A partir d'une solution étalon méthanolique de la catéchine, une gamme des solutions diluées a été préparée en milieu méthanolique pour établir la courbe d'étalonnage.

500µl de chaque solution diluée de la catéchine ou de l'extrait dilué ont été suivis par l'addition de 1.25 ml de vanilline 1% (m/v) et de 1.25ml l'acide chlorhydrique concentré (HCl) 8% et agités légèrement, puis ce mélange a été laissé réagir à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance à 500 nm est mesurée contre un blanc. La concentration des tanins est estimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) de l'extrait sec à partir de la courbe d'étalonnage.

II.6. 4. Dosage des saponines

- **Le principe**

La procédure de dosage des saponines est adoptée par Hiai *et al.* (1976) *in* (Chan *et al.*, 2014) en utilisant la vanilline comme réactif. La vanilline est un aldéhyde aromatique qui se lie avec les groupements de méthylènes insaturés des saponines libérés après la déshydratation dans un milieu acide (acide sulfurique concentré) et en présence de la chaleur formant un complexe chromogène rouge mauve qui absorbe à une longueur d'onde de 540nm (Hostettmann et Marston, 1995).

- **Le protocole**

A partir d'une solution étalon méthanolique de la digitonine, une gamme des solutions diluées a été préparée en milieu méthanolique pour établir la courbe d'étalonnage.

100µl de chaque solution diluée de la digitonine ou de l'extrait dilué ont été suivis par l'addition de 100 µl de vanilline 8% (m/v) et de 1ml d'acide sulfurique 72 % (v/v) et agités légèrement, puis ce mélange a été incubé dans un bain marie à 60 °C pendant 10 min, il a été refroidit dans un bain glacé pendant 4 min. La lecture de l'absorbance de chaque solution a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre de Jenway 6405 à une longueur d'onde de 540 nm contre un blanc (ce qui nous permet de tracer la courbe d'étalonnage de la digitonine et de doser les saponines dans les extraits végétaux).

II.7. L'évaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante :

L'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes $\text{ROO}\cdot$ par les méthodes **ORAC** (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et **TRAP** (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) (Ricardo et al, 1991) ; les ions ferriques par la méthode **FRAP** (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) (Benzie et Stain, 1996) ; ou les radicaux **ABTS**• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Tiveron et al, 2012), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphényl-picrylhydrazyle) (Molyneux, 2004 ; Bidie et al, 2011).

La méthode DPPH est rapide, simple, précise et peu coûteuse permettant de mesurer la capacité de différents composés pour agir avec différents radicaux libres fixateurs ou des donneurs d'hydrogène, et d'évaluer l'activité antioxydante des aliments et des boissons (Prakesh, 2001 in Marinova et Batchvarov, 2011).

II.7.1. Principe du test du DPPH

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) (figure 9) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (Molyneux, 2004).

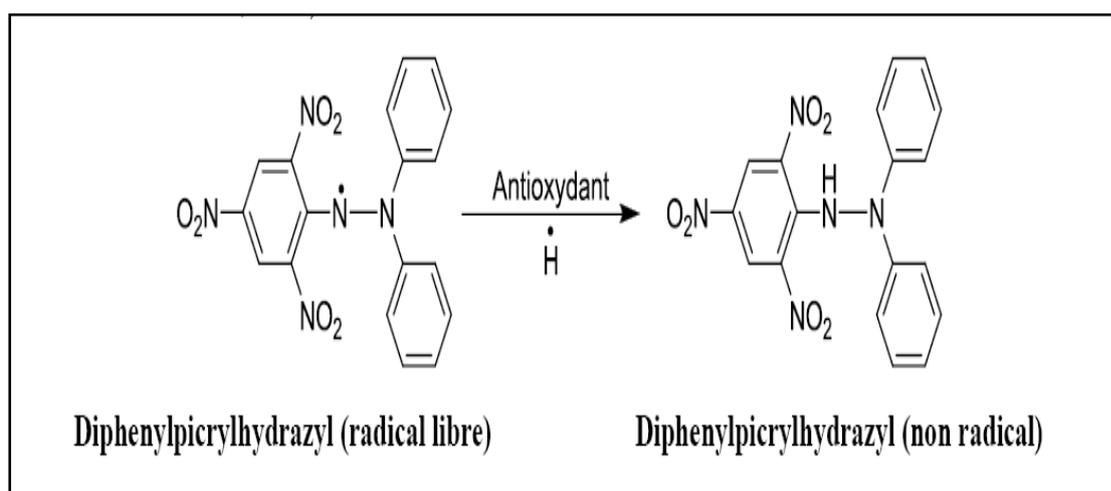


Figure 9. Réduction du radical DPPH (Molyneux, 2004 ; Popovici et al, 2009).

II.7.1.1. Le protocole expérimental du test DPPH

Des dilutions d'huiles essentielles et des extraits ont été préparées dans du méthanol afin de tester le pouvoir antioxydant. Un millilitre d'une solution méthanolique du DPPH (100 μM)

est ajouté à 1 ml de chaque dilution. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, les absorbances des échantillons ont été lues à 517nm (Molyneux, 2004)

Le pouvoir antiradicalaire des extraits et des huiles est calculé en déterminant le facteur EC₅₀, à partir de la courbe de la variation du pourcentage d'inhibition (*I* %) des radicaux libres de DPPH•, en fonction des concentrations des extraits (Molyneux, 2004).

Chaque absorbance correspond à un pourcentage d'inhibition calculé par la relation suivante :

$$I(\%) = \left(\frac{A_0 - A}{A_0} \right) \times 100$$

Où :

A₀ est l'absorbance de la solution de DPPH sans l'huile essentielle et sans extraits

A est l'absorbance de la solution de DPPH en présence de l'huile essentielle ou des extraits.

Nous avons tracé le graphique de la variation de l'absorbance, en fonction de la concentration des échantillons d'huiles essentielles. Cette courbe nous a permis de déterminer les valeurs d'EC₅₀ (Sharma et Bhat, 2009). La vitamine C et la Vitamine E ont été utilisés comme antioxydants de référence.

EC₅₀ est définie comme étant la concentration en (mg/ml) de l'extrait capable d'inhiber 50% des radicaux libres.

II.8. L'étude de l'activité antimicrobienne

II.8.1. Les tests préliminaires

Une ré-identification des souches est faite pour s'assurer de la pureté des ces souches identifiées.

Les souches bactériennes et la levure sont mise en culture dans des milieux de culture sélectifs et ordinaires (voir tableau 5), et aussi soumises à quelques tests biochimiques par la mini galerie classique (TSI, mannitol mobilité, ONPG, Citrate de Simmons, Urée, Indole, LDC, ODC, ADH) (tableau 6) et les galeries API (API 20 E, et API candida) afin de s'assurer de leur pureté.

L'aspect des colonies représente un critère d'identification, ainsi la coloration de Gram et coloration simple ont été pris comme critères primaires pour caractériser les souches.

Tableau 5 :Les milieux de culture utilisés

Les Milieux de culture	Les souches
Hecktoen	<i>E. coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella enteritidis</i>
ENDO	<i>E coli</i>
Desoxycholate	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>E. coli</i>
Gélose au sang frais de cheval	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>MSSA et MRSA</i> <i>Klebesilla pneumoniae</i>
Chapman	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>MRSA</i> , <i>MSSA</i>
Gélose nutritif Muller Hinton	Toutes les souches
OGA Sabouraud Sabouraud +chloromphenicol	<i>Candida albicans</i>
SS	<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella enteritidis</i>
King A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PDA (Potato Dextrose Agar)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> . <i>Fusarium culmorum</i>

Tableau 6 : Mini galerie biochimique pour l'identification des souches bactériennes (Djelouat , 1990 ; Meziani, 2012)

Test	Utilisation	Mode opératoire	Lecture de résultats
T.S.I (Triple Sugar Iron) 1	-La recherche de pouvoir glucidolytique - production (H ₂ S) et de gaz	Piqure centrale + stries sur la pente	Resultat (+): couleur jaune H ₂ S (+) : Culot noire Gaz (+):décollement de milieu
Catalase	Mise en évidence des enzyme respiratoire	Une colonie de bacteries + Goutte H ₂ O ₂	Catalase (+) : formation de bulles d'oxygène
Oxydase	Mise en évidence des enzyme respiratoires	Disque d'oxydase + colonie bactérienne	Oxydase (+) : Coloration violet-noir
Urée-Indole 1 T.D.A	-Mise en évidence de l'urée : enzyme uréase, - TDA ⁴ : Tryptophane Désaminase, -Indole : Tryptophanase.	1ml Bouillon Stuart (Urée-Indole) + 3Gouttes (SB) ² +une goutte de reactif TDA	Urée (+) : couleur rouge Indole ³ (+) : anneau rouge TDA ⁴ (+) : couleur rouge brique
ADH/ODC/LDC¹	La recherche des décarboxylases de l'ornithine, lysine, et de l'arginine	1ml Bouillon Moëller (Arginine, Ornithinine, Lysine et Témoin) + 5Gouttes (SB)	ADH/ODC/LDC (+) : couleur violet réaction (-) : Couleur jaune
Citrate de Simmons¹	-La recherche de citrate perméase -Source de carbone : le citrate	Ensemencement en série longitudinale	Resultat (+) : Pente bleu + Colonie
Mannitol¹	-Fermentation du mannitol -La mobilité,	piqure centrale	Mannitol (+) : Couleur jaune mobilité :répartition des colonies dans le milieu
O.N.P.G¹	Recherche de la Bêta-galactosidase	SB + un disque d'ONPG imprégnés	B-galactosidase + = ONPG+:couleur jaune

¹ incubation à 37°C pendant 24 h

²suspension bactérienne : eau physiologique + quelque goutte de bouillon nutritif de culture de 18 à 24 h

³ + Réactif Kowacs

- **Le choix des solvants**

Nous avons effectué des tests préliminaires sur le choix de diluant : le tween 80 (0,05%) et le DMSO(10%) et la solution d'agar 0.2%.

Le Diméthyle Sulfoxide (DMSO) a été choisi comme diluant des huiles essentielles et les extraits pour les différents tests d'activité antibactérienne, le DMSO n'exerce aucun effet sur la croissance des bactéries et permet une très bonne dispersion des HEs et des extraits sur la gélose .

La solution d'agar 0.2% a été choisie pour diluer les huiles essentielles et les extraits afin de déterminer leurs activités antifongiques.

II.8.2. L'évaluation de l'activité antimicrobienne

Les tests d'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits ont été réalisés avec deux méthodes :

La première de diffusion sur milieu solide (méthode de Vincent) (Bekhechi *et al*, 2008). la seconde de dilution, en milieu liquide, afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ainsi que les concentrations minimales bactéricides (CMB), pour les extraits actifs (Rios *et al*, 1988).

II.8.2.1. Méthode de diffusion (méthode de Vincent)

L'étude est réalisée par la méthode de diffusion, qui est initialement conçue pour les antibiotiques (antibiogramme) mais en substituant les disques d'antibiotiques par d'autres imprégnés par de l'huile essentielle (aromatogramme) ou les extraits dilués (Rios *et al*, 1988). Cette technique permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque (Billerbeck, 2007 ; Jacob *et al*, 1979 in Bekhechi *et al*, 2008; Saidana *et al*, 2008 ; Ayadi *et al*, 2011).

L'huile essentielle et les extraits ont été dilués préalablement dans le DMSO (un émulsifiant). Trois dilutions (v/v) ont été choisies pour l'huile: 1/2, 1/4 et 1/10 (v/v) (Lahlou *et al*. 2000b in Lahlou, 2004).

Pour l'extrait d'acétate d'éthyle des concentrations décroissantes (3mg/ml à 125µg/ml par disque) et (3mg/ml à 500µg/ml par disque) pour l'extrait butanolique, ont été testées.

- **Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques**

Des antibiogrammes ont été effectués en parallèle afin de tester la sensibilité des bactéries vis-à-vis des antibiotiques (CLSI, 2006). Les antibiogrammes servent de contrôle positif comme le montre le tableau (7).

Tableau 7: les antibiotiques choisis, leurs codes et leurs concentrations

Les antibiotiques	Le code	La concentration
Enrofloxacin	ENR	5 µg
Chloramphénicol	C	30 µg
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	AMC	20 µg
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	AMC	30 µg
Vancomycine	VA	30 µg
Pénicilline	P	10 µg
Oxacilline	OX	1 µg
Spiramycine	SP	100 µg
Erythromycine	ER	15 µg
Acide Nalidixique	NA	30 µg
Bacitracine	B	10 µg
Ampicilline	AM	10 µg

Le mode opératoire de méthode de diffusion

A partir d'une suspension bactérienne préparée dans l'eau physiologique et ajustée à 10^8 cellules/ml, nous avons ensemencé par un écouvillon une gélose Muller-Hinton (pour les bactéries) et Sabouraud (pour le *Candida albicans*), puis nous avons organisé les disques stériles sur la gélose. Ces disques sont formés par des papiers filtre stérilisés de 6 mm de diamètre (El-Houti, 2010 ; Ayadi et al, 2011; Benabed, 2011).

Nous avons imbibé chaque disque d'un volume fixe de 15 µl de l'extrait ; l'opération a été répétée 3 fois pour chaque dilution (3 disques de la même dilution par boîte).

Pour avoir une bonne diffusion des HE et des extraits, une préculture a été faite à 4°C pendant 1 heure, puis les cultures ont été incubées à 37°C pendant 24 h, pour les bactéries, et 48 h pour la levure.

Des témoins sans extrait ont été réalisés :

*contrôle - : des disques imprégnés par le DMSO (sans huile essentielle et sans extrait)

*control + : par des antibiotiques

A la fin de l'incubation, nous avons noté l'activité des HEs et les extraits, en mesurant les zones d'inhibition, claire, autour des disques, à l'aide d'un pied à coulisse. Les résultats de la lecture sont exprimés selon trois niveaux d'activité :

Résistant ($D = 6 \text{ mm}$)

Intermédiaire ($6 \text{ mm} < D \leq 13 \text{ mm}$)

Sensible ($D > 13 \text{ mm}$) (Billerbeck, 2007).

II.8.2.2. La détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide

Nous avons procédé à la détermination des CMI des extraits, révélés actifs, selon la méthode de dilution en milieu liquide (Janssen *et al.*, 1986 ; Rios *et al.*, 1988).

Le mode opératoire

Une solution mère a été préparée préalablement, en faisant dissoudre l'HE et les extraits de la plante dans une solution de DMSO 10% pour réaliser des dilutions successives (Cao *et al.*, 2009) (les concentrations des huiles sont décroissantes de 6 à 0,062 mg /ml) et 6 à 0,25mg/ml pour les extraits. Pratiquement, les bactéries sont cultivées sur du bouillon nutritif.

Des volumes constants de milieu de culture liquide (3.2 ml) ont été répartis dans des tubes à essai, pour obtenir une charge de 10^5 cellules/ml, nous les avons inoculés avec une suspension bactérienne. Ensuite, nous avons ajouté dans les tubes les solutions, à concentration croissantes ; le volume injecté dans chaque tube étant de 668 μ l. Un tube servant de témoin négatif estensemencé sans extrait.

Les tubes à essai, ainsi préparés, sont incubés pendant 24h à 37°C pour les bactéries et pendant 48h à 25°C pour le *Candida albicans*.

Les résultats sont notés à l'œil nu. Ainsi, nous avons déterminé la CMI (la concentration la plus faible présentant une inhibition de la croissance en comparaison avec le témoin négatif).

Après avoir révélé la CMI, nous avons procédé à la détermination de la CMB (c'est la plus faible concentration pour laquelle 99,99% de l'inoculum initial a été tué (Canillac *et al* , 2001; May *et al*, 2000 *in* Saidana *et la*, 2008; Ayadi *et al*, 2011).

Les tubes ayant un aspect clair ont été ensemencés à la surface de la gélose nutritive pour les bactéries et le milieu Sabouraud pour l'espèce *Candida* afin de déterminer la CMB.

II.8.2.3.L'évaluation de l'activité antifongique

En utilisant la méthode du contact direct pour évaluer l'activité antifongique de l'huile essentielle et des extraits, rapportée par Remmal *et al*(1993) *in* Satrani *et al* (2007). Des dilutions sont préparées au 1/2 à 1/1000e pour les huiles essentielles dans la solution d'agar 0,2%. Dans des tubes à essai contenant chacun 13,5 ml du milieu solide PDA (Potato Dextrose Agar), stérile à l'autoclave pendant 20 min à 121 °C et refroidis à 45 °C, puis on ajoute aseptiquement 1,5 ml de chacune des dilutions de façon à obtenir les concentrations finales allant de 1/20 à 1/10000 (v/v) (Satrani *et al* 2007 ; El Ajjouri *et al*, 2008 ; Hadizadeh *et al*, 2009 ;Bourkhiss *et al* 2010; Amarti *et al*, 2010).

Pour les extraits (acétate d'éthyle et le butanol), les concentrations allant de 6mg/ml à 0,25mg/ml.

Chaque tube est homogénéisé instantanément par agitation puis son contenu est versé dans une boîte de Pétri. Le mélange ainsi versé et laissé au repos jusqu'à refroidissement et des témoins, contenant le milieu de culture et la solution d'agar à 0,2 % seule, sont également préparés.

Après solidification du milieu, l'ensemencement se fait par un disque de mycélium, provenant d'une culture de 7 jours, et déposé au centre de la boîte. Après, on procède à une incubation de 7 jours (25°C).

Quotidiennement, la croissance du filament sur chaque boîte est relevée et il est procédé, à la fin du temps approprié d'incubation, à une mesure des diamètres de mycélium pour calculer le taux d'inhibition (I%) (Cheng *et al*, 2008).

$$I\% = \frac{(Da - Db)}{Da} \times 100 \text{ (Cheng et al, 2008)}$$

Ou :

I% pourcentage d'inhibition exercé par l'huile sur le mycélium

Da Diametre de mycélium témoin

Db Diametre de mycélium

La lecture des résultats nous a permis de déterminer la CMI (la plus faible concentration en extrait pour laquelle on n'observe pas de croissance, visible à l'oeil nu, sur le milieu PDA ; c'est une action fongistatique) après 6 jours d'incubation.

La CMF (définie comme étant la plus faible concentration des extraits détruisant le champignon ; c'est une action fongicide). Elle a été déterminée par la réponse (absence de croissance) du repiquage à partir de cultures, de 7 j, n'ayant donné aucune croissance fongique. L'extrait est dit :

- très actif , lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 75 et 100 %, la souche fongique est dite très sensible ;
- actif, lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 50 et 75 %, la souche fongique est dite sensible
- moyennement actif, lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 25 et 50%, la souche est dite limite.
- peu ou pas actif, lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 0 et 25%, la souche est dite peu sensible ou résistante (Kpemissi, 2007) .

Partie III

Résultats et discussion

I. Résultats de l'étude phytochimique

I.1. La teneur en huiles essentielles

Les teneurs en HEs ont été calculées par rapport à la masse des parties aériennes de la plante (tiges et feuilles).

La durée d'extraction des huiles essentielles est de 4 heures, l'extrait est un liquide jaune avec une forte odeur.

La teneur en huiles essentielles de basilic est égale à $2,047 \pm 0,48\%$, qui est proche de celui déterminé par Khelifa et al (2012) à partir d'un échantillon collecté dans la région de Khemis Miliana où le rendement était de 1,98 %, Özcan et Chalchat (2002), et en Turquie, ont obtenu un rendement égal à 1,25%. Le rendement égal à 1,7% des huiles essentielles de basilic collectée dans une région de l'Egypte (Ismail, 2006), tandis que Ngom et al (2012) ont enregistré un rendement de 1,24% pour un échantillon collecté au Sénégal.

En revanche; Telci et al (2006) ont obtenu des rendements variant entre 0,5 et 1,5 % en l'huile essentielle de *Ocimum basilicum* de Turquie et ont obtenu le grand rendement dans le chémotype II (chémotype de méthyle cinnamate).

Dans la littérature, les rendements de cette espèce en huiles essentielles varient entre 0,2% et 1% (v/m) (Stănescu et al 1995 in Benedec 2009).

Le rendement en huiles essentielles est lié à plusieurs paramètres, l'environnement, le génotype, l'origine géographique, l'âge de la plante, la période de récolte, le séchage, lieu de séchage, le procédé d'extraction utilisé, la température, la durée de séchage, les parasites, les virus, les traitements phytosanitaires et les stress hydrique, (Grayer, 1996; Svoboda et Hampson, 1999; Smallfield, 2001; Bruneton, 2009; Ekren et al, 2012).

Du fait que notre espèce était collectée de la région de Laghouat située dans des contextes écologiques différents, on constate que la grande variabilité entre les rendements en huiles essentielles est peut être fonction de l'impact de ces facteurs.

En comparant nos résultats avec ceux issus de la littérature, nous pouvons conclure que *O. basilicum* est très riche en huile essentielles (Tableau 8).

Tableau 8 :le rendement en huiles essentielles de différentes espèces de basilic

L'espèce	Zone de collecte	Teneur %	Reference
<i>O. gratissimum</i>	Kenya	2,9%	Dambolena et al, 2010
<i>Ocimum canum</i>	Cameron	0,58%	Ngassoum et al, 2004
<i>O. suave</i>	Tanzania	1,01%	Runyoro et al, 2010
<i>O. gratissimum</i>	Inde	0,65%	Dubey et al, 2000
<i>O. basilicum</i>	Pakistan	0,6%	Hussain et al, 2008
<i>O. basilicum</i>	Turquie	1,0%	Chalchat et Ozcan, 2008

I.2.Les Tests phytochimiques

Le tableau 9 renferme les résultats des tests phytochimiques réalisée sur les différents extraits de basilic .

Tableaux 9:résultats des tests phytochimiques

Flavonoïdes	Alcaloïdes	Tanins	Saponines
+	-	+	+

- absence de métabolite.

+ Présence de métabolite.

Les tests phytochimiques réalisés sur les différents extraits de basilic ont permis de constater la présence des flavonoïdes, des tanins et des saponines et donc ces plantes sont des sources de composés phénoliques et de saponines (figure A1, Annexe A).

Par contre, un résultat négatif est remarqué avec le réactif de Mayer, ceci est due à l'absence d'alcaloïdes dans notre plante ce qui est confirmé aussi par le réactif de Wagner qui donne un test négatif .

Et selon Kpemissi., (2007).La composition chimique des extraits varient selon les organes et suivant les espèces.

D'après les résultats des études antérieures, le basilic contient:

des acides phénoliques tels que l'acide rosamarinique, l'acide vanillique, p-coumarique, l'acide hydroxybenzoïque, l'acide férulique, l'acide caféique, l'acide gentisique et l'acide chicorique (Bais et al, 2002 ; Lee et Scagel, 2010) et la présence de flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, acide ascorbique, glucoside et saponines (Grayer et al, 1996; Grayer et al, 2004 ; Ali-Delille, 2010; Baba Aissa, 2011).

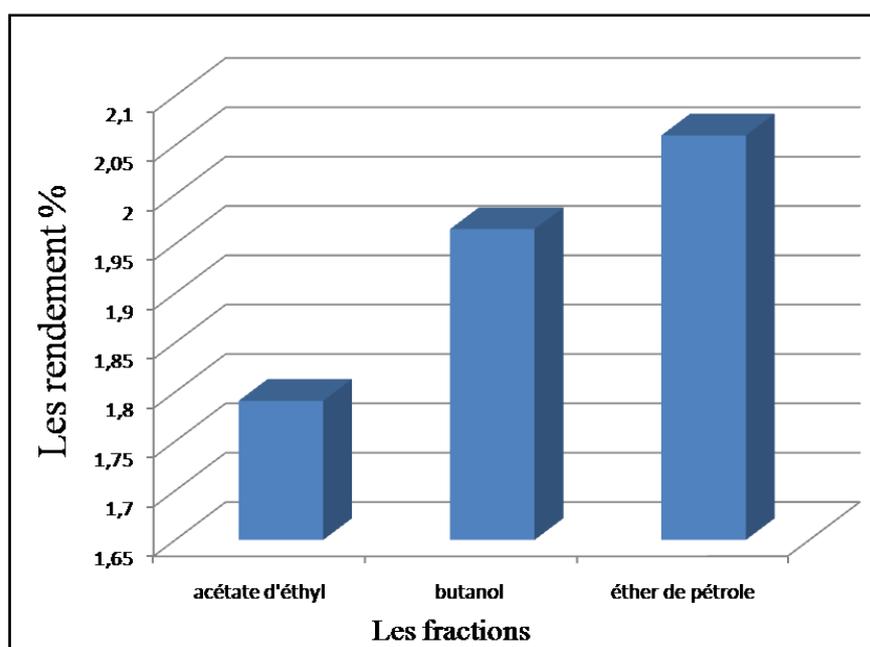
I.3. Les rendements des extraits

Les rendements en composés des différentes fractions extraites par le système de solvants (Ethanol/Méthanol/Eau), sont consignés dans les (Tableau 10), avec l'aspect et la couleur de chaque extrait.

Tableau 10: les rendements, couleur et aspect des différentes fractions

Les extraits	Couleur et aspect	Masse en mg	Rendement % (m/m)
Acétate d'éthyle	Vert olive visqueux	89,55±0,63	1,791
Butanol	Marron poudreux	98,25±2,27	1,96
Ether de pétrole	Vert foncé visqueux	103,33±10,10	2,066

Les rendements des extraits en fractions organiques varient de 1,791% à 2,066% (figure 10).



La figure 10: Les valeurs des rendements obtenus pour chaque fraction

On remarque que les rendements varient d'un extrait à l'autre. Cela veut dire qu'il y a une différence de diffusion du solvant dans la poudre de la plante dans l'étape de macération et probablement à la nature des solvants utilisés pour l'extraction.

Le rendement le plus élevée est enregistré pour l'extrait d'éther de pétrole (2,066%) car l'éther de pétrole (solvant apolaire) permet d'éliminer les composés lipophiles (acides gras), des stérols et des pigments (chlorophylle et caroténoïdes) leurs poids moléculaires sont élevés (Torck et Pinkas, 1992 ; Kebieche, 2009 ; Hammoudi *et al*, 2012).

La valeur de rendement obtenue pour l'extrait butanolique est de 1,96% et pour l'acétate d'éthyle elle est de 1,791%. Cela peut être expliqué par la différence de polarité. De plus, l'acétate d'éthyle peut extraire les composés apolaires et peu polaires de poids moléculaires faibles comme les flavonoïdes et le phénol apolaire (Mansour, 2009), alors que le butanol peut aussi solubiliser les molécules les plus polaires de poids moléculaires plus élevés qui sont les tanins et certains flavonoïdes polaires (Kwon *et al*, 2003 ; Benarous *et al*, 2013).

