

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة خميس مليانة
Université Khemis Miliana
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de Biologie



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention d'un diplôme de **Master** en

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologique

Spécialité : Analyses biologiques et biochimiques

*Etude des activités antibactériennes et antioxydantes des extraits d'*Ocimum basilicum* (basilic) dans la région de Aïn Defla*

Soutenu le : 27 Juin 2016, Devant le jury:

par :

- M^{elle}. Métali Mouna

- M^{me}. Kerras Kheira

Président : Mr Mahi. M

MAA U.D.B Khemis Miliana

Promotrice : Mme Daoudi. A

MAA U.D.B Khemis Miliana

Examineur : Mme Saadi. F

MAA U.D.B Khemis Miliana

Examineur : Mr Aoun. O

MCB U.D.B Khemis Miliana

Année universitaire 2015/2016



Dédicace

*Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de mes efforts
A ceux que j'aime le plus au monde mes très chers parents,
leurs sacrifices et leurs encouragements toute ma vie, je ne
saurais jamais comment exprimer mes sentiments pour avoir
veillé sur mon éducation, jamais je ne peux les remercier
assez de m'avoir donné le meilleur.*

A mon fiancé Hakim.

A ma chère grand-mère.

A ma chère sœur Zyzy et son mari AHMMED.

A mes chers frères Amine et Youssef.

Je n'oublie jamais la générosité illimitée de mes amis,

Amira, Houria, Maria, Amina, Naima, Yesmina,

Soumia, Amel et Hafessa.

A mon oncle Ahmed et mes tantes.

A tout mes cousines Malika, Fatom, Sousou, Ourda et Djamila.

A tout mes voisines Lila, Fatma et Kheira.

*A mon binôme Mouna avec qui j'ai partagé les bons et
les durs moments.*

*A toute ma famille et à tout ce qui me connais-je-vous
aime.*

Kheira



Dédicace

*A mes très chers parents, sans eux je n'ai pas pu être ce que je suis,
en reconnaissance de leurs efforts, leurs amours et leurs
encouragements durant toute ma vie*

*A mes adorables sœurs pour leurs soutiens
moral et leurs aides merci d'être là pour moi.*

*A mes très chers frères qui ont toujours
été à mes côtés.*

*A mon binôme Kheira avec qui j'ai partagé les bons et
les durs moments.*

A mes beaux frères

A mes belles sœurs

A tous mes oncles, mes tantes, mes cousins

A tous mes amis

A tous ceux qui m'ont encouragé et m'ont

Apporté leur soutien.

Mouna



Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH EL KARIM et le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qui nous a donné durant toutes les années d'études. Recevez ici nos sincères remerciements pour la confiance, les conseils que vous nous avez accordés tout le long de ce travail. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité et votre gentillesse madame DAOUDI AHLAM.

Nous tenons à remercier mes dames et messieurs les membres de jury

L'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner ce travail.

Nous remercions tous les enseignants de département "Biologie"

spécialement: Mr. ROUABEH A, Mr. MAHI M, Mr. BOURAS, Mr. MAROC, Mr. AOUN

Mr DJEZZAR, Mr Arous et Mr. LAKHDER EZZINE.

Melle. GUETARNI H, Melle. LADAIDI, Mme. SAADI. F, Mme DJIROUN, Mme AROUS et Mme. SARI. F

tous qui nous ont aidés de près ou loin pendant toutes les années d'études.

Nous remercions également Mr. FAYSAL, Mr. ELHADJ et Mr. AMINE, Melle. AICHA, NAIMA, WASSILA, FATIHA et Mme. NADJIBA

veuillez trouver ici l'expression de nos gratitudes pour nous avoir accueillie au sein de vos laboratoires. Soyez assurées de nos profonds respects et de nos vives reconnaissances pour nous avoir fait bénéficier de vos expériences et de vos rigueurs scientifiques et professionnelles.

Nous profitons aussi de cet occasion pour adresser nos remerciements à nos parents pour leur sacrifices et à toutes les familles qui nous ont toujours encouragé et soutenu tout au long des années d'étude. Nous remercions en fin tous ceux qui n'ont pas été cités dans ces quelques lignes et qui ont contribués de près ou de loin par leur aide au bon déroulement de ce travail.

Liste des abréviations

Liste des abréviations

AFNOR - NF : Association Française de Normalisation - Norme Française.

AAO : Activité Antioxydant.

AAR : Activité antiradicalaire.

AG : Acide gras.

AM : Atmosphère Modifiée.

ATCC : American Type Culture Collection

CAT : Capacité antioxydante totale.

CL50 : Concentration inhibitrice 50.

CMB : Concentration minimum bactéricide.

CMI: Concentration minimum d'inhibition.

DL 50 : Dose létale 50.

DMSO : Di-Méthyl-Sulf-Oxide

DPPH : 2,2 -diphényl -1- picrylhydrazyl

EO : Essential Oil

Ext-aq : Extrait aqueux.

HD : Hydrodistillation.

HE : Huile essentielle.

I_A : Indice d'acide.

I_E : Indice d'ester.

I_S : Indice de saponification.

mg d'EAA / ml : milligramme d'Equivalent Acide Ascorbique par millilitre.

mg EAA/g Ms : milligramme Equivalent d'Acide Ascorbique par gramme de matière sèche.

NF : Norme Française.

Liste des abréviations

O. basilicum: *Ocimum basilicum*.

ppm : partie par million.

R : Radical libre.

RH : Radical libre d'un acide gras insaturé.

ROOH : Péroxyde lipidique.

t / ha : tonne par hectare.

t: tonne.

UFC/g : Unité Fermante Colonie par gramme.

Vit C : Vitamine C.

Liste des figures

Figure 01 : Présentation d' <i>Ocimum basilicum</i> L. (Pousset, 2004)	6
Figure 02 : Présentation morphologique des feuilles de basilic (Grazza et Khamouli, 2007)	6
Figure 03 : Les graines d' <i>Ocimum basilicum</i> L. (Dreamstime, 2016)	7
Figure 04 : Mécanisme d'Auto-oxydation des lipides. (Eymard, 2003)	17
Figure 05 : Structure de l'acide rosmarinique (Boyadzhiev, 2006)	18
Figure 06 : Structure de la vitamine E (Diarra, 2006)	18
Figure 07 : Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (Guinoiseau, 2010)	20
Figure 08 : Le basilic : a. parties aériennes, b. feuilles fraîches, c. feuilles sèches	22
Figure 09 : Montage expérimental de l'hydrodistillation au laboratoire	24
Figure 10 : Préparation des échantillons des extraits d' <i>O. basilicum</i> et de vitamine C	31
Figure 11 : Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (Congo, 2012)	32
Figure 12 : Aromatogramme	35
Figure 13 : Schéma du test de l'activité antibactérienne des HE d' <i>O. basilicum</i> sur la viande de poulet inoculée avec <i>S. typhimirium</i>	41
Figure 14 : Teneur en humidité et en matière sèche d' <i>O. basilicum</i> de la région de Ain Defla	42
Figure 15 : l'HE d' <i>O. basilicum</i>	44
Figure 16 : La capacité antioxydante totale des extraits d' <i>O. basilicum</i>	46
Figure 17 : Résultats de l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle d' <i>Ocimum basilicum</i> par le test DPPH	47

Liste des figures

Figure 18 : Résultats de l'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux d' <i>Ocimum basilicum</i> par le test DPPH	48
Figure 19 : Résultats de l'aromatogramme des extraits d' <i>O. basilicum</i>	50
Figure 20 : Résultats de l'aromatogramme de l'HE d' <i>O. basilicum</i>	50
Figure 21 : Résultats de l'aromatogramme de l'extrait aqueux de l' <i>Ocimum basilicum</i>	51
Figure 22 : Comparaison entre les résultats de l'aromatogramme des extraits et de l'antibiogramme sur les bactéries Gram(-)	53
Figure 23 : Comparaison entre les résultats de l'aromatogramme des extraits et de l'antibiogramme sur les bactéries Gram (+)	53
Figure 24 : Résultats des CMI de l'HE d' <i>O. basilicum L</i>	56
Figure 25 : Résultats des CMI de l'extrait aqueux d' <i>O. basilicum</i>	57
Figure 26 : Effet inhibiteur de l'HE d' <i>O.basilicum</i> à différentes concentrations vis-à-vis de <i>S.typhimirium</i> inoculée sur la viande de poulet pendant le stockage à 6°C	59

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification botanique d' <i>Ocimum basilicum</i> (Riaz, 1999)	5
Tableau 02 : Composition moyenne de l'huile essentielle d' <i>O. basilicum</i> (Hurbet, 2007)	11
Tableau 03 : les principaux constituants des HE des parties aériennes du basilic (<i>Ocimum basilicum</i>) de W. Ain Defla (Brada <i>et al.</i>, 2013; Baser et Buchbauer, 2010; Botrel, 2001; Compagnie, 2015 ; LCSS, 2016 ; Booksofdante , 2014)	12
Tableau 04 : Caractéristiques de l'huile essentielle de basilic (Max, 2008)	13
Tableau 05 : Quelques conservateurs chimiques autorisés (eureka, 2015)	14
Tableau 06 : Quelques conservateurs alimentaires traditionnels (eureka, 2015)	15
Tableau 07 : Caractéristiques organoleptiques de notre huile essentielle	43
Tableau 08 : Caractéristiques physico-chimiques de l' <i>Ocimum basilicum</i>	44
Tableau 09 : Qualification de l'activité antibactérienne de l'HE (après 7 jours d'incubation).	54
Tableau 10 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'HE d' <i>O. basilicum</i>	55
Tableau 11 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait aqueux d' <i>O. basilicum</i>	56

Table de matière

Introduction	1
Partie bibliographique	
Chapitre I : Matière végétale « <i>Ocimum basilicum</i> »	
I. Généralité	3
I.1. Définitions	3
I.1.1. Plantes médicinales	3
I.1.2. Plantes aromatiques	3
I.2. Classification des plantes aromatiques	3
II. Présentation de la plante sélectionnée	4
II.1. Présentation de la famille des Lamiacées	4
II.2. Basilic (<i>Ocimum basilicum</i>)	4
II.2.1. Nomenclature	4
II.2.2. Classification	5
II.2.3. Description	5
II.2.4. Variétés d' <i>Ocimum basilicum</i>	7
II.2.5. Habitat et culture	8
II.2.6. Récolte	8
II.2.7. Séchage et conservation	8
Chapitre II : Huiles essentielles d' <i>Ocimum basilicum</i>	
I. Définition	9
II. Localisation	9
II.1. Synthèse et formation des huiles essentielles au niveau des plantes	9
III. Composition chimique	10
III.1. Terpènes	10
III.2. Composés aromatiques	11
IV. Caractéristiques des huiles essentielles	12
IV.1. Caractéristiques organoleptiques	12
IV.2. Caractéristiques physicochimiques	13
Chapitre III : HE d' <i>O. basilicum</i> et la bioconservation	
I. Conservation alimentaire	14

Table de matière

I.1. Conservation chimique	14
I.2. Conservation traditionnelle	14
II. Inconvénients des additifs alimentaires	15
III. Bioconservation alimentaire par des extraits d' <i>O. basilicum</i>	16
III.1. Activité antioxydante des HE d' <i>O. basilicum</i>	16
III.1.1. Oxydation	16
III.1.2. Mode d'action des HE	18
III.2. Activité antibactérienne de l'HE d' <i>O. basilicum</i>	19
III.2.1. Généralité	19
III.2.2. Mode d'action des HE	20
IV. Toxicité de l'HE d' <i>O. basilicum</i>	21

Partie expérimentale

Chapitre IV : Matériel et méthodes

Partie I : Préparation et analyses physico-chimiques des extraits d'*O. basilicum*.

I. Matériel	22
I.1. Matériel biologique	22
I.2. Matériel non biologique	22
I.3. Produits et réactifs chimiques	23
II. Méthodes	23
II.1. Séchage de la plante	23
II.2. Détermination de la matière sèche et du taux d'humidité	23
II.3. Extraction des HE	24
II.3.3. Conservation de l'huile essentielle obtenue	25
II.4. Rendement	25
II.5. Caractérisation des huiles essentielles	26
II.5.1. Caractérisation organoleptique	26
II.5.2. Détermination des propriétés physico-chimiques	26
II.5.2.1. Propriétés physiques	26
II.5.2.2. Propriétés chimiques	27
II.6. Préparation de l'extrait aqueux	29

Partie II : Etude des activités antioxydantes et antibactériennes de nos extraits

I. Matériel	29
I.1. Matériel biologique	29
I.2. Matériel non biologique	30

Table de matière

I.3. Produits et réactifs chimiques	30
II. Méthodes	30
II.1. Activité antioxydante	30
II.1.1. Capacité antioxydante totale (CAT)	31
II.1.2. Test du piégeage du radical libre DPPH	32
II.2. Méthode d'étude de l'activité antibactérienne des extraits d' <i>O. basilicum</i>	34
II.2.1. Caractérisation microscopique des souches étudiées	34
II.2.2. Préparation des suspensions bactériennes	34
II.2.2.1. Préparations des prés cultures	34
II.2.2.2. Préparations des cultures jeunes	34
II.2.2.3. Ajustements de la concentration bactérienne	34
II.2.3. Activité antibactérienne des extraits	34
II.2.3.1. Méthode de l'aromatogramme	35
II.2.3.2. Test de sensibilité aux antibiotiques	36
II.2.3.3. Méthode de dilution en gélose (détermination des CMI)	37
<u>Partie III</u> : Bioconservation par l'HE d' <i>O. basilicum</i>	
I. Matériel	38
I.1. Matériel biologique	38
I.2. Matériel non biologique	38
I.3. Produits et réactifs chimiques	39
II. Méthodes	39
II.1. Test de contrôle de la qualité hygiénique	39
II.2. Effet inhibiteur de l'HE du basilic sur <i>S.typhirium</i> inoculées sur la viande de poulet	39
II.2.1. Protocole expérimental	39
II.2.2. Analyse microbiologique	40
Chapitre V : Résultats et discussion	
Partie I : préparation et analyses physico-chimiques des extraits d' <i>O. basilicum</i>	
I. Taux d'humidité	42
II. Rendement en HE	43
III. Caractérisation des huiles essentielles	43
III.1. Caractéristiques organoleptiques	43
III.2. Caractéristiques physico-chimiques	44
<u>Partie II</u> : Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne de nos extraits.	

Table de matière

I. Activité antioxydante	45
I.1. Capacité antioxydante totale (CAT)	45
I.2. Test du piégeage du radical libre DPPH	46
II. Activité antibactérienne des extraits	49
II.1. Aromatogramme	49
II.2. Qualification de l'activité antibactérienne de l'HE	54
II.3. Détermination des CMI	55
<i>Partie III : Bioconservation par l'HE d'<i>O. basilicum</i></i>	
I. Qualité hygiénique du poulet	57
II. Activité antibactérienne de l'HE du basilic appliquée sur la viande de poulet	58
Conclusion	61
Références	63
Glossaire	
Annexes	



Introduction générale

INTRODUCTION

La région méditerranéenne d'une manière générale, avec son climat doux et ensoleillé est particulièrement favorable à la culture des plantes aromatiques et médicinales. (**Anthoula, 2003**). Ces plantes ont été traditionnellement employées pour l'assaisonnement et la prolongation de la durée de conservation des aliments (**Wang et al., 2010**).

Les plantes aromatiques sont prometteuses et constituent une grande source d'antioxydants et d'antibactériens naturels pour l'industrie agroalimentaire. La présence des antioxydants 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 (**El kalamouni, 2010**).

Parmi les familles qui appartiennent à cette catégorie des plantes aromatiques et médicinales, la famille de Lamiacée représente une grande importance aussi bien pour son utilisation en industrie alimentaire et en parfumerie qu'en thérapeutique. Elle est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant (**Bakkali et al., 2008**). Le genre le plus cité dans la littérature est : *Ocimum basilicum* (**Lee et al., 2005**).

Notre choix s'est porté sur cette plante, car elle est ré pondue en Algérie ; elle est utilisée en conservation traditionnelle de certains aliments (concombre), ses huiles essentielles et leurs composants commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour la protection des aliments contre l'oxydation (**Caillet et al., 2007; Bouhdid et al., 2006**). Sans aucun doute, les conservateurs alimentaires chimiques ou synthétiques font partie de la panoplie des techniques et des moyens qui permettent d'assurer la sécurité du consommateur, d'allonger la durée de vie des produits alimentaires et de limiter leurs altérations par l'oxydation (**Multon, 2002**).

Cependant, la recherche de nouvelles molécules s'est avérée nécessaire car, ces substances synthétiques ont montré un certain nombre d'inconvénients et de limites d'utilisation ; elles sont avérées responsables d'effets indésirables. En effet, le

butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) sont suspectés avoir des effets carcinogènes (**Belhadj *et al.*, 2006**).

Le recours aux huiles essentielles s'avère être un choix pertinent face à un risque de contamination précis ou à la nécessité de réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques (**Caillet *et al.*, 2007**). Ceci nous a amené à étudier l'activité antibactérienne et l'activité antioxydante des extraits d'*O.basilicum*.

Notre étude a pour l'objectif de valoriser cette plante par :

- Préparation des extraits (huile essentielle et extrait aqueux) d'*O. basilicum*.
- Analyses physico-chimiques de l'HE d'*O. basilicum*.
- Evaluation des propriétés antioxydante et antibactériennes des extraits préparés.
- Application de l'huile essentielle dans la bioconservation alimentaire.