I.4. Le dosage des composés phénoliques et des saponines

I.4.1. Dosage des phénols totaux

Les teneurs en composés phénoliques totaux des différents extraits de la plante étudiée ont été calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage d'acide gallique (Figure 11)

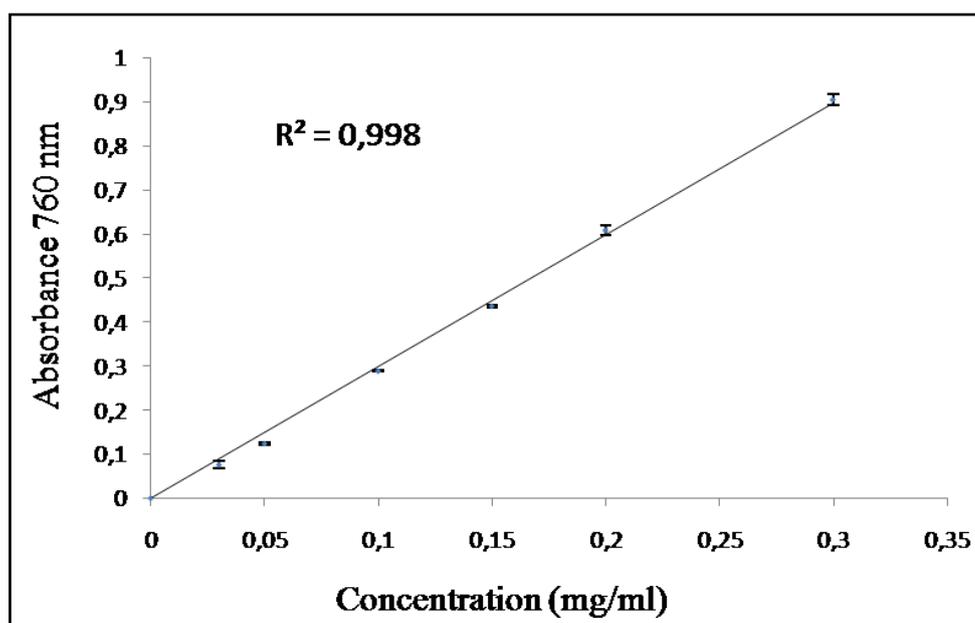


Figure 11 : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Les teneurs sont exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique (GAE)/gramme d'extraits sec (Tableau 11). Tous les essais ont été reproduits au moins trois fois.

Tableau 11 : Les teneurs en phénols totaux des deux extraits

Les extraits	Concentration en mg/g
Acétate d'éthyle	24,45±0
Butanol	3,087±0,0014

Les teneurs en phénols totaux mesurés à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu varient de 24,45mg/g pour l'acétate d'éthyle à 3,087mg /g pour l'extrait butanolique.

Le taux important en phénol totaux est enregistré dans l'extrait d'acétate d'éthyle , ceci pourrait être due à la nature des composés phénoliques extraits par l'acétate d'éthyle de la plante étudiée, elle contient plus de composés phénoliques apolaires (comme les flavonoïdes aglycones et les acides phénoliques... qui sont extractibles par l'acétate d'éthyle) que les polaires comme les tanins ... qui sont extractibles par le butanol (Andersen et Markham, 2006).

Nos valeurs ont été comparées à celles des travaux antérieurs (tableau 12).

Tableau 12. Comparaison de la teneur en phénols totaux de l'extrait d'acétate d'éthyle de *O. basilicum* avec d'autres travaux sur la même espèce.

Teneur de phenols totaux (mg/g)	Region	Reference
1,65 à 2,044	Italy	Carlo et al, 2013
2,23 ± 0,15	La Chine	Zheng et Wang, 2001
24	Inde	Surveswaran et al, 2007
9,76 ± 0,03	Serbia	Kaurinovic et al, 2011

Nous pouvons conclure que notre plante est très riche en composés phénoliques en comparaison avec les teneurs obtenues dans d'autres travaux.

Les résultats obtenus restent approximatifs, puisque le dosage de Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique pour les polyphénols. En effet, le réactif peut réagir avec des protéines, des sucres réducteurs, l'acide ascorbique et des composés soufrés et d'autres composés (Macheix et al, 2005).

De plus, l'augmentation de phénol totaux dans cette plante dans notre région peut être liées aux conditions climatiques difficiles (température, exposition solaire élevée, sécheresses ..) (Djeridane et al, 2006)

I.4.2. Dosage des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes des différents extraits ont été calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la quercétine (Figure 12)

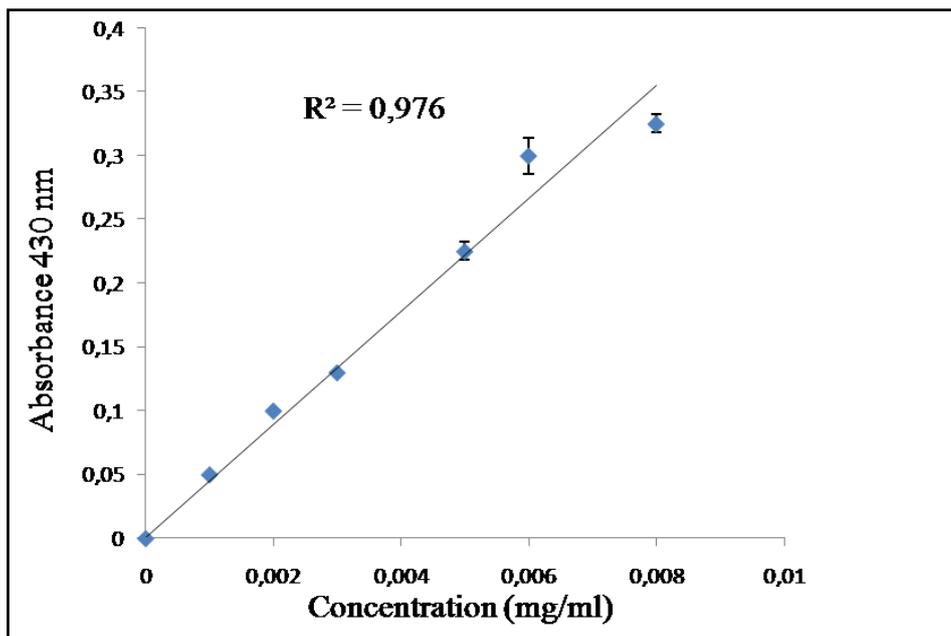


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

Les teneurs sont exprimées en équivalent de mg de la quercétine (QE) / g d'extrait sec (Tableaux 13). Tous les essais ont été reproduits au moins trois fois.

Tableau 13 : Les teneurs en flavonoïdes des deux extraits

Les extraits	Concentration en mg/g
Acétate d'éthyle	3,575±0,021
Butanol	1,28±0,006

Nous avons remarqué que le taux des flavonoïdes est de 3,575±0,021mg/g dans la fraction d'acétate d'éthyle et de 1,28±0,006 mg/g dans la fraction butanolique.

Nous pouvons constater que l'extrait d'acétate d'éthyle est plus riche en flavonoïdes par rapport à l'extrait butanolique, ceci est peut être dû à la nature de la plante étudiée car elle contient plus

de flavonoïdes apolaires (par exemple les isoflavones, flavanones, les flavones méthylés, et flavonols) (Andersen et Markham, 2006).

Ces taux représentent la quantité des flavones et flavonols puisque la méthode de dosage suivie est utilisée spécifiquement pour le dosage de ces deux classes.

La teneur en flavonoïdes de l'extrait d'acétate d'éthyle (3,575 mg/g) est proche de celui déterminé par Grayer et al, (2004) qui ont révélé que les teneurs en flavonoïdes pour *O basilicum* varient entre 0,08 à 3 mg/g., de plus Essien et al, (2012) ont obtenu le taux de flavonoïdes égal à 0,413 mg/g de *Ocimum basilicum* de Nigeria.

I.4.3. Dosage des tanins condensés

Les teneurs en tanins condensés des deux extraits de la plante étudiée ont été calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la catéchine (Figure 13)

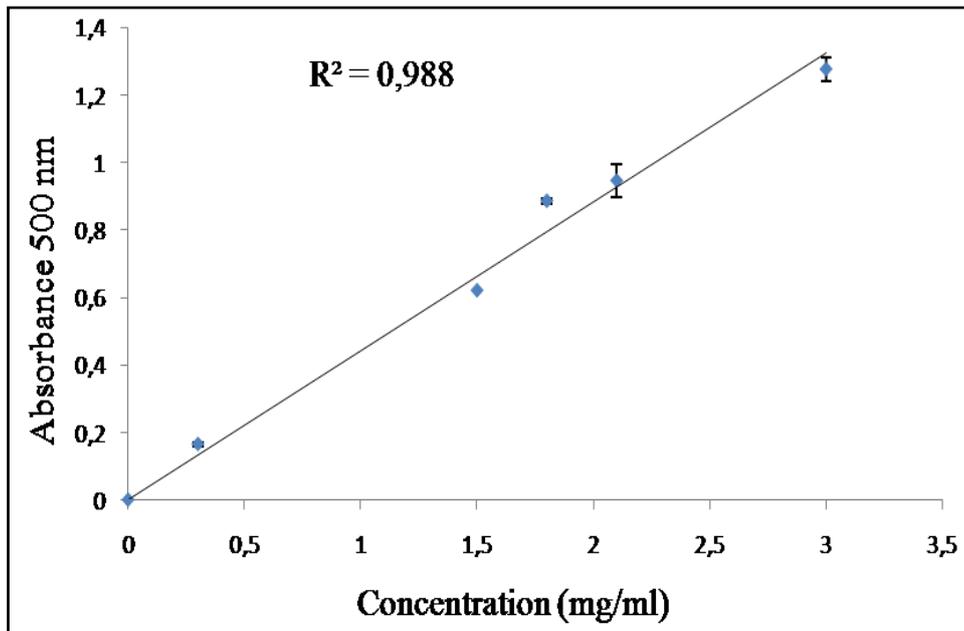


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.

Les teneurs sont exprimées en équivalents de mg de la catéchine / g d'extrait sec (Tableau 14).

Tableau 14: Les teneurs en tanins condensés des deux extraits

Les extraits	Concentration en mg/g
Acétate d'éthyle	3,686±0,002
Butanol	0,298±00

D'après les résultats obtenus lors de la quantification des tanins condensés, les teneurs en tanins sont de $3,686 \pm 0,002$ mg /g dans l'extait d'acétate d'éthyle et de $0,298 \pm 00$ mg/g dans l'extrait butanolique.

L'extraction des tanins à l'aide d'un solvant comme l'acétate d'éthyle, permet d'isoler aussi les composés phénoliques libres, en particulier galliques et catéchiques, et des produits condensés (Richardin et *al*, 1988), et peuvent extraire les dimères de proanthocyanidol (Mamadon, 2002).

Les tanins généralement sont plus extractibles par le butanol (Andersen et Markham, 2006) mais dans notre cas, la teneur le plus faible est calculé dans l'extrait butanolique est révèlé. Cette variation de la composition peut être probablement due à plusieurs facteurs comme les protocoles expérimentaux (le mode d'extraction, le choix de l'étalon, dosage, ...etc.).

Nous avons présenté nos résultats dans l'histogramme ci-dessous (figure 14) afin de comparer le contenu de notre plante en composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et tanins),

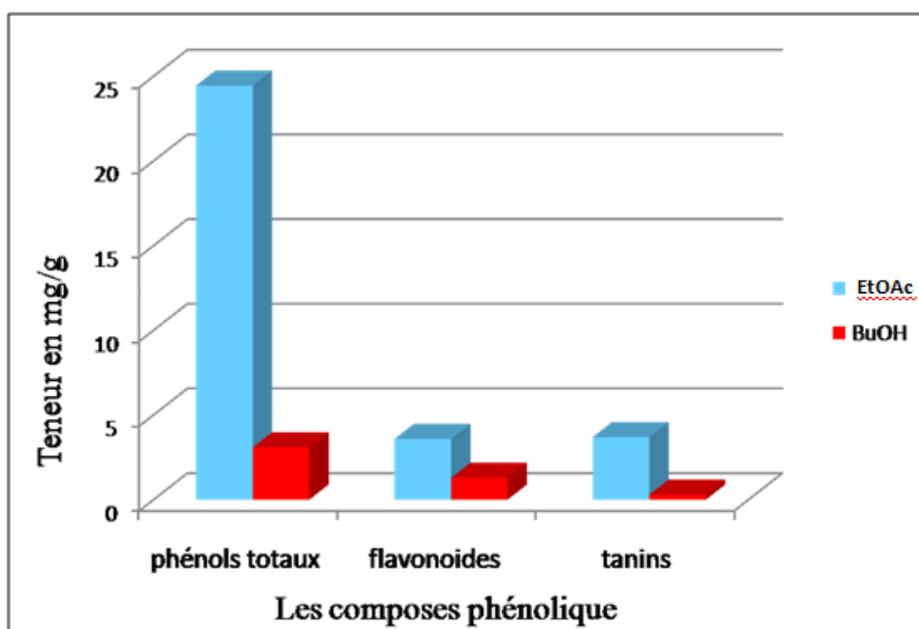


Figure 14 : comparaison entre les composés phénoliques

Si nous comparons la teneur en phénols totaux avec la teneur en flavonoïdes et des tanins dans la fraction acétate d'éthyle, nous remarquons que le taux des flavonoïdes représentent 14,62%, des tanins 15,075%. Ce résultat peut être interprété par le fait que ces composés phénoliques contiennent d'autres composés outre les flavonoïdes et les tanins.

Amrani et al, (2009), ont montré que l'extrait aqueux de *O basilicum* contient des tanins et représentent 42% de la teneur de phénols totaux. La quantité de flavonoïdes est de 23% .

L'étude de Bora et al., (2011), a estimé que le taux des tanins de *O basilicum* de l'Inde dans l'extrait d'acétate d'éthyle est de 36,68% de phénols totaux calculés , les flavonoïdes représentant 18,51%.

Concernant la fraction butanolique, on remarque que les pourcentages des flavonoïdes et des tanins sont respectivement 41.46% et 9.65% , cela est peut-être expliqué par le fait que cette fraction renferme des composés flavonoïdiques polaires beaucoup plus que les tanins.

Les teneurs en phénols totaux sont toujours très faibles par rapport aux rendements des extraits bruts (figure 15) , ce résultat indique que les extraits bruts obtenus par extraction liquide-liquide avec de l'acétate d'éthyle et du butanol contiennent des composés autres que les polyphénols comme les saponines.

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques. Des études ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Aganga et Mosase, 2001)

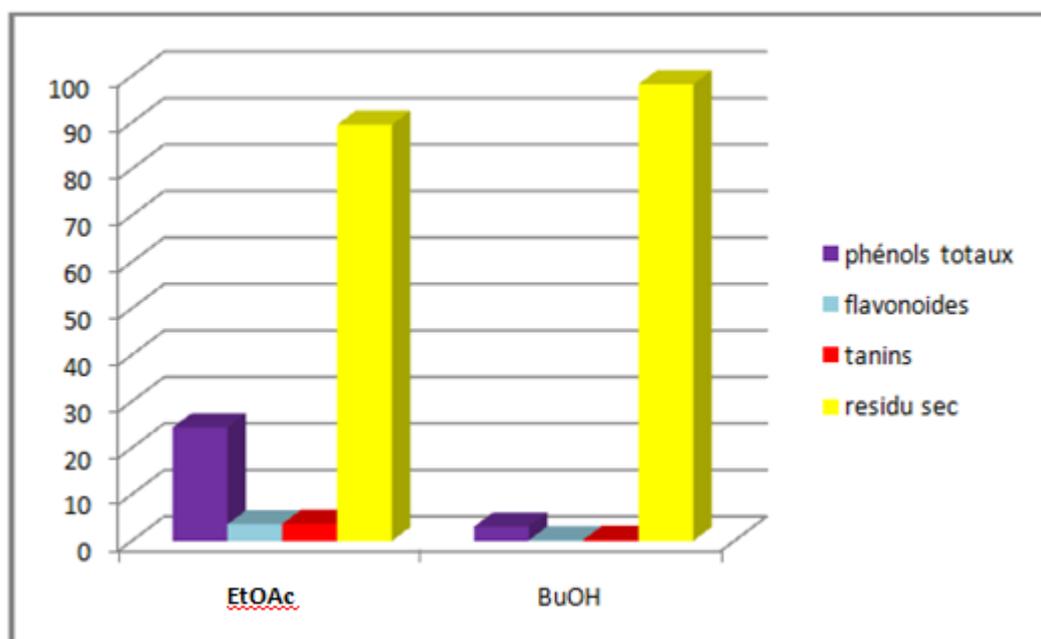


Figure 15: comparaison entre les composés phénoliques et les résidus secs.

I.4.4. Dosage des saponines

La teneur en saponines de l'extrait butanolique de la plante étudiée ont été calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la digitonine (Figure 16) et exprimée en équivalent de mg de la digitonine /g d'extrait sec .Tous les essais ont été reproduits au moins trois fois.

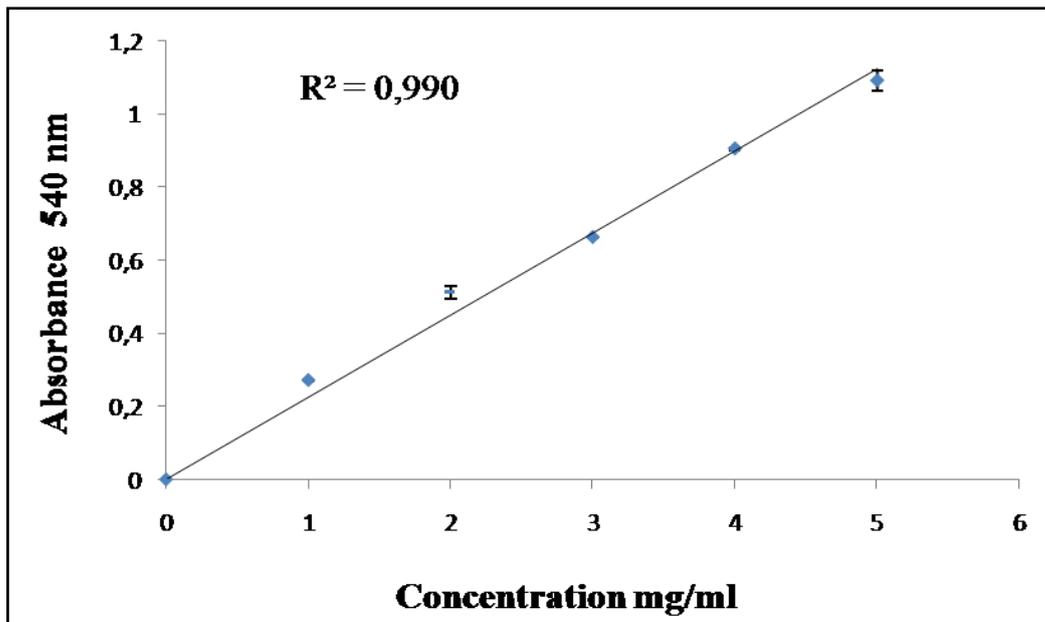


Figure 16 : Courbe d'étalonnage de la digitonine

Nous avons obtenu un taux moyen de $18,28 \pm 0,007$ mg/g de saponines dans l'extrait butanolique qui représente 18,60% de la masse d'extrait brut de butanol (98,25mg). voir la figure 17.

Si nous comparons ce résultat avec les travaux de Essien et *al*, (2012)., dont le taux de saponines de l'extrait aqueux de la même espèce issue du Nigeria, qui est de 1,09mg/g, nous pouvons conclure que *Ocimum basilicum* de la région de Laghouat est riche en saponines.

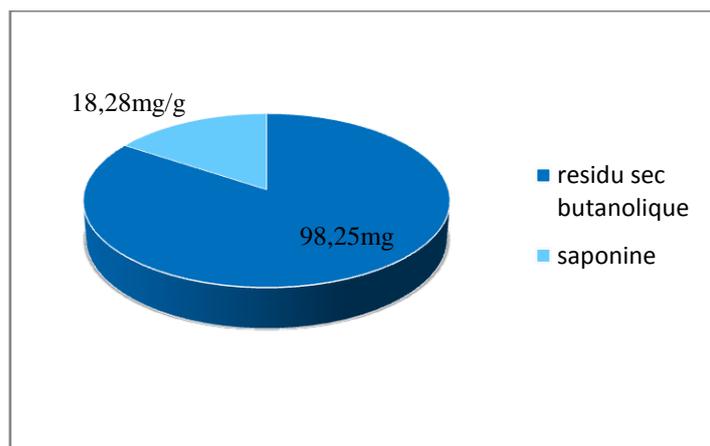


Figure 17: Comparaison entre la teneur de saponine et le résidu sec butanolique.

Il est nécessaire de noter que l'extraction des composés à partir des plantes est influencée par plusieurs facteurs liés soit aux procédures d'extraction employées en tenant compte du type de solvants, la durée d'extraction, et le type de contact matière-solvant, la taille des particules de l'échantillon, l'agitation et la température, soit aux composés à extraire particulièrement leurs natures chimiques, leurs polarités et leurs poids moléculaires (Nazck et Shahidi, 2004 ; Spigno *et al.*, 2007 in Telli *et al.*, 2010 ; Bonnaillie *et al.*, 2012).

II. L'activité antioxydante

Nous avons employé le test chimique DPPH, afin d'étudier l'activité antioxydante, exprimant la capacité de réduction des radicaux libres.

Les valeurs obtenues (I% de chaque extrait), nous ont permis de tracer les graphes illustrant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'HE et des extraits (acétate d'éthyle et butanol) figure 18 et 19, ainsi que la figure 20 qui représente la variation des pourcentages d'inhibitions (I%) en fonction des concentrations des deux antioxydants standards choisis pour cette étude à savoir, la vitamine C et la vitamine E.

Le tableau 15 renferme les valeurs des EC_{50} des différents extraits et les valeurs des EC_{50} de quelques antioxydants de référence, en guise de comparaison.. Ces valeurs correspondent aux concentrations nécessaires en substrat pour piéger 50% du radical libre DPPH• .

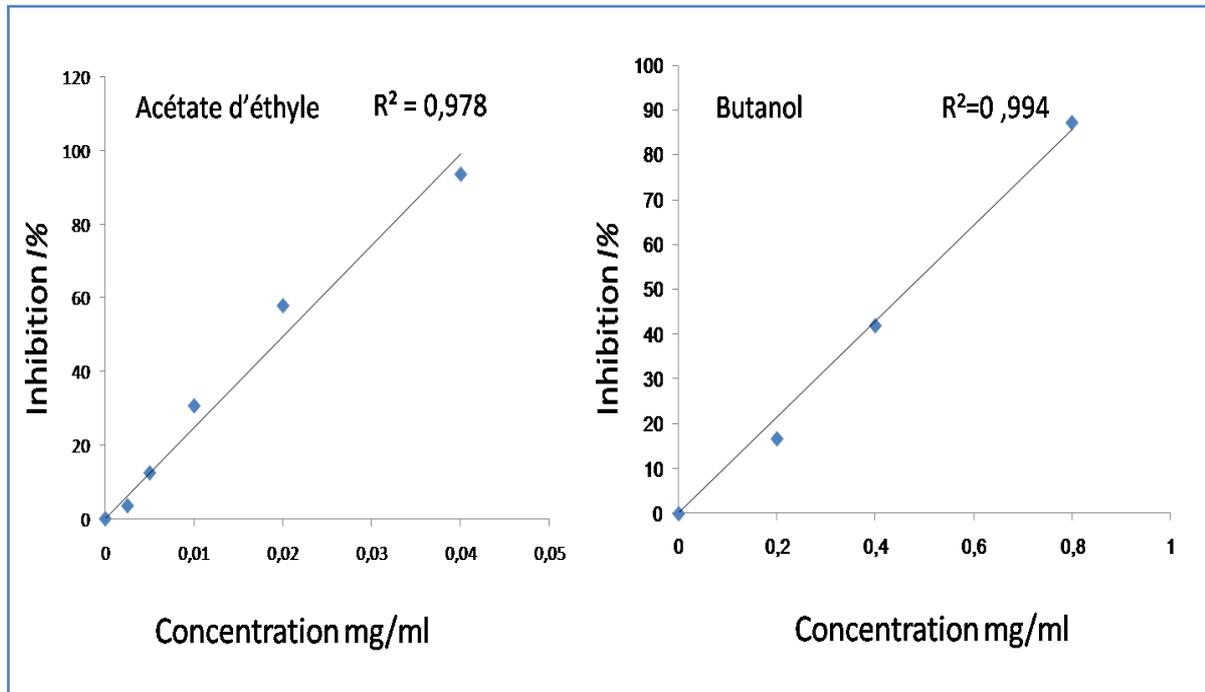


Figure 18 : Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction des concentrations des extraits (Acétate d'éthyle, Butanol)

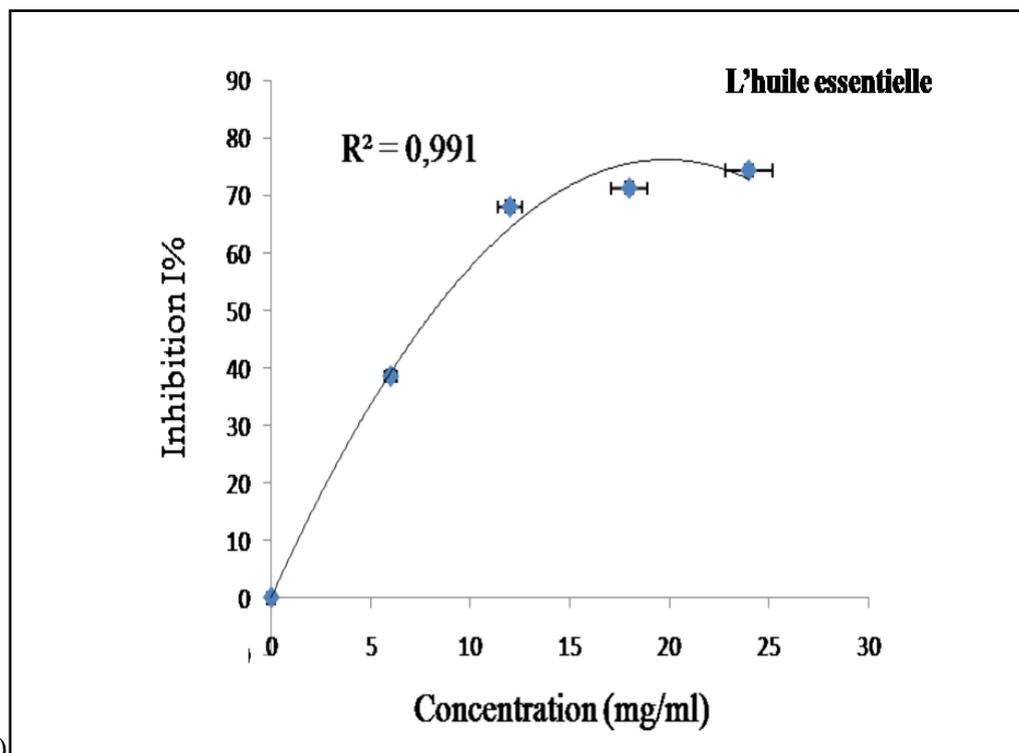


Figure 19: Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de l'HE

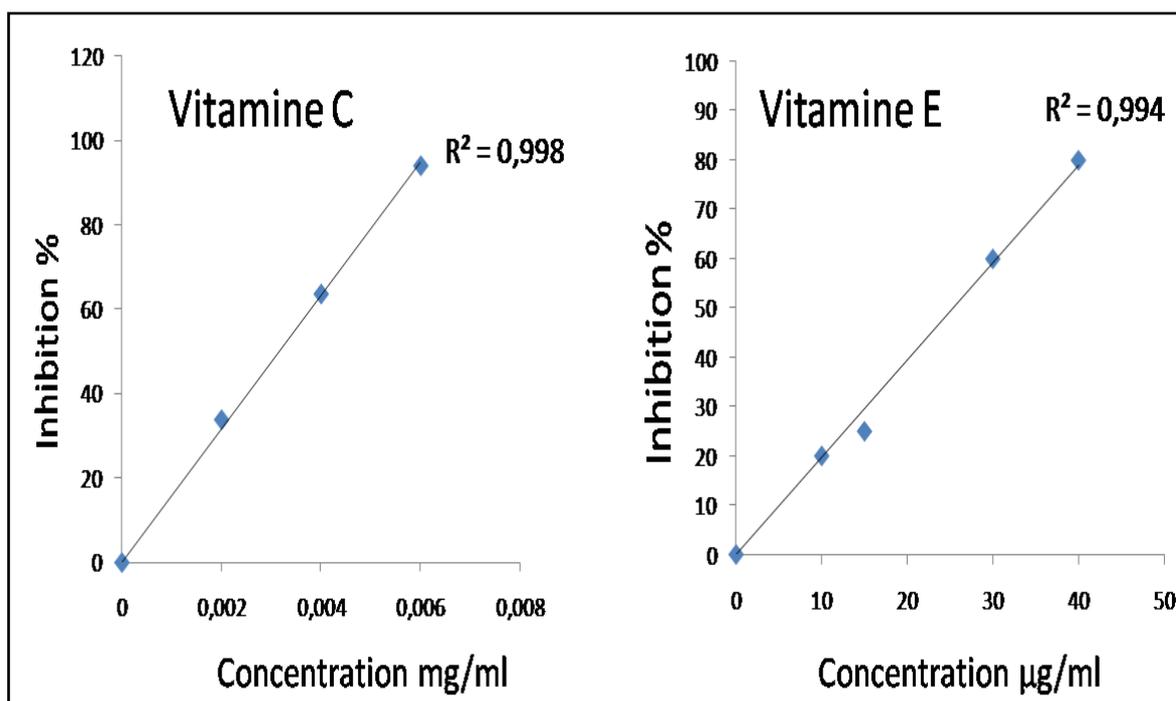


Figure 20: Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration en Vitamine C et en Vitamine E

Tableau 15 : les valeurs des EC₅₀ des différents extraits

Extraits et antioxydant de référence	EC ₅₀ (mg/ml)
Les huiles essentielles	8,11±0,25
L'acétate d'éthyle	0,02013±0,00032
Le butanol	0,467±0,022
La Vitamine C	0,00317±0,000152
La Vitamine E	0,022±0,0002

D'après les résultats obtenus (Tableau 15), nous remarquons que parmi les trois extraits, l'acétate d'éthyle représente l'extrait le plus actif, la EC₅₀ est de 0,0201 mg/ml, suivi par l'extrait butanolique avec une EC₅₀ de l'ordre de 0,467 mg/ml. Par contre, l'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée par les huiles essentielles avec une EC₅₀ de l'ordre de 8,11mg/ml.

En analysant l'ensemble des résultats obtenus et sachant que la faible valeur de EC₅₀, signifie la forte activité antioxydante. Et en se basant sur les valeurs de la EC₅₀ déterminées par

le test DPPH utilisé pour les deux antioxydants de références synthétiques (Vitamine C et vitamine E), nos résultats, montrent clairement que l'extrait d'acétate d'éthyle possède un potentiel antioxydant important comparable avec celui des antioxydants de référence utilisés dans ce test. Les autres extraits présentent une activité antioxydante de moyenne à faible, et nous remarquons que les valeurs d'EC₅₀ les plus grandes ont été obtenues dans l'HE puis, l'extrait butanolique, ces valeurs restent incomparable à celle de la vitamine C (0,00317mg/ml) et de la vitamine E (0,022mg/ml).

Pour comparer l'activité antioxydante de nos extraits par rapport à celle de quelques antioxydants de référence, la figure 21 illustre le classement du pouvoir antiradicalaire exprimé en EC₅₀ des extraits.

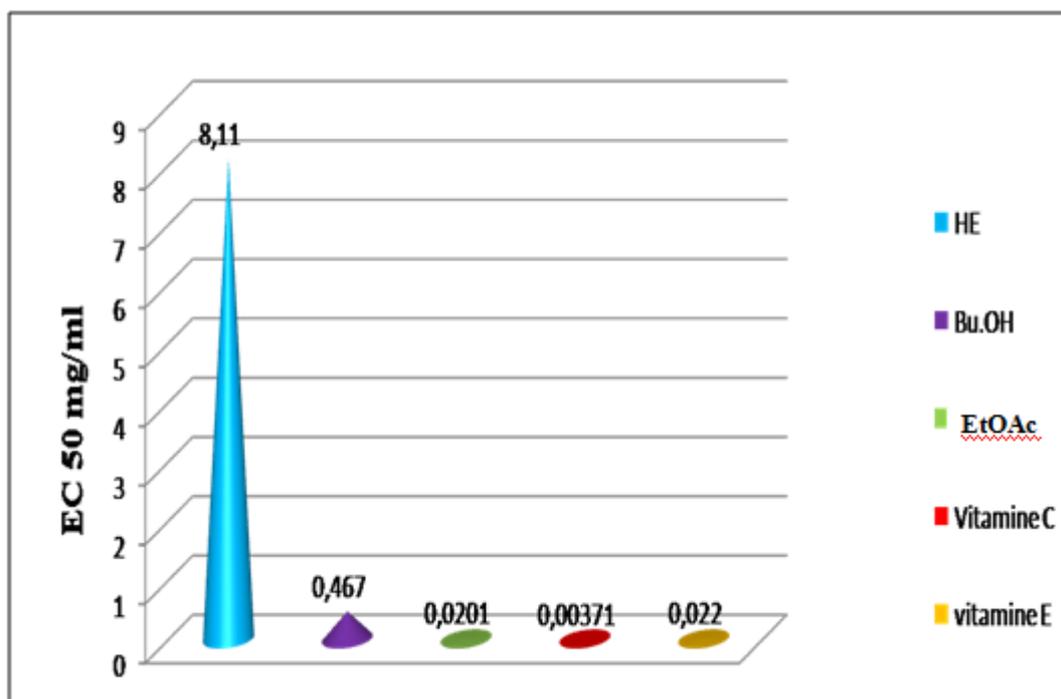


Figure 21: l'EC₅₀ de différents extraits et des antioxydants de référence

La présence d'une activité antioxydante dans l'extrait d'acétate d'éthyle, est expliquée par sa richesse en phénols totaux notamment les tanins et les flavonoïdes.

La différence entre les différents extraits, peut être expliquée par le fait que ces différentes fractions d'acétate d'éthyle et de butanol et aussi les huiles essentielles renferment des structures de composés phénoliques différents. Cette même constatation, a été observée par Khoudja et al, (2014) dans leur étude sur deux extraits de *Thymus algeriensis* (Lamiaceae), ils ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle possède une très bonne activité par une EC₅₀ de l'ordre de 0,048mg/ml, et de 0,987mg/ml pour l'extrait butanolique.

L'extrait butanolique présente une activité moins importante par rapport aux antioxydants de référence et à l'extrait acétate d'éthyle, ceci est peut être due à sa pauvreté en phénols totaux d'une part et d'autre part, la structure chimique de saponines présents.

La corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire, est mise en évidence dans un grand nombre des travaux, comme les ceux de : (Cristina- Mihalache et al, 2014) sur l'extrait de Prune, (Popovici et al, 2009) concernant les extraits des pépins de raisin, et de (Drogoudi et al, 2008 in Cristina- Mihalache et al, 2014) sur les extraits de l' Abricot (*Prunus armeniaca L*).

L'activité antioxydante de l'extrait acétate éthyle est peut être liée aussi à la structure des composés phénoliques. Plusieurs études ont été réalisées sur la relation entre la structure chimique des composés phénoliques et leur pouvoir piègeur des radicaux libres ont montre que l'activité anti-radicalaire est dépendante du nombre, de la position et de la nature des substituants sur les cycles B et C (groupements hydroxyles, glycosyles) et le degré de polymérisation (Amarowicz et al, 2000).

La comparaison des résultats de notre étude avec d'autres travaux sur la même espèce en utilisant le même test (DPPH) est portée dans le tableau 16.

Tableau 16: Comparaison de EC₅₀ de différent extraits végétaux de *O basilicum* avec quelques travaux.

Les extraits	EC50mg/ml	Référence	Région
Extrait d'acétone	0,58	Lee et al,2011	Japan
Extrait éthanolique	0 ,022	Fathiazad et al, 2012	Iran
Extrait acétate d'éthyle	0,012	Kaurinovic et al, 2011	Serbia

En comparant la EC₅₀ de l'extrait d'acétate d'éthyle avec celle de ces travaux , nos résultats sont proches à ceux déterminés par ces études , et nous pouvons déduire que l'extrait d'acétate d'éthyle de la plante de notre région est un très bon antioxydant.

L'activité antioxydante des HEs s'est montrée assez faible pour la réduction des radicaux libres du DPPH. L'absence d'une activité antioxydante dans l'huiles essentielles, est effectivement liée à sa composition chimique.

Après (Stefanovits-Bányai *et al.*, 2003 *in* Mohammdi, 2006) la capacité antioxydante des huiles est étroitement liée à tout le contenu phénol.

La comparaison de notre étude avec celle de Khelifa *et al.*, (2011) utilisant le même test (DPPH), pour l'activité antioxydante des huiles essentielles de *O. basilicum* de la région de Khemis Miliana (Nord alger), montre que les valeurs de la EC₅₀ varient selon la composition chimique des plantes. Elle est de **83,54 mg/ml**. Les même auteurs ont montré que la présence de linalol en tant que composé majoritaire (32,83 %) avec la diminution de eugénol, dans leur composition chimique est la cause de cette diminution.

Dabiré *et al.*, (2011), ont étudié l'influence de séchage de *O. basilicum* sur l'activité antioxydante des huiles essentielles. Ils ont montré que la diminution du taux de l'eugénol dans l'huile essentielle (en présence de linalol) à cause de la longue durée de séchage de la plante provoquant une diminution de plus de 87% de ses propriétés antioxydantes.

On peut conclure que la faible activité antioxydante des huiles essentielles de basilic est peut être causée par la longue durée de séchage (plus de dix jours) qui a affecté la composition des huiles. La plante risque, ainsi, de perdre quelques constituants importants.

III. Résultats de l'activité antimicrobienne

III.1. résultats de purification des souches microbiennes

Le tableau 17 renferme les résultats de l'aspect macroscopiques après la culture de ces souches dans différents milieux de culture et de l'aspect microscopique après la coloration de Gram pour les bactérie et la coloration simple par le bleu de méthylène pour la levure .

Tableau 17: Les aspects macroscopiques et microscopiques des souches bactériennes

Les souches	Les milieux de culture et l'observation macroscopique	Coloration de Gram et simple
<i>E. coli</i>	Hecktoen : Colonie jaune saumon ENDO :rouge avec éclat métallique Dsoxycholate : Colonie rose rouge	Bacille à Gram -
<i>K. pneumoniae</i>	Hecktoen : Colonie orange saumon Dsoxycholate :incolore	Bacille à Gram -
<i>S. typhi</i>	Hecktoen : Colonies naine transparent avec centre de noir SS : Colonies naine transparent avec centre de noire	Bacille à Gram -
<i>S. enteritidis</i>	Hecktoen : Colonies naine verte avec centre noir SS : Colonies naine transparent avec centre noir	Bacille à Gram -
<i>P. aeruginosa</i>	Gelose nutritif : vert fluorescent et odeur de jasmin King A : jaune-vert fluorescent	Bacille à Gram -
<i>E. faecalis</i>	Gélose nutritif : petites colonies transparentes	Cocci à Gram+ en petites chaînettes
<i>S. aureus</i>	Chapman : Petite Colonie dorée	Cocci à Gram – en grappes
<i>B. cereus</i>	Gelose nutritif : Grandes colonies de contour irrégulier	Bacille à Gram+
<i>C. albicans</i>	Sabouraud : Grandes colonies blanc opaque OGA :bonne croissance colonie transparente	de petites cellules, rondes ou ovalaires, bourgeonnantes

Le Tableau 18 présente les résultats des tests d'identification biochimique par les galeries classiques de six souches bactériennes.

Tableau 18 : Caractères biochimiques des souches bactériennes

Les Souches bactérienne	T.S.I	Mannitol	Mobilite	ONPG	Citrate de Simmons	Uréé	Indole	TDA	LDC	ODC	ADH	Oxydase	Catalase
<i>E. coli</i>	Glu+Lac+Sac +Gaz+H ₂ S-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	
<i>K. pneumoniae</i>	Glu+Lac+Sac +Gaz+H ₂ S-	+	-	+	+	+	-	/	+	-	-	-	+
<i>P. aeruginosa</i>	Glu+Lac+Sac +Gaz+H ₂ S-	+	+	-	+	-	-	/	-	-	+	+	+
<i>E. faecalis</i> *	Glu+Lac+Sac +Gaz-H ₂ S-	+	-	-	-	-	-	/	-	-	+	-	-
<i>S. aureus</i>	Glu+Lac+Sac +Gaz-H ₂ S-	-	-	-	-	-	-	/	+	+	+	-	+
<i>B. cereus</i>	Glu+Lac+Sac +Gaz-H ₂ S-	+	+	-	-	-	+	/	+	+	+	/	-

+ : réaction positif
 - : réaction négatif
 Glu : glucose
 Lac : lactose
 Sac : saccharose
 *Plus le teste de l'esculine : Esculine +

les résultats de API20E sont représenté dans le tableau 19, les figures (A 3 ,B1 et B2, Annexe A et B) représentent les photos de résultats de galerie API20E , et galerie classique de *Echerichia coli*.

Tableau 19 :résultats des galeries API20E

	ONP	ADH	LDC	ODC	ICITI	H ₂ S	URE	TDA	IND	IVPI	I GEL!	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO ₂	N ₂ *
<i>Echerichia coli</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	/	/
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	/	/

les résultats de API *C. albicans* sont présentés dans le tableau 20 , figure (A2, Annexe A)

Tableau 20 : Resultat de API *Candida albicans*

TEST	GLU	GAL	SAC	TRE	RAF	βMAL	αAMY	βNAG +	βGAL	UREE
résultat	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<p>TRE:D-Trehalose RAF:D-Raffinose βMAL:4-nitrophenyl-βD-maltopyranoside αAMY:2-chloro-4_nitrophenyl-αD-maltotrioside βNAG:5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-acetyl- βD-glucosaminide βGAL: 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-acetyl- βD-galactopyranoside</p>										

D'après ces résultats d'identification, nous nous sommes assurés de la bon ré-identification de nos de souches

III.2. Le choix de solvant

Le test préliminaire avec les solvants suivant : Tween 80, solution d'agar 0.2% et le DMSO à été réalisé dans le but de choisir le solvant approprié qui ne présente aucun effet sur la croissance microbiennes.

les résultats sont regroupés dans le tableau 21.

Tableau 21:La réaction entre les solvants et les souches

Les souches	DMSO 10%	Tween80 (0,05%)	Agar 0.2%
<i>B. cereus</i>	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-

(-) Pas d'action sur les souches

Nous avons constaté que les trois diluents , le DMSO (10%), le Tween 80 (0,05%) et l'Agar 0.2%, n'exercent aucune effet sur la croissance des souches testées. Mais le Diméthyle Sulfoxide (DMSO) a été choisi comme diluant des huiles essentielles et des extraits pour les différents tests d'activité antibactérienne.

Le DMSO n'exerce aucun effet sur la croissance des bactéries au milieu gélose (figure 22 et 24) d'une part , et il permet une très bonne dispersion des HEs dans le bouillon nutritif et de l'homogénéité du mélange lors de testes de l'activité sur le milieu liquide d'autre part. Par contre, l'utilisation de Tween 80 dans le milieu aqueux présente l'inconvénient d'entraver les observation visuelles dues à la turbidité qu'il provoque et, il pourrait interférer dans l'activité antimicrobienne des HEs et des extraits (Cressy et al, 2003 in Hellal 2011).

En se basant sur les résultats de El-Houiti (2010), la solution d'agar 0,2% a été choisie pour diluer les huiles essentielles et les extraits afin de déterminer leurs activités antifongiques.

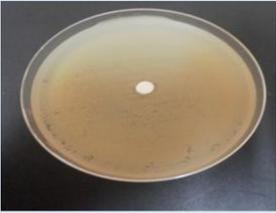
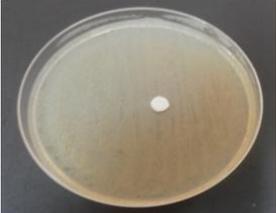
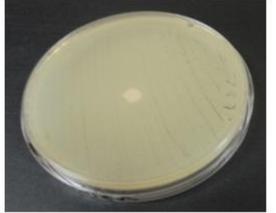
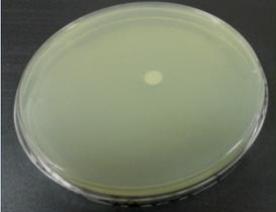
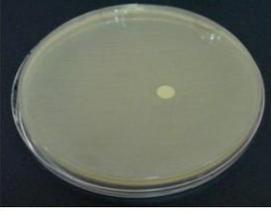
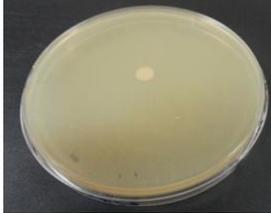
<i>Bacillus cereus</i>		
		
DMSO 10%	Tween 80 (0,05%)	Agar 0.2%
<i>Staphylococcus aureus</i>		
		
DMSO 10%	Tween 80(0,05%)	Agar 0.2%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
		
DMSO 10%	Tween 80(0,05%)	Agar 0.2%
<i>Echerichia coli</i>		
		
DMSO 10%	Tween 80(0,05%)	Agar 0.2%

Figure 22 : L'effet des solvants sur la croissance des bactéries à Gram Positif et Gram négatif

III.3. Pouvoir antimicrobien de l'antibiotique

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un microorganisme vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques (contrôle positif). Cette sensibilité est exprimée par l'apparition des zones d'inhibition autour de ces disques (Figure 23). Les résultats sont présentés dans le tableau N° 22 .

Tableau 22 :L'antibiogramme des souches

	ENR	C	AMC	AMC	VA	P	OX	SP	E	NA	B	AM
	Les doses en µg											
	5	30	20	10	30	10	1	100	15	30	10	10
<i>S. typhi</i>	S	S	S	S			R				R	
<i>S. enteritidis</i>	S	S	S	S	R	R	R					
<i>K. pneumoniae</i>	S		R		I	S	R					R
<i>P. aeruginosa</i>	S	R	R	R	R	R						I
<i>E. coli</i>	S	I	I		R	R					S	
<i>E. faecalis</i>					I	S	R		S		R	
<i>B. cereus</i>					S			S		S	R	S
<i>S. aureus</i>		S			R	S	I	R	S			
<i>MRSA</i>					R	I	R	S		I	S	
<i>MSSA</i>	S	S	S	S			S			R		

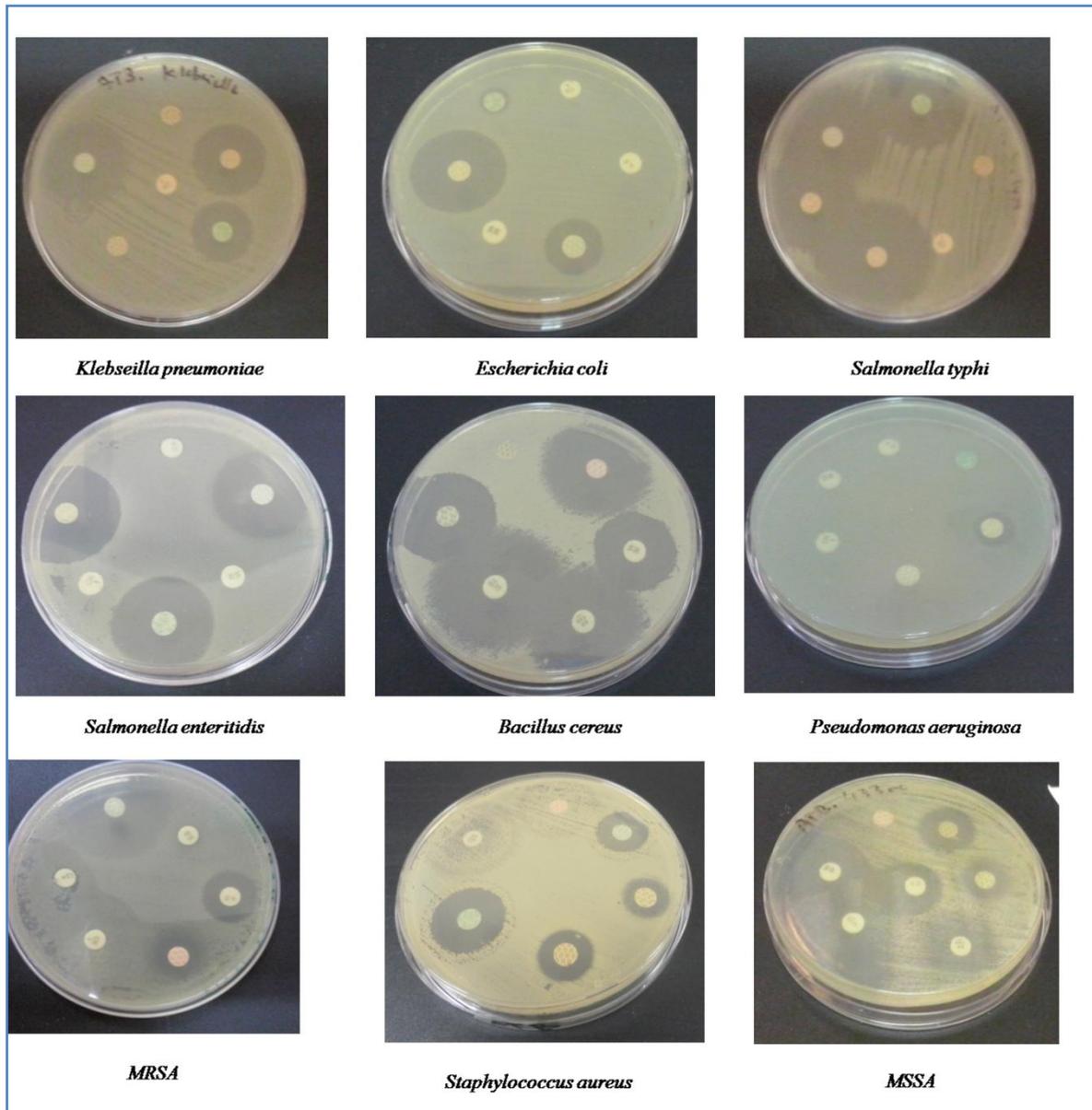


Figure 23 : Résultats des antibiogrammes

Les souches de bactéries à Gram + et à Gram - ont montré des sensibilités différentes aux antibiotiques standards testées, à l'exception de *MRSA* et *Pseudomonas aeruginosa* qui a révélé une résistance vis-à-vis de la plupart des antibiotiques.

- **Résultats de contrôle négatif**

Le DMSO n'exerce aucun effet sur la croissance des toutes les bactéries au milieu gélosé. La figure ci-dessous représente les résultats des contrôles négatifs

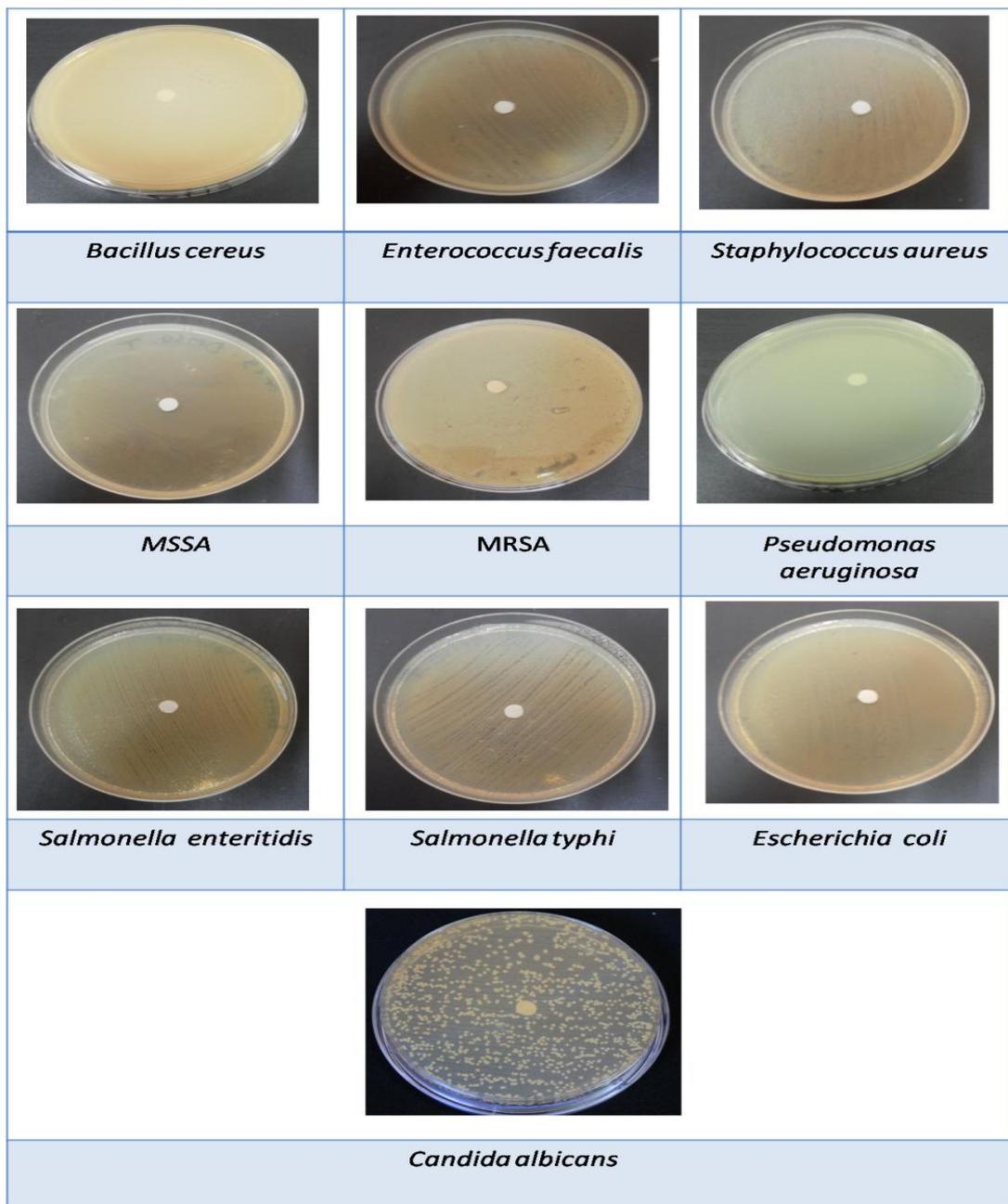


Figure 24 : Les résultats des contrôles négatifs

III.4. Résultats de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur gélose

Nous avons utilisé la méthode de Vincent afin d'effectuer un aromatogramme pour déterminer la sensibilité des microorganismes, vis-à-vis des échantillons d'HE et des extraits, les diamètres des zones d'inhibition des souches inoculées avec les dilutions d'HE et des extraits sont notés et exprimés en millimètres. Les résultats de la méthode de diffusion sont regroupés dans les tableaux 23, 24 et 25.

III.4.1. Résultat du test du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

Les résultats obtenus dans le test de l'activité antibactérienne par la méthode des disques sont présentés dans le tableau N°23.

Tableau 23 : Les diamètres des zones d'inhibition de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles .

Les concentrations des huiles essentielles	10% (1/10) 0,92 mg/ml par disque	25% (1/4) 2,3mg/ml par disque	50 % (1/2) 4,6 mg/ml par disque
Les souches	Les diamètres des zones d'inhibition (mm)		
<i>S. typhi</i>	8,66± 1,15	12,66± 0,57	27 ,66±2,51
<i>S. enteritidis</i>	6,66±1,15	9,33±3,059	14,16±0,28
<i>K. pneumoniae</i>	8±3,46	9,33±1,15	12,33±0,57
<i>P. aeruginosa</i>	6±0	6±0	6±0
<i>E. coli</i>	8,66±0,57	12,66±0,57	18,33±0,57
<i>E. faecalis</i>	6,33±0,57	6,66±0,57	8.33±0.28
<i>B. cereus</i>	7±1,73	10,33±1,15	17,16±2,02
<i>S. aureus</i>	6±0	6,33±0,57	12± 0
<i>MSSA</i>	8,66±0,57	8± 2	13± 2
<i>MRSA</i>	6±0	7 ± 0	8,66±0,57
<i>C. albicans</i>	6±0	10,33±0,57	14,33±0,57
Sachant que l'activité antimicrobienne a été estimée comme suit:			
<ul style="list-style-type: none"> • Forte, pour des diamètres de zone d'inhibition supérieures à 13mm (souche sensible) • Moyenne, pour des valeurs comprises entre 6 mm et 13mm (souche intermédiaire) • Faible ou nulle, lorsque les diamètres n'excèdent pas 6 mm (souche résistante) (Billerbeck, 2007) 			

L'activité des huiles varie en fonction de sa concentration et le type des bactéries, ce qui nous donne une variation des diamètres d'inhibition des HEs allant de 6 à 27, 66 mm.

Pour les dilutions 1/10 et 1/4, les souches microbiennes ont été presque moyennement sensibles vis-à-vis les HEs, les diamètres d'inhibition sont compris entre 6 et 12,66mm aux concentrations varient entre 0,92 mg/ml et 2,3mg/ml par disque., le diamètre le plus important

a été observé pour *S. typhi* et *E. coli* (12,66mm) puis *B. cereus* et leur diamètres sont d'environ 10,33mm à concentration égale à 2,3mg/ml par disque.

En effet, les HEs présentent des diamètres de zones d'inhibition différents allant de 6mm pour *P. aeruginosa* à 27,66 mm pour le *S. typhi* enregistré dans la dilution 1/2 (4,6 mg/ml par disque).

Chez les bactérie Gram -, l'activité la plus élevée a été remarqué contre la souche *S. typhi* dont la valeur moyenne de l'auréole d'inhibition a été de 27,66mm. Ajoutant une zone de 18,33mm en moyenne contre *E. coli*, les deux bactéries Gram-(*S. enteritidis* et *K. pneumoniae*) ont révélé une sensibilité très importante avec des diamètres de 14,16mm et 12,33mm respectivement.

Les huiles essentielles a montré son optimum d'activité pour les Gram+ envers la souche *B. cereus* (environ 17,16 mm) suivi par *MSSA* (13mm) et *S. aureus* (12mm), tandis que les souches, *E. faecalis* et *MRSA* ont été les moins sensibles avec des zones d'inhibitions ne dépassant pas les 9 mm.

Pour *P. aeruginosa*, aucune sensibilité n'a été révélée, vis-à-vis des trois dilutions d'HEs, cette souche possède un potentiel de résistance très élevé contre l'action antimicrobienne. Ce comportement n'est pas surprenant, car elle possède une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides (Billerbeck, 2007).

Nos résultats coïncident avec ceux de Shafique *et al* (2011), qui ont étudié l'activité de l'huile essentielle de *O. basilicum* contre six souches bactériennes : *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli* et *E. faecalis*. Cette étude a révélé que les huiles essentielles sont actives contre ces bactéries à Gram + et à Gram - testées, ils ont révélé une activité contre les Gram + et une activité moindre contre les Gram-.

Généralement, l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *O. basilicum* a été plus prononcée contre Gram positif que contre les bactéries Gram-. Ce résultat est en accord avec de nombreuses études menées sur la même espèce et aussi sur d'autres espèces de plantes (Hussain *et al*, 2008 ; Shafique *et al*, 2011).

Cette résistance généralement plus élevée chez les bactéries à Gram négatif, pourrait être attribuée à la présence de la membrane externe, autour de leur paroi cellulaire (Burt, 2004) ce qui limite la diffusion des composés hydrophobes des huiles à travers la couche lipopolysaccharide, l'absence de cette barrière chez les bactéries Gram positif permet un contact

direct de constituants hydrophobes des huiles essentielles avec la double couche de phospholipides de la membrane, ce qui provoque soit une augmentation de la perméabilité des ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux ou d'altération des systèmes enzymatiques bactériens (Wendakoon *et al.*, 1995 in Saïdana *et al.* 2008).

Elgayyar *et al.* (2001), est en désaccord avec ce rapport, car pour cet auteur, il est très difficile de faire de telles généralisations du fait que chaque essence est unique dans sa composition et chaque bactérie à Gram positif diffère considérablement l'une de l'autre en structure et en fonctionnalité.

L'histogramme ci-dessous représente la comparaison entre l'activité de notre huile essentielle vis-à-vis des Gram- et Gram+.

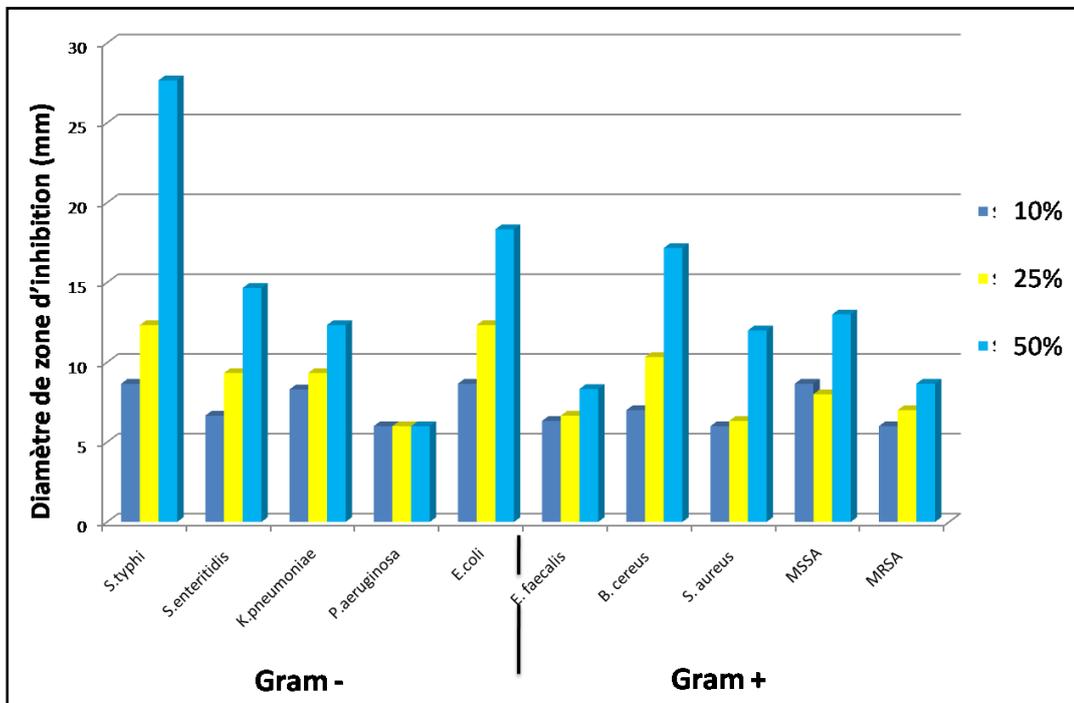


Figure 25: Histogramme représente l'action des HEs sur les bactéries Gram et Gram+

Les huiles essentielles testées sur les différentes bactéries à Gram positifs et négatifs ont montré une action légèrement variable. les HEs de basilic, semblaient être préférentiellement plus actives sur les Gram- (Figure 25), ceci peut être traduit par la présence de composés ressemblant à Carvacole ou thymol car les deux composants sont capables de désintégrer la membrane externe des bactéries Gram- , en libérant les lipopolysaccharides (LPS), ce qui permet l'augmentation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique (Burt, 2004).

De plus, nos résultats concordent avec ceux de Carovic-Stanko *et al.*, (2010) ayant rapporté dans leurs travaux sur les huiles essentielles de *O. basilicum* et montrent que l'activité observée contre *E. coli* est la plus importante avec une concentration de 400ppm.

Selon Adeola *et al.*, (2012), dans une étude sur *O. basilicum L* de Nigeria ; ont montré que le diamètre d'inhibition le plus grand est de (19,5 mm) pour *P. aeruginosa* et le plus petit est pour *S. aureus* (10,5 mm), ceci pourrait être due à une composition chimique particulière.

Suppakul *et al.*, (2008) ont montré par la méthode de diffusion sur gélose l'efficacité de film à base de linalol (constituant principal de basilic) ou méthyle-chavicol contre *E. coli* beaucoup plus que *S. aureus*.

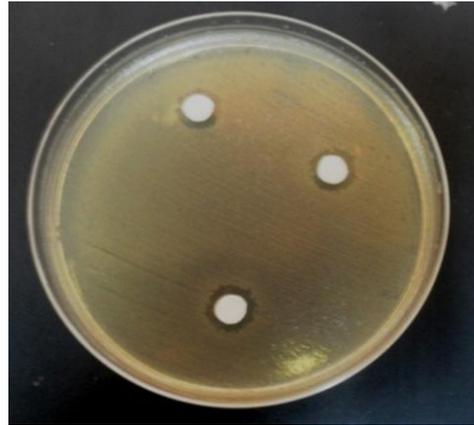
Les huiles ont aussi montré une action contre *Candida albicans* avec des zones d'inhibition d'environ 6 et 14,33 mm pour les trois dilutions.

Conner et Beuchat (1984) *in* Bousbia, 2011) , ont suggéré que le mode d'action de composés de l'huile contre les levures pourrait être dû à l'affaiblissement des processus enzymatiques impliqués dans la production énergétique et dans la synthèse des composantes structurales de levure.

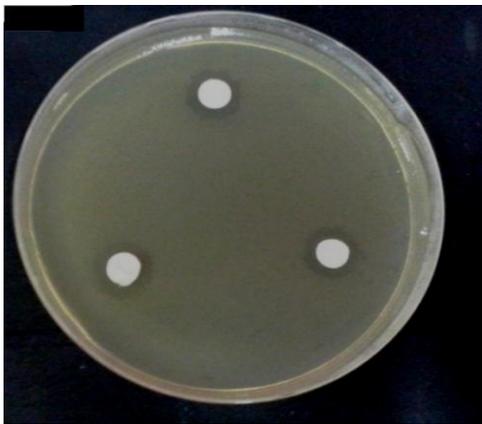
Les figures 26,27 représentent l'activité antibactérienne des huiles essentielles.



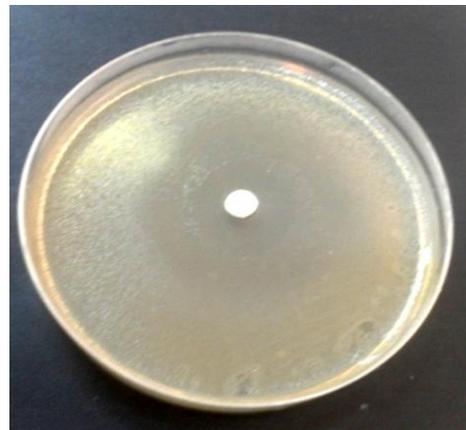
Escherichia coli



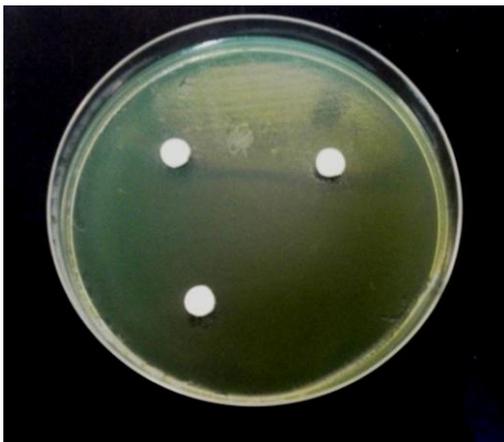
Klebsiella pneumoniae



Salmonella enteritidis



Salmonella typhi

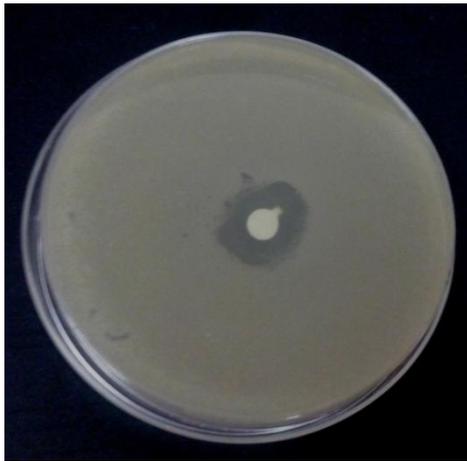


Pseudomonas aeruginosa

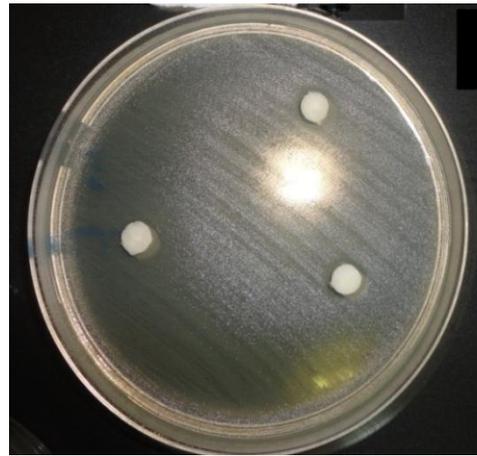


Candida albicans

Figure 26: l'activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis des souches à Gram négatif et *Candida albicans*



Bacillus cereus



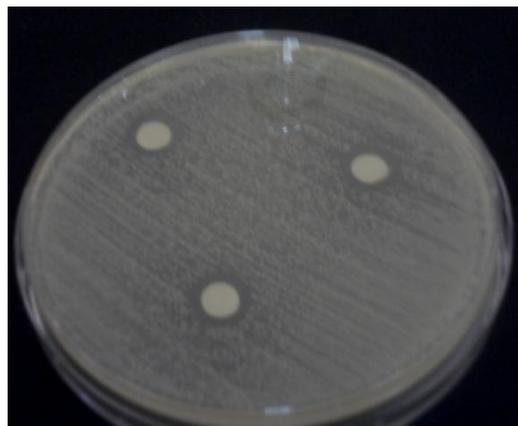
Enterococcus faecalis



MRSA



MSSA



Staphylococcus aureus

Figure 27 : activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis des souches à Gram positif

III.4.2. Résultat du test du pouvoir antimicrobien des extraits (Acétate d'éthyle et Butanol)

Les résultats de l'activité antimicrobienne d'extraits d'acétate d'éthyle par la méthode des disques sont enregistré dans le tableau 24.

Tableau 24 :Les diamètres des zones d'inhibition de l'extrait acétate d'éthyle

Les souches	Les concentration mg/ml par disque					
	3	2	1	0,5	0,25	0,125
	Diamètres des zones d'inhibition (mm)					
<i>S. typhi</i>	9,1±1,60	9±0	9,4±0,5	6±0	6±0	6±0
<i>S. enteritidis</i>	9,5±0,86	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0
<i>K. pneumonia</i>	9,33±2,51	9±0	8,5±0	6±0	8±0	6±0
<i>P. aerogenosa</i>	8,5±0,86	6,33±0,57	6±0	6±0	6±0	6±0
<i>E. coli</i>	8,16±1,04	8,66±0,28	8,5±0,5	6±0	6±0	6±0
<i>E. faecalis</i>	9,60±3,21	7,5±	7±1,73	7,66±2,88	6±0	6±0
<i>B. cereus</i>	11±0	8,5±0	8,5±0,86	6,83±1,44	6±0	6±0
<i>S. aureus</i>	9,66±0,57	9,8±0,28	8,5±0,5	7±1	7,66±0,28	6±0
<i>MSSA</i>	13±1,15	12,66±0,28	9,33±0,57	8,83±0,28	8,16±2,02	6±0
<i>MRSA</i>	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0
<i>C albicans</i>	6,33±1,15	6,66±0,28	6±0	6±0	6±0	6±0

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de basilic par la méthode des disques, nous révèlent une variation des diamètres des zones d'inhibition allant de **6** à **13 mm** selon les souches microbiennes testées et les concentrations de l'extrait.

Selon les résultats enregistrés, l'extrait d'acétate d'éthyle est doté d'un pouvoir antimicrobien important et a montré son optimum d'activité envers la souche de MSSA (13mm, 12,66mm) à concentration de 3 mg/ml et 2 mg/ml, suivi par le, *B. cereus* (11 mm) à concentration 3mg/ml par disque, tandis que les restes des souches ont été les moins sensibles avec des zones d'inhibition ne dépassant pas les 10 mm.

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait butanolique sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 25 : Les diamètres des zones d'inhibition des extraits butanoliques

Les souche	Les concentration mg/ml par disque			
	3	2	1	0,5
	Diamètres des zones d' inhibition (mm)			
<i>S.typhi</i>	8,33±0,57	7,83±2,02	7.5±1.5	6±0
<i>S. enteritidis</i>	9±1,52	6,5±0,86	6±0	6±0
<i>K.a pneumonia</i>	6±0	6±0	6±0	6.66±0.57
<i>P. aeruginosa</i>	11±1	10±1	8.83±0.28	6±0
<i>E.oli</i>	8,16±1,04	8,5±0,5	8.83±1.04	6±0
<i>E. faecalis</i>	8,83±0,28	8,5±0,5	7.66±1.44	6±0
<i>B. cereus</i>	6±0	6±0	6±0	6±0
<i>S.aureus</i>	9,66±0,57	9,5±2,17	8.5±1.32	6±0
<i>MSSA</i>	6,83±1,44	6,83±1,44	6±06.	6.6±0.57
<i>MRSA</i>	6±0	6±0	6±0	6±0
<i>C. albicans</i>	6±0	6±0	6±0	6±0

D'après les résultats du tableau 25, selon les souches microbiennes testées et les concentrations de l'extrait, nous remarquons une variation des diamètres des zones d'inhibition allant de **6** à **11mm**. L'activité antibactérienne de l'extrait butanolique de *O. basilicum* généralement faible ou nulle vis-à-vis de la plupart des souches à l'exception de de *S. aureus*, *S. enteritidis* et *P. aeruginosa*.

la sensibilité la plus importante détectée chez le *P. aeruginosa* dont la zone d'inhibition moyenne est égale à 11 mm, *S. aureus* et *S. enteritidis* ont révélé une sensibilité modérée de 9,66mm et 9mm de diamètre respectivement ,

Nous avons présenté nos résultats dans l'histogramme ci-dessous (figure 28) afin de comparer l'activité antimicrobienne de deux extraits.

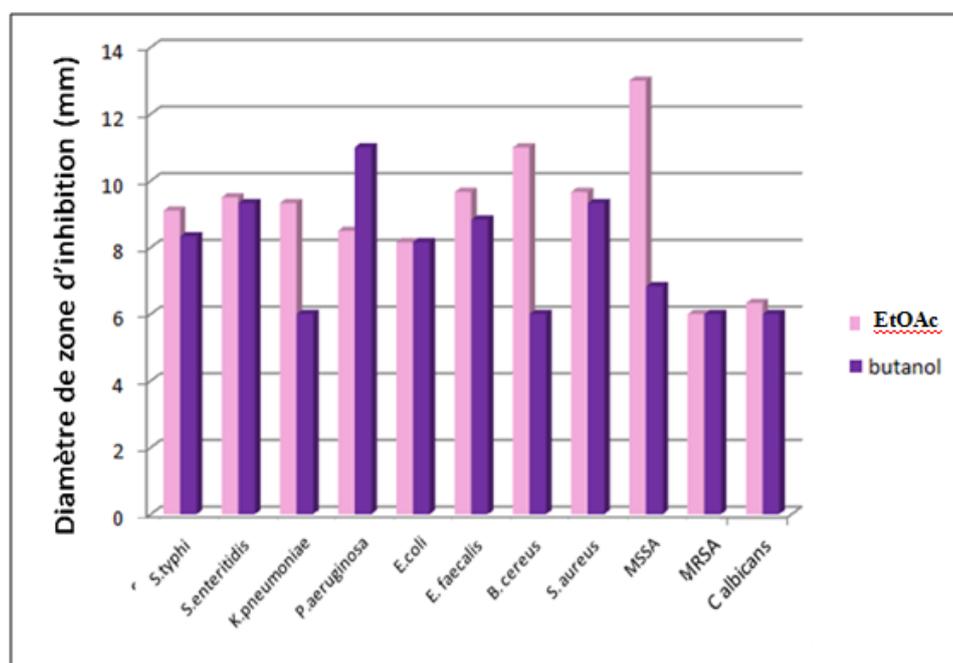


Figure 28: Comparaison entre l'activité antimicrobienne de l'extrait Ac.ET et de Bu.OH

Pour l'ensemble des extraits, nous remarquons que l'extrait d'acétate d'éthyle montre une activité plus ou moins élevée par rapport au extrait butanolique, où nous avons noté l'absence de toute inhibition avec *MRSA* et la levure *C. albicans*.

Ces résultats, montrent que les activités antimicrobiennes obtenues sont en relation avec la concentration du principe actif (extrait phénolique ou autre) et de la nature du solvant avec lequel sont extraits les composés. Ceci, pourrait expliquer l'activité de nos extraits par le fait que l'acétate d'éthyle est capable d'extraire des composés actifs capables d'inhiber la croissance microbiennes.

L'activité antibactérienne révélée par nos extraits phénoliques pourrait être attribuée à la présence de certains constituants, notamment les tanins, les flavonoïdes et d'autres substances phénoliques (Cown et al,1999).

Comparativement aux travaux de (Adiguzel et al, 2005) ayant concerné l'étude de l'activité antimicrobienne de différents extraits de *O. basilicum* de Turquie (Ethanol, Méthanol et l'hexane) à l'encontre de 55 souches bactériennes y compris *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. typhimerium* et *C. albicans*, avec une concentration à 300µg/ml par disque, l'extrait hexanolique a montré un spectre d'activité antibactérienne forte et plus large.

Patil et al (2011), ont étudié l'effet antimicrobien des trois extraits (Ethanol ,Méthanol et de l'Hexane) de *O. basilicum*, collectée de l'Inde . Ces auteurs, ont détecté que les extraits de cette espèce présentent une activité antibactérienne prononcée contre les souches *E. coli*, *B. subtilis* et *S. aureus*, *C. albicans*, et nous pouvons constater après la comparaison que nos extraits ont présenté des activités antimicrobiennes plus ou moins importantes.

Ainsi, selon Geissman et al (1963) in Ullah et Khan (2008), les effets antimicrobiens des composés phénoliques peuvent être mis en jeu par la présence des composés plus hydroxylés et sont plus actifs et plus toxiques vis-à-vis les microorganismes .

En plus, Mori et al., (1987) ont trouvé que les flavonoïdes trihydroxylés 3',4',5' sur le cycle B et substitués 3-OH sont nécessaires pour l'activité antimicrobienne, et selon Cown et al (1999), les effets antimicrobiens des composés phénoliques peuvent être mis en jeu par plusieurs mécanismes comme l'inhibition des enzymes microbiennes par des composés oxydés , ou bien par leurs actions non spécifiques sur la protéine microbienne.

La seule fraction qui a révélé active contre le *P. aeruginosa* c'est l'extrait butanolique. Pour cela, nous pouvons conclure que l'activité antimicrobienne des extraits dépend non seulement des composés phénoliques mais, aussi de la présence d'autres métabolites secondaires comme les saponines (Kwon et al., 2003), notre extrait butanolique est riche en saponines (18,28mg/ml)., de plus l'activité antimicrobienne de saponines varie selon leur structure chimique (Konishi et al, 1998 in Sparg, 2004). Ces auteurs ont montré que la saponine tetraglycoside a une activité antimicrobienne plus importante que la saponine triglycoside, dans leur étude sur l'activité de saponines de *Hedyotis nudicaulis* (Rubiaceae) contre *Bacillus subtilis* .

Hammoudi et al, (2012) ont montré que la sensibilité de *P. aeruginosa* vis-à-vis l'extrait butanolique présente un effet plus marqué par rapport aux autres extraits testées (acétate d'éthyle, hexane et chloroforme) de la plante *Teucrium polium geyrii* (Lamiaceae).

Les figures (29 et 30) illustrent l'activité antimicrobienne de deux extraits.