Partie bibliographique

Chapitre I :



Matière végétale

« O. basilicum »

Chapitre I : Matière végétale « Ocimum basilicum »

I. Généralités

Les plantes aromatiques constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Les propriétés des plantes dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques (**Mailhebiau, 1994**).

I.1. Définitions

I.1.1. Plantes médicinales

Selon la **pharmacopée française (1965)**, une plante médicinale est une drogue végétale qui peut être utilisée entière ou sous forme d'une partie de plante et qui possède des propriétés médicamenteuses. Ces plantes peuvent aussi avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques.

I.1.2. Plantes aromatiques

Les plantes aromatiques appartiennent à la fois au domaine des plantes médicinales et des matières premières industrielles d'origine végétale, et constituent des sources de substances naturelles complexes, destinées à apporter des caractères organoleptiques particuliers aux aliments (**Anton et Lobestein, 2005**).

I.2 Classification des plantes aromatiques

La classification des plantes peut se faire en fonction de nombreux intérêts (**Kateb, 1989**) :

- Classification botanique (systématique).
- Classification thérapeutique (action physiologique).
- Classification chimique (nature du principe actif).
- Classification commerciale (intérêt commercial)

La recherche bibliographique sur ces plantes montre qu'elles appartiennent essentiellement aux 3 familles botaniques suivantes : Astéracées, Lamiacées et Apiacées. (**El kalamouni, 2010**)

II. Présentation de la plante sélectionnée

II.1. Présentation de la famille des Lamiacées

La région méditerranéenne a été le centre principal pour domestication et culture de Lamiaceae. La famille des Lamiacées est l'une des plus répandues dans le règne végétal (Naghbi *et al.*, 2005).

La famille des Lamiacées connue également sous le nom des Labiées, comporte environ 258 genres pour 6900 espèces plus ou moins cosmopolites; mais dont la plupart se concentrent dans le bassin méditerranéen tel que le thym, la lavande et le romarin (Botineau, 2010). Elle est divisée en deux principales sous-familles : les *Stachyoideae* et les *Ocimoideae*.

Les Lamiacées sont des herbacées ayant la consistance et la couleur de l'herbe, parfois sous-arbrisseaux ou ligneuses (Botineau, 2010). Une grande partie de ces plantes sont aromatiques riches en l'huile essentielle d'où leur intérêt économique et médicinal. Toutes ont un appareil sécréteur à huile essentielle. Celle-ci s'accumule dans une cellule évoluant vers la glande sécrétrice et, sauf par rupture de l'enveloppe par frottement, ne sera séparée de la plante que par la sénescence des parties aériennes (Hubert, 2007).

Un très grand nombre des genres de la famille des Lamiaceae sont des sources riches en terpénoïdes, flavonoïdes et iridiodes, glycosylés et composés phénoliques (Lee *et al.*; 2005).

II.2. Basilic (*Ocimum basilicum*)

II.2.1. Nomenclature

O.basilicum sont des plantes à croissance rapide (*Ocimum* est dérivé du grec Okimon, okus signifiant rapide). (Hubert, 2007).

Le nom basilic vient du grec Basilikon qui signifie « plante royale » ; lui-même dérivé de bas-latin Basilicum Royal en référence à la grande estime portée à cette herbe (Kothari *et al.*, 2008).

- Nom botanique : *Ocimum basilicum*
- Nom commun (français) : Basilic
- Nom commun (Arabe): ريحان
- Appellation locale: حبق

Matière végétale « Ocimum basilicum »

- Autres noms : Herbe royal, Basilic romain, Grand basilic (Kothe, 2007)

II.2.2. Classification

O. basilicum désigne un genre de Magnoliophyta de l'ordre des Lamiales et de famille des Lamiacées (Tableau 01).

Tableau 01 : Classification botanique d'*Ocimum basilicum*.

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Ocimum</i>
Espèce	<i>Ocimum basilicum</i>

Source: (Riaz, 1999)

II.2.3. Description

O.basilicum est une plante annuelle de la famille des Lamiacées (Labiacée, Labiées) (Hurtel, 2000), herbacée ligneuse, feuillée, très ramifiée et parfumée.

- La tige : quadrangulaire, pouvant atteindre jusqu'à 1m de hauteur.
- Les feuilles : sont opposée, denticulées dans la partie supérieure, ovales, cuvées a la base, acuminées au sommet (Pousset, 2004). Elles sont petites ou large et toujours très brillantes (vert pale à vert foncé) (Figure 02).
- Les fleurs : bilabiées et petites, ont la lèvre supérieure découpée en quatre lobes, entourée d'une substance mucilagineuse qui se renfle dans l'eau comme celle de la graine de lin (Riaz, 1999). Elles sont de couleur crème, blanche, rose ou

Matière végétale « Ocimum basilicum »

violacée selon la variété (Arabici et Bayram, 2004; Koudjéga, 2004) (Figure 01).

- Graines : petites (fines), oblongues et marron foncé (Pousset, 2004), la durée de germinative de cette graine est de huit ans (Riaz, 1999). (Figure 03)
- Les fruits : sont des tétrakènes renfermant chacun une seule graine marron-noire oblongue.
- Le système racinaire : est du type pivotant (Arabici et Bayram, 2004).



Figure 01 : Présentation d'*Ocimum basilicum* L (Pousset, 2004)



Figure 02 : Présentation morphologique des feuilles de basilic (Khamouli et Grazza, 2007).



Figure 03 : Les graines d'*O. basilicum L.* (Dreamstime, 2016).

II.2.4. Variétés d'*Ocimum basilicum*

Les différentes variétés d'*O. basilicum* se distinguent par leur couleur, leur forme, leur taille et leur parfum. (Detraz, 2001; Youger-Comaty, 2001; Darbonne, 2002), dont les plus cultivées sont (MacKee, 1994) :

- *Ocimum basilicum* var. *album* ;
- *Ocimum basilicum* var. *anisatum* ;
- *Ocimum basilicum* var. *densiflorum* ;
- *Ocimum basilicum* var. *difforme* ;
- *Ocimum basilicum* var. *glabratum* ;
- *Ocimum basilicum* var. *majus* ;
- *Ocimum basilicum* var. *minimum* ;
- *Ocimum basilicum* var. *pilosum* ;
- *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* ;
- *Ocimum basilicum* var. *thyrsiflorum* ;

II.2.5. Habitat et culture

Le basilic étant une plante des pays chauds méditerranéen, introduit dans toutes les régions tropicales et subtropicales (Bulgarie, Madagascar, Italie, Comores et Maroc ...etc.) et cultivé dans les pays tempérés (**Schauenberge, 2006 ; Hubert, 2007 ; Bezanger et al., 1990**). Herbe de saison chaude, son multiplication se fait par semis au printemps, vers Mars-Avril. En climat tempéré, il faut le faire en serre ou dans des pots maintenus à une température de l'ordre de 20°C. La germination se produit au bout de 4 à 7 jours. Le repiquage en pleine terre peut se faire lorsque le sol est suffisamment réchauffé. Le basilic a besoin d'un pH de 5 à 8 et d'une température plus de 15°C et une exposition abritée et cinq heures d'ensoleillement quotidien (**Bezanger et al., 1990**).

II.2.6. Récolte

Pour l'herbe culinaire en frais, avant épanouissement des fleurs, on récolte de Juillet à Septembre ; pour la première coupe, la barre est placée à 15 cm au-dessus du sol car la plante remonte sur les bourgeons de bas de tige. Pour l'herboristerie ; on récolte en pleine floraison. (**Hubert, 2007**)

II.2.7. Séchage et conservation

On sèche le plus rapidement possible à une température de 30 - 35°C. On crible pour séparer feuilles et tiges. Pour l'huile essentielle, on récolte en pleine floraison (**Hubert, 2007**). Les parties utilisées sont les feuilles, que l'on peut faire sécher, mais qui ne se conservent pas longtemps (**Erik, 2001**). Il se conserve frais en pot ou séché à l'ombre, à l'abri de la lumière, de l'humidité et de la poussière (**Riaz, 1999**).

Chapitre II:



*Huile essentielle
d'O. basilicum*

Chapitre II : Huile essentielle d'*Ocimum basilicum*

I. Définition

Huiles essentielles, substances volatiles et odorantes sécrétées par des parties spécifiques de certains végétaux (**Encarta¹, 2009**). Ils ont été initialement appelées "esprit" pour un souci de normalisation, cette dénomination " essence" a été abandonnée au profit de celle de l'huile essentielle, seul terme en usage actuellement. Le mot essentielle renferme deux significations : origine essence ou partie la plus importante (**Pellecuer *et al.*, 1980**).

La norme AFNOR NF T 75-006 définit l'huile essentielle comme : « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques» (**Heinrich *et al.*, 1983**).

Une huile essentielle est en général un mélange de substances naturelles volatiles obtenues par codistillation avec la vapeur d'eau à partir de la biomasse végétale. Les huiles essentielles se caractérisent par leur odeur, leur goût, leurs propriétés physicochimiques et biologiques (**McGraw-Hill, 2007**).

II. Localisation

Les HE sont stockés sous forme des microgouttelettes dans les glandes des plantes. (**Encyclopædia Britannica, 2016**). On les trouve dans les fleurs, les fruits, les feuilles, les racines, les graines et les écorces de nombreux végétaux (**Encarta², 2009**). Ces huiles sont stockées dans des structures cellulaires spécialisées (cellules à huile essentielle, poils sécréteurs comme dans la menthe, canaux sécréteurs) et ont vraisemblablement un rôle défensif (**El kalamouni, 2010**).

II.1. Synthèse et formation des huiles essentielles au niveau des plantes

Les essences végétales sont d'une part des produits aromatiques de la plante, d'autre part des substances élaborées par des cellules sécrétrices localisées dans les différentes parties de la plante (**Sylvie, 2001**).

Huile essentielle d'Ocimum basilicum

Sous l'influence du rayonnement solaire, les plantes synthétisent au sein de cellules très spécifiques des composés aromatiques, véritables concentrés d'énergie : les huiles essentielles (**florilab, 2013**).

Ces substances se forment de trois façons (**Sylvie, 2001**) :

- *La première formation est dite "en surface glandulaire épidermique"* : Les essences sont formées au niveau de la périphérie de la plante par des glandes spécialisées : ce sont les poils sécréteurs fabriquant les essences. Les essences sont stockées dans des poches à essence : chez la Lavande vraie, la Sauge officinale, la Verveine citronnée.
- *La deuxième formation est dite "schizogène"* : C'est à dire qu'elle se fait dans l'épaisseur de la plante : au niveau de la feuille. On la retrouve notamment dans le Millepertuis, le Géranium, L'eucalyptus, le Mélaleuque...
- *La troisième formation est dite "par canaux" ou "schizolysigène"* : Elle se produit en profondeur de la plante : Elle est l'essence dominante que l'on trouve dans le bois des arbres (Bois de Rose, le Pin, le Santal).

III. Composition chimique

Les huiles essentielles sont constituées de plusieurs molécules chimiques de synthèse naturelle. Ces molécules sont différentes selon la nature de la plante, le sol, le temps de récolte, la partie de la plante, la préparation de l'échantillon, ainsi que la méthode d'extraction (**Noun, 2013**). Les HE regroupent des "composés majeurs": les alcools, les esters, les aldéhydes, les cétones...etc (**Encarta¹, 2009**).

L'ensemble de ces composés peut être divisé en deux grands groupes :

III.1. Terpènes :

Les terpènes sont très répandus dans la nature et surtout dans les plantes comme constituants des huiles essentielles. Ils sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique (**Noun, 2013**). Ce sont des hydrocarbures naturels, de structures cycliques ou de chaînes ouvertes. Leur particularité la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbones (C_5H_8).

Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprène en: monoterpène formés de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpènes, formés de trois isoprènes formés de ($C_{15}H_{24}$), diterpènes, formés de quatre isoprènes ($C_{20}H_{32}$), tétraterpènes formés de huit isopènes qui conduisent aux caroténoïdes et polyterpènes (C_5H_8)_n (où n peut-être de 9 à 30) (**Hernandez, 2005**).

Huile essentielle d'Ocimum basilicum

III.2. Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C₆-C₃) sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Ce sont très souvent des allyl- et propénylphénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiaceae, mais aussi de celles du girofle, de la muscade, de l'estragon, du basilic, ...etc. (eugénol, safrole, asarones, cinnamaldéhyde, etc.). On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés en C₆-C₁ comme la vanilline (assez fréquente) ou comme l'antranilate de méthyle. Les lactones dérivées des acides cinnamiques (c'est-à-dire les coumarines) étant, au moins pour les plus simples d'entre elles, entraînaient par la vapeur d'eau, elles seront également présentes dans certaines huiles essentielles. (Bruneton, 2009)

La composition moyenne de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* est représentée dans le **tableau 02**.

Tableau 02 : Composition moyenne de l'huile essentielle d'*O. basilicum*.

Hydrocarbures terpéniques		Aldéhydes	
(z)- β-ocimène	Traces à 0.1%	Anisaldéhyde	Traces à 2%
		4- méthoxycinnamaldéhyde	1 à 4%
(E) – β-ocimène	Traces à 0.7%	Cétone	
Myrcène	0.1 à 0.6%	Camphre	0.2 à 2%
Limonène	Traces à 3.6%	Ester	
β-élémente	Traces à 2.1%	Acétate de bornyle	0.2 à 1.4%
germacréne D	Traces à 1%	(E)-Cinnamante de méthyle	Traces à 68.6%
β-pinène	Traces à 1%	(z).cinnamante de méthyle	Traces à 11.2 %
&-bergamotène	0.1 à 2.6%	Ether	
β-caryophyllène	0.1 à 6.5%	1.8 – cinéole	1.5 à 12%
Alcools		Phénols	
Linalol	Traces à 54%	Chavicol	0.1 à 3%
&- terpinéol	Traces à 3%	Méthylchavicol	Traces à 85%
Bornéol	Traces à 2.7%	Eugénol	Traces à 27.8%
T-cardinol	Traces à 5.3%		

Source : (Hubert, 2007)

Les principaux constituants des huiles essentielles extraites des parties aériennes du basilic (*Ocimum basilicum*) de la W. Ain Defla sont représentés dans le **tableau 03**.

Huile essentielle d'Ocimum basilicum

Tableau 03 : Les principaux constituants des HE des parties aériennes du basilic (*Ocimum basilicum*) de W. Ain Defla

Composés	Linalol	Linalyl acetate	1,8 Cinéole	Myrcene	α -Terpineol
% de composition	44,7	14,0	6,7	5,6	5,1
Structure	*	**	***	****	*****
Références	(Compagnie, 2015)	Laboratory Chemical Safety Summary (LCSS), 2016	(Booksofdante, 2014)	(Baser et Buchbauer, 2010)	(Botrel, 2001)

Sources : (Brada *et al.*, 2013)

IV. Caractéristiques de l'huile essentielle d'*O.basilicum*

IV.1. Caractéristiques organoleptiques

Les huiles essentielles ont un parfum, mais elles ont également une couleur, une viscosité, et un gout (Jeanne, 1999)

- **Odeur** : Epicée, anisée, aromatique
- **Apparence** : Liquide à température ambiante, mobile, limpide
- **Couleur** : Jaune pâle à jaune ambré (Festy, 2013); (Valnet, 2010).

Huile essentielle d'Ocimum basilicum

IV.2. Caractéristiques Physicochimiques

Les caractéristiques physicochimiques de l'huile essentielle d'*O.basilicum* sont présentées dans le **tableau 04**

Tableau 04 : Caractéristiques physicochimiques de l'huile essentielle de basilic.

Densité	0,90 à 0,97
Indice de réfraction	1,51 à 1,52
Pouvoir rotatoire	- 1° a + 2°
Chemotypes	méthyl chavicol, 1,8 cinéole, l, linalol, estragol

Source : (Max, 2008)

Chapitre III:



***HE d'O. basilicum et
la bioconservation***

Chapitre III : HE d'*O.basilicum* et la bioconservation

I. Conservation alimentaire

I.1. Conservation chimique

Les conservateurs chimiques sont des additifs autorisés (**Tableau 05**) que les industriels utilisent afin de prolonger la durée de consommation des aliments (**eureka, 2015**). Ils empêchent la croissance de micro-organismes susceptibles d'entraîner la détérioration des aliments et/ou responsables des intoxications alimentaires (**Encarta², 2009**);...et protègent ceux-ci des effets de l'oxygène (**eureka, 2015**).

L'action des conservateurs chimiques n'est pas illimitée dans le temps. Au bout de quelques semaines, les aliments finissent par subir des modifications dues à l'oxygène et aux micro-organismes (**eureka, 2015**).

Tableau 05 : Quelques conservateurs chimiques autorisés.

Conservateurs autorisés	Quelques usages
Acide benzoïque (E 210)	Confitures allégées, fruits confits, légumes au vinaigre.
Propionate de calcium (E 282)	Pains de mie, pâtisseries.
Sorbate de sodium (E 201)	Fromages, vins, fruits séchés et en purée.
Nitrite de potassium (E 249)	Charcuteries, harengs.
Natamycine (E 235)	Fromages, saucissons.
Disulfite de potassium (E 224)	Fruits séchés et en conserve, vins.

Source :(eureka, 2015)

I.2. Conservation traditionnelle

Depuis l'antiquité, les aliments ont toujours été préservés par certains produits naturels qui peuvent jouer le même rôle que les conservateurs chimiques. (**Tableau 06**)

Tableau 06 : Quelques conservateurs alimentaires traditionnels.

Conservateurs	L'aliment conservé	Précautions
Le sucre	Les fruits (confitures, fruits au sirop)	*La proportion de <u>sucre</u> doit atteindre au moins 50 % pour empêcher la croissance des bactéries. *une stérilisation par chauffage.
Les acidifiants (les vins et les vinaigres 2%)	Les légumes	*Elle doit être associée à un autre procédé de conservation (<u>sucre</u> , <u>sel</u> ou stérilisation).
Le sel (8 %)	La viande, les légumes et les poissons	*Pour éviter l'altération du goût, les aliments sont souvent séchés après salaison (charcuteries, par exp).
La saumure (<u>sel</u>, 0,4 % de nitrite)	Les poissons	*Les aliments se conservent mieux s'ils ont été fumés au préalable.
Le fumage	La viande et les poissons	*Le salage est souvent associé au fumage. *éviter de consommer les parties noires cancérigènes.

Source :(eureka, 2015)

II. Inconvénients des additifs alimentaires

La présence d'antioxydants 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 (**El Kalamouni, 2010**).

On peut citer quelques effets négatifs des additifs alimentaires sur la santé :

- **Les allergies et les réactions asthmatiques** : Selon le docteur Rob Loblay, chef de l'unité d'allergologie de l'hôpital Royal de Sydney, environ 5% de la population est sensible à un ou plusieurs additifs alimentaires.

- **L'hyperactivité** : L'hyperactivité se caractérise chez l'enfant par des difficultés à rester en place, à se concentrer et par un comportement impulsif. Des recherches menées en 2005 par l'université de Liverpool démontrent que certains mélanges d'additifs (aspartame E951 et colorants) peuvent endommager les cellules nerveuses. L'université de Southampton en Grande-Bretagne démontra peu après en 2007 des liens directs entre des colorants et l'hyperactivité chez des enfants entre 3 et 8 ans. Cette étude mis également en évidence l'effet négatif du benzoate de sodium.
- **Les cancers** : De nombreuses études scientifiques associent une augmentation du risque de cancers à certains additifs alimentaires. **(Bio-transition, 2015)**

III. Bioconservation alimentaire par des extraits d'*O. basilicum*

La bioconservation alimentaire est l'utilisation des composés d'origines organique provenant de sources naturelles pour la protection de la qualité des produits alimentaires et la santé des consommateurs. Actuellement les huiles essentielles et leurs composants représentent un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires. Ces substances naturelles sont riches en composées antimicrobiens et antioxydants. Elles pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaire. **(Caillet et Lacroix, 2007)**.

De nombreux auteurs **(Kim *et al.*, 1995a et 1995b ; Smith-Palmer *et al.*, 2001 ; Pintore *et al.*, 2002 ; Lin *et al.*, 2004 ; Fisher et Phillips, 2006 ; Oussalah *et al.*, 2006 ; Caillet et Lacroix, 2007)**, ont rapporté que les HE peuvent être ajoutées pratiquement à tous les aliments. L'incorporation d'HE dans la viande hachée a contribué au maintien de la qualité microbiologique et à la réduction de l'oxydation lipidique au-delà de sa durée normale d'entreposage.

III.1. Activité antioxydante de l'HE d'*O. basilicum*

III.1.1. L'oxydation

L'oxydation est le phénomène qui fait rouiller les métaux, qui fait flétrir les légumes et les fruits, rancir les graisses. Il modifie le goût et la couleur des aliments. **(Rolland., 2004)**. Les substances d'oxydation peuvent avoir différentes structures chimiques que sont les acides gras non saturés, cholestérol, phospholipide, etc....Après l'eau et l'air, la nutrition est

L'huile essentielle d'*O.basilicum* et la bioconservation

le troisième élément essentiel de la vie. Les lipides constituent l'un des composés majeurs de notre nutrition. En raison de leur instauration, les lipides naturels sont très sensibles à l'oxydation. Le mécanisme d'oxydation le plus connu des lipides dans les aliments est l'auto-oxydation. Ce mécanisme comprend trois phases, initiation, propagation et terminaison (**Figure 04**). La plupart des aliments contiennent des traces de métaux résultant de l'emballage ou de stockage ou même de la composition alimentaire. Des traces de métal dans l'aliment avec des concentrations inférieures à 0,5ppm sont suffisantes pour catalyser l'oxydation des lipide (**Labuza, 1971; Larson, 1997**).

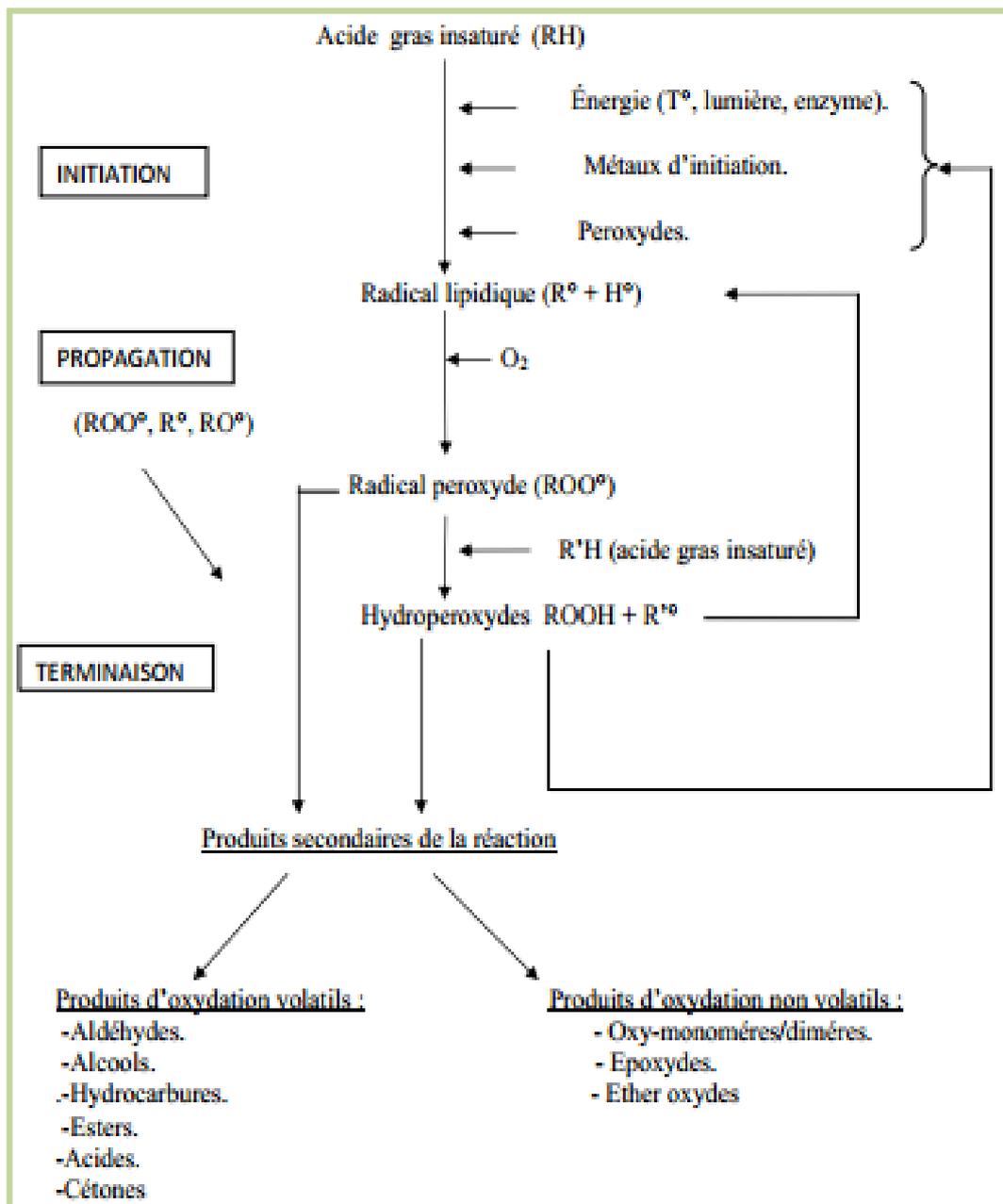


Figure 04 : Mécanisme d'Auto-oxydation des lipides (**Eymard, 2003**).

III.1.2 Mode d'action des HE

Les antioxydants sont définis par **Halliwell *et al.*, (1987)** comme «toute substance qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat» (**pastre et priymenko, 2007**). Les antioxydants sont largement présents dans nos aliments, soit sous forme naturelle, soit sous forme d'additifs utilisés dans l'industrie agroalimentaire (**Tanguy *et al.*, 2009**). Ils piègent les radicaux libres en inhibant les réactions à l'intérieur des cellules provoquées par les molécules de dioxygène et de peroxyde, aussi appelées espèces oxygénées radicalaires (EOR) et espèces azotées radicalaires (**Benbrook, 2005**).

Il y a deux options pour retarder la réaction d'oxydation :

- Soit intercepter les radicaux libres responsables de la réaction en chaîne.
- Soit éviter la décomposition des hydroperoxydes dans les radicaux libres.

Ces deux options fournissent la base de classification des antioxydants sous forme primaire ou secondaire selon leur mécanisme d'action (**Rolland, 2004**)

Les antioxydants sont utilisés pour empêcher les aliments gras de rancir (**Encarta², 2009**). Le principal antioxydant retrouvé dans les feuilles de basilic est l'acide rosmarinique. Ce dernier agirait de façon synergique avec la vitamine E, ce qui signifie que l'action antioxydante combinée de ces deux composés serait supérieure à leur action antioxydante individuelle. D'autres acides phénoliques et des flavonoïdes qui possèdent des propriétés antioxydantes se trouvent également dans le basilic (**Yanishkieva, 1995**).

L'acide rosmarinique et la vitamine E (**Figure 05 et 06**) prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en captant les radicaux peroxydes (**Ahamet, 2003**).

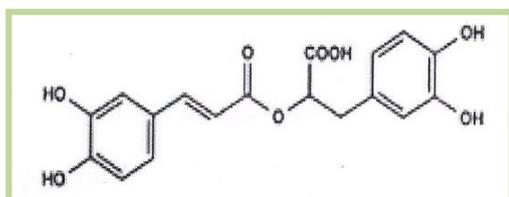


Figure 05: Structure de l'acide rosmarinique

(**Boyadzhiev, 2006**)

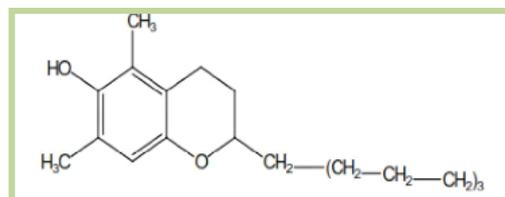


Figure 06 : Structure de la vitamine E

(**Diarra, 2006**)

Des chercheurs ont observé une diminution de l'oxydation des lipides, in vitro et chez l'animal, avec un extrait de basilic. L'effet antioxydant de l'extrait de basilic a été obtenu avec des très faibles concentrations (**Paulette, 2006**).

Les résultats rapportés par **Constantin et al. (2011)** ont montrés que l'AAO de l'huile essentielle de *O. basilicum* est effectivement liée à sa composition chimique, notamment à sa teneur en eugénol, puisque la diminution de la teneur de ce composé va dans le même sens que la diminution de l'activité Antioxydante de l'huile essentielle.

Les travaux de **Brada et al., (2013)** montrent que l'activité antioxydante de l'HE extraite de l'*O. basilicum* est supérieure quatre fois par rapport à celle de la vitamine E.

III.2. Activité antibactérienne de l'HE d'*O. basilicum*

III.2.1. Généralité

Le mécanisme d'action des HE sur les cellules bactériennes et fongiques reste difficile à cerner, compte tenu de la composition complexe des huiles volatiles (**Guinoiseau, 2010**). La variabilité des constituants des huiles suggère qu'elles agissent sur plusieurs sites d'action étant donné que chaque composé possède son propre mode d'action (**Sipailiene, 2006**). Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (**Wendakoon, 1995**).

Leur action se déroule en trois phases (**El kalamouni, 2010**) (**Figure 07**) :

- **1ere Phase** : attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- **2ème Phase** : acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- **3ème Phase** : destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

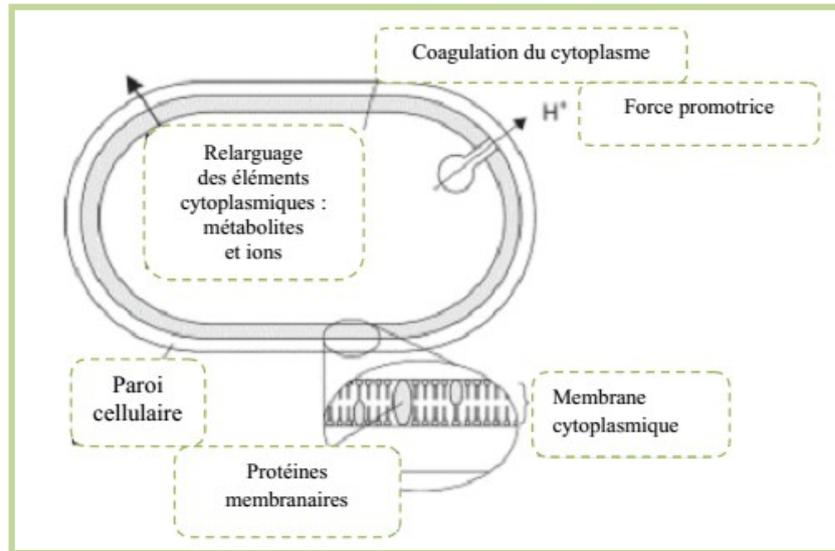


Figure 07 : Sites d'action des Huiles essentielles sur la cellule bactérienne (**Guinoiseau, 2010**)

III.2.2. Mode d'action des HE

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (**Sipailiène *et al.*, 2006**). Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

Les caractéristiques des huiles essentielles sont attribuées aux dérivés terpénoïdes et phénylpropanoïdes dont elles sont constituées. L'activité de ces molécules bioactives dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées (**Sipailiène *et al.*, 2006**).

Les terpènes ainsi que les flavonoïdes peuvent pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne et induire sa rupture. Le contenu cytoplasmique est déchargé à l'extérieur de la cellule impliquant sa destruction (**Tsuchiya *et al.*, (1996)** ; **Hammer *et al.*, (1999)**).

L'huile essentielle d'O.basilicum et la bioconservation

Egalement, une perturbation chémo-osmotique et une fuite de potassium intracytoplasmique peuvent subvenir, suivi de la libération d'acides nucléiques, de L'ATP, et du phosphate inorganique (**Hammer *et al.*, 1999 ; Daroui, 2011 ; Kurita, 1979**).

D'après **Masson et Wasserman (1987)**; les composés phénoliques et les aldéhydes possèdent un mécanisme similaire, avec une efficacité inhibitrice proportionnelle à leur degré d'hydrophobicité.

Certains composés phénoliques des HEs interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP (**Kurita *et al.*, 1979 ; Knobloch *et al.*, 1989**).

La synthèse de l'ADN, l'ARN, des protéines et des polysaccharides peuvent être inhibés par les huiles essentielles (**Johansen *et al.*, 1997**).

IV. Toxicité de l'HE d'*O. basilicum*

Généralement, les huiles essentielles d'*O. basilicum* ingérées par voie orale ont une toxicité aiguë faible. Selon **Bruneton (1999)** la dose létale (**DL₅₀**) des HE du basilic est égale **1 - 2 g/Kg**. Le basilic possède une teneur élevée en estragon, un composé qui devient cancérigène quand il est consommé en trop grande quantité. Il faut limiter la prise d'huile essentielle à 4 gouttes



Partie expérimentale

Chapitre IV:

Matériels et

Méthodes



Chapitre IV : Matériel et Méthodes

L'ensemble de ce travail a été réalisé aux laboratoires de chimie, biochimie et microbiologie de l'Université Djilali Bou-Naama de Khemis- Miliana pendant une durée de 04 mois (février-mai 2016).

Partie I : Préparation et analyses physico-chimiques des extraits d'*O. basilicum*

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

➤ *Matière végétale*

Les échantillons d'*O. basilicum* (**figure 08**) ont été récolté durant la période allant du mois de Février jusqu'au mois de Mai 2016 dans la région de Ain-Defla.



Figure 08 : Le basilic : **a.** parties aériennes, **b.** feuilles fraîches, **c.** feuilles sèches.

I.2. Matériel non biologique

- Hydrodistillateur type Clevenger (**Thermo scientific**)
- Réfractomètre
- Etuve + Autoclave (**Mammert**)
- Plaque chauffante(**AREC**)
- Balance de précision (**KERN®**)
- Bain marie (**Mammert**)
- Papier de pH

I.3. Produits et réactifs chimiques

- Sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄)
- Hydroxyde de sodium (KOH) 0.5mol/l ; 0.1mol/l
- Acide chlorhydrique (HCl) 0.5mol/l
- Phénolphtaléine

II. Méthodes

II.1. Séchage de la plante

La plante, fraîchement récoltée, est lavée et laissée sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Devenu sèche, les feuilles sont récupérées dans des sacs propres. Notant qu'avant le lavage, une certaine quantité de la plante est récupérée pour la mesure du taux d'humidité.