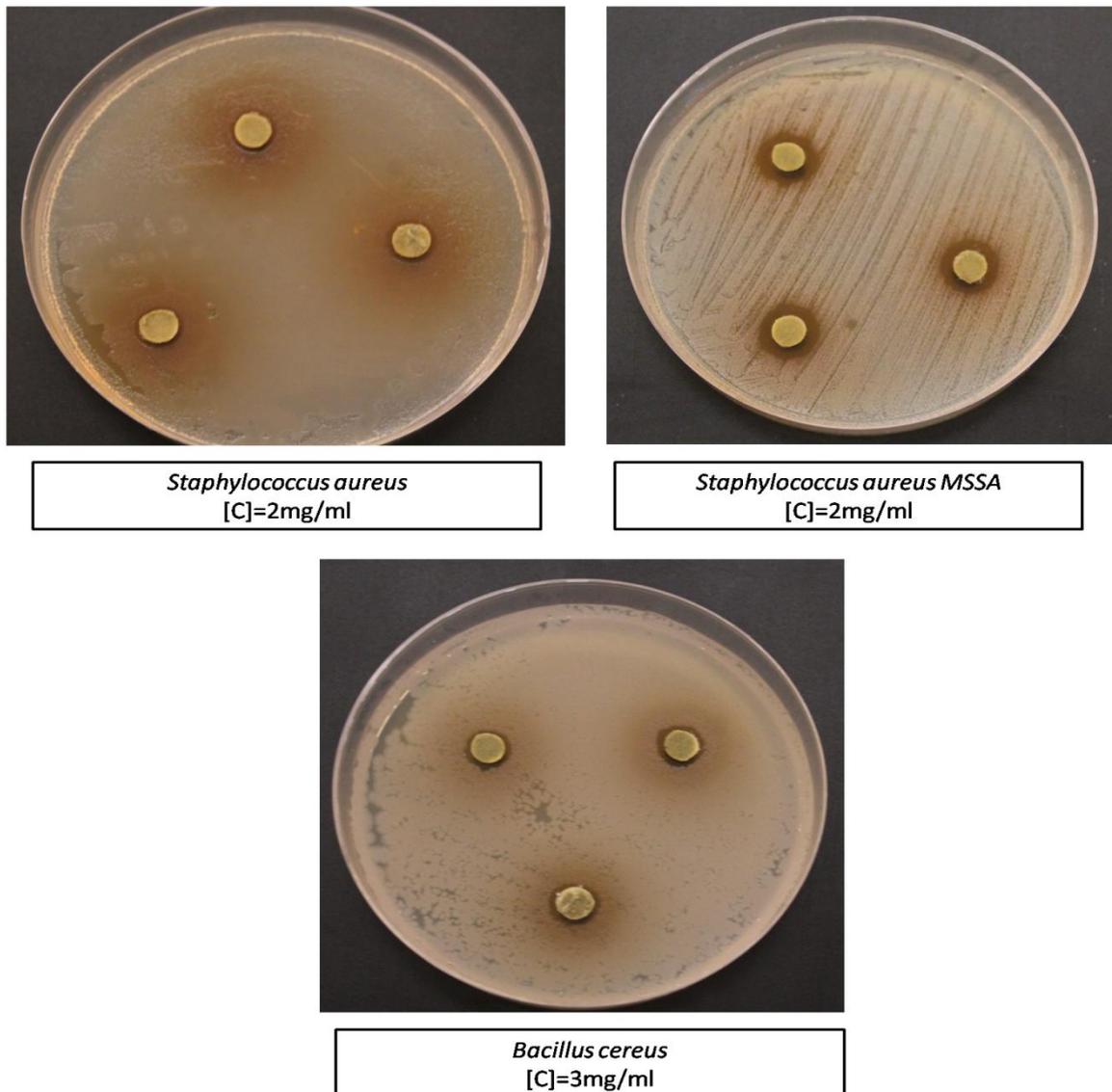


Figure 29 :l'activite antibacterienne de l'extrait d' acétate d'éthyle

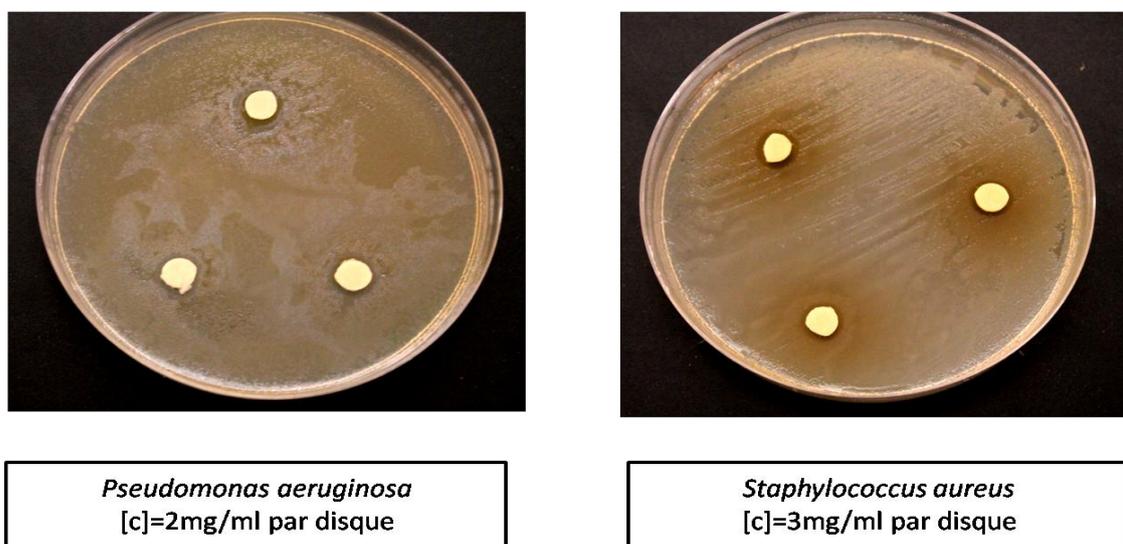


Figure 30 :l'activite antibacterienne de l'extrait butanolique

III.5. Les résultats de la détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide

La détermination des CMI et CMB ont été réalisées seulement pour les souches pour lesquelles nous avons noté des diamètres d'inhibition importants.

Nous rapportons dans le Tableau 26 les CMI et le CMB obtenues par la méthode de contact direct pour les HEs et les deux extraits(Acétate d'éthyle et butanol).

Tableau 26 : les CMI (mg/ml) et le CMB(mg/ml) obtenues par la méthode de contact direct

	leL'huile essentiel			Extrait EtOAc			Extrait Bu.OH		
	CMI	CMB	CMB /CMI	CMI	CMB	CMB /CMI	CMI	CMB	CMB /CMI
<i>S. typhi</i>	1	2	2	/	/	/	/	/	/
<i>S. enteritidis</i>	2	2	1	> 6	> 6		/	/	/
<i>K. pneumonia</i>	2	2	1	/	/	/	/	/	/
<i>P. aeruginosa</i>	/	/	/	/	/	/	6	6	1
<i>E. coli</i>	2	2	1	/	/	/	/	/	/
<i>E. faecalis</i>	/	/	/	> 6	> 6	/	/	/	/
<i>B. cereus</i>	0,125	1	8	4	5	1,25	/	/	/
<i>S. aureus</i>	2	2	1	> 6	> 6	/	7	7	1
<i>MSSA</i>	1	3	3	4	4	1	/	/	/
<i>C. albicans</i>	1	1	1	/	/	/	/	/	/

/ teste non réalisé

III.5.1. CMI de l'huile essentielle

Afin d'évaluer l'activité de l'huile en terme bactéricides ou bactériostatique, le rapport CMB/CMI a été calculé selon (Oussou *et al*, 2008 *in* Razafint salama *et al*, 2013) : un extrait est considéré comme substance bactéricide si le rapport CMB/CMI est inférieur à 4 sinon, il est bactériostatique (CMB/CMI \geq 4).

Pour les huiles essentielles, les valeurs des CMI obtenues varient entre 0,125 mg/ml pour *Bacillus cereus* et 2 mg/ml pour la plupart des souches., les valeurs de CMB se rangent entre 1 mg/ml (pour *B. cereus* et *C. albicans*) et 3mg/ml (pour *MSSA*). Cette huile a révélée une action inhibitrice et bactéricide contre toutes les souches bactériennes testées à l'exception de *B. cereus* dont l'huile a révélée une action bacteriostatique.

Nous avons comparé nos résultats avec ceux de Ouibrahim et al, (2013), qui ont déterminé la CMI de l'huile essentielle de *O. basilicum* du Nord -Est d'Algérie sur plusieurs souches microbiennes, il ont enregistré les valeurs de CMI varient entre 4,95mg/ml pour *E. faecalis* et 9,5mg/ml pour le reste des souches (*MRSA*, *Salmonella sp*, *E. coli*....).

Hussain et al, (2008)., ont révélé les CMI des huiles essentielles *O. basilicum* d'Iran sur plusieurs souches microbiennes, notamment *E. coli* et *S. aureus*. Ils ont enregistré la valeur de CMI pour *S. aureus* de 1,5 mg/ml, et 2,1mg/ml pour *E.coli*, Nous avons également comparé nos résultats à ceux de Runyoro et al., (2010), qui ont déterminé les CMI des huiles essentielles de basilic sur plusieurs souches, notamment le *S. aureus* (12,5 mg/ml), *E. coli* (4,25 mg/ml) et *K. pneumoniae* (5,30mg/ml).

Par ailleurs, (Teixeira Duarte et al,2005 in Bekhechi et al, 2008) déclarent que toute huile essentielle qui présente des CMI inférieures à 2mg/ml est caractérisée par un pouvoir antimicrobien.

Sur la base de ces études, nous pouvons constater que l'HE de basilic de la région de Laghouat est la plus active vis-à-vis des microorganismes.

D'une façon générale, l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *O. basilicum* peut s'expliquer d'une part, par les composés majoritaires et les alcools terpéniques et autres hydrocarbures et phénols (Goetz et Ghedira, 2012) et d'autre part, par la synergie entre tous les constituants volatils et peuvent être l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible pour les composés majoritaires (Burt, 2004; Lahlou, 2004; Zhiri et Baudoux, 2005). De plus, la variabilité du pouvoir bactéricide est due certainement à la sensibilité des microorganismes aux différents composés chimiques qui dépendent de la nature de l'espèce végétale, des chémotypes et des conditions climatiques (Lawrence, 1993 in Rasooli ,2005)

Les figures 31 et 32, illustrent les gammes de concentrations utilisées pour les huiles essentielles

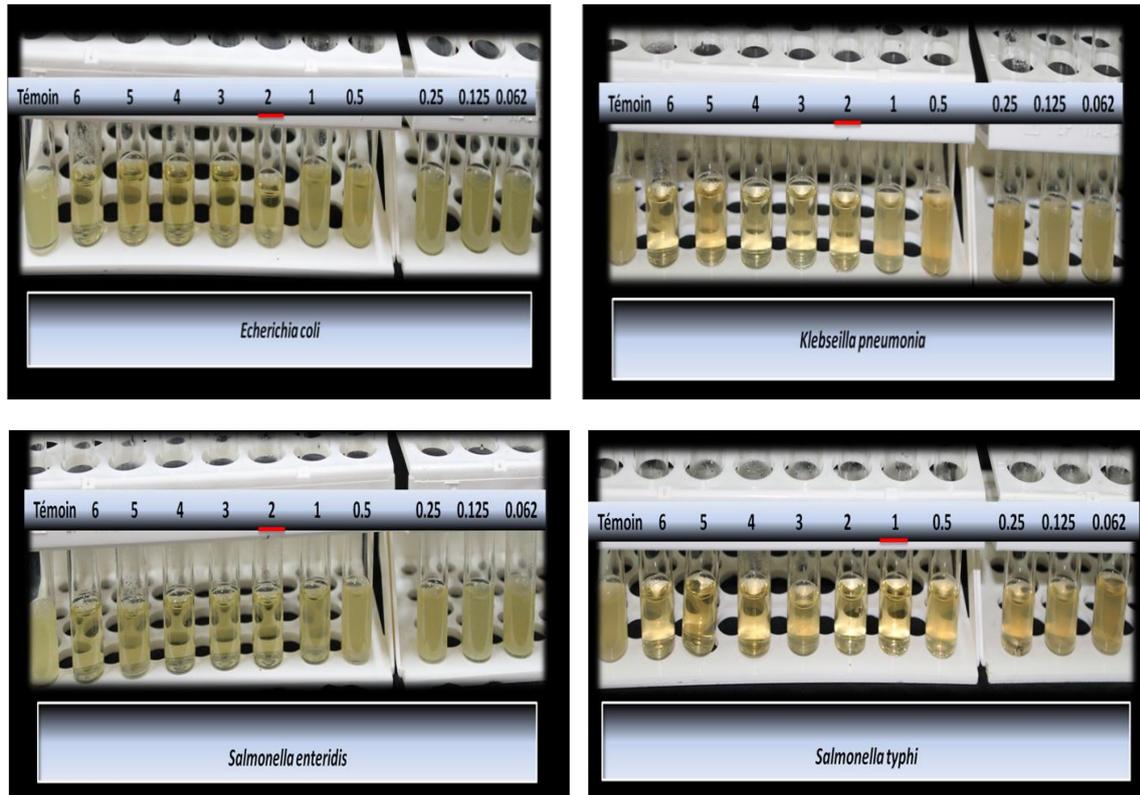


Figure 31 : Détermination de la CMI des huiles essentielles pour les Gram-

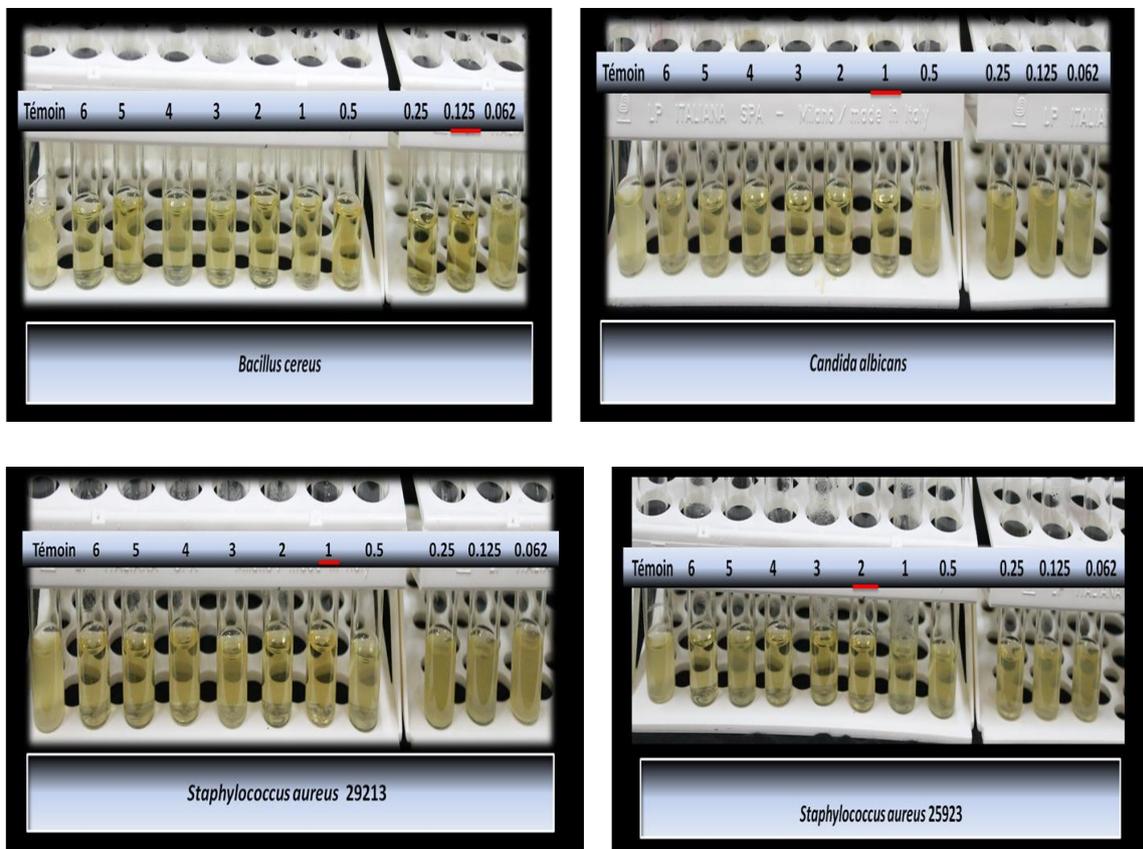


Figure 32 : Détermination de la CMI des huiles essentielles pour les Gram+ et *C albicans*

III.5.2. CMI des extraits (acétate d'éthyle et de butanol)

Après l'analyse des données expérimentales (tableau 26) et comparativement aux témoins de contrôle de croissance on remarque que :

Pour les extraits d'acétate d'éthyle les plus faibles valeurs CMI ont été obtenues avec les souches MSSA et *Bacillus cereus* (CMI= 4mg/ml) et les plus fortes valeurs ont été obtenues pour les autres bactéries (*E. faecalis*, *S. enteritidis*, *S. aureus*) (CMI > 6 mg/ml), le rapport CMB/CMI détecté pour le MSSA et le *B. cereus* sont respectivement 1 mg/ml et 1,25mg/ml, alors cet extrait a révélé une action bactéricide pour ces souches.

Pour l'extrait butanolique le CMI et CMB obtenues sont à l'ordre de 6mg/ml et 7mg/ml pour le *P. aeruginosa* et le *S. aureus* respectivement, le rapport d'activité CMB/CMI pour les deux souches étudiées égal à 1mg/ml, alors elle est dite action bactéricide.

Adiguzel et al, (2005), ont révélé les CMI des trois extraits de basilic pour différentes souches notamment, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* varient entre 125µg/ml et 500µg/ml.

La variabilité du pouvoir bactéricide des extraits de *O. basilicum*, est peut être due à la sensibilité des souches testées aux composés phénoliques tels que les proanthocyanidines et les flavonoïdes et dont leurs spectre d'action dépend étroitement de leurs diversité de structures chimiques (Hayet et al, 2008) et peut être aussi par la présence de saponines avec une structure particulière qui permet d'inhiber les souches comme notre cas, l'action bactéricide vis-à-vis de *P. aeruginosa* et *S. aureus* dans la fraction butanolique qui est riche par les saponines.

Au regard de ces résultats, on a observé une discordance dans les résultats obtenus dans l'étude de la zone d'inhibition et l'étude de l'inhibition de la croissance à différentes concentrations de l'extrait par la méthode de contact direct. L'activité inhibitrice des extraits organiques sur différentes souches est plus faible par la méthode de contact direct en comparaison avec la méthode de diffusion sur gélose dont l'activité apparait à l'ordre de 2mg/ml à 3mg/ml.

L'origine de cette discordance dans notre cas est peut être due à la difficulté de déterminer le meilleur agent émulsifiant pour avoir des proportions minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) reproductibles et comparables entre les différentes méthodes.

Selon Cushnie et Lamb, (2005), le mauvais choix de l'emulsifiant pour les extraits phénoliques est susceptible de réduire les contacts entre les souches bactériennes et les molécules comme les flavonoïdes, et peuvent diminuer la précision des résultats.

De plus, l'activité des antimicrobiens des phyto-molécules dépend d'autres facteurs tels que la méthode d'extraction, la phase de croissance des souches, les milieux de culture utilisés et de leurs composition et aussi le composé actif de phyto-molécules (Brandi et al, 2006 in Shaaban et al,2012).

Les figures 33 et 34 illustrent les gammes de concentrations utilisées pour les extraits

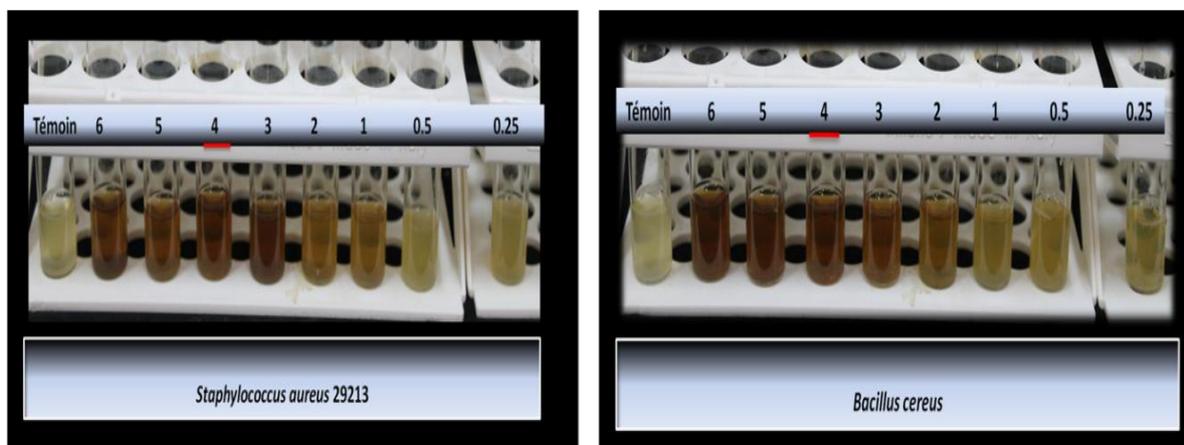


Figure 33: Détermination de la CMI pour les extraits d'acétate d'éthyle

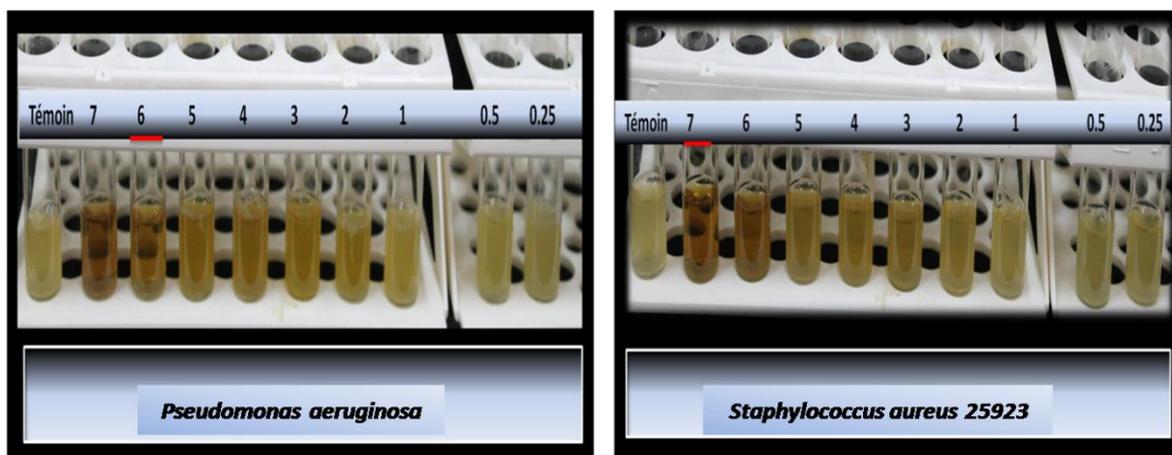


Figure 34 : Détermination de la CMI pour les extraits butanolique

IV .L'évaluation du pouvoir antifongique

Rappelons que la méthode employée est celle de contact direct, la lecture des résultats nous a permis de déterminer la CMI (la plus faible concentration en extrait pour laquelle on n'observe pas de croissance visible à l'oeil nu, sur le milieu PDA ; c'est une action fongistatique) après 6 jours d'incubation, les résultats sont regroupés dans les tableaux 27 et 29.

La CMF (définie comme étant la plus faible concentration des extraits détruisant de champignon ; c'est une action fongicide) a été déterminée par la réponse (absence de croissance) du repiquage à partir de culture de 7 j, n'ayant donné aucune croissance fongique.

L'activité antifongique a été estimée comme suit :

- *I%* comprise entre 75 et 100 % :très actif, la souche fongique est dite très sensible
- *I%* comprise entre 50 et 75 % :actif, la souche fongique est dite sensible
- *I%* comprise entre 25 et 50% :moyennement actif, la souche est dite limite.
- *I%* comprise entre 0 et 25% :peu ou pas actif, la souche est dite peu sensible ou résistante

IV .1.L'activité antifongique des huiles essentielles

Les résultats de la recherche des concentrations minimales fongicides et fongistatique des huiles essentielles contre les souches fongiques testées sont alignés dans le tableau N°27.

Tableau 27 : Effet des huiles essentielles de *basilic* sur le diamètre (mm) des colonies mycéliennes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis* et *Fusarium culmorum*

		<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedins</i>		<i>Fusarium culmorum</i>	
Les concentrations en		Témoin :73±1		Témoin :79±1,8	
%	µl/ml	Diamètre	I%	Diamètre	I%
1/20 (5%)	50	0	100	0	100
1/50 (2%)	20	0	100	0	100
1/100 (1%)	10	0	100	0	100
1/250 (0,4%)	4	0	100	0	100
1/500 (0.2%)	2	25±6	65,75	0	100
1/1000 (0.1%)	1	43±4	41,09	13 5±0	82,91
1/2000 (0.05%)	0,5	47,5±0,5	34,93	60.5±7.5	23,41
1/5000 (0.02%)	0,2	49,33±7,37	32,42	75,5±3,5	4,43
1/10000 (0.01%)	0,1	64,33±1,52	11,87	75±5	5,06

I% :taux d' inhibition des colonies mycélienne

D'après nos résultats (Tableau 27), nous constatons que *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *Fusarium culmorum* sont sensibles vis-à-vis des huiles essentielles de *Ocimum basilicum*.

Les HEs présente des taux d'inhibition variables vis-à-vis les deux souches filamenteuses soumises à l'expérimentation, à chaque fois qu'on augmente la concentration de l'huile, le diamètre des colonies diminue jusqu'à atteindre une absence de germination du disque (la CMI).

Les taux d'inhibition pour *F. oxysporum* f. sp. *Albedinis* sont variables entre 11,87 à 100% une inhibition totale avec une concentration supérieure ou égale à 0,4%(4µl/ml)., les taux d'inhibition pour les concentrations (0,001% à 0,1%) ont eu un effet moyen ou nul, la concentration 0,2% (2µl/ml) a révélé une inhibition active avec un taux d'inhibition de 65,75%.

Les activités remarquables aussi sont enregistrées avec *F. culmorum*, dont la concentration à l'ordre de 0,1% (1µL/ml), le taux d'inhibition est très important est à l'ordre de 82,91%, et l'HE est très active avec une inhibition totale dans les concentrations supérieures à 1µl /ml,

Le développement de *F. culmorum* n'est pas affecté par les faibles quantités (0,1µl/ml à 0,5µl/ml) des huiles essentielles. Par contre, à la plus forte concentration (1µL/ml et plus), l'effet inhibiteur est obtenu sur cette souche . Cela se traduit par une inhibition du développement du thalle de 82,91 % à 100%,

Nous avons procédé aussi à la détermination de la CMF en effectuant un repiquage à partir des cultures fongiques présentant une inhibition de croissance.

Lorsqu'il s'agit d'une activité fongistatique, le mycélium, ainsi repiqué, donne naissance à un thalle à croissance normale ; le thalle croit peu ou pas si c'est une activité fongicide. Après incubation, aucune croissance n'est notée., le tableau N°28 résume les CMI et le CMF.

Tableau 28 :CMI et CMF de *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* et *Fusarium culmorum*

	<i>Fusarium oxysporum f.sp. albedinis</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
CMI	0.4% (4µl/ml)	0,2% (2µl /ml)
CMF	0.4%(4µl/ml)	0,2% (2µl /ml)

L'action fongistatique des huiles essentielles a été détecté pour une CMI égale à 0,2% (2µl /ml) enregistrée pour *F. culmorum* et 0,4% (4µl/ml) pour *F. oxysporum f. sp. Albedinis*. Il est à noter également, que les huiles essentielles agissent sur la croissance du mycélium (tableau C1 et C2, Annexe C) . Les figure 35 et 36 élucident clairement cette activité des huiles essentielles à différentes doses sur les deux souches.

La CMF estimée est d'une concentration à 4 µl/ml. pour *F. oxysporum f. sp. albedinis* et 2µl/ml pour le *F. culmorum*.

D'après ces résultats, il s'avère que l'activité de notre huile est plus importante sur la souche fongique *Fusarium culmorum* que sur *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*, nous pensons que cette différence entre les résultats dépend à la variété et la pathogénicité des souches fongiques.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de (Edris et Farrag 2003, *in* Gbogbo et al, 2006)., qui constatent que les vapeurs de cette huile essentielle et de son composé majoritaire, le linalol, peuvent inhiber la croissance de *Mucor sp.* et *Rhizopus stolonifer* .

Les travaux de Gbogboci et al, (2006), sur l'effet des HEs de basilic sur des micromycètes des champignons phytopathogènes et toxigenes, compris *Fusarium oxysporum*

sp, ont constaté qu'à la concentration maximale testée (1,14µl/l) des huiles essentielles de *Ocimum basilicum*, tous les isolats ont dépassé un pourcentage d'inhibition de 94%.

Plusieurs études ont également signalé que l'activité antifongique des huiles essentielles de *O. basilicum* et la présence de haute teneur en linalol, composé majoritaire, peuvent être la cause de cette activité (Sartoratotto et al, 2004 ; Koutsoudaki et al, 2005 in Hussain et al, 2008).

Les résultats obtenus ont montré que l'HE de *Ocimum basilicum* de notre région présente une activité antifongique très importante avec une faible concentration.