II.2. Détermination de la matière sèche et du taux d'humidité

La matière sèche est déterminée selon la norme **NF B 51004 (Bois, 2004)** à partir d'une masse de matière végétale (E) introduite dans creuset taré, puis séchée dans une étuve à 105°C jusqu'à poids constant. Après refroidissement, le creuset est pesé. Le taux de M.S est calculé selon l'équation suivante :

$$\mathbf{M.S\ (\%) = S / E. 100}$$

M.S : matière sèche en %

S : masse de creuset taré après séchage

E : masse de la matière végétale

A partir du pourcentage de la matière sèche on peut calculer le taux d'humidité en (%.)

$$\mathbf{H\ (\%) = 100\ \% - M.S\ (\%)}$$

H : taux d'humidité en %

M.S: Matière sèche en %

II.3.Extraction des HE

➤ **Principe**

Les huiles essentielles de la plante étudiée a été extraite par hydrodistillation grâce à un appareil du type Clevenger (1928) (**Figure09**).«Cette méthode consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans l'eau distillée qui est portée à l'ébullition. Les principes volatiles sont alors entraînés par la vapeur d'eau et après condensation du distillat, sont séparés par décantation. » (**Bruneton, 1987**).



Figure 09: Montage expérimental de l'hydrodistillation.

➤ **Mode opératoire**

Dixgrammes10g de la matière végétale est placée dans un ballon à vide de 1l, additionnées de 500ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à l'ébullition, après l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du condenseur de la vapeur ; l'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par un

Matériel et méthodes

réfrigérant, qu'est fixé par un support vertical qui facilite l'écoulement du distillat. Le temps de cette extraction est d'environ deux heures.

Le distillat est laissé au repos quelques minutes, ce qui résulte l'apparition de deux phases, l'une est organique (huile essentielle) chargée d'espèces volatiles contenues dans la plante et l'autre est aqueuse (ou l'hydrolat) ayant une densité plus élevée. Le volume de l'huile essentielle obtenue est récupéré dans une epeindorf. La masse d'HE est noté pour le calcul du rendement.

II.3.3. Conservation de l'huile essentielle obtenue

La conservation de l'huile essentielle exige certaines précautions indispensables (**Burt, 2004**). C'est pour cela nous avons déshydraté l'huile essentielle par le sulfate de sodium (Na_2SO_4) (**Bajpai et Kang, 2010**) et la conservée à une température voisine de 4°C , dans des epeindorfs en plastique bien fermées et étiquetées, recouvertes par papier aluminium pour la préserver de l'air et de la lumière.

II.4. Rendement

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielle (R_{HE}), est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction (M_{HE}) et la masse de la matière végétale utilisée (M_s). Il est donné par la formule suivante :

$$R_{HE} (\%) = M_{HE}/M_s \cdot 100$$

R_{HE} : rendement de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* %

M_{HE} : masse de l'huile essentielle obtenue en gramme

M_s : masse en gramme de la matière végétale sèche

➤ **Rendement moyen**

$$R_{HE} = (R_{HE1} + R_{HE2} + R_{HE3} + \dots + R_i) / n$$

n: Le nombre des extractions

II.5.Caractérisation des huiles essentielles

II.5.1.Caractérisation organoleptique

Chaque huile essentielle est caractérisée par ces caractères organoleptiques tels que : l'odeur, l'aspect physique et la couleur(**Bentchicou, 1999; Hameurlaine, 2009**).

- **L'aspect physique** : l'aspect d'une HE dépend des produits qui la constituent, elle nous apparaitre sous forme liquide, solide ou bien semi solide.
- **Odeur** : il appartient aux sens chimiques les plus sensibles.
- **Couleur** : la coloration d'une huile essentielle dépend des produits qui la constituent, donc la couleur change d'une huile essentielle à l'autre ; elle peut être déterminé à l'œil nu.

II.5.2.Détermination des propriétés physico-chimiques

Aujourd'hui, les propriétés physico-chimiques des HE (densité, indice de réfraction, indice d'acide, indice d'ester) sont exigées pour leur évaluation commerciale (**El Abed et Kambouche, 2003**).

II.5.2.1. Propriétés physiques

***L'indice de réfraction (NFT 75 112, 1977)**

L'indice de réfraction est le rapport de la vitesse d'un rayon lumineux (la raie D du sodium 589 nm) dans le vide et sa vitesse dans le milieu. Autrement dit, c'est la mesure de la réfringence d'un corps donné par rapport à la raie D du sodium.

➤ Mode opératoire

Régler le réfractomètre en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée qui doit être de 1,333 à 20°C. Ouvrir le prisme secondaire et déposer 2 ou 3 gouttes de l'échantillon liquide sur la partie centrale du prisme principal. Fermer ensuite doucement le prisme secondaire. L'échantillon s'étale entre le prisme principal et le prisme secondaire en un film mince. Attendre que la température soit stable à 20°C et effectuer la mesure.

L'indice de réfraction (IR), à la température de référence t, est donné par l'équation suivante :

$$I_{20} = I_t + 0,00045 (t - 20^{\circ}\text{C})$$

I₂₀ : indice à 20°C.

I_t: indice à la température de chambre.

t : température de mesure.

*pH

Le pH exprimé par une valeur numérique, indique si une solution est acide ou basique, il représente aussi la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse (**Mélet et Benchabane, 1997**). Le pH est déterminé à l'aide d'un papier pH.

II.5.2.2. Les propriétés chimiques

*L'indice d'acide (NFT 75 103, 1982)

L'indice d'acide est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1 g de substance.

➤ Mode opératoire

Peser 2 g d'H.E. introduire la prise d'essai dans le ballon. Ajouter 5 ml d'éthanol à 95% et 2 à 3 gouttes de phénolphthaléine. Titrer le liquide avec la solution d'hydroxyde de potassium (0,1 M) jusqu'à obtention d'une couleur rose persistante pendant 30 secondes. Noter le volume de solution d'hydroxyde de potassium utilisé. L'indice d'acide (I.A) est donné par l'équation suivante :

$$I_A = 5.61 (v / m)$$

v : volume (ml) de la solution d'hydroxyde de potassium utilisé pour le titrage.

m: masse (g) de la prise d'essai.

Matériel et méthodes

***L'indice d'ester (NFT 75 104, 1982)**

L'indice d'ester (I.E) est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides libres par l'hydrolyse des esters présents dans 1 g de substance.

➤ Mode opératoire

Dans un bicher, on introduit la solution provenant de la détermination de l'indice d'acide et on ajoute 25 ml de la solution d'hydroxyde de potassium (0.5 mol/L). Puis on couvre le bicher par du papier aluminium et on le place dans un bain marie pendant 1h. On le laisse refroidir puis on ajoute 20ml d'eau et 5 gouttes de la solution de phénolphtaléine. On titre l'excès d'hydroxyde de potassium avec la solution d'acide chlorhydrique (0.5 mol/L).

Le blanc composé de solution d'hydroxyde de potassium est incubé dans les mêmes conditions que celle de l'échantillon. L'indice d'ester est donné par la relation suivante :

$$I_E = 28.05/m. (V_0 - V_1). I_A$$

V_0 : volume en ml de la solution d'acide chlorhydrique utilisée pour l'essai à blanc ;

V_1 : volume en ml de la solution d'acide chlorhydrique utilisée dans la détermination de l'IE.

m : masse (g) de la prise d'essai.

*** L'indice de saponification**

L'indice de saponification d'un lipide est déterminé par la masse de potasse en mg nécessaire pour neutraliser les acides libres et aussi saponifier les acides gras estérifié dans un gramme de matière grasse. Selon la norme de la **pharmacopée européenne, (2001)** l'indice de saponification est donné par la relation suivante :

$$I_S = I_E - I_A$$

II.6. Préparation de l'extrait aqueux

Une quantité de 40g de poudre de la plante d'*O. basilicum* est portée à ébullition pendant 5 min dans 320ml d'eau distillée. Le décocté refroidi subit une double filtration sur coton hydrophile puis sur papier filtre. Ce filtrat est ensuite séché à 50°C jusqu'à l'obtention du poids constant. Puis stérilisé à l'autoclave à 121°C /15 min. Une solution de concentration égale à 500 mg/ml est préparée dans l'eau distillée stérile avec l'extrait autoclavé de la plante. Enfin, une gamme de concentration est préparée par la méthode de dilution de 2 en 2 (en série de 1/2 à 1/32) donnant des concentrations de 250 à 15,6 mg/ml.

Partie II : Etude des activités antioxydantes et antibactériennes de nos extraits.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

➤ *Les extraits*

Nous avons testés les activités antibactériennes et antioxydantes des extraits (HE et Ext-aq) qu'on a préparés à partir des feuilles de notre plante.

➤ *Les souches bactériennes utilisées*

Les bactéries qui ont été testées pour détecter l'activité antibactérienne des extraits d'*O. basilicum* sont les suivantes :

- **Bactérie à GRAM (-)** : *Escherichia coli* ATCC 25912 ; *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 ; *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 ; *Citrobacter freundii* ATCC8090 ; *Salmonella typhimurium* ATCC13311 ; *Enterobacter cloacae* ATCC13047.
- **Bactérie à GRAM (+)** : *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ; *Entérocooccus faecalis* ATCC49452 ; *Listeria monocytogenes* ATCC15313 ; *Bacillus cereus* ATCC10876 ; *Bacillus subtilis* ATCC21332.

Ces souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) ont tous été fournis par le laboratoire de recherche de l'université Aboubakr Belkaid Tlemcen.

I.2. Matériel non biologique

- Spectrophotomètre (**Thermo**) ;
- Vortex (**VELP® Scientifica**) ;
- Microscope optique (**Primo star**) ;
- Etuve + Autoclave(**Mammert**) ;
- Bain marie(**Mammert**) ;
- Hotte (**Biobas**) ;
- Milieux de culture : Gélose Nutritive (GN) ; Bouillon Nutritive (BN) ; Gélose Mueller Hinton (MH).

I.3. Produits et réactifs chimiques

- Acide sulfurique (H_2SO_4) 0.6M ;
- Phosphate de sodium (Na_3PO_4) 28mM ;
- Molybdate d'ammonium ($(NH_4)MoO_4^{2-}$) 4mM;
- DPPH (2,2-di-phényl –picryl-hydrazyl);
- Acide ascorbique ;
- DMSO (di-méthyl-sulfoxyde) ;
- Ethanol 95% ;
- Les antibiotiques : Cefotaxamine 30 (CTX) ; Chloramphenicol 30(C3) ; Pénicilline 20 (PI) ; Amoxicilline 25 (AMX).

II. Méthodes

II.1. Activité antioxydante

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante d'un composé. L'activité antioxydante des extraits d'*O.basilicum* traduit leur aptitude à piéger les radicaux libres. Deux méthodes ont été utilisées pour l'évaluée.

- ✓ Capacité antioxydante totale CAT.
- ✓ Test du piégeage du radical libre DPPH.

II.1.1. Capacité antioxydante totale (CAT)

➤ Principe

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de **Prieto *et al.*, (1999)**. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} au molybdène Mo (V) MoO^{2+} en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/Mo (V) à pH acide. (Annexe1).

➤ Mode opératoire

- Un volume de 0.3 ml de chaque dilution des extraits (HE et extrait aqueux) (1/2 ; 1/4 ; 1/8 ; 1/16 ; 1/32 ; 1/64) (**Figure 10**) est mélangé avec 3 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium).
- Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 90 min.
- Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml d'éthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon.
- La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS).
- Pour l'extrait aqueux la solution mère préparée par la dissolution de 2mg de l'extrait aqueux dans 2 ml d'eau distillé puis on prépare les mêmes concentrations que celles des HE.

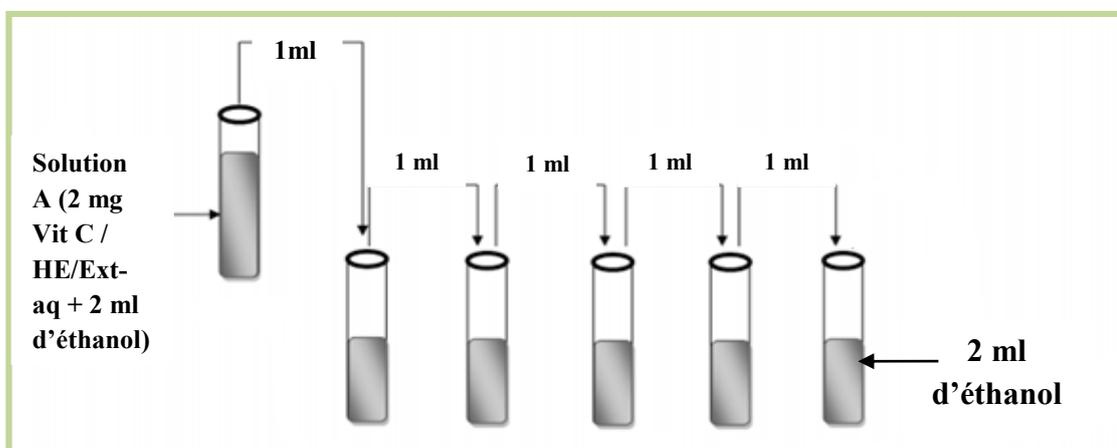


Figure10 : Préparation des échantillons des extraits d'*O. basilicum* et de vitamine C.

II.1.2. Test du piégeage du radical libre DPPH

➤ Principe

L'activité antiradicalaire a été évaluée en utilisant le DPPH, qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante (**Brand et al., 1995**).

Le DPPH (2,2 -diphényl -1- picrylhydrazyl) est un radical libre stable possédant un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Cette délocalisation empêche la polymérisation du composé, qui reste sous forme monomère relativement stable à température ambiante. Ainsi, cet état induit l'apparition d'une couleur violet foncée bien caractéristique de la solution DPPH. (**Figure11**).

Cette couleur disparaît en présence d'antioxydant lorsque le DPPH est réduit, passant au jaune pâle du groupe picryl; et l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (**Sanchez, 2002**). Le suivi de la délocalisation est réalisé par spectrophotométrie à 517nm (**Gulcin et al., 2003 ; Molyneux, 2004 ; Roginsky et Lissi 2005**).(Annex2).

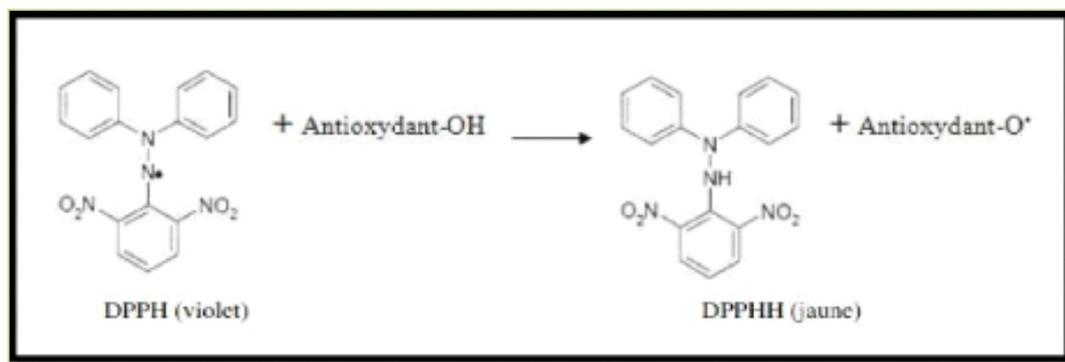


Figure 11 : Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl) (**Congo, 2012**).

➤ Mode opératoire

Le pouvoir antiradicalaire a été testé en employant la méthode dicté par **Brand et al., (1995)**. La solution de DPPH a été préparée par la solubilisation de 2,4mg de DPPH dans 100ml d'éthanol (elle ne se conserve pas plus de 4-5jours à -5C° et à l'obscurité).

Matériel et méthodes

Différentes concentrations des extraits du basilic ont été mélangées avec 2ml de la solution d'éthanol de DPPH• dans des tubes à essais. Après 30min d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517nm à l'aide de spectrophotométrie UV-visible. Le contrôle négatif est composé d'éthanol.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'absorbance de l'acide ascorbique est mesurée dans les mêmes conditions que celle de l'extrait (**Bougandoura, 2013**).

- Pour l'H.E les concentrations utilisées sont : 2,5 -7,5 -15 -30µg/ml
- Pour l'Ext-aq les concentrations utilisés sont: 7,5 -15 -45 -50 -60 -75 -100 µg/ml
- Pour les échantillons de contrôle positif « vitamine C » on prépare les mêmes concentrations que celles des extraits (même procédé).

La capacité de l'antioxydant à piéger le radical libre est estimée en pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans l'éthanol. Les résultats sont exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire ou l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante (**Meddour, 2013**) :

$$I \% = [1 - (\text{Abs Échantillon} - \text{Abs Contrôle négatif})] \times 100$$

I %: Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%).

Abs Échantillon : Absorbance de l'échantillon.

Abs Contrôle négatif : Absorbance du contrôle négatif.

Le paramètre IC₅₀ (concentration équivalente à 50% de DPPH perdu) est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (couleur), elle a été calculée par régression linéaire à partir des graphes des taux d'inhibition.

II.2.Méthode d'étude de l'activité antibactérienne des extraits d'*O. basilicum*

II.2.1. Caractérisation microscopique des souches étudiées

Après une culture de 24h à 37 °C sur milieu sélectif la pureté des souches est vérifiée par examen microscopique après coloration de Gram (**Annexe 3**).

II.2.2. Préparation des suspensions bactériennes

II.2.2.1. Préparations des prés cultures

Des colonies bien isolées des cultures pures ont été repiquées dans le bouillon nutritif puis incubées à 37 °C pendant 72 h.

II.2.2.2. Préparations des cultures jeunes

A Partir du pré culture, des cultures jeunes de 24 h ont été préparées sur bouillon nutritif puis incubées à 37 °C.

II.2.2.3. Ajustements de la concentration bactérienne

Après la préparation des dilutions décimales ,1ml de chacune des dilutions 10^{-5} , 10^{-7} sontensemencés en masse dans la gélose nutritive .les boites sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h. Le dénombrement est effectué en utilisation un compteur de colonies (**Oussou et al., 2004**). (**Annexe4**)

II.2.3. Activité antibactérienne des extraits

Afin de tester l'activité antibactérienne des extraits d'*O. basilicum*, nous avons fait appel à 2 méthodes complémentaires :

- Méthode de l'aromatogramme.
- Méthode de contact direct par dilution en milieu solide (détermination des CMI).

II.2.3.1.Méthode de l'aromatogramme

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits a été réalisée par la méthode décrite par (Vincent, 1991; Kavbouche *et al.*, 2005; Ormeno *et al.*, 2005).

➤ Principe

Le principe de l'aromatogramme est inspiré de l'antibiogramme, il consiste à tester la sensibilité des souches bactériennes par la diffusion de l'extrait sur le milieu solide dans une boîte de Pétri. L'apparition et l'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflète l'impact des HE / l'extrait aqueux sur les souches bactériennes. Ainsi, ces dernières seront qualifiées de sensibles ou très sensibles, ou résistantes (Ouibrahim, 2015). (Figure 12)

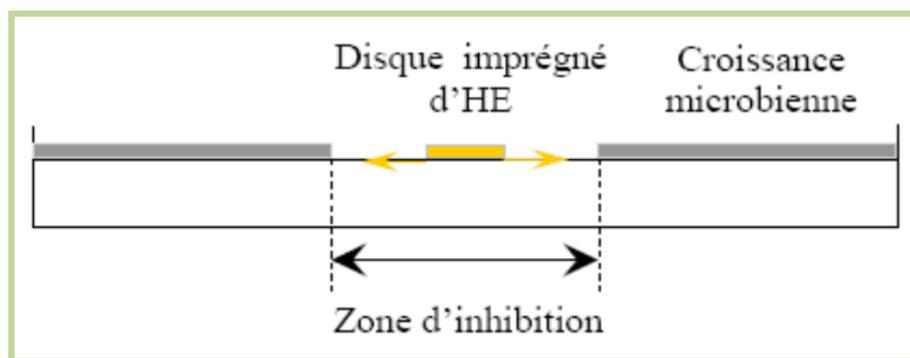


Figure 12 : Aromatogramme.

➤ Application

Cette méthode de est préconisée par (carson *et al.*, 1995 et cavallo *et al.*, 2006)

- La gélose M-H, préalablement fondue au bain marie bouillant, a été coulée en boîte de pétri à une épaisseur de 4mm.
- Les boîte de M-H refroidies sont inoculées (par inondation) de 1ml d'inoculum (10^8 UFC /ml) de façon à recouvrir toute la surface gélosée.
- Des disques stériles de 6mm de diamètre sont imbibés d'une quantité suffisante (10 μ l) de chaque extrait.
- Ces disques imprègnés sont alors déposés sur la gélose et les extraits diffusent radialement des disques dans la gélose en formant un gradient de concentration.

Matériel et méthodes

- Les boîtes sont fermées et incubées à température ambiante pendant 20 min, ensuite dans une étuve à 37 °C /24 h.

➤ **Lecture des résultats**

La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres d'inhibition qui sont représentés par une auréole claire formée autour de chaque disque. Les résultats sont exprimés selon les niveaux d'activité :

- Résistant ($D < 8$)
- Sensible ($8 > D > 14$)
- Très sensible ($15 > D > 19$)
- Extrêmement sensible ($D > 20$)

Les bactéries montrant une sensibilité aux extraits sont sélectionnées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) (**Derwich *et al.*, 2010**).

Plus la zone d'inhibition mesurée est grande, plus le germe est sensible. Le pourcentage d'inhibition de la croissance bactérienne est calculé par la formule suivante (**Fellah et Mouaici, 2015**):

$$\% \text{ Inhibition} = (D_{\text{test}} / D_{\text{control}}) \times 100$$

D_{test}: diamètre de la zone d'inhibition.

D_{control}: diamètre de la boîte de pétri 90mm.

NB

- ✓ Deux boîtes sont utilisées pour chaque souche.
- ✓ La boîte de contrôle, réalisée pour chaque expérience, est une boîte ensemencée dont le disque déposé au centre de la gélose n'est pas imbibé d'extrait végétale.

II.2.3.2. Test de sensibilité aux antibiotiques

L'étude de l'antibiogramme s'est limitée à tester les antibiotiques les plus utilisés en antibiothérapie tels que : Cefotaxamine, Chloramphenicol, Pénicilline et l'Amoxicilline.

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes et le comparer avec l'effet de nos extraits bruts. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'extrait.

II.2.3.3.Méthode de dilution en gélose (détermination des CMI)

Dans certaines situations, la réponse qualitative ne suffit pas : la détermination précise de la CMI est demandée pour mieux préciser le niveau de l'activité des molécules (CMI et CMB).

➤ Principe

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en extrait pour laquelle, aucune croissance visible à l'œil nu n'est observée (**Skandamis et Nycha ; 2001**).

Cette méthode permet la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentrations d'extrait dilué dans le DMSO. Ce choix a été fait, parce que, le DMSO est le solvant préconisé par la majorité des auteurs, notamment, **Gachkaret al., (2006)** qui ont prouvé que le DMSO n'a aucun pouvoir antibactérien puissant.

➤ Application

- La gamme de concentration des extraits végétaux a été préparé dans tubes à essai par la méthode de dilution de deux en deux (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32,) (**Ossou et al., 2004**), à partir d'une solution mère.
- Les boîtes de MH préalablement coulées, sont ensemencées par les suspensions bactériennes à l'aide d'un écouvillon. La surface des boîtes est séchée à l'aire libre un moment de temps.
- Des disques de papier Buvard stérile de 6mm de diamètre sont imprégnés de 10 µl des différentes concentrations (0.5, 0.25, 0.125, 0.060.0005 %), puis déposés à la surface des géloses ensemencées avec les différentes souches bactériennes. Le DMSO a été utilisé comme contrôle négatif.
- Les boîtes de Pétri ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h.
- Tous les essais sont réalisés deux fois.

➤ **Lecture des résultats**

La CMI représente la plus faible concentration d'huile essentielle / l'extrait aqueux inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 24 heures d'incubation à 37°C (**De Billerbeck *et al.*, 2002; Bassole *et al.*, 2002**). Par ailleurs, la CMB représente la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 5 jours d'incubation à 37°C (**Mayachiew et Devahastin, 2008**).

Le rapport CMB/CMI nous a permis de déterminer les pouvoirs bactéricide et bactériostatique de l'huile essentielle étudiée. Lorsque ce rapport est supérieur à 4, l'huile essentielle (l'extrait aqueux) a un pouvoir bactériostatique, et bactéricide quand il est inférieur ou égal à 4 (**Canillac et Mourey, 2001**) (**Annexe 5**).

Partie III : Bioconservation par l'HE d'*O. basilicum*.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

- L'huile essentielle d'*O. basilicum* ;
- Le poulet (viande blanche).

Afin de valider l'effet antibactérien de notre HE, nous avons utilisé la viande de poulet. Cette dernière est très vulnérable aux altérations microbiennes et elle est également beaucoup consommée par la population algérienne.

I.2. Matériel non biologique

- Réfrigérateur (Hert)
- Etuve (Mammert)
- Balance (KERN®)
- Milieu de culture : Gélose d'Hektoen ; Bouillon nutritive

I.3. Produits et réactifs chimiques

- Eau peptonée ;
- Eau physiologique.

II. Méthodes

II.1. Test de contrôle de la qualité hygiénique

Dans le but de contrôler la qualité microbiologique de la viande de poulet (*Gallus gallus domesticus*), nous avonsensemencé 1ml de la solution mère (2g de la viande de poulet introduite dans 18 ml d'eau peptonée 0.1%) sur gélose nutritif (GN) puis, les boites sont incubées à 37°C pendant 24h.

II.2.Effet inhibiteur de l'HE du basilic sur *S. typhimurium* inoculée sur la viande de poulet

La concentration en HE qui est nécessaire pour qu'elle exerce son pouvoir antibactérien dans une matrice alimentaire doit être supérieure à celle appliquée « in vitro ».

Burt (2004) a suggéré que les valeurs des CMI des HE obtenues « in vitro » doivent être affectées d'un coefficient correcteur allant de 2 à100, pour qu'elles aient le même effet dans une matrice alimentaire.

Le choix du coefficient correcteur a été établi après avoir procédé à des tests préalables de dégustations avec les HE. Nous avons jugé utile de multiplier les valeurs des CMI, par un coefficient de 4.

II.2.1.Protocole expérimental

La viande de poulet est achetée fraîchement au marché local de Djendel. Elle est nettoyée, rincée à l'eau distillé, laisser égouttée, conservée auréfrigérateur à (6°C), jusqu'au moment de l'emploi. Des échantillons de viande fraîche (cuisse) sont préparés dans des boites de Pétris en verre, puis ils ont été inoculés en surface à l'aide d'un écouvillon avec une charge de 10^7 UFC/g de *S. typhimurium*.

Matériel et méthodes

Les différents échantillons sont répartis comme suite :

- * 20 g de viande fraîche + *S. typhimurium* + HE d'*O. basilicum* de concentration (1 x CMI).
- * 20 g de viande fraîche + *S. typhimurium* + HE d'*O. basilicum* de concentration (4 x CMI).
- * 20 g de viande fraîche + *S. typhimurium* (Témoin).

L'échantillon témoin a été traité avec de l'eau distillée stérile, puis conservé à une température de réfrigération de 6°C pendant 7 jours.

II.2.2. Analyse microbiologique

Afin de déterminer l'effet des HE appliquées à la viande de poulet inoculée par la bactérie test, des analyses microbiologiques sont effectuées pour suivre la cinétique de la croissance bactérienne en présence et/ou en absence de l'HE.

Les dénombrements des bactéries sont réalisés à partir des prélèvements de deux jours (**J₁** ; **J₃** ; **J₅** ; **J₇**). Pour cela, 2g de viande de poulet fragmentée en petites morceaux, dont sont prélevés de chaque échantillon, et introduits dans 18 ml d'eau peptonée stérile (0,1%). Des dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) décimales sont préparées à partir de la solution mère. L'ensemencement de 1ml de la solution mère et ses dilutions est effectué dans des boites de Pétris contenant environ 15 ml de gélose sélective (Hektoen).

Incubation à 37°C pendant 24 heures. La lecture est réalisée par comptage direct des colonies caractéristiques pour l'espèce. Le dénombrement est exprimé en Log UFC/g comme étant moyenne de deux déterminations (**Figure 13**).

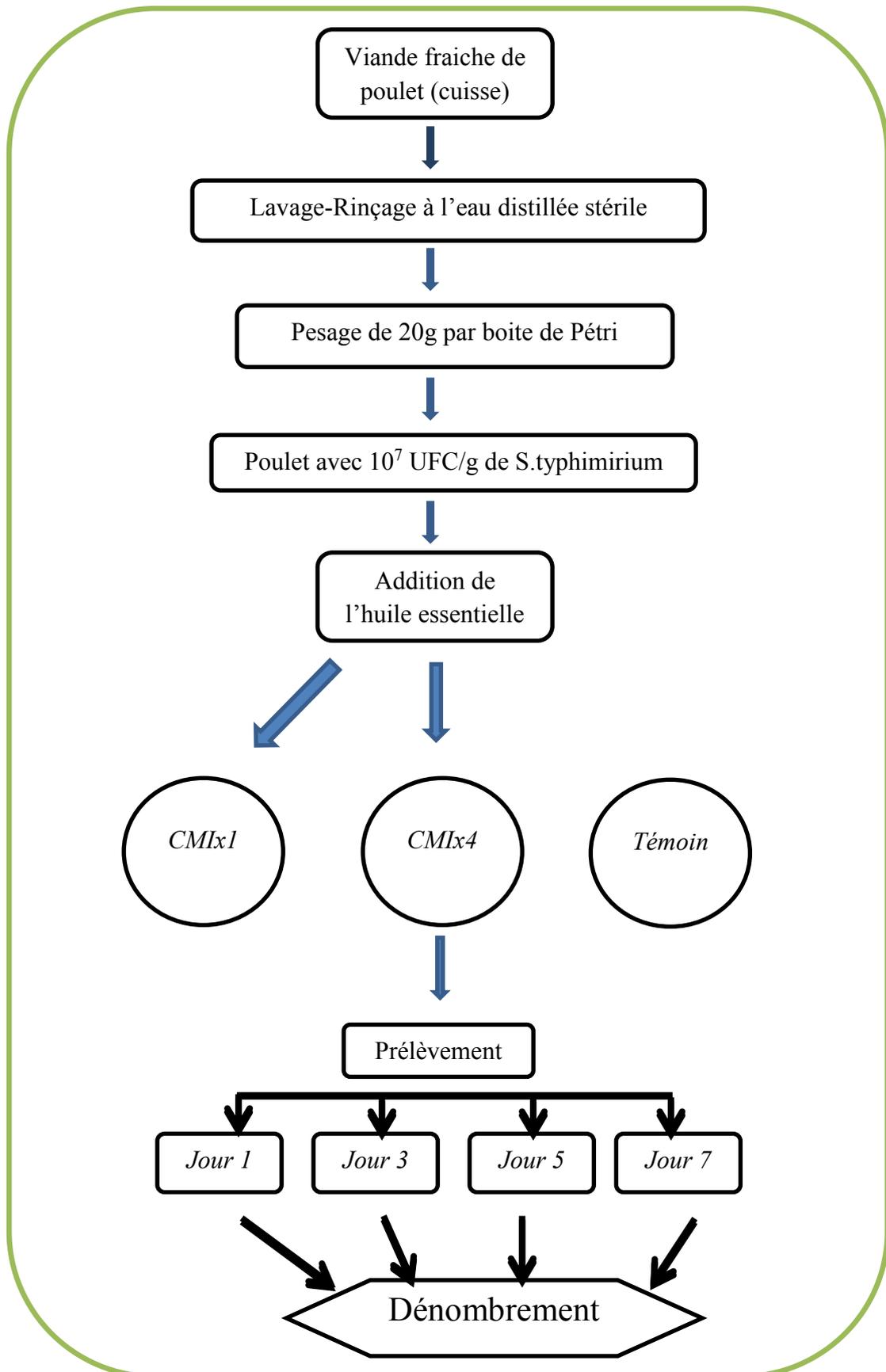


Figure 13 : Schéma du test de l'activité antibactérienne de l'HE d'*O. basilicum* sur la viande de poulet inoculée avec *S.typhimurium*

Chapitre V:



*Résultats et
discussion*

Chapitre V : Résultats et discussion

Partie I : Préparation et analyses physico-chimiques des extraits d'*O. basilicum*.

I. Taux d'humidité

Les végétaux sont riches en eau, les analyses de notre échantillon ont révélé un taux d'humidité important compris entre 83% et 88%. Cela signifie que plus de la moitié du poids de la plante fraîche est constituée par l'eau. (Figure 14).

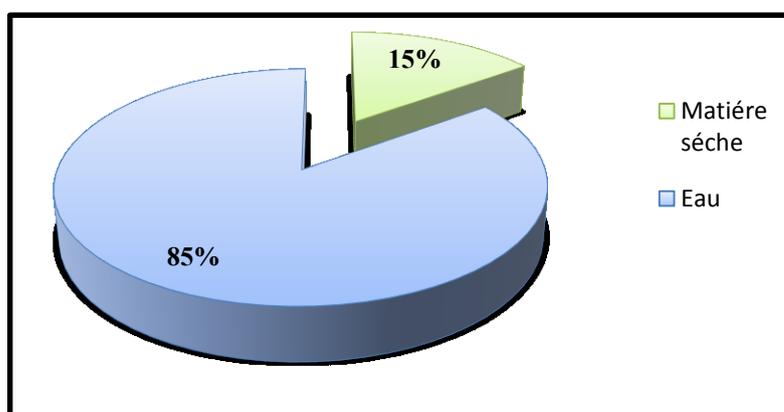


Figure 14 : Teneur en humidité et en matière sèche d'*O. basilicum* de la région de Ain Defla

La teneur en eau de la plante *Lappia citriodora* de la région de Miliana obtenue par **Fellah et Mouaici. (2015)** est légèrement faible par rapport à celle de notre plante, qui est de l'ordre de 74.66%. Par contre le docteur **Makhloufi. (2010)** a aperçu des taux d'humidités plus faibles : 20.80% et 28.17% respectivement pour *Matricaria pibescens* et *Rosmarinus officinalis L.* provenant de la région de Béchar.

Selon **Hamoudi, (2012)** la différence marquée entre les teneurs en eau pourrait être expliquée par la saison et la région de récolte, la plante d'*O. basilicum* comprend approximativement des quantités équivalentes de matière sèche et d'eau au mois de juin, aussi les plantes cultivées dans les régions tempérées comme le sud Algérien ont un taux d'humidité plus faible par rapport aux plantes cultivées dans le nord.