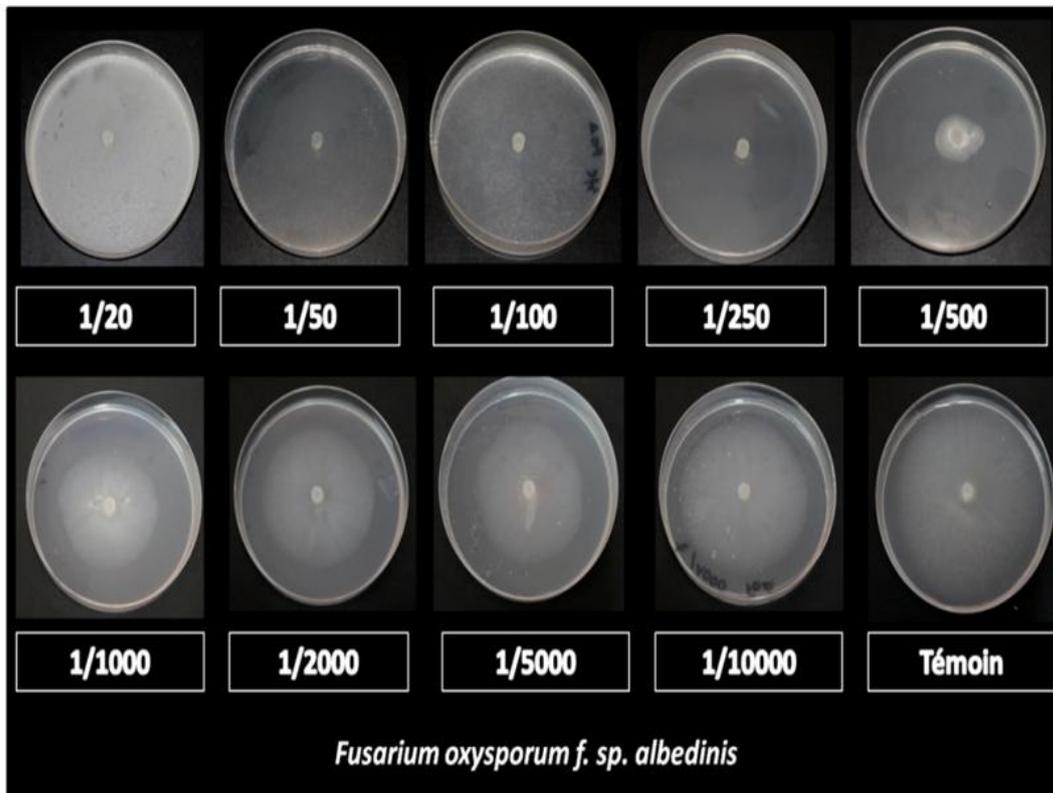


Figure 35 :test de contact direct de l'HE sur *Fusarium oxysporum f. sp. Albedinis*

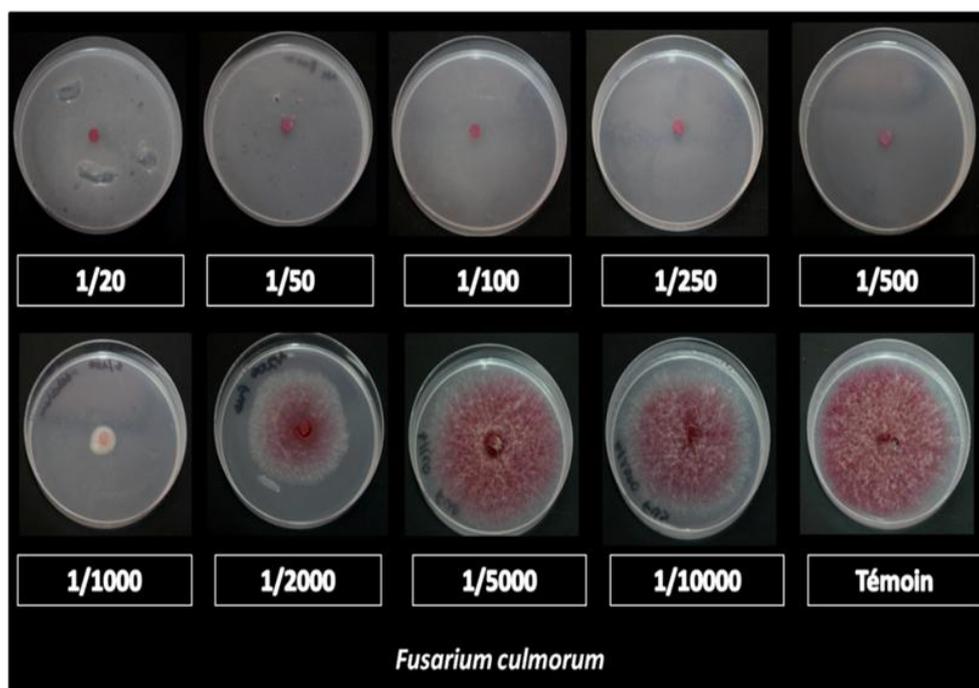


Figure 36 :test de contact direct des HEs sur *Fusarium culmorum*

IV .2.Pouvoir antifongique des extraits (Acétate d'éthyle et Butanol)

les résultats de l'activité antifongique des extraits végétaux de *Ocimum basilicum* sont regroupés dans le Tableau 29.

Tableau 29: : Effet des extraits (Acétate d'éthyle et Butanol) de *basilic* sur le diamètre (mm) des colonies mycéliennes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis* et *Fusarium culmorum*

	Extrait acétate d'éthyle				Extrait butanolique			
	<i>F oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>		<i>F culmorum</i>		<i>F oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>		<i>F culmorum</i>	
	Témoin=72±1,5		Témoin=80±2,66		Témoin=72±1,5		Témoin=80±2,6 6	
[C]=mg/ml	Ø	I%	Ø	I%	Ø	I%	Ø	I%
6	20±2	72,22	18±0,75	77,5	36±0,66	50	34±0,54	57,5
4	21±2,5	70,83	27±1,5	66,25	40±0,5	44,44	45±0,66	43,75
2	30±0,6	58,33	32±2,1	60	42±2,3	41,66	49±2	38,75
1	37.5±0,67	47,91	48±3	40	53±1,25	26,38	59±0	26,25
0.5	51±0	29,16	54±2	32,5	64±0,75	11,11	80±2,22	0
0.25	51±4	29,16	60±1,83	25	68,5±6	4,86	80±1,5	0

Les deux souches fongiques sont très sensibles pour des concentrations de l'extrait d'acétate d'éthyle variant entre 4 et 6mg/ml. Les taux d'inhibition sont à l'ordre de (77,5%) pour *F. culmorum* et entre (70,83 %) et (72,22%) pour *F. oxysporum f. sp. albedinis*, alors que, la concentration entre 2 et 4 mg/ml permet d'inhiber la souche *F. culmorum* avec un taux d'inhibition de (60% et 66,24% respectivement). En outre, l'extrait est moyennement actif vis-à-vis de la souche *F. oxysporum f. sp. albedinis* pour une concentration à 2mg/ml.

Par ailleurs, l'extrait butanolique possède une activité inhibitrice pour les deux souches pour une concentration de 6 mg/ml, cette activité diminue progressivement avec la diminution de la concentration, alors que les pourcentages d'inhibition de deux champignons allant de (26,25% à 44,44 %) pour les concentrations 1 , 2 et 4 mg/ml voir aussi (tableau D1 et E1 , Annexe D et E).

La CMI pour les pour les deux extraits sont supérieure à 6mg/ml. L'histogramme de la figure 37, présente la comparaison entre les résultats des deux extraits.

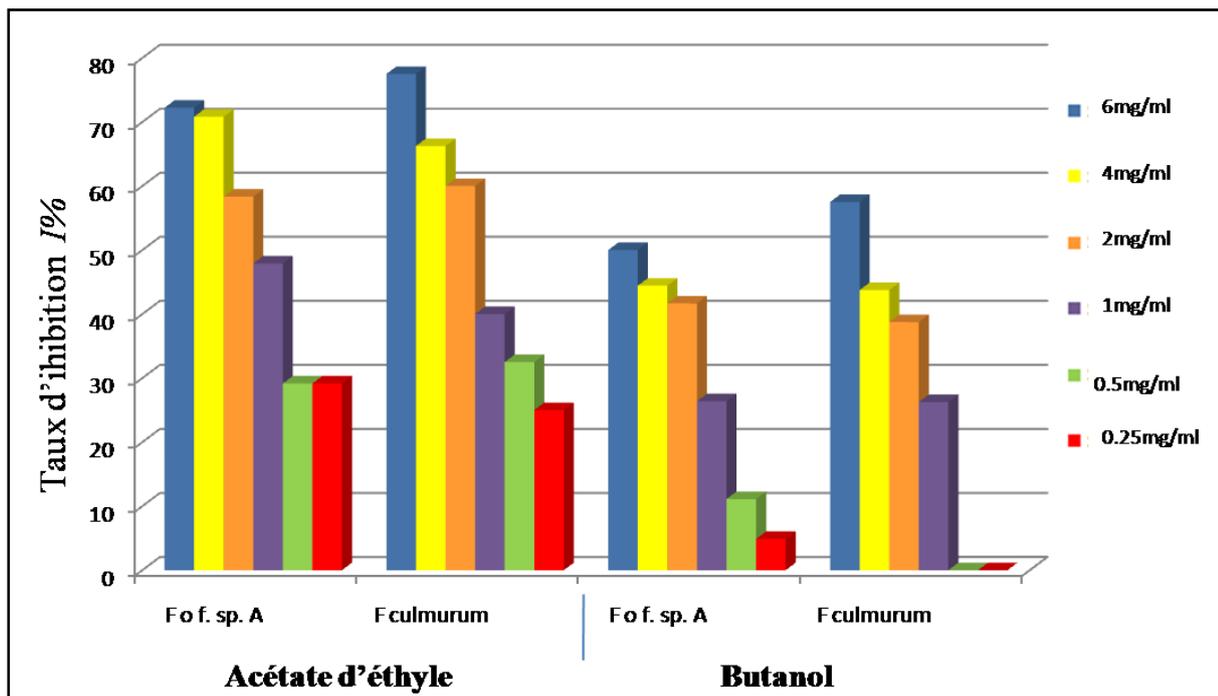


Figure 37 : l'histogramme des taux d'inhibitions de la croissance fongique par les extraits (Acétate d'éthyle et butanol)

Selon les résultats enregistrés, l'extrait acétate d'éthyle est plus actif contre les deux souches. Cette différence peut être à l'origine de la composition chimique différente entre les deux extraits, l'acétate d'éthyle permettant une meilleure extraction des composés phénoliques.

Ces résultats peuvent également être expliqués par le taux élevé des flavonoïdes et des tanins par rapport aux phénols totaux dans l'extrait d'acétate d'éthyle en comparaison avec l'extrait butanolique.

L'activité antifongique enregistrée aussi dans l'extrait butanolique est due peut être à la teneur importante de saponines 18,28mg/ml.

Pour cela, nous pouvons conclure que l'activité antimicrobienne des extraits dépend non seulement des composés phénoliques mais, aussi de la présence de différents métabolites secondaires à effet antifongique tels que les stéroïdes, les saponosides qui ont par ailleurs déjà été signalés par plusieurs auteurs (Morris et al, 1997 in Bougandoura, 2012)

L'activité antifongique des extraits apparait plus importante que celle de Adigüzel et al. (2005), qui ont montré que les trois extraits de basilic testés (ethanol, le méthanol et l'hexane) n'ont présenté aucune activités antifongique contre *F. oxysporum*. En revanche, Bidarigh et al, (2012), ont montré que la CMI de l'extrait éthanolique de basilic contre *Fusarium sp* est à l'ordre de 0,12µl/ml.

La concentration élevée de l'extrait de basilic agit sur les morphologies des hyphes de champignon, ces déformations peuvent être liées à des changements au niveau cellulaire (diminution de la consommation d'oxygène, la réduction de la croissance cellulaire, l'inhibition de la synthèse des lipides, des protéines et des acides nucléiques, et l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire fongique (Kocić-Tanackov et al, 2005)

Les figure 38, 39,40 et 41 illustrent les Tests de contact direct d'extrait acétate d'éthyle et de butanol

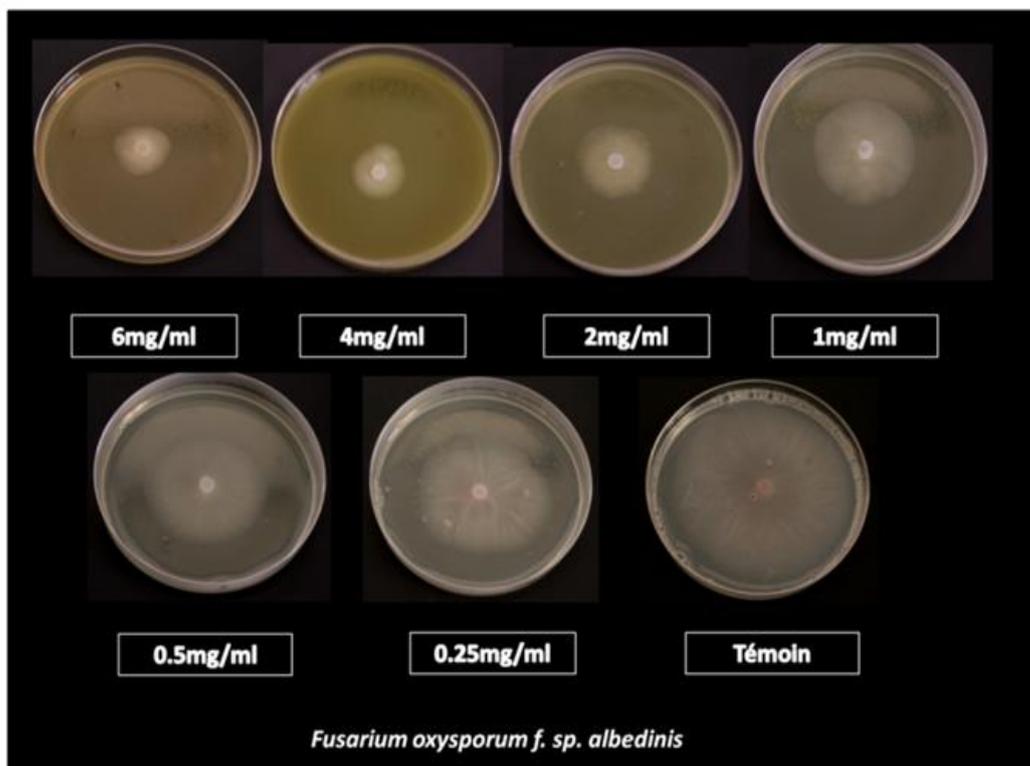


Figure 38: Test de contact direct de l'extrait d'acétate d'éthyle sur *Fusarium oxysporum f. sp. Albedinis*

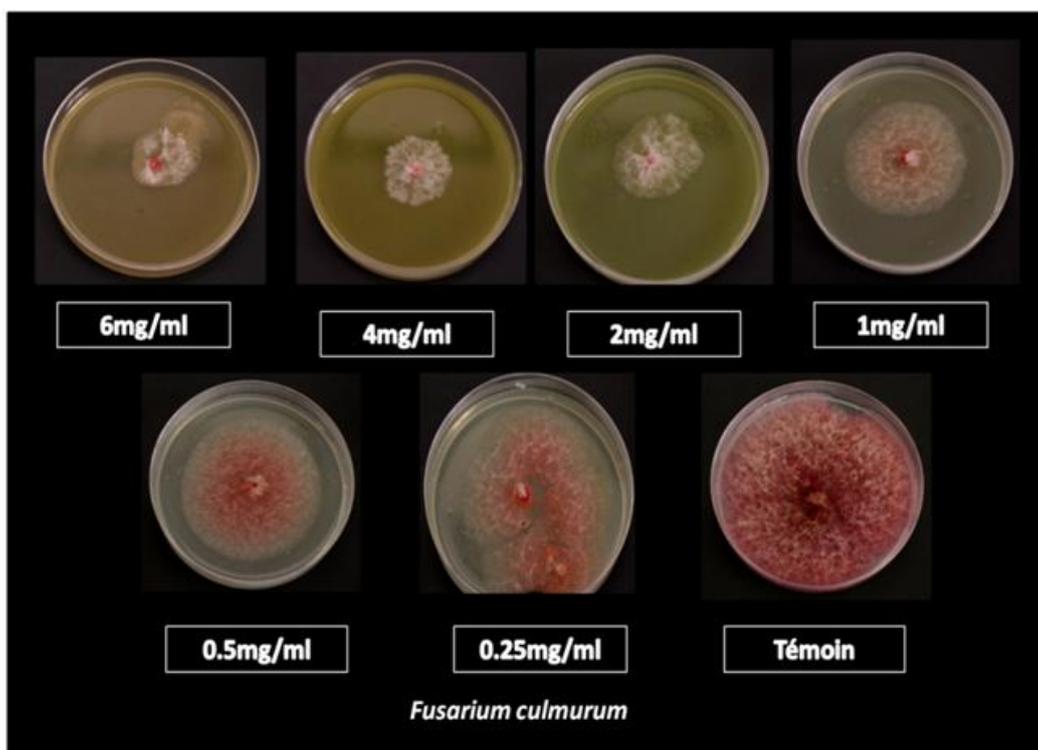


Figure 39 : Test de contact direct de l'extrait d'acétate d'éthyle sur *Fusarium culmorum* .

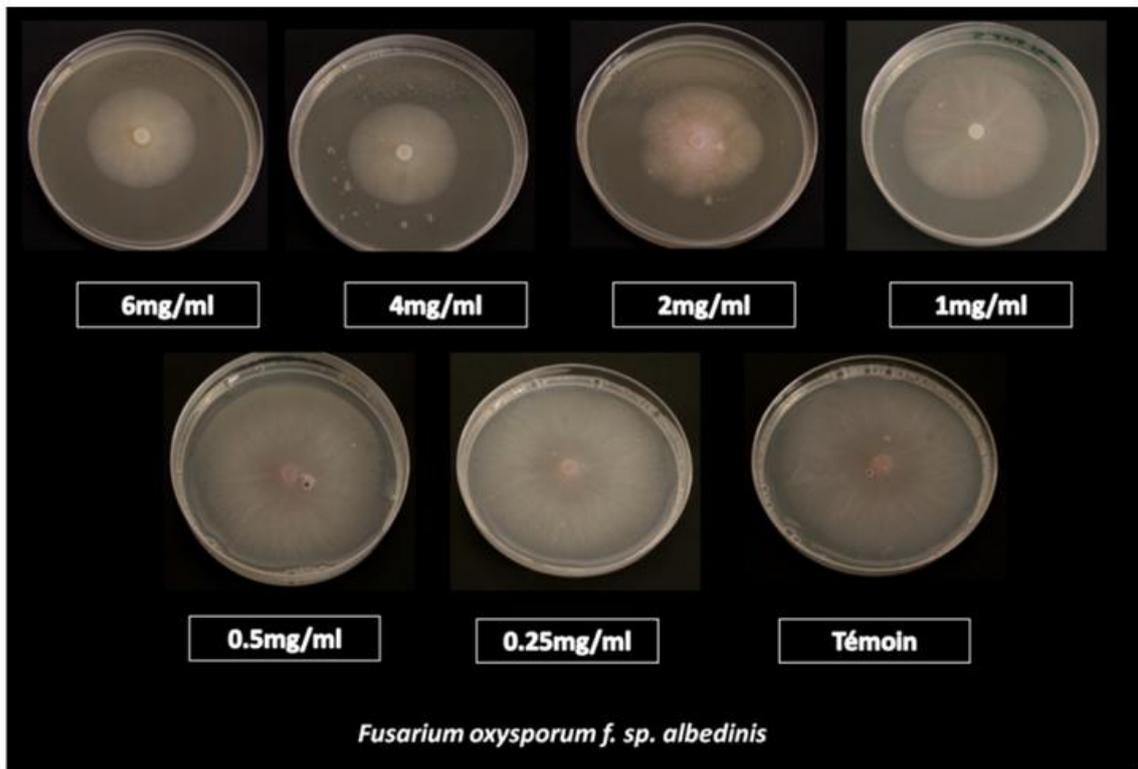


Figure 40 : Test de contact direct d'extrait butanolique sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis*

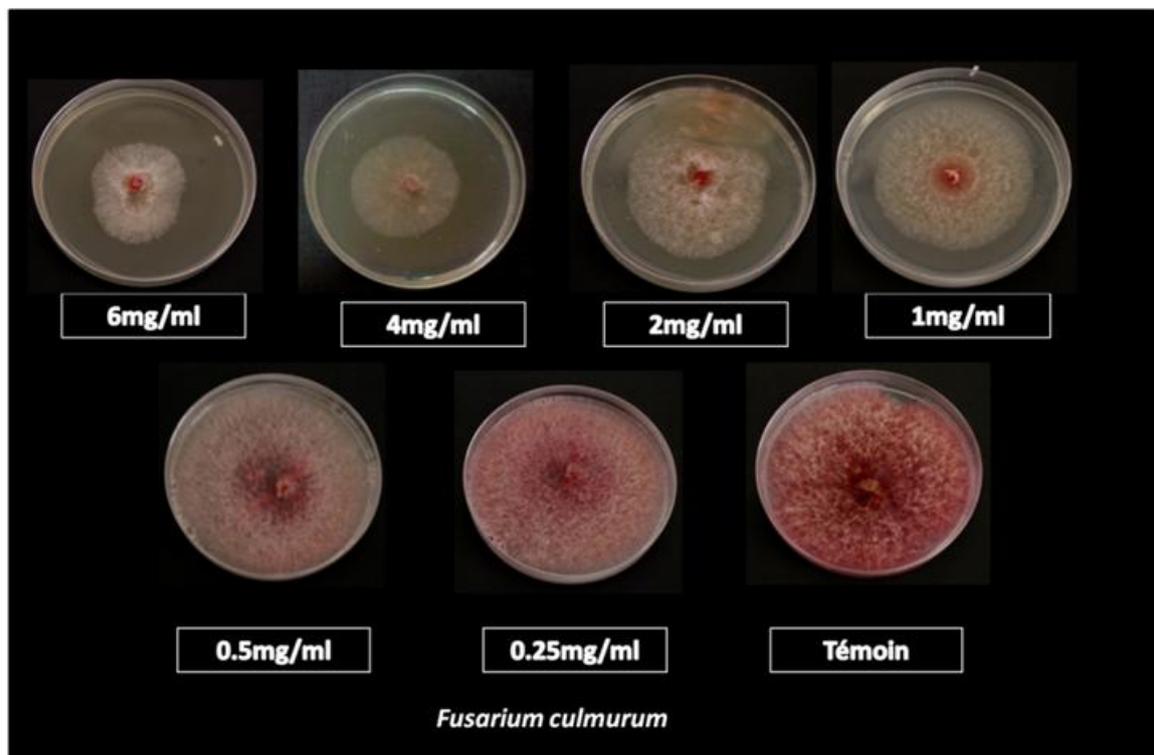


Figure 41 : Test de contact direct d'extrait butanolique sur *Fusarium culmorum*

D'après ces résultats, on constate que l'activité de l'huiles et des extraits est plus importants vis-à-vis des souches fongique par rapport aux bacteries et la levure.

Nous pouvons déduire que la différence ou la concordance de nos résultats avec ceux d'autres travaux sur les même espèces peut être expliquée par :

*La composition des huiles essentielles et des extraits qui est lié avec les plusieurs facteurs comme :le chémotype, facteur climatique, et aussi le mode d'extraction.

*La nature et ou la concentration de principes actifs présents dans les espèces et de leur solubilité dans le solvant choisi.

*Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne et le choix des microorganismes à tester.

Conclusion

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié *Ocimum basilicum*, une plante très utilisée en pharmacopée traditionnelle pour ses vertus thérapeutiques.

Ce travail nous a permis de mettre en évidence le rendement des huiles essentielles et des extraits, les teneurs des composés phénoliques et de saponine, ainsi que les activités biologiques des huiles essentielles et des extraits à partir de la plante.

L'étude phytochimique préliminaire basée sur des tests spécifiques a permis de caractériser les flavonoïdes, les tanins et les saponines ainsi que les huiles essentielles, le test de la présence des alcaloïdes a donné une réaction négative dans la plante.

La détermination de rendement en l'huile essentielle a montré une rentabilité de 2,047% ce qui est très important en comparaison avec la rentabilité issue d'autres études. Le rendement des extraits acétate d'éthyle et le butanol sont respectivement 1,791% et 1,96%.

Le dosage des composés phénoliques contenus dans les deux extraits (acétate d'éthyle et butanol) a révélé des teneurs considérables en phénol totaux (24,45mg/g) avec des quantités appréciables en flavonoïdes 3,087mg/g et en tanins 3,575mg/g dans la fraction d'acétate d'éthyle, tandis que, la fraction butanolique a permis d'obtenir une teneur importante en saponines (18,20mg/g) et faible en polyphénols.

L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode du DPPH a confirmé les propriétés puissantes que possèdent les composés phénoliques à piéger les radicaux libres. Les valeurs d'EC₅₀ obtenue expérimentalement est égale à 0,0201 mg/ml pour la fraction d'acétate, alors pour la fraction butanolique et les huiles essentielles sont à l'ordre de 0,467mg/ml et 8,11mg/ml respectivement.

L'effet antimicrobien des extraits (Acétate d'éthyle et butanol) et des huiles de notre plante a été mis en évidence *in vitro* en utilisant différentes méthodes. L'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles par la méthode de diffusion sur milieu gélosé vis-à-vis les souches étudiées (*Staphylococcus aureus*, *MRSA*, *MSSA*, *Bacillus cereus* et *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis* et *Candida albicans*), a révélé une action inhibitrice contre la plupart des germes et beaucoup plus sur les Gram-, les CMI par le test de dilution sur milieu liquide comprises entre 0,125mg/ml et 1mg/ml, En comparaison avec la bibliographie, il paraît que notre l'huile présentant une activité antimicrobienne importante.

L'activité antimicrobienne de nos extraits (acétate d'éthyle et le butanol) apparaît faible à bonne sur les mêmes souches testées, les résultats indiquent que dans la majorité des cas, nos

extraits peuvent être considérés comme des substances bactéricides vis-à-vis (*MSSA* , *B. cereus*, *P. aeruginosa* et le *S. aureus*).

Nous avons remarqué une activité importante par l'extrait butanolique affectant le *Pseudomonas aeruginosa*, qui s'est manifestée résistante vis-à-vis des huiles et de l'extrait d'acétate d'éthyle.

Les champignons phytopathogène (*F oxysporum* f.sp. *albedinis* et *F culmorum*) se sont plus sensibles que les bactéries, vis-à-vis les huiles essentielles et les extraits par la méthode de contact direct sur milieu solide. Les CMF intéressantes, avec une forte activité observée pour les huiles essentielles (2µl/ml et 4µl/ml), ainsi une inhibition importantes de ces champignons vis-à-vis les deux extraits (acétate d'éthyle et le Butanol).

Suivant les résultats qu'on a obtenu expérimentalement, nous pouvons prédire que les huiles essentielles sont plutôt des antimicrobiennes alors que l'extrait phénolique d'acétate d'éthyle est un agent antioxydant de première classe. L'extrait butanolique possède l'activité la moins importante mais la plus remarquable vis-à-vis le *Pseudomonas aeruginosa* (souche multi résistante).

En perspectives,

- Il serait intéressant d'approfondir les études sur les constituants d'huile essentielle en caractérisant la ou les molécules responsables de l'activité observée et d'étudier leur mode d'action moléculaire.
- Un travail complémentaire s'impose en vue d'identifier les différentes molécules en particulier les composés phénoliques et le saponine présents dans les extraits d'acétate d'éthyle et de n-butanol et les purifier en utilisant diverses techniques chromatographiques notamment la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).
- Il est souhaitable de faire une étude plus approfondie dans l'espace et le temps pour étudier l'influence des facteurs écologiques sur la teneur et la composition chimique d'huiles essentielles et des extraits phénolique de *Ocimum basilicum* de la région de Laghouat.

Elargir la gamme des microorganismes et tester d'autre activité comme l'activité antiparasitaire.