II. Rendement en HE

L'HE a été extraite de la matière végétale sèche, le rendement en HE varie beaucoup avec la plante utilisée, les pratiques culturales, l'origine de la plante, le matériel employé et la méthode d'extraction.

Du point de vue rentabilités en poids, *O. basilicum* présente un rendement satisfaisant (1.2%) non seulement en comparaison avec les autres plantes de genre différents mais aussi avec la même espèce de région différente. Ceux de Ourgla, Beskra et Ghardaia (**Khamouli et Grazza, 2007**), de Khemis miliana (**Hamoudi, 2012**), d'El teref (**Ouibrahim, 2015**) et Ougadougou (**Constantine et al., 2011**), présentent des taux relativement faibles : 0.1%, 0.33%, 0.48%, 0.14%, 0.6% et 0.79% respectivement.

Au contraire, *O. basilicum* du Sénégal (**Saliou et al., 2009**) et de Ain defla (**Brada et al., 2011**), ont présenté un taux supérieure au notre avec 1.26% et 1.96 respectivement.

Cette différence pourrait être expliquée selon **Kelen et Tepe. (2008)**. Par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en terme de rendement et qualité de l'HE. Le climat, la zone géographique, l'organe de la plante utilisé, la période de séchage, etc. Ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur les rendements en HE (**Vekiari et al., 2002**).

III. Caractérisation des huiles essentielles

III.1. Caractéristiques organoleptique

Les caractéristiques organoleptiques de notre l'huile essentielle (**Figure 15**) sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 07 : Caractéristiques organoleptiques de notre huile essentielle.

L'odeur	La couleur	L'aspect physique
Aromatique, caractéristique de la matière végétale	Jaune claire	Liquide huileuse

Aspect physique, la couleur et l'odeur de notre HE sont en accord avec ceux rapportées par **Hamoudi. (2012)**.



Figure 15 : l'HE d'*O. basilicum*

III.2. Caractéristiques physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques tels que : l'indice de réfraction, PH, l'indice d'acide, l'indice d'ester,... etc, constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle (**Afssaps, 2008**). Les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles analysées ont été déterminées selon les normes de l'association française de normalisation (AFNOR). Les moyennes des paramètres étudiés sont représentées dans le tableau 08.

Tableau 08 : Caractéristiques physico-chimiques de l'HE d'*Ocimum basilicum*.

	Caractéristiques physico-chimiques				
	pH	I _A	I _S	I _E	I _R
Nos résultats	5	7.01	16.83	9.81	1.6536
Hamoudi. (2012)	3.812	4.48	20.45	15.97	1.524
Norme AFNOR	-	-	-	-	1.51 à 1.52

Nos résultats ont été mis en parallèle avec ceux donnés par **Hamoudi. (2012)**. Les paramètres physico-chimiques diffèrent suivant l'origine de l'huile essentielle. Ainsi, une huile de France n'aura pas les mêmes valeurs de paramètres qu'une huile d'Algérie, de la

Tunisie, de Madagascar,Tous ces paramètres sont influencées par les conditions édaphiques, climatique ainsi que les conditions de cultures des plantes ; il est logique que leurs valeurs différent d'un endroit à l'autre du globe. (**Rajeswara et al., 1993 ; Kulkarni et al., 1996 ; Juliani et al., 2006**)

- Le pH obtenu indique que notre HE est légèrement acide.
- L'indice de réfraction (I_R) est une grandeur qui nous permet d'identifier l'HE, aussi de contrôler sa pureté, en effet un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé (**Boukhatem et al., 2010**).
- Pour les constantes chimiques, l'indice d'acide (I_A) donne une idée sur le taux d'acides gras libres, ce paramètre peut nous aider à savoir la qualité de notre produit. L' I_A de l'HE d'*O. basilicum* est de 7.01, un produit avec un indice d'acidité faible est un produit de bonne qualité. En effet, une huile fraîche ne contient que très peu d'acides libres. C'est pendant la période de stockage que l'huile peut subir des dégradations telle l'hydrolyse des esters. **Lazouni et al., (2007)**.
- Plus la valeur de l'indice de saponification de l'HE est élevée 16.83 plus le poids moléculaire est faible.
- La valeur de l'indice d'ester (I_E) de notre HE (9.81) est faible comparativement à celle enregistrée par **Hamoudi, (2012)**.

Partie II : Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne de nos extraits.

I. Activité antioxydante

L'activité antioxydante de nos extraits a été évaluée par deux méthodes : la capacité antioxydante totale (CAT), et le test du piégeage du radical libre DPPH.

I.1. La Capacité antioxydante totale (CAT)

Les résultats de la **figure 16** indiquent les valeurs de la capacité antioxydante totale des extraits étudiés, ces résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de matière sèche.

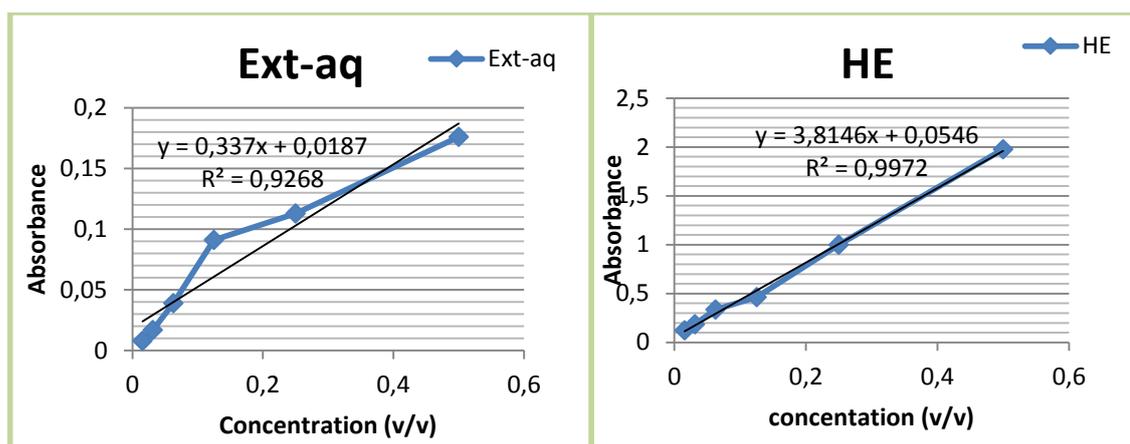


Figure 16: La capacité antioxydante totale des extraits d'*O. basilicum*

D'après la **figure 16**, on constate que les deux extraits (HE et Ext-aq) de notre plante présentent une forte capacité antioxydante totale avec 965 mg EAA/g MS pour l'huile essentielle et 58 mg EAA/g MS pour l'extrait aqueux.

D'après les recherches de **Jayasinghe, Gotoh, Aoki *et al.*, (2003)** le principal antioxydant retrouvé dans les feuilles de basilic est l'acide rosmarinique.

L'activité anti-oxydante de l'acide rosmarinique est due à la présence de quatre groupes hydroxyles dans sa molécule (**Caniova *et al.*, 2001**). Ce dernier est présent dans les espèces de la famille des *Lamiacea* (**Ribeiro *et al.*, 2001**); (**Yanishkieva et Marinova; 1995**); (**Petersen et Simmonds; 2003**); (**Scarpati et Oriente; 1958**); (**Zgorka et Glowniak; 2001**); (**Carnat *et al.*, 1998**); (**Lamaison *et al.*, 1990**); (**Lamaison *et al.*, 1991**)

Zgorka et Glowniak, (2001) ont rapportées que les variations du contenu en acide rosmarinique provenant de 10 plantes de la famille des *Lamiacea*, permettent de classer l'*O. basilicum* comme la deuxième plante la plus riche en acide rosmarinique. (**Annexe6**)

Quelques travaux ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que les antioxydants synthétiques (**Hussain *et al.*, 2010**). Les effets antioxydants des huiles essentielles et des extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique (**Hussain, 2009**).

1.2. Test du piégeage du radical libre DPPH

Le piégeage des radicaux DPPH est une méthode couramment utilisée pour évaluer la capacité des extraits des plantes à piéger les radicaux libres générés à partir du réactif DPPH.

Résultats et discussion

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C), les antioxydants synthétiques BHT (butyl-hydroxy-toluène) ou le Trolox[®] (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E (Molyneux, 2004).

Nous avons opté pour tester deux extraits des feuilles d'*O. basilicum*. Les résultats obtenus sont représentés dans les **figures (17 et 18)**.

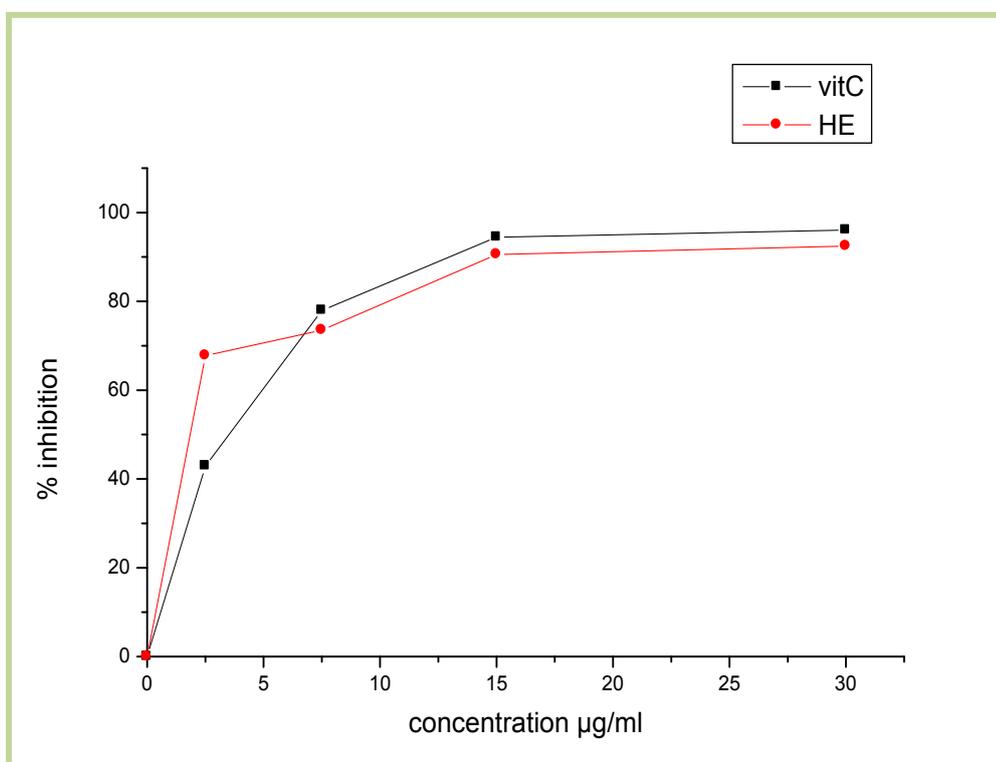


Figure 17 : Résultat de l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* par le test DPPH.

Les résultats du pouvoir antioxydant des extraits testés montrent que le pourcentage d'inhibition de l'HE d'*O. basilicum* est supérieur à 90% à une concentration de l'ordre de 30 µg/ml et celui de l'Ext-aq est supérieur à 70% à une concentration de 100 µg/ml.

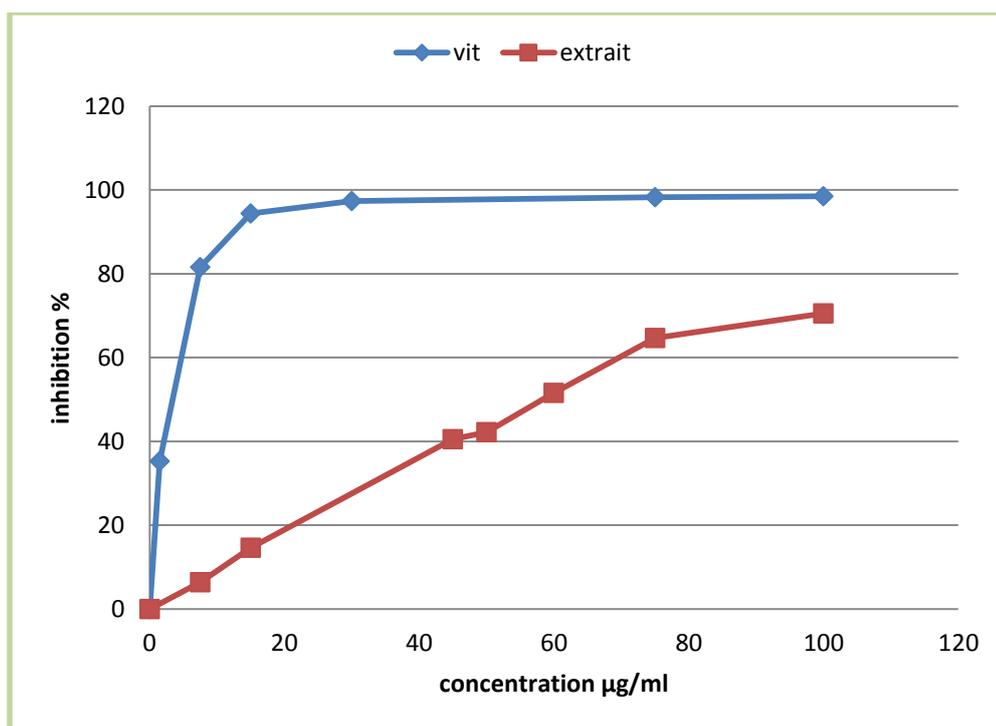


Figure 18 : Résultat de l'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux d'*Ocimum basilicum* par le test DPPH

La capacité antioxydante de nos extraits a été déterminée à partir des IC_{50} , c'est la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH•. Plus la valeur d' IC_{50} est faible plus l'activité de l'extrait est grande (**Pokorny et al., 2001**)

Les résultats expérimentaux obtenus montrent que l'HE d'*O. basilicum* présente une activité très importante avec une IC_{50} de 4.2 $\mu\text{g/ml}$. Cette valeur est inférieure à celle de l'acide ascorbique (IC_{50} = 6.4 $\mu\text{g/ml}$). Nous avons constaté aussi que l'Ext-aq des feuilles d'*O. basilicum* présente une activité remarquable vis-à-vis du piégeage du DPPH• avec une IC_{50} de 62 $\mu\text{g/ml}$.

L'H.E d'*Ocimum basilicum* a fait l'objet de nombreux travaux dont les résultats sont variables. Les travaux d'**Ijaz Hussain et al., (2008)** sur l'HE d'*Ocimum basilicum* en fonction de différentes périodes de récolte dans l'année, démontrent que les HE de la période d'hiver et de printemps jouissent d'une plus grande activité antiradicalaire comparée à celle de l'automne et de l'été, présentant des valeurs respectives d' IC_{50} de 4.8, 5.3, 6.0 et 6.7 $\mu\text{g/ml}$. Cette variabilité est due aux impacts des facteurs environnementaux sur la composition chimique des HE ainsi que sur leurs activités biologiques.

Agbodan et al., (2014) montrent que l'*Ocimum basilicum* à linalol est l'échantillon le plus antioxydant avec une IC₅₀ de 266 ppm.

Une autre étude a montré une similitude des IC₅₀ entre l'HE de basilic et un agent antioxydant de référence le BHT, soit IC₅₀ équivalente à 1,378g/l et 0,908g/l (**Politeo et al., 2007**).

Ouibrahim, (2010) a enregistré une IC₅₀ de 2 mg/ml avec l'HE d'*O. basilicum* de la région d'El Kala, de même **Constantin et al., (2011)** a trouvé une activité antiradicalaire de 1.8 mg de l'HE du basilic à Ouagadougou.

II. Activité antibactérienne des extraits

II.1. Aromatogramme

L'activité antimicrobienne des extraits du basilic a été testée par la méthode de l'aromatogramme. Les diamètres d'inhibition ont été déterminés en exposant les souches aux extraits purs (**Annexe 6**). Le potentiel antibactérien de l'HE et de l'extrait aqueux d'*O. basilicum* de la région de Ain Defla a été évalué sur 11 espèces bactériennes (dont six Gram (-) et Cinq Gram (+)) provenant du labo de recherche de l'Université Aboubakr Belkaid - Tlemcen.

Les résultats exprimés dans les **figures (19, 20 et 21)** montrent que les espèces bactériennes étudiées présentent des degrés de sensibilité différents vis-à-vis des extraits testés.

On remarque que l'HE d'*O. basilicum* est plus active que l'Ext-aq sur toutes les espèces testées.

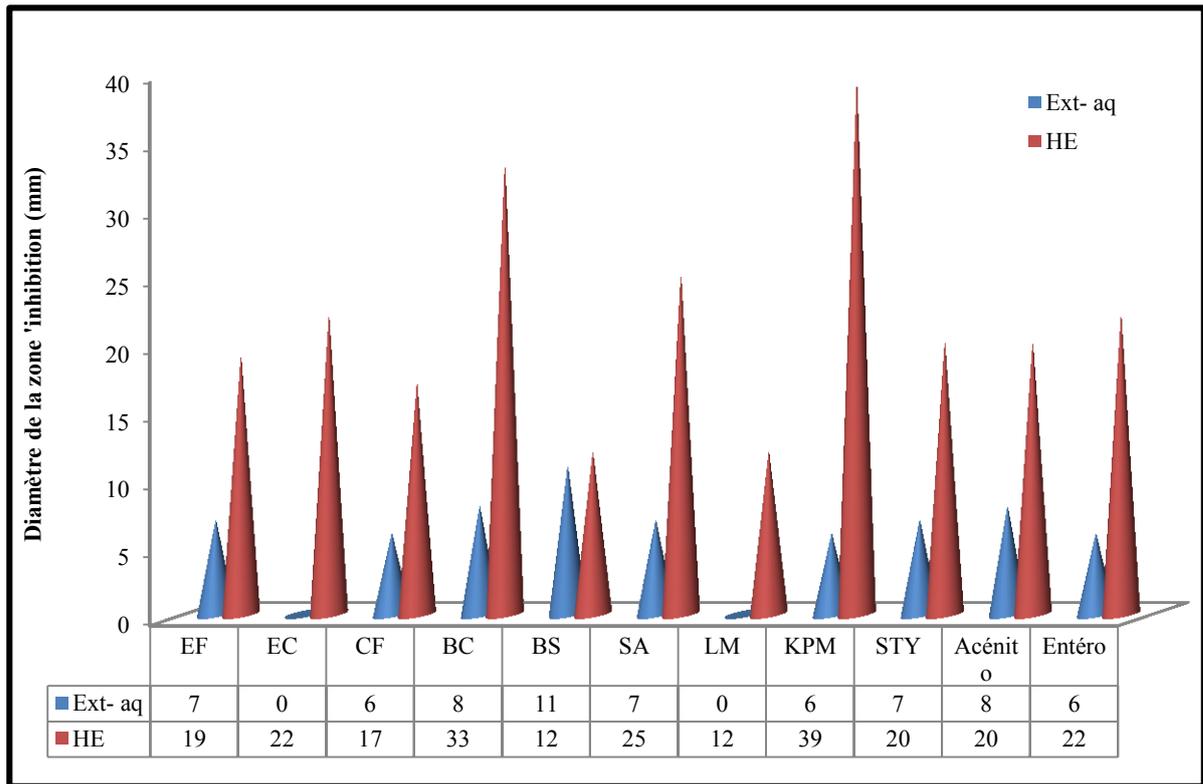


Figure 19 : Résultats de l'aromatogramme des extraits d'*O. basilicum*.

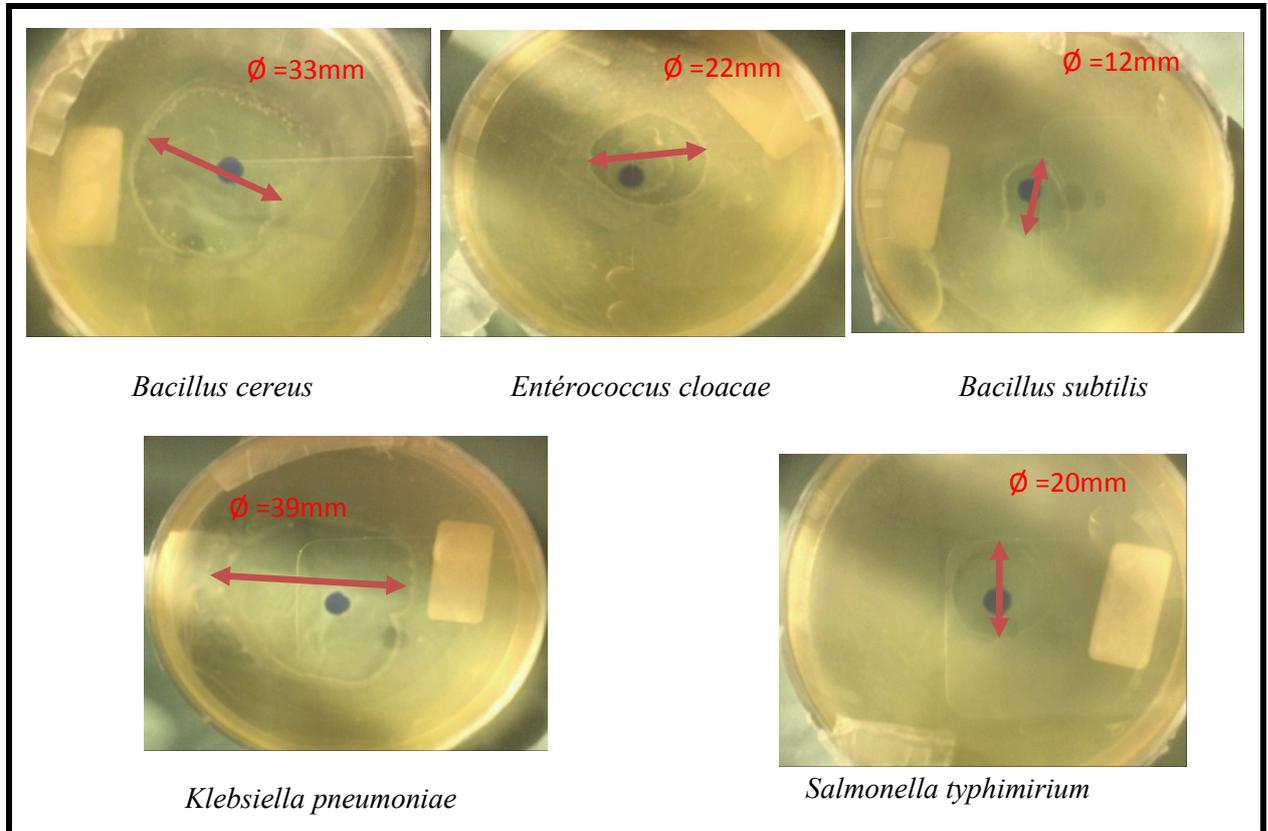


Figure 20 : Résultats de l'aromatogramme de l'HE d'*O. basilicum*.

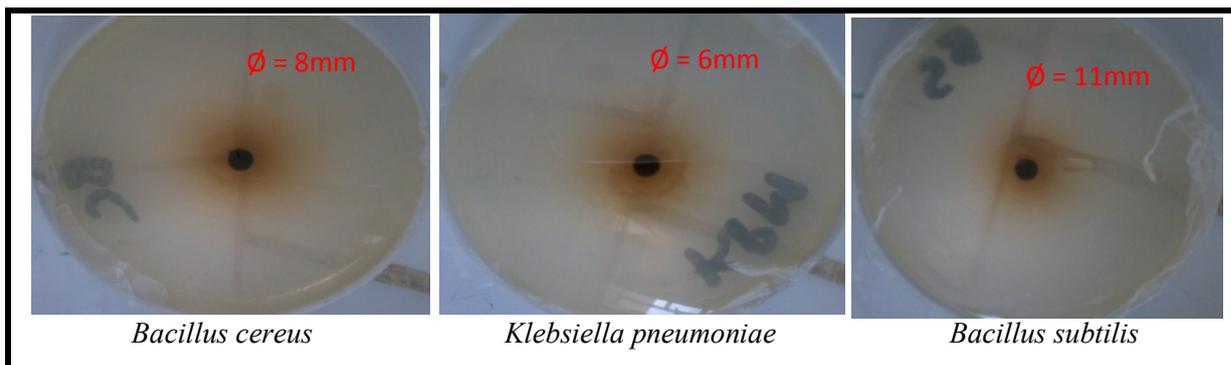


Figure 21: Résultats de l'aromatogramme de l'extrait aqueux d'*Ocimum basilicum*.

➤ Huile essentielle

La plus grande surface d'inhibition est enregistrée avec *Klebsiella pneumoniae* (39 mm), suivi par *Bacillus cereus* (33 mm). Ces 2 espèces sont donc les plus sensibles à l'HE d'*O. basilicum*. En revanche, *Staphylococcus aureus*, *Entérococcus cloacae*, *Echerichia coli*, *Salmonella typhimurium*, et *Acénitobacter baumannii* sont légèrement moins sensibles à cette HE.

Une activité modérée est enregistrée avec les 4 autres espèces *Citrobacter freundii*, *Entérobacter foecalis*, *Listéria monocytogenes*, et *Bacillus subtilis* pour lesquelles les diamètres des zones d'inhibition n'ont pas dépassé les 19 mm.

Nos résultats sont meilleurs que celle trouvés par **Ouibrahim. (2015)** sur les mêmes espèces étudiées : *Staphylococcus aureus* (18,8 mm), *Klebsiella pneumonia* (16 mm), *Escherichia coli* (11,8 mm), *Entérobacter cloacae* (13,6 mm), *Citrobacter freundii* (8,4 mm) et *Acénitobacter baumannii* (11,7 mm).

L'HE d'*O. basilicum*, contient une forte quantité de β -linalol suivie de α -Terpinéol acétate, et de 1,8 cinéole. Ces composants sont à l'origine du pouvoir inhibiteur de l'HE du basilic. Plusieurs recherches, ont estimé que la forte teneur en linalol est le précurseur de l'activité antibactérienne (**Sartoratotto et al., 2004; Koutsoudaki et al., 2005; Sokovic et al., 2006**).

Selon **Wang et ses collaborateurs (2012)**, l'impact des composés mineurs n'est pas à négliger. Ils ont démontré que les HEs entières ont une activité antimicrobienne supérieure à un mélange de composants majeures des mêmes huiles essentielles, ce qui suggère que les composants mineurs peuvent avoir un effet synergique

Le degré de sensibilité des bactéries testées vis-à-vis d'une même HE est supposé varier selon le Gram. **Chalestori et al., (2015)** ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (-) par rapport aux bactéries Gram (+).

D'autres résultats sont confirmés par de nombreuses expériences (**Inouye et al., 2001, Lopez et al., 2005, Bozin et al., 2006 ; Bouzouita et al., 2008**) ayant montré que les bactéries Gram (-) sont plus résistantes aux HE que les bactéries Gram (+).

Ces affirmations n'ont cependant pas été confirmées d'autres travaux, la susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram (**Usman et al., 2013; Adeola et al., 2012 ; Inouye et al., 2001**). Nos résultats corroborent cette dernière affirmation.

➤ Extrait aqueux

Les résultats de cette étude (**figure 21**), ont montré que l'extrait aqueux d'*O. basilicum* a un effet antibactérien faible par rapport à l'HE sur la totalité des souches testées (diamètre de la zone d'inhibition ne dépasse pas les 11 mm)

On peut expliquer ces résultats par la différence de composition entre les 2 extraits (**Verma et al., 1997**)

Nos résultats sont très loin de ceux indiqués par **Makhloufi. (2010)** qui a trouvé que l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens* exerce une forte activité sur les souches testées avec un diamètre de 31 mm pour *Listéria monocytogénés* et un diamètre de 28 mm pour *Enterococcus faecalis*.

- **Comparaison avec les antibiotiques**

La comparaison quantitative des résultats des extraits et des antibiotiques est difficile, car la nature de l'activité et la composition des molécules ne sont pas comparables (**Pibier, 2002**). On peut tout de même risquer à une comparaison globale de l'activité des antibiotiques avec celle des extraits de notre plante.

A partir des **figures (22 et 23)**, nous pouvons constater que les effets des antibiotiques et des extraits sont différents sur la plupart des souches étudiées.

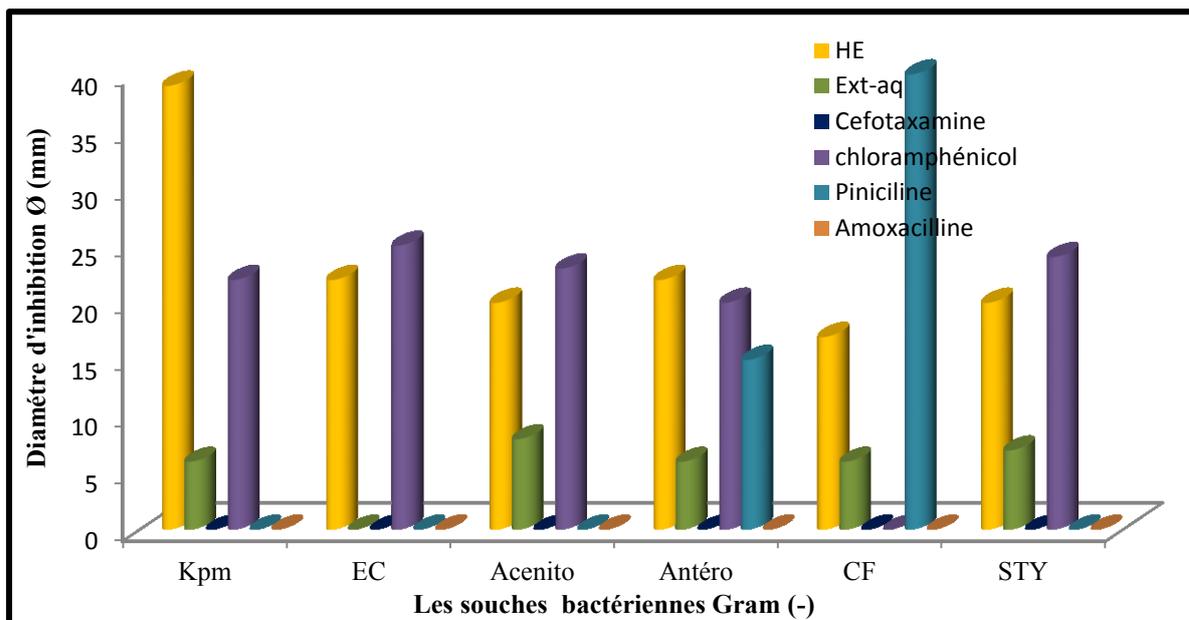


Figure 22 : Comparaison entre les résultats de l’aromatogramme et de l’antibiogramme sur les bactéries Gram (-)

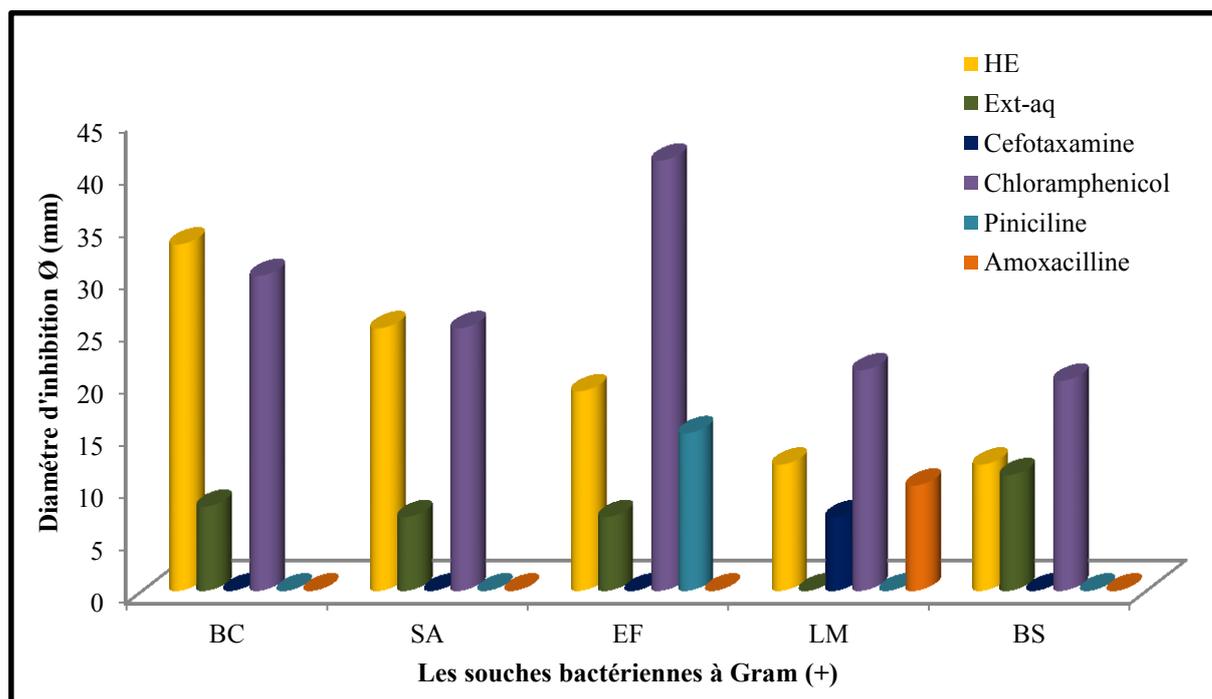


Figure 23 : Comparaison entre les résultats de l’aromatogramme et de l’antibiogramme sur les bactéries Gram (+)

Résultats et discussion

Nos extraits ont une activité supérieure à celle de la Cefotaxamine et Amoxicilline avec la totalité des espèces. Ils sont globalement meilleurs que la Penicilline à l'exception pour la bactérie *Citrobacter freundii*.

Pour la Chloramphenicol, l'activité antibactérienne est très adjacente à celle de notre huile essentielle, avec une primauté notable concernant la souche *Entérobacter foecalis*

II.2. Qualification de l'activité antibactérienne de l'HE

Les résultats présentés dans le **tableau 09** montrent que l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* a un effet bactéricide avec une augmentation de diamètre d'inhibition pour certaines bactéries telles que *Klebsiella pneumonia* (40mm), *Bacillus cereus* (25mm), *Acénitobacter baumannii* (22mm), *Escherichia coli* (22mm), *Entérobacter cloacae* (23mm), *Salmonella typhimurium* (20mm), *Citrobacter freundii* (19mm), *Enterococcus foecalis* (18mm) et *Listéria monocytogénèse* (14mm). Pour les autres espèces (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), l'HE d'*O.basilicum* exerce une activité bactériostatique qui diminue en fonction de temps.