Référence Bibliographique

- Abbasi-Montazeri E., Khosravi A.D., Feizabadi M.M., Goodarzi., Khoramrooz S.S., Mirzaii M., Kalantar E et Darban-Sarokhalil D., 2013.** The prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates with high-level mupirocin resistance from patients and personnel in a burn center. *Burns*, **39**,650-654.
- Abdul Murad A.M., Lee P.R., Broadbent I.D., Barelle C.J. et Brown A.J.P., 2000.** CIp 10, an efficient and convenient integrating vector for *Candida albicans*. *Yeast*, **16**, 325-327.
- Adeola S.A, Folorunso O.S, et Amisu K.O., 2012.** Antimicrobial Activity of *Ocimum basilicum* L and its Inhibition on the Characterized and Partially Purified Extracellular Protease of *Salmonella typhimurium*. *Research Journal of Biology*, **2(5)**, 138-144.
- Adiguzel A., Gulluce M., Sengul M., Ogutcu H., Sahün F et Karaman I., 2005.** Antimicrobial Effects of *Ocimum basilicum* (*Labiatae*) Extract. *Turk J Biol*, **29**, 155-160.
- Aganga A.A et Mosase K.W., 2001.** Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Animal Feed Science and Technology*, **91**, 107-113.
- Agostini F., Ana dos Santos C.A., Rossato M., Pansera M.R., dos Santo P.L., Serafini L.A., Molon R et Moyna P., 2009.** Essential Oil Yield and Composition of *Lamiaceae* Species Growing in Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **52**, 473-478.
- Aït Youssef M., 2006.** Plantes médicinales de Kabylie. *Edition IBISS PRESS*, Paris. 349p.
- Aklilu E., Zunita Z., Hassan L et Cheng C.H., 2013.** Molecular epidemiology of *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) among veterinary students and personnel at a veterinary hospital in Malaysia. *Veterinary Microbiology*. **164**, 352–358.
- Al-Dahmoshi H.O.M., 2013.** Genotypic and Phenotypic Investigation of Alginate Biofilm Formation among *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Victims in Babylon, Iraq. *Science Journal of Microbiology*. Article ID sjmb-233, 8p.
- Ali-Delille L., 2010.** Les plantes médicinales d'Algérie. 2^{ème} Edition. *Berti. Alger*, 239 p.
- Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Abdellah Farah A., Aafi A., Lotfi Aarab L., El Ajjouri M et Chaouch A., 2010.** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. Du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **14(1)**, 141-148.
- Amrani S., Harnafi H., Gadi D., Mekhfi H., Legssyer A., Aziz M., oise F., Martin-Nizard et Bosca L., 2009.** Vasorelaxant and anti-platelet aggregation effects of aqueous *Ocimum basilicum* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, **125**, 157–162.
- Amzal H., 2010.** Étude de l'activité antioxydant des saponines du tourteau de l'Arganier. Thèse Doctorat, Université de Rabat, 149p.

- Andersen Ø.M., K.R. Markham., 2006.** Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications, *Taylor & Francis Group*, 1197p.
- ANIREF ., 2011.** Agence Nationale d'Intermédiation et de Régulation Foncière. Rubrique Monographie wilaya de Laghouat, 30p.
- Asha M.K., Prashanth D., Murali B., Padmaja R et Amit A.,2001.** Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum sanctum* and eugenol. *Fitoterapia*, **72**, 669-670.
- Atoui A., El Khoury A., Kallassy M et Lebrihi A., 2011.** Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize. *International Journal of Food Microbiology*. **154**, 59-65.
- Attou A., 2011.** Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain T'émouchent. Memoire Magister, université de Tlemcen, 119p.
- Augustin J.M., Kuzina Vera., Andersen S.B et Bak S., 2011.** Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, **72**, 435–457.
- Ayadi S., Jerribi C et Abderrabba M., 2011.** Extraction et Etude Des Huiles Essentielles De *Rosmarinus officinalis* cueillie dans trois régions différentes de La Tunisie. *J.Soc.Alger.Chim.* **21(1)**, 25-33.
- Baba-Aissa F., 2011.** Encyclopédie des plantes utiles, flore Méditerranéenne (Maghreb, Europe méridionale) substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Edition El- Maarifa, 68p.
- Bahorun, T. (1997).** Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, *Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius* , p 83.
- Bais H.P., Walker T.S., Schweizer H.P et Vivanco J.M., 2002.** Root specific elicitation and antimicrobial activity of Rosamarinic acid in rainy root cultures of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Plant Physiology and Biological Chemistry*, **40**, 983–995.
- Bakkali F., 2008.** Biological effects of essential oils–A review, *Food and Chemical. Toxicology*, **46**, 446-475.
- Becker K., Harmsen D., Mellmann A., Meier, C., Schumann P., Peters G et von Eiff C., 2004.** Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology.*, **42 (11)** 4988-4995.
- Bekhechi C., F. Atik-Bekkara et D. E. Abdelouahid., 2008.** composition et activité antibacterienne des huiles essentielles de *Origanum glondulosum* d'Alger. *Phytotherapie*, **6**, 153–159.

Békro Y.A., Békro J.A.M., Boua B., Trabi F.H et Ehouan E. Éhilé. Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend et Zarucchi (*Caesalpinaceae*). *Sciences et Nature*, **4**, 217-225.

Bellakhdar J., 2006. Plantes médicinales au Maghreb et soins de base. Précis de phytothérapie moderne. *Edition le Fennec*. Casablanca, Maroc, 385p.

Ben Hadda T., Charrouf Z et Masand V., 2011. A la recherche des sites pharmacophores des saponines extraites d'*argania spinosa*: Pom, un moyen bioinformatique efficace, économique et rapide pour prédire et optimiser l'activité biologique des saponines. Actes du premier congrès international de l'arganier, Agadir. 195-202p.

Benabed K.H., 2011. Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de quelques plantes de la famille des *Lamiaceae*. Thèse Magister, université de Laghouat, 89p.

Benarous K., 2010. Evaluation de l'activité antioxydante et étude des effets inhibiteurs des extraits phénoliques, saponines et alcaloïdes sur la lipase de *Candida rugosa*. Mémoire Magister, université de Laghouat, 133p.

Benarous k., Djeridane A., Kameli A et Yousfi M., 2013. Inhibition of *Candida rugosa* Lipase by Secondary Metabolites Extracts of Three Algerian Plants and their Antioxydant Activities. *Current Enzyme Inhibition*, **9**, 75-82.

Benedec D., Oniga I., Oprean R.U et Tamas M., 2009. Chemical composition of the essential oils of *Ocimum basilicum* L. cultivated in romania. *Farmacica*, **57**, 625-629.

Benhammou N., 2011. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest algérien. Thèse Doctorat, Université de Tlemcen, 174p.

Benhamou D., Carrié A.S et Lecomte F., 2005. *Staphylococcus aureus* : place et impact dans la prise en charge des pneumopathies nosocomiales. *Rev Mal Respir*, **22**, 595-603.

Benzie I.F et Strain J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, 70-76.

Bi L., Tian X., Dou F., Hong L., Tang H et Wang S., 2012. New antioxidant and antiglycation active triterpenoid saponins from the root bark of *Aralia taibaiensis*. *Fitoterapia*. **83**, 234–240.

Bidarigh S., Massiha A., Mohammad R. M. Pahlaviani K., Issazadeh K., Muradov P Z et Azarpour E. 2012. Antimicrobial (Screening) properties of Various Plant Extracts from *Ocimum basilicum* L. and *Nerium oleander* L. against Fungal Common Rots of Potato *In vitro*. *Bioassay J. Basic. Appl. Sci. Res*, **2** (**7**), 6810-6815.

Bidie A.d.P., N'guessan. B.B., Yapo A.F., N'guessan J.D et Djaman A.J., 2011. Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*, **8**, 1-11.

- Billerbeck V.G., 2007.** Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Pharmacognosie Phytothérapie*, **5**, 249–253.
- Binello A., Orio L., Pignata G., Nicola S., Chemat F. et Cravotto G., 2014.** Effect of microwaves on the *in situ* hydrodistillation of four different Lamiaceae. *C. R. Chimie*, **17**, 181–186.
- Bonnaillie C., Salacs M., Vassiliova E et Saykova i., 2012.** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea L.*). *Revue de génie industriel*, **7**, 35-45.
- Bora K-S., Arora S., Shrib R., 2011.** Role of *Ocimum basilicum L.* in prevention of ischemia and reperfusion-induced cerebral damage, and motor dysfunctions in mice brain. *Journal of Ethnopharmacology*, **137**, 1360– 1365.
- Bottone E.J., 2010.** *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Rev. April Clin. Microbiol*, **23(2)**, 382-398.
- Bouabdelli F., Djelloul A., Kaid-Omar Z., Semmoud A et Addou A., 2012.** Antimicrobial Activity of 22 Plants used in Urolithiasis Medicine in Western Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* , S530-S535
- Bougandoura N et Bendimerad N., 2012.** Effet antifongique des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp.(nepeta)* briq. *BioRessources*. **2 (1)**, 1-7.
- Bourkhiss M., Hnach M., Lakhlifi T., Bourkhiss B., Ouhssine M et Satrani B., 2010.** Production et caractérisation de l'huile essentielle de la Sciure de bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, **79**, 4 - 11.
- Bousbia N., 2011.** Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse Doctorat, INA El Harrach. Alger, 175p.
- Bousseboua H., 2005.** Elément de microbiologie. 2^{ème} Edition. *Campus-Club*. Canstantine, 304p.
- Bozin B., Mimica-Dukic N., Simin N. et Anackov G., (2006).** Characterization of the volatile composition of essential oil of some *lamiaceae* species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **54**, 1822-1828.
- Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M., Staley J.T., Boone D.R., De Vos., Good fellow M., Krieg N.R., Rainey F.A et Schleifer K., 2005.** Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume Two The *Proteobacteria* Part B The *Gammaproteobacteria*. 2^{ème} Edition. *Bergey's Manual Trust*. USA, 1136p.
- Brooks G.F., Butel J.S et Morse S.A., 2001.** Jawetz, Melnick and adelberg's Medical microbiology. 21^{ème} Edition. *Middle East.Liban*. 649p.

Bruneton J., 2009. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*. Techniques et Documentation, 4^{ème} Edition. Lavoisier, Paris.

Brzozowska J et Hanower P., 1976. Sur les composés phénoliques avec un déficit hydrique chez des cotonniers des végétaux et leur rapport. *Annales de l'Université d'Abidjan, série C (Sciences)*, tome XII, B.P. V 51 - ABIDJAN - Côte-d'Ivoire, p 65-87.

Brzozowska J., Hanower P et Tanguy J., 1973. Poly-phénols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. *Phytochemistry*, **12**, 2353-2357.

Buronzo M.A., 2008. Grand guide des huiles essentielles : Santé. Beauté. Bien-être. Hachette pratique, 254p.

Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food Microbiol*, **94**, 223-253.

C, D

Cabalion P., 1990., Les substances naturelles végétales, leur intérêt biologique, leurs perspectives d'application., *Bull .Soc. industr. Mulhouse*, 819(4), 65-69

Canillac N et Mourey A., 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiol.* **18**, 261–268.

Cao L., Young Si.J., Liu Y., Sun H., Jin W., Li Z., Zhao X.H. et Le Pan R., 2009. Essential oil composition antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. *Food chemistry.* **115**, 801-805.

Carovic´-Stanko K., Orlic S., Politeo O., Frane S., Ivan K., Milos M et Zlatko Satovic., 2010. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum taxa*. *Food Chemistry*, **119**, 196-201.

Catier O et Roux D., 2007. Botanique , pharmacognosie, phytothérapie . 3^{ème} Edition . *Wolters Kluwer*.141p.

Cavin A., 1999. Investigations phytochimiques des trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires. *Tinospora crisp (Menispermaceae)*, *Merremia emarginata (Convolvulaceae)* et *Orophea enneandra (Annonaceae)*. Thèse Doctorat, Lausanne, 243p.

CEDEF I., 2012. Modules Transdisciplinaires *Module 7 : Santé Et Environnement, Maladies Transmissibles*: Item 87 Infections cutanéomuqueuses bactériennes et mycosiques : *Candida albicans*. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 139, A40-A46p.

Chaabi M., 2008. Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (*Plumbaginaceae*). Thèse Doctorat, Louis Pasteur. France, 266p.

Chaker H., 2006. Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte: implication des métabolites du tryptophane. Thèse Doctorat, Université de Grenoble, 290p.

Chalchat J.C et Ozcan M.M., 2008. Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. *Food Chemistry*, **110**, 501-503.

Chan K.W., Iqbal S., Khong N. M.H., Ooi D.J. et Maznah Ismail ., 2014. Antioxidant activity of phenolic se saponins rich fraction prepared from defatted kenaf seed meal. *LWT. Food Science and Technology*, **56**, 181-186.

Chan K.W., Khong N.M.H., Iqbal S et Ismail M., 2013. Isolation and antioxidative properties of phenolics-saponins rich fraction from defatted rice bran. *Journal of Cereal Science*. **57**, 480-485.

Charrouf Z., 2007. 20 ans de recherche-action pour faire de l'arganier un levier du développement durable du milieu rural marocain. Colloque international. Rabat. **6**, 35p.

Chebil L., 2006. Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse Doctorat, Institut national polytechnique de Lorraine, 229p.

Cheng S.S., Liu J.U., Chang E.H et Chang S.T., 2008. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*. **99**, 5145-5149.

Cheyrier V et Sarni-Manchado P., 2006. Structures phénoliques et gout *In* Sarni-Manchado P et Cheyrier V. les polyphénols en agroalimentaire. Editions TEC et DOC .Lavoisier , 399p.

Clarke S., 2008. Essential chemistry for aromatherapy. 2^{ème} Edition. *Elsevier*, 320p.

CLSI., 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. 9^{ème} Edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, **23**, 52p.

Couic-Marinier F et Lobstein A., 2013a. Composition chimique des huiles essentielles. *Elsevier Masson SAS*, **525**, 22-25.

Couic-Marinier F et Lobstein A., 2013b. Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Elsevier Masson SAS*, **525**, 18-21.

Cowan M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical biology Reviews*, **12 (4)**, 564-582.

Cristina-Mihalache A., Jessica T., Claire K., Marius N., Razvan F., Dumitru B et Jacques D., 2014. Antioxidant potential of different plum cultivars during storage. *Food Chemistry*, **146**, 485-491.

Cushnie T.P. Tim et Andrew J. L., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids . *International Journal of Antimicrobial Agents*, **26**, 343-356.

Daayf F., El Bellaj M., El Hassni M., J'Aiti F et El Hadrami I., 2003. Elicitation of soluble phenolics in date palm (*Phoenix dactylifera*) callus by *Fusarium oxysporum* F. sp. *albedinis* culture medium. *Environmental and Experimental Botany*. **49**, 41- 47.

Dabire C., Nebie R.H.C., Belanger A., Nacro M et Sib F.S., 2011. Effect of drying the plant material on the chemical composition of the essential oil and antioxidant activity of extracts of *Ocimum basilicum* L. *Int. J. Biol. Chem. Sci*, **5(3)**.

Daglia M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, **23**, 174–181.

Dambolena J.S., Zunino M.P., López A.G., Rubinstein H.R., Zygodlo J.A., Mwangi J.W., Thoithi G.N., Kibwage I.O., Mwalukumbi J.M., Samuel T et Kariuki., 2010. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonis in production by *Fusarium verticillioides*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*,. **11**, 410–414.

Degenhardt J., Kollner T.G et Jonathan Gershenzon J., 2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* **70**, 1621–1637.

Djelouat S., 1990. Le diagnostique biochimique bactérien. *Edition Science Technique. Constantine*, 112p.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P et Vidal N., 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, **97**, 654–660.

Djerroumi A et Nacef M., 2012. 100 plantes médicinales d'Algérie. Edition Houma, 44p.

Doat J., 1978. Les tanins dans les bois tropicaux. bois et forêt des tropiques, **182** , 37.

Drobniewski F.A., 1993. *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* **6(4)**, 324p.

Dubey N. K., Tiwaria T.N., Mandinb D., Andriamboavonjyc H et Chaumontb J-Pi., 2000. Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). *Fitoterapia*, **71** ,567-569.

Dupont B., 2002. An epidemiological review of systemic fungal infections. *Journal de mycologie médicale*. **4**, 163-173.

Dupont F et Guignard J.L., 2012. Botanique des familles de plantes. 15^{ème} Edition. *Elsevier Masson SAS*, 237-300p.

Dupont H., 2000. **Infections à staphylocoques. Conférences d'actualisation, Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, et SFAR, p. 447-463.**

- EFSA., 2009.** Les saponines de *Madhuca Longifolia* en tant que substances indésirables dans l'alimentation animale. Avis du groupe scientifique sur les contaminants de la chaîne alimentaire. *The EFSA Journal*, **979**, 2-3.
- Ekren S., Sönmez C., Özçakal E., Kurttas Y.S.K., Bayram E et Gürgülü H., 2012.** The effect of different irrigation water levels on yield and quality characteristics of purple basil (*Ocimum basilicum* L.). *Agricultural Water Management*, **109**, 155-161.
- El Ajjouri M., Satrani B., Ghanmi M., Aafi A., Farah A., Rahouti M., Amarti F et Aberchane M., 2008.** Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* L. Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'oeuvre. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **12**, 345-351.
- Elgayyar M., Draughon F.A. Golden D.A. et Mount J.R., 2001.** Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food Protec.*, **64(7)**, 1019 – 1024.
- El-houiti F., 2010.** Composition chimique, activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles de *Rhanterium adpressum*. Université Amar Téliidji, Laghouat, 103p.
- Eric K et Rowinsky M.D., 1997.** The development and Clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu. Rev. Med.* **48**, 74-353
- Essien E.B., Onyeike E.N., Ugbeyide D.E et Eneke I.C., 2012.** Effects of Aqueous Extract Of *Occimum basilicum* Leaves on some Hematological and Biochemical Parameters of Wistar Albino Rats. University of Port Harcourt. Rivers State, Nigeria. *Canadian Journal on Scientific and Industrial Research*, **3**, 256.
- Fathiazad F., Matlobi A, Khorrami A., Hamedeyazdan S., Soraya H., Hammami M., Maleki-Dizaji N. et Garjani A., 2012.** Phytochemical screening and evaluation of cardioprotective activity of ethanolic extract of *Ocimum basilicum* L. (basil) against isoproterenol induced myocardial infarction in rats DARU. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **20**,87.
- Favier A., 2003.** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'actualité chimique*, 108-115
- Fernandez D., Ouinten M., Tantaoui A., Geiger J.P., E Daboussi M.J et Langin T., 1998.** *Fot 1* Insertions in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis* Genome Provide Diagnostic PCR Targets for Detection of the Date Palm Pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 633–636.
- Figueredo G., 2007.** Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Thèse Doctorat, Université de Blaise Pascal, 416p.

Gamse T., 2002. Liquid - Liquid Extraction and Solid - Liquid Extraction. Institute of Thermal Process and Environmental Engineering Graz University of Technology, 80p.

Gavaret T et Briffaud M., 2009. *Klebsiella pneumoniae* en aviculture fréquence d'isolement, Sensibilité aux antibiotiques. *Huitièmes Journées de la Recherche Avicole, St Malo*, Journal. *JRA*, 423-427.

Gbobgobi K. A., Batawilae K., Ananici K., David M. P ., Gbeassore M., Bouchet P et Akpaganae K., 2006. Activité antifongique des huiles essentielles de *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) et *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng. (Poaceae) sur des micromycètes influençant la germination du Mais et du Niebe. *Acta Bot. Gallica*, 153(1), 115-124.

Giraffa G., 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26 (2), 163-171.

Girard G., 2010. Les propriétés des huiles essentielles dans les soins bucco-dentaires d'aujourd'hui : Mise au point d'un modèle préclinique de lésion buccale de type aphte pour tester les effets thérapeutiques des huiles essentielles. Thèse Doctorat, Université d'Henri Poincaré-Nancy, 1-116.

Goetz P et Ghedira K., 2012, Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles, Collection Phytothérapie Pratique, p193-208.

Gould I.M., 2013. Controlling hospital MRSA. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. **1**, 43-45.

Govindarajan M., Sivakumar R., Rajeswary M et Yogalakshmi K., 2013. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). *Experimental Parasitology*, **134**, 7-11.

Grayer R.J., 2001. Basil. The Genus *Ocimum*. *Phytochemistry*. **58**, 533-535.

Grayer R.J., Kite G.C., Goldstone F.J., Bryan S., Paton A et Putievsky E., 1996. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum Basilicum*. *Phytochemistry*, **43**, 1033-1039.

Grayer, R. J., Vieira, R. F., Price, A. M., Kite, G. C., Simon, J. E., et Paton, A. J., 2004. Characterization of cultivars within species of *Ocimum* by exudate flavonoid profiles. *Biochemical Systematics and Ecology*, **32**, 901-913

Greeson J.M., Sanford B et Monti D.A., 2000. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology*, **153**, 402-414.

Gueye O., 2007. Utilisation Des Méthodes Biométriques Dans l'identification De Quelques Bacilles à Gram Négatif. Thèse Doctorat, Université de Dakar, 120p.

- Guillaume D et Charrouf Z., 2005.** Saponines et métabolites secondaires de l'arganier (*Argania spinosa*). *Cahiers Agricultures*, 14(6),509-516
- Guinoiseau E., 2010.** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Thèse Doctorat, Université de Corse, 148p.
- Gurib-Fakim A., 2006.** Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of medicine*. **27**, 1-93
- Hadizadeh I., Peivastegan B et Hamzehzarghani H., 2009.** Antifungal Activity of Essential Oils from Some Medicinal Plants of Iran against *Alternaria alternata*. *American Journal of Applied Sciences*. **6 (5)**, 857-861.
- Hagerman A.E., 2002.** Tannin Handbook. 2^{ème} Edition. *Miami University. Oxford*, 116p.
- Hammoudi R., Hadj-Mahammed M et Ramdane F., 2012.** Activité antibactérienne des extraits phénoliques de la plante *Thurium polium geyrii*. *Algérien journal of arid environment*. **2**, 49-55.
- Handa S S., Khanuja S. P. S., Longo G et Rakesh D. Du.,2008.** Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. Edition United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology,266p
- Hawkey P.M., 2008.** Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *British Journal of Pharmacology* , **153**, 406–413.
- Hayet E., Maha M., Samia A., Mata M., Gros P., Raida H., Mohamed A. M., Mohamed A. S., Gutmann L., Mighri Z. et Mahjoub A., 2008.** Antimicrobial, antioxidant, and antiviral activities of *Retama raetam* (Forssk.) Webb flowers growing in Tunisia . *World J Microbiol Biotechnol*, **24**,2933–2940 .
- Hellal Z., 2011.** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *citrus*. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire magister université de TISI-OUZO .120p.
- Hennebelle T., Sahpaz S et Bailleul F., 2004.** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, **1**, 3-6.
- Hilan C., Sfeir R., Jawish D et Aitour S., 2005.** Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de La Famille des *Lamiaceae*. *Lebanese Science Journal*, **7(2)**,13-22
- Hostettmann K et Marston A., 1995.** Saponins. Chemistry and pharmacology of natural products. *Cambridge University Press*, Cambridge, isbn-10: 0521020174, p 1, 2
- Hota S., Hirji Z., Stockton K., Lemieux C., Dedier H., Wolfaardt G et Gardam M. A., 2009.** Outbreak of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Colonization and Infection Secondary to Imperfect Intensive Care Unit Room Design. *Infection control and hospital epidemiology*, **30(1)**.

Huang H.N., Rajanbabu V., Pan C.Y., Chan Y.L., Wu C.J et Chen J.Y., 2013. **Use of the antimicrobial peptide Epinecidin-1 to protect against MRSA infection in mice with skin injuries.** *Biomaterials*. 34, 10319-10327.

Hussain A.I., Anwar F., Sherazi S.T.H et Przybylski R., 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depend on seasonal variations. *Food Chemistry*. 108, 986-995.

I, J

Iserin P., 2001. Encyclopedie des Plantes Médicinales (identification, preparation, soin) .2^{ème} Edition Larousse, Dorling Kindersiey Limited, Londres, 335p.

Ismail M., 2006. Central Properties and Chemical Composition of *Ocimum basilicum* Essential Oil. *Pharmaceutical Biology*, 44, 619-626.

Isorez G., 2007. Contribution à la chimie des flavonoïdes : Accès à des analogues de pigments des vins rouges. Thèse Doctorat, Université de Louis Pasteur de Strasbourg, 228p.

Janssen A.M., Scheffer J.J.C et Baerheim Svendsen A., 1976. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976–1986 literature review. *Aspect of the test methods. Planta Medica*, 53, 395–398.

Jessica T., Claire K., Joël P., Jean-Olivier D et Jacques D., 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113, 1226–1233.

Joshi R.K., 2013. Chemical Composition of the Essential Oil of Camphor Basil (*Ocimum kilimandscharicum* Guerke). *Global Journal of Medicinal Plant Research*, 1, 207-209.

Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A., Stevens P., 2002, Botanique systématique, une perspective phylogénétique. 1^{ère} Edition. Université de Boeck, Paris, 467p.

K, L

Kalamouni., 2010. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse Doctorat, université de Toulouse, 263p.

Kau A.L., Martin S.M., Lyon W., Hayes E., Caparon M.G et Hultgren S.J., 2005. *Enterococcus faecalis* Tropism for the Kidneys in the Urinary Tract of C57BL/6J Mice. *Infection and Immunity*. 4, 2461–2468.

Kaurinovic B., Popovic M., Vlasisavljevic S et Trivic S., 2011. Antioxidant Capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. Extracts, *Molecules*. 16, 7401-7414.

Kebieche., 2009. Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L: effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse Doctorat, Université de Constantine, 143p.

Khalil E.A., Afifi F.U et Al-Hussaini M., 2007. Evaluation of the wound healing effect of some Jordanian traditional medicinal plants formulated in Pluronic F127 using mice (*Mus musculus*). *Journal of Ethnopharmacology*, **109**, 104-112.

Khanbabaee K et van Ree T., 2001. Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep*, **18**, 641–649

Khelifa L. H., Brada M., Brahmi F., Achour D., Fauconnier M.L et Lognay G., 2012. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil of *Ocimum basilicum* Leaves from the Northern Region of Algeria. *Topclass Journal of Herbal Medicine*, **1(2)**, 25-30.

Khoudja K-N., -Makhlouf B. L et Khodir M., 2014. Antioxidant capacity of crude extracts and their solvent fractions of selected Algerian *Lamiaceae*. *Industrial Crops and Products*, **52**, 177– 182

Klevens R.M., Morrison M.A., Nadle J., Petit S., Gershman K., Ray S et al., (2007). Invasive *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* infections in the United States. *The Journal of the American Medical Association*, **298**, 1763-1771.

Kluytmans J., van Belkum A et Verbrugh H., 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews*, **10 (3)**, 505-520.

Kocić-Tanackov S ., Dimić G, Lević J., Tanackov I et Tuco D., 2011. Antifungal activities of basil (*Ocimum basilicum* L.) extract on *Fusarium* species. *African Journal of Biotechnology*, **10(50)**, 10188-10195.

Konishi M., Hano Y., Takayama M., Nomura T., Hamzah A.S., Ahmad R.B et Jamani H., 1998. Triterpenoid saponins from *Hedyotis nudicaulis*. *Phytochemistry*. **48**, 525–528.

Kpemissi Amana E., 2007. Les Anacardiaceae Du Togo: Etudes botaniques, écologiques et propriétés antifongiques. Thèse Doctorat, Université de Reims Champagne-Ardenne et LOMÉ, 77p.

Kulisik T., Radonic A., Katalinic V et Milos M., 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food chemistry*, **85**, 633-640.

Kwon J.H., Bélanger J.M.R., Jocelyn Paré J.R et Varoujan Yaylayan A., 2003. Application of the microwave-assisted process (MAPTM*) to the fast extraction of ginseng saponins. *Food Research International*, **36**, 491-498.

Kyle J. A.M et Duthie G .G., 2006. Flavonoids in Foods in Andersen Ø. M et Markham K. R. flavonoids *Chemistry, Biochemistry and Applications* USA. Editions *Taylor et Francis Group*, 1197p

Labra M., Miele M., Ledda B., Grassi F., Mazzei M et Francesco S., 2004. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Plant Science*, **167**, 725–731.

Lagunez Rivera L., 2006. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. Thèse Doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse, 335p.

Lahlou M., 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother. Res.* **18**, 435-448.

Lanzotti V., Romano A., Lanzuise S., Bonanomi G et Felice S., 2012. Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa L. phytochemistry.* **74**, 133–139.

Le Loir Y., Baron F et Gautier M., 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research : GMR*, **2(1)**, 63-76.

Lee C-J., Chen L-G., Chang T-L., Ke W-M., Lo Y-F et W C-C., 2011. The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in *Lamiaceae* plants. *Food Chemistry*, **124**, 833–841.

Li D., Baert L et Uyttendaele M., 2013. Inactivation of food-borne viruses using natural biochemical substances. *Food Microbiology.* **35**, 1-9.

Li J., Zu Y.G., Fu Y.J., Yang Y.C., Li S.M., Li Z.N et al., 2010. Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge). kernel and evaluation of its antioxidant activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* **11**, 637–643.

Lopez-Salas P., Llaca-Diaz J., Morfin-Otero R., Tinoco J.C., Rodriguez-Noriega E.C., Lorena Salcido-Gutierrez., Gonzalez G.M., Mendoza-Olazarán S et Garza-Gonzalez E., 2013. Virulence and Antibiotic Resistance of *Enterococcus faecalis* Clinical Isolates Recovered from Three States of Mexico. *Detection of Linezolid Resistance*, **44**, 422-428.

Lugasi A., Hóvári J., Sági K.V et Bíró L., 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, **47(1-4)**, 119-125.

M, N

Macheix J.J., Fleuriet A et Jay-Allemand C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.

Macheix J.J., Fleuriet A et Sarni-Manchado P., 2006. Composés phénoliques dans la plante : structure, biosynthèse, répartition In Sarni-Manchado P et Cheynier V. *les polyphénols en agroalimentaire.* Editions TEC et DOC .Lavoisirm, 399p.

Mahmoud AB, Zahran WA, Hindawi GR, Labib AZ, Galal R., 2013. Prevalence of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Patients with Nosocomial Infections at a University Hospital in Egypt, with Special Reference to Typing Methods. *J Virol Microbiol.*

- Mamadou M.B., 2002.** Action pharmacologiques des tanins. Thèse Doctorat, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, 57p.
- Mansour., 2009.** Investigation photochimique de l'extrait *N*-butanol de l'espèce *Centaurea Africana*. Thèse Magister, Université de Constantine, 114p.
- Marinova G et Batchvarov V., 2011.** Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, **17**, 11-24.
- Matasyoh L.G., Matasyoh J.C., Wachira F.N., Kinyua M.G., Thairu Muigai A.W. et Titus Mukiyama K., 2007.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. *African Journal of Biotechnology*, **6 (19)**, 760-765.
- Mehdi N., 2011.** Essai de lutte biologique contre la fusariose vasculaire de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Mémoire Magister, Université de Tizi Ouzo, 103p.
- Meziani M., 2012.** Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques: Cas des *Entérobactéries* et *Pseudomonas*. Thèse Magister, université de Constantine, 96p.
- Mohammedi Z., 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire Magister, Biologie, Université de Tlemcen, 103p.
- Molyneux P., 2004.** The use of the stable free radical diphenyl picryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin, Sci. Technol.*, **26**, 211-219.
- Morello J.A., Granato P.A et Mizer H.E., 2003.** Laboratory Manual and Workbook in Microbiology Applications to Patient Care. 7^{ème} Edition. *Spiral Bound.Comb*, 286 p.
- Mori A., Nishino C., Enoki N et Tawata S., 1987.** Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, **26**, 2231-2234.
- Mueller M.S., Runyambo N., Wagner I., Steffen B., Dietz K et Heide L., 2004.** Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **98**, 318-321.
- Nacoulma A.P., 2013.** Reprogrammation métabolique induite dans les tissus hyperplasiques formés chez le tabac infecté par *Rhodococcus fascians*: aspects fondamentaux et applications potentielles. thèse Doctorat. Université de Bruxelles, 187p
- Naczk R. A. M et Shahidi F., 2000.** Antioxidant Activity of Crude Tannins of Canola and Rapeseed Hulls. *JAOCS*, **77(9)**.
- Naczk M et Shahidi F., 2004.** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, **1054**, 95-111.

Ngassoum M.B., Ousmaila H., Ngamo L.T., Maponmetsem P.M., Jirovetz L et Gerhard B., 2004. Aroma compounds of essential oils of two varieties of the spice plant *Ocimum canum* Sims from northern Cameroon. *Journal of Food Composition and Analysis*, **17**, 197-204.

Ngom S., Faye F.D., Diop M., Kornprobst J.M et Samb A., 2012. Composition chimique et propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Ocimum basilicum* et de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Récoltés dans la région de Dakar au Sénégal. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège.*, **81**, 166 – 175.

Nijveldt R.J., Nood E., Hoorn D.E., Boelens P.G., Norren K et Leeuwen P., 2001. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin Nutr*, **74**, 418–425.

Nouioua w., 2012. Biodiversité et ressources phytogénétiques d'un écosystème forestier « *Paeonia mascula* (L.) Mill. ».Memoire Magister, universite de SETIF, 80p.

O, P

Özcan M et Chalchat J.C., 2002. Essential Oil Composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. *Czech J. Food Sci*, **20**, 223–228.

Pascual-Villalobos M.J et Ballesta-Acosta M.C., 2003. Chemical variation in an *Ocimum basilicum* N germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**, 673–679.

Pasquali M., Spanu F., Scherm B., Balmas V., Hoffmann L., et al., 2013. *FcStuA* from *Fusarium culmorum* Controls Wheat Foot and Root Rot in a Toxin Dispensable Manner. *PLoS ONE*, **8**(2): e57429.

Patil D.D., Mhaske D.K et Wadhawa G.C., 2011. Antibacterial and Antioxidant study of *Ocimum basilicum* Labiatae (sweet basil). *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, **2**, 104-112.

Paton A., Harley M.R. Et Harley M.M., 1999. 1.*Ocimum*: an overview of classification and relationships. *OPA (Overseas Publishers Association)*, 38p.

Pelli et Marika Lyly., 2003. Les antioxydants dans L'alimentation. *Biotechnology* Finlande. Project n° QLK1-CT - 2000 – 00040.17p.

Pengelly A., 2004. The constituents of medicinal plants an introduction to the chemistry and therapeutic of herbal medicines. *Editions Allen ET Unwin*, Australie, 172p.

Petko Ivanov PENCHEV., 2010 . Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse Doctorat. Université de Toulouse, 239p.

Poirot R.2007. Méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matières végétale. Thèse Doctorat. Université de Toulouse ,133p.

Popovici C., Saykova I et Tylkowski B., 2009. Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, **4**, 25-39.

Pourmorad F., Hosseinimehr S.J et Shahabimajd., 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected N. Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. **5**, 1142-1145.

Q, R

Quettier-Deleu C et al., 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, **72**, 35–42.

Rahman I et Chung S., 2011. Dietary polyphenols, deacetylases and chromatin remodeling in inflammation. *Nutrigenet Nutrigenomics*, **3**(4-6), 220-230.

Rai M.K., Acharya D et Wadegaonkar P., 2003. Plant derived-antimycotics: Potential of Asteraceous plants, In: Plant-derived antimycotics: Current Trends and Future prospects, Haworth press. *N-York. Londin. Oxford*, 165-185.

Rammal H., Bouayed J., Desor F., Younos C et SoulimaninR., 2009. Notes ethnobotanique et phytopharmacologique de *Hypericum perforatum* L. phytothérapie, **7**, 161-164.

Rasooli I., 2005. Antibacterial and Chemical Properties of *Thymus persicus* Essential Oils at Pre and Flowering Stages. *Targeted Screening of MAPs, Economics & Law*, **4**, 139-147 .

Rates S.M.K., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*, **39**, 603–613

Raven P. H., Evert R. F Eichhorn S. E., 2007. Biologie végétale. Traduit de l'anglais. Edition de Boek et Larcier S.a.a. 733p.

Rayan D., Antolovich M., Prenzler P., Robars Ket Lavee S., 2002. Biotransformations of phenolic compound in *olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, **92**, 147-176.

Razafintsalama V., Sarter S., Mambu L., Randrianarivo R., Petit T., Rajaonarison J.F., Mertz C., Rakoto D et Jeannoda V., 2013. Antimicrobial activities of *Dilobeia thouarsii* Roemer and Schulte, a traditional medicinal plant from Madagascar. *South African Journal of Botany*, **87**, 1–3.

Reguieg L. 2011. , Using medicinal plants in Algeria . *Am. J. Food. Nutr*, 1(**3**), 126-127.

Ricardo da Silva J.M., Darmon N., Fernandez Y et Mitjavila S. 1991. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**, 549-1552.

Richardin P., Capderou C., Flieder F., BONmassies S et Raison D., 1988. Analyse de quelques tannins végétaux utilisés pour la fabrication des cuirs. *Edition Academia*, 180p

Rigney U., Kimber S et Hindmarch I., 1999. The effects of acute doses of standardized *Ginkgo biloba* extract on memory and psychomotor performance in volunteers. *Prevention. Aug*, **13**, 408-15.

Rios J.L., Recio, M.C et Villar A., 1988. Screening Methods for Natural Products with Antimicrobial Activity: A Review for the Literature. *Journal of Ethnopharmacology*, **23**, 127-149.

Rizzi A., Schuh R., Bruckner A., Cvitkovich B., Kremser L., Jordis U., Frohlich J., Kuenburg B et Czollner L., 1999. Enantiomeric resolution of galanthamine and related drugs used in anti-Alzheimer therapy by means of capillary zone electrophoresis employing derivatized cyclodextrin selectors. *Journal of Chromatography B*. **730**, 167-175.

Rolland Y., 2004. Antioxydants naturels végétaux. *OCL* vol. 11 N° 6, 419-429.

Runyoro D., Ngassapa O., Vagionas K., Aligiannis N., Graikou K et Chinou I., 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum species* growing in Tanzania. *Food Chemistry*, **119**, 311–316

S, T

Saidana D., Mahjoub S., Boussaada O., Chriaa J., Mahjoub M.A., Cheraif I., Daami M., Mighri Z et Helal A.N., 2008. Antibacterial and Antifungal Activities of the Essential Oils of Two Saltcedar Species from Tunisia. *J Am Oil Chem Soc*. **85**, 817–826.

Sajjadi S.E., 2006. Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum L.*) from Iran. *Daru*, **14(3)**, 128-130.

Salhi S., Fadli M., Zidane L et Douira A., 2010. Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). *Lazaroa*. **31**, 133-146.

Samseny R.A., 2003. Contribution à l'étude photochimique d'une plante traditionnellement utilisée comme poison d'épreuve au Gabon : Le *Strychnos Icaja* Baillon (MBundu) ; *Loganiaceae*. Thèse Doctorat, Université de Bamako, 89p.

Satrani B., Ghanmi M., Abdellah Farah A., Aafi A., Fougrach H., Bourkhiss B., Bousta D et Talbi M., 2007. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. **146**, 85-96.

Scherm B., Balmas V., Spanu F., Pani G., Delogu G., Pasquali M et Migheli Q., 2012. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Mol Plant Pathol*, **14(4)**, 41-323.

Schwämmle B., Winkelhausen E., Kuzmanova S et Steiner W., 2001. Isolation of Carvacrol Assimilating Microorganisms. *Biotechnol*, **39**, 341-345.

- Sedra M.H et Besri M., 1994.** Évaluation de la résistance du palmier dattier au bayoud causé par *Fusarium oxysporum F.sp albedinis*. Recherche d'une méthode de discrimination des vitroplants acclimatés en serre. *Agronomie*, **14**, 467-472.
- Seidel V. 2006.** Initial and Bulk Extraction in Sarker S. D., Latif Z et Gray A. I., Natural Products Isolation. 2^{ème} Edition Humana Press Inc, Totowa, New Jersey, 529p
- Shaaban H. A.E. , El-Ghorab A. H. et Shibamoto T., 2012.** Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *The Journal of Essential Oil Research*, **24**, (2), 203–212.
- Shafique M., Jabeen Khan S et Habib Khan H., 2011.** Study of antioxidant and antimicrobial activity of sweet basil (*ocimum basilicum*) essential oil. *Pharmacologyonline*.1, 105-111.
- Sharma O.P et Bhat T.K., 2009.** DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*. **113**, 1202–1205.
- Smallfield B., 2001.** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research*, **45**, 4p.
- Sparg S.G., Light M.E et van Staden J., 2004.** Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal. Ethnopharmacol.* **94**, 219–243.
- Suppakula P., Sonneveldb K., Stephen W., Biggerb et Miltz J., 2008.** Efficacy of polyethylene-based antimicrobial films containing principal constituents of basil. *LWT*, **41**, 779-788.
- Svoboda K.P et Hampson J.B., 1999.** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW*, 1-17.
- Tanguy M et Begué-Simon A.M., 2009.** Antioxydants Première partie : les antioxydants dans l'alimentation. *Rev. Medicine*, 256-260.
- Tantaou A et Boisson I.C., 1991.** Compatibilité végétative d'isolats du *Fusarium oxysporum F. sp. albedinis* et de *Fusarium oxysporum* de la rhizosphère du Palmier dattier et des sols de palmeraies. *Phytopnth. Inedit.* **30**, 155-163.
- Telci I., Bayram E., Yılmaz G et Avcı B., 2006.** Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum L.*). *Biochemical Systematics and Ecology*, **34**, 489-497.
- Telli A., Mahboub N., Boudjeneh S., Siboukeur O. E. K et moulti-mati., 2007.** Optimisation des conditions d'extraction des Polyphénols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera l*) Variété ghars. *Annales des Sciences et Technologie*, **2(2)**, 107-114.

Tiveron A.P., Melo P.S., Bergamaschi K.B., Vieira T.M.F.S., Regitano-d'Arce M.A.B et Severino M., Alencar., 2012. Antioxidant Activity of Brazilian Vegetables and Its Relation with Phenolic Composition. *Int. J. Mol. Sci*, **13**, 8943-8957.

Torck M et Pinkas M., 1992. Les Flavonoïdes du Genre *Vicia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **20**, 453-457.

Tremblay C., 2008. Mise à jour du traitement des infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. *Pharmactuel*, **41** (5), 284-295.

U, V

Ullah M.F. et Khan W. M .D., 2008. Food as Medicine: Potential Therapeutic Tendencies of Plant Derived Polyphenolic Compounds. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **9**, 187-196.

Umerie S.C., Anaso H.U et Anyasoro L.J.C., 1997. Insecticidal Potentials of *Ocimum basilicum* Leaf-extract. *Bioresource Technology*, **64**, 237-239.

Urquiaga I et Leighton F., 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, **33** (2), 55-64.

Valour F., Blanc-Pattin V., Freydière A.M., Bouaziz A., Chanard E., Lustig S., Ferry T et Laurent., 2013. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistance in bone and joint infection samples: evaluation of the GeneXpert MRSA/SA SSTI assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Article in press.

Van Immerseel F., De Buck J., Boyen F., Pasmans F., Bertrand S., Collard J.M., Saegerman C., Hooyberghs J., Haesebrouck F et Ducatelle R., 2005. *Salmonella* dans la viande de volaille et dans les oeufs: Un danger pour le consommateur qui demande la mise en place d'un programme de lutte efficace. *Ann. Méd. Vét*, **149**, 34-48.

Vermerris W et Nicholson R., 2006. Phenolic compounds. *Biochemistry, Library of Congress*, 276 p.

Vijay P.N et Amasiddha B., 2013. Ethanobotany and qualitative phytochemical analysis of some indian medicinal plants. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, **4** (2),59-63.

W,Y

Wagacha J.M., Muthomi J.W., 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **62**, 87-9

Wei A et Shibamoto T., 2010. Medicinal activities of essentials oil: Rol in disease prevention in Watson R.R et Preedy V.R., Bioactive foods in promoting health :fruit and vegetabl. *Edition Elsevier. Inc. USA*, 729p.

Yoong Cheok C., Salman H.A et Sulaiman R., 2014. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*. **59**, 16–40.

Z

Zaouali Y., Bouzaine T et Boussaid M., 2010. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 3144–3152.

Zhiri A et Baudoux D., 2005. Huiles Essentielles Chémotypées et leurs synergies. *Edition Inspir Development*. Luxembourg, 80p

Les Annexes

Annexe A

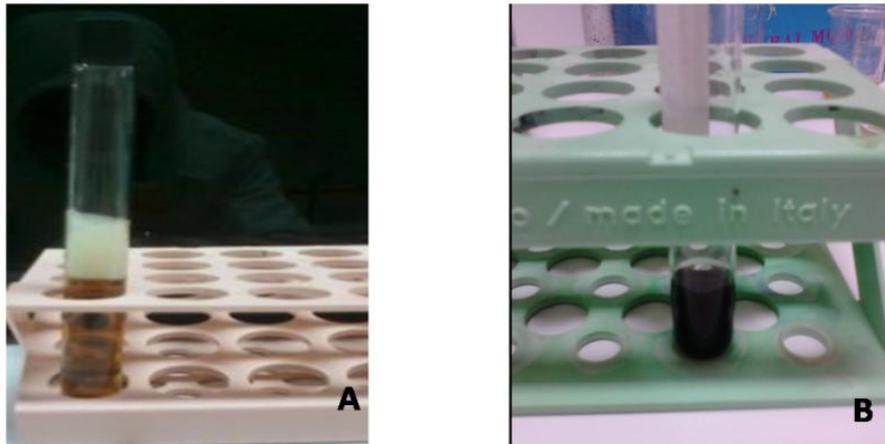


Figure A1 :Resultat de teste phytochimique ,Saponine (A) ,Tanin (B)

Resultat de teste de re-identification et purification



Figure A2 : resultat de galerie API *Candida albicans*

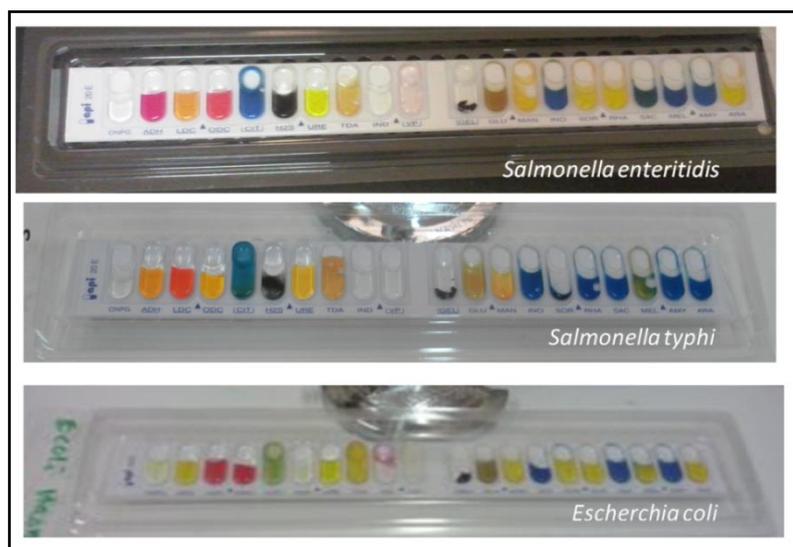


Figure A3:les résultats des galeries API20E pour les trois souches

Annexe B



Figure B1 :galerie classique d'*Escherichia coli*

Annexe C

Tableau C1 :l'effet de l'huiles essentielles sur les diamètres des colonies mycélienne de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis* chaque jours

Les jours	1j	2j	3j	4j	5j	6j	7j
T	0	9±0,55	23±0,6	35±0,54	38±1	59±1	73±1
Les Concentrations %	Les diamètre (mm)						
1/20 (5%)	0	0	0	0	0	0	0
1/50 (2%)	0	0	0	0	0	0	0
1/100 (1%)	0	0	0	0	0	0	0
1/250 (0,4%)	0	0	0	0	0	0	0
1/500 (0.2%)	0	0	0	0	11.25±2 .75	17±3	25±6
1/1000 (0.1%)	0	0	11±3	14±3	24±3	32 .5±3.5	43±4
1/2000 (0.05%)	0	7±3.4	15.5±3.9	18.5±3.9	28.33±4.04	39.66±3.05	47.5±0.5
1/5000 (0.02%)	0	8.6±2	20±1.5	23±2.64	30.66±4.04	47±2	49.33±7.37
1/10000 (0.01%)	0	9±4.5	22±5	25±7	37±6	52±1	64.33±1.52

Tableau C2:l'effet de l'huiles essentielles sur les diamètres des colonies mycélienne de *Fusarium culmurom* chaque jours

Les jours	1j	2j	3j	4j	5j	6j	7j
T	0	11±0,76	27±0,77	34±1,2	37±1,7	65±1	79±1,8
Les concentrations %	Les diamètres (mm)						
1/20 (5%)	0	0	0	0	0	0	0
1/50 (2%)	0	0	0	0	0	0	0
1/100 (1%)	0	0	0	0	0	0	0
1/250 (0,4%)	0	0	0	0	0	0	0
1/500 (0.2%)	0	0	0	0	0	0	0
1/1000 (0.1%)	0	0	0	0	0	10±0	13 .5±0
1/2000 (0.05%)	0	10.5±1	17±3	19.5±3.5	28±8	43±6	60.5±7.5
1/5000 (0.02%)	0	11±0	20±3.6	25±1	36.5±3.5	60±3	75.5±3.5
1/10000 (0.01%)	0	11±1.5	22±6	25±7	37±6	56.5±5.5	75±5

Annexe D

Tableau D1: Effet des extraits d'acétate d'éthyle sur le diamètre (mm) des colonies mycéliennes du *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis* et *Fusarium culmorum* chaque jours

Les jours μ^*	1j	2j	3j	4j	5j	6j	7j
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Albedinis</i>							
Témoin	0	10 \pm 0,66	23 \pm 1,5	34 \pm 1,2	48 \pm 1,8	68 \pm 1	72 \pm 1,5
Concentration mg/ml	les diamètres (mm)						
6	0	0	10 \pm 1,3	11.5 \pm 2	16 \pm 3,5	19 \pm 2,1	20 \pm 2
4	0	0	8.5 \pm 1,6	10 \pm 2	13 \pm 7	14 \pm 6	21 \pm 2,5
2	0	7 \pm 0,7	11 \pm 5	17 \pm 5	21 \pm 3	22 \pm 1,1	30 \pm 0,6
1	0	8 \pm 2,1	15 \pm 1	20 \pm 2,5	27 \pm 2,5	37 \pm 2	37.5 \pm 0,67
0.5	0	8.5 \pm 3	18 \pm 4	24 \pm 3,5	32 \pm 4	50 \pm 4,4	51 \pm 0
0.25	0	8.5 \pm 0	20 \pm 5,2	25 \pm 1	34 \pm 4	47 \pm 7	51 \pm 4
<i>Fusarium culmurom</i>							
T ⁻	0	11 \pm 1	27 \pm 4	34 \pm 1,25	56 \pm 0,75	59 \pm 4	80 \pm 2,66
Concentration	les diamètres (mm)						
6	0	0 \pm 1	8 \pm 3	9 \pm 3	11 \pm 2,5	17 \pm 4	18 \pm 0,75
4	0	0 \pm 3	9 \pm 3	9 \pm 2	14 \pm 2	18 \pm 1,12	27 \pm 1,5
2	0	0 \pm 1	9.5 \pm 4	11 \pm 1,2	18 \pm 3,6	25 \pm 2,9	32 \pm 2,1
1	0	10 \pm 4	15 \pm 5,1	17 \pm 2	29 \pm 6,1	32 \pm 1	48 \pm 3
0.5	0	10 \pm 2,9	16 \pm 1,5	19 \pm 5	29 \pm 1	39 \pm 5,4	54 \pm 2
0.25	0	11 \pm 1,2	15 \pm 2,5	24 \pm 1,3	37 \pm 2	40 \pm 1,3	60 \pm 1,83

Annexe E

Tableau E1 : Effet des extraits Butanolique sur le diamètre (mm) des colonies mycéliennes du *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis* et *Fusarium culmorum* chaque jours

Les jours	1j	2j	3j	4j	5j	6j	7j
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Albedinis</i>							
Témoin	0	10±0,66	23±1,5	34±1,2	48±1,8	68±1	72±1,5
Concentration mg/ml	les diamètres (mm)						
6	0	0	14±1,2	16±2,2	27±2,5	32±0,25	36±0,66
4	0	8±1	13±3	20±2	28±1,2	29±1	40±0,5
2	0	8.5±2,3	15±6	21±3	28±1	33±1,25	42±2,3
1	0	10±2,5	16±2,9	26±2,25	36±1	43±2,1	53±1,25
0.5	0	10±2	18±3	31±5	46±1,6	54±1,5	64±0,75
0.25	0	13±4	23±2	34±3	47±2,3	58±3	68,5±6
<i>Fusarium culmurom</i>							
Témoin	0	11±1	27±4	34±1,25	56±0,75	59±4	80±2,66
Concentration	les diamètres (mm)						
6	0	8.5±3	10±1	12±1,25	17±1	25±2,3	34±0,54
4	0	9±2	12±1,5	20±3	22±2,9	33±4	45±0,66
2	0	10±1,5	13±2,3	19±0.5	27±2	41±2	49±2
1	0	10.5±0.25	18±2,9	19±1	31±4	42±2	59±0
0.5	0	11±2	23±3	33±0.5	55±3	58±1,25	80±2,22
0.25	0	11±2	23±0.25	34±1,5	55±0,75	58.5±3	80±1,5

Annexe F

Composition des milieux de culture et de réactifs

1. Potatoes dextrose Agar (PDA : pour les champignons)

Infusion de pomme de terre	200 ml
Glucose.....	15 g
Agar-agar.....	20 g
Eau distillée.....	qsp 1L

2. Mueller-Hinton Agar (M-H : pour souches bactériennes)

Infusion de viande de boeuf déshydratée.....	3 g
Hydrolysate de caséine.....	17,5 g
Amidon de maïs.....	1,5 g
Agar-agar.....	16 g
Eau distillée.....	qsp 1L
pH final.....	7,2 – 7,4

3. Bouillon Nutritif (BN : pour l'enrichissement)

Peptone pancréatique.....	10 g
Extrait de viande.....	5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Eau distillée.....	qsp 1L
pH final.....	7,2 – 7,4

4. Chapman (sélectif pour *Staphylococcus aureus*)

Extrait de viande.....	3 g
Extrait de levure.....	3 g
Tryptone.....	5 g
Peptone bactériologique.....	
Chlorure de sodium.....	70 g
Mannitol.....	10 g
Rouge de phénol.....	0,05 g
Agar-agar.....	18 g
Eau distillée.....	qsp 1L

Annexe G**5.Sabouraud gélose (pour les levures)**

Neopeptone.....	30 g
Glucose.....	20 g
Agar-agar.....	20 g
Eau distillée.....	qsp 1L

6.Solution d'Agar 0,2%

Agar-agar.....	2 g
Eau distillée.....	qsp 1L

7.Réactif de Mayer

KI.....	5 g
HgCl ₂	1,358 g
Eau distillée.....	qsq100 ml

8.Réactif de Wagner

KI.....	2 g
1,27g.....	d'I ₂
Eau distillée.....	qsq100 ml