Tableau 09 : Qualification de l'activité antibactérienne de l'HE (après 7 jours d'incubation).

Les souches bactériennes à tester		Diamètre Ø (mm) après 7 jours	L'effet des HE
Gram-	<i>Klebsiella pneumonia</i>	40	Bactéricide
	<i>Escherichia coli</i>	22	Bactéricide
	<i>Acénitobacter baumannii</i>	22	Bactéricide
	<i>Citrobacter freundii</i>	19	Bactéricide
	<i>Entérobacter cloacae</i>	22	Bactéricide
	<i>Salmonella typhimurium</i>	20	Bactéricide
Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	Bactériostatique
	<i>Bacillus cereus</i>	25	Bactéricide
	<i>Enterococcus foecalis</i>	19	Bactéricide
	<i>Listéria monocytogénés</i>	14	Bactéricide
	<i>Bacillus subtilis</i>	-	Bactériostatique

(-) : Développement des colonies dans le halo translucide.

II.3. Détermination des CMI

Les résultats sur les **tableaux 10 et 11** indiquent les valeurs des CMI des extraits d'*O.basilicum* vis-à-vis des bactéries testées.

➤ Huile essentielle

Les analyses des résultats montrent que notre HE présente une activité antibactérienne remarquable (**figure 24**). En effet, pour les 11 souches étudiées, la gamme des CMI varie de 0.03% à 0.0005%.

Ainsi, les 11 bactéries n'ont montré aucune croissance en présence de la solution mère de l'HE. Cette concentration est donc inhibitrice pour l'ensemble des souches étudiées.

Tableau 10 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'HE d'*O. basilicum*

Souches	<i>KPM</i>	<i>EC</i>	<i>Acénito</i>	<i>CF</i>	<i>Entero</i>	<i>SA</i>	<i>BC</i>	<i>STY</i>	<i>EF</i>	<i>LM</i>	<i>BS</i>
CMI (%)	0.0005	0.003	0.003	0.03	0.003	0.003	0.003	0.007	0.003	0.003	0.003

Nos résultats sont déferents à ceux indiqués par **Ouibrahim, (2015)** qui a trouvé que, la souche qui s'est montrée la plus sensible à l'HE d'*O. basilicum* est *E. coli* avec une CMI de (0.12%), suivie d'*E. faecalis*, *Citrobacter Freundii*, et *Salmonella sp* dont la croissance a été inhibée à la concentration de (0,25%).

Par contre, **Makhloufi, (2010)** et par l'étude de l'H.E de *M. pubescens* a démontré que *E.coli* est la souche la plus sensible avec une CMI de (0.0005%) ; au même temps il a constaté la résistance de *S.aureus*, *B. cereus* et *E.feacalis*. D'autre part l'H.E de *R. officinalis* a montré une activité contre la plupart des bactéries testées, et la concentration minimale inhibitrice (CMI) est située entre (0.015% et 0.007%).

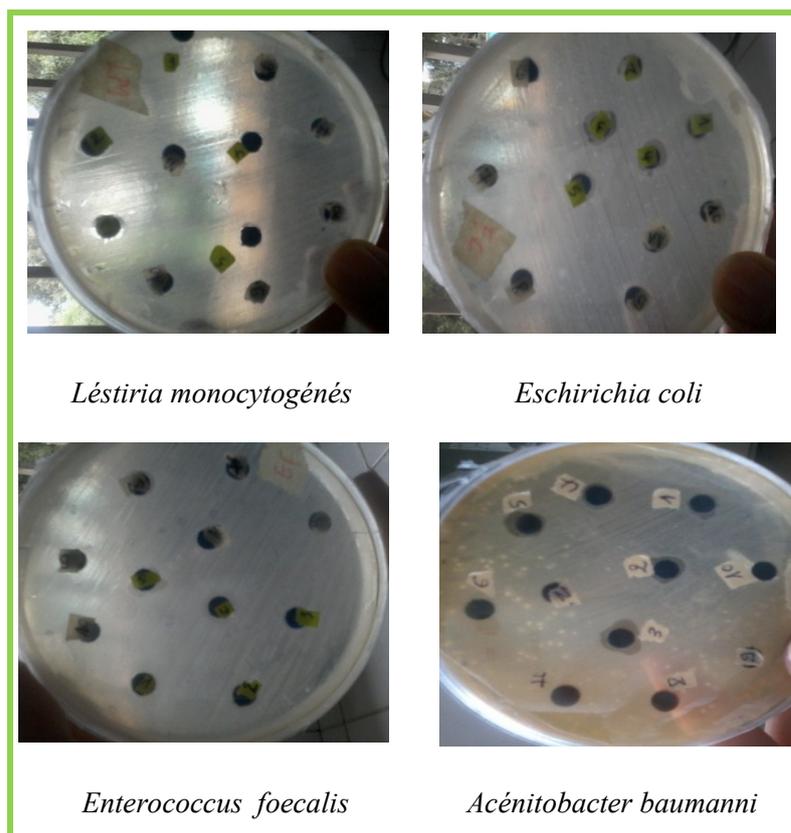


Figure 24 : Résultats des CMI de l'HE d'*O. basilicum*.

➤ Extrait aqueux

Les résultats de l'Ext-aq d'*O. basilicum* (**Tableau 11 et Figure 25**), ont montré que cet extrait n'est actif que sur 3 espèces bactériennes à savoir : *Bacillus subtilis* (0.12%), *Bacillus cereus* (0.12%) et *Acénitobacter baumannii* avec une concentration de (0.06%)

Tableau 11 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait aqueux d'*O. basilicum*

Les souches bactériennes	CMI [%]
<i>Bacillus subtilis</i>	0.12 %
<i>Acénitobacter baumannii</i>	0.06 %
<i>Bacillus cereus</i>	0.12 %

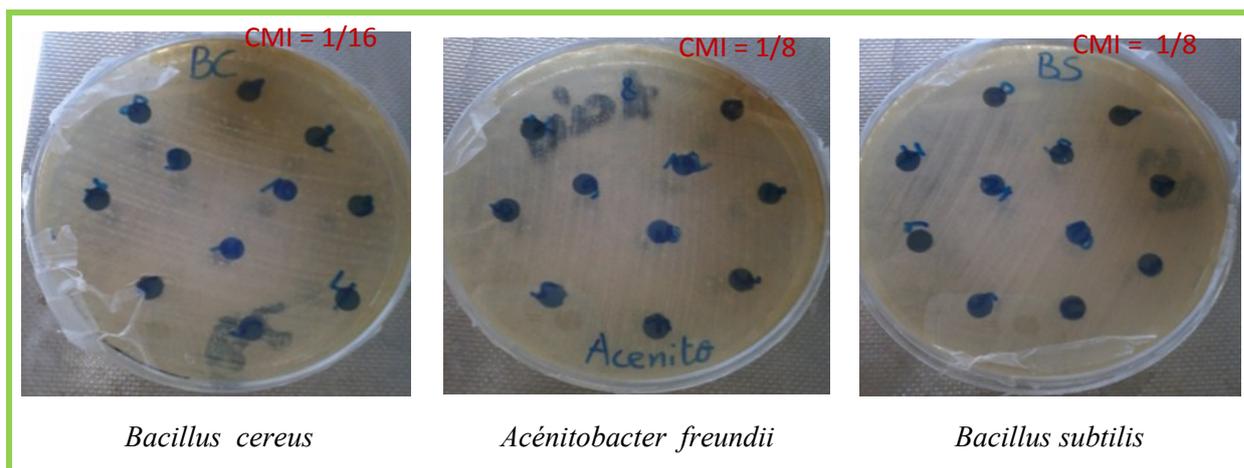


Figure 25 : Résultats des CMI de l'extrait aqueux d'*O. basilicum*.

Makhloufi. (2010) a constaté que les extraits aqueux des deux plantes « *M. pubescens*, *R. officinalis* » réagies positivement sur la majorité des souches testées. *E. faecalis* est la souche la plus sensible avec une CMI de 0,5 mg/ml ; alors que *P.aeruginosa* et *S.aureus* sont les souches les plus résistantes avec une CMI de 2,33 mg/ml.

Partie III : Bioconservation par l'HE d'*O. basilicum*

I. Qualité hygiénique du poulet

Les chaînes d'abattage de volailles ne disposent d'aucun moyen ni de barrières efficaces capables de contrôler les salmonelles. Depuis l'origine de la production à travers l'ensemble de la filière la microflore du poulailler est transférée à l'abattoir puis aux ateliers de découpe sur les parties externes des volailles mais aussi avec leur microflore digestive. La contamination croisée se produit particulièrement pendant l'échaudage, le plumage, la section de la tête, l'éviscération et le refroidissement. (**Fries., 2002**)

La prévalence et la distribution de Salmonella dans la viande crue et les abats (foie, gésier et cœur) de poulet provenant d'établissements de transformation de volailles et de marchés montre que les gésiers sont les plus contaminés, à l'opposé de la peau qui est la moins contaminée et le sérotype le plus commun est S.T. (**Molla and Mesfin., 2003**).

A partir des résultats obtenus, on remarque que la viande de poulet contient une flore bactérienne de 10^3 UFC/g.

D'après Cécile *et al.*, 1972 « la flore microbienne rencontrée sur la peau des volailles, immédiatement après leur abattage, est constituée d'espèces très diverses ; son hétérogénéité a été montrée par de nombreux auteurs (Gunderson, Mac Faddenet Kyle, 1954; Walker et Ayres, 1956 ; Barnes, 1960). Ultérieurement, au cours des opérations qui suivent l'abattage, les conditions d'environnement provoquent une sélection parmi les germes susceptibles de se développer.

II. Activité antibactérienne de l'HE du basilic appliquée sur la viande de poulet

En raison de l'utilisation de l'HE d'*O. basilicum* en bioconservation alimentaire, cette étude visait en premier lieu à déterminer l'efficacité antibactérienne «*in vitro*» de l'HE obtenue à partir de l'espèce végétale étudiée et en deuxième lieu évaluer son application sur un produit largement consommé en Algérie « la viande de poulet » pour tester son efficacité antimicrobienne. En se basant sur les résultats obtenus «*in vitro*», nous avons pu suivre la cinétique de développement de *S. typhimurium* inoculé dans la viande en présence de l'huile essentielle d'*O. basilicum*.

La Figure (26) montre les résultats de développement de *S. typhimurium* sur la viande de poulet conservé à 6°C en présence de différentes concentrations en HE d'*O. basilicum*. D'après ces résultats, il ressort que l'effet antibactérien exercé est proportionnel à la concentration de l'HE rajoutée sur le produit.

On remarque que le nombre de *S. typhimurium* sur la viande de poulet non supplémenté (Témoin) avec l'HE reste à-peu-près stable pendant les trois premiers jours, deux jours plus tard (5^{ème} jour) la charge atteint une valeur de 6 log₁₀ UFC/g.

Il ressort de ces résultats que lorsque l'HE est appliquée sur le produit à une concentration égale CMI×1, elle exerce un effet antibactérien par rapport à échantillon non traité (Témoin). Cet effet est évident dès le 1^{er} jour de stockage, en effet une réduction de 4 log₁₀ UFC/g de la charge bactérienne a été enregistrée en dernier jour de stockage (7^{ème} jour).

Il est évident d'après nos résultats, qu'une application de l'ordre de CMI×4 a permis une réduction bactérienne plus accentuée par rapport à la première concentration. En effet des réductions de 4 log₁₀ UFC/g et 6 log₁₀ UFC/g ont été enregistrées pendant le 5^{ème} et le 7^{ème} jour de stockage.

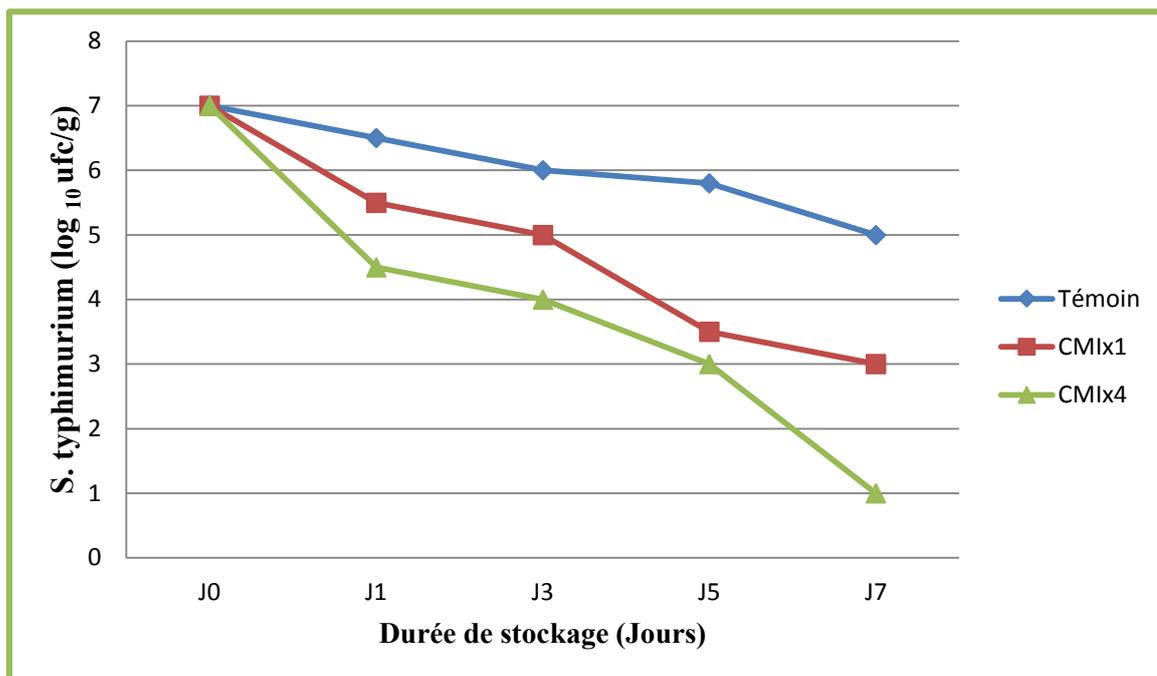


Figure 26 : Effet inhibiteur de l'HE d'*O. basilicum* à différentes concentrations vis-à-vis de *S. typhimurium* inoculée sur la viande de poulet pendant le stockage à 6°C.

Il ressort que lorsque l'HE d'*O. basilicum* est appliquée sur la viande à une faible concentration (CMI×1), l'effet observé est aussi meilleur. Toutefois, l'activité bactéricide a été prononcée lorsque l'HE est appliquée à une concentration supérieure (CMI×4).

Il faut souligner qu'une HE testée expérimentalement « in vitro » peut ne pas présenter le même effet dans un produit alimentaire. En général, selon **Burt, (2004)** pour obtenir un effet antibactérien significatif dans une matrice alimentaire, il faut des concentrations élevées de l'ordre de (5 – 20µl/g). En général, les HE possèdent des odeurs assez forte et puissante ce qui peut être un facteur limitant pour leurs applications dans des denrées alimentaires. Cependant, selon **Caillet et Lacroix, (2007)** les effets organoleptiques indésirables peuvent être limités en sélectionnant soigneusement l'HE selon le type d'aliment considéré.

Oussalah et al. (2007), ont rapporté que la différence dans les activités antibactériennes des HE peut être liée à la concentration, à la nature et le contenu, aux groupements fonctionnels, à la configuration des composés et, leur interaction synergique possible.

La disponibilité d'éléments nutritifs dans les aliments comme les graisses, protéines, substances antioxydantes, le sel, et d'autres substances, ainsi que , le pH, la température, le type de conditionnement, et les caractéristiques du microorganisme, sans nul doute peuvent influencer sur l'activité des HE. Ainsi, selon **Holley et Patel. (2005)**, à pH bas, l'hydrophobicité de certaines HE augmente ce qui leur permet de se dissoudre facilement dans la phase lipidique de la membrane bactérienne.

Burt, (2004) a suggéré qu'une faible teneur en eau dans les aliments peut entraver l'action des agents antimicrobiens envers les sites cibles dans la cellule bactérienne. Ainsi, un niveau élevé d'eau et du sel faciliterait l'action des HE. Le même auteur a constaté aussi, qu'une teneur élevée en graisses peut réduire sensiblement l'action des HE dans les produits carnés. Par formation d'une couche protectrice de graisses autour des bactéries ou bien la fraction lipidique dans l'aliment peut absorber l'agent antimicrobien en diminuant concentration et son efficacité dans la phase aqueuse.

Des analyses identiques ont été menées par **Firrouzi et al. (1998)** sur le poulet, en étudiant l'effet antibactérien des HE d'origan et de muscade contre *L. monocytogénés*.

Sharafati et leur collaborateur, et d'après leurs résultats de recherche, ont déduit que l'HE d'*O. basilicum* d'origine d'IRAN peuvent substitué des conservateurs synthétiques.

D'après l'étude d'**Idir, (2010)** les HE de la menthe poivrée et de la sarriette ont inhibées la croissance d'*E. coli* inoculée sue la viande hachée des taux respectivement de (68% et de 72.7%).

Selon **Tassou et al., (2000)** des extraits phénoliques ont été appliqués à une concentration de 0.4% sur une salade de thon inoculée avec une charge microbienne de 7 log₁₀ UFC/g (*S.aureus*, *Pseudomonas fragi* et *S. enteridis*). Les résultats ont pu montrer que ces extraits exercent une activité sur ces microorganismes. D'autre part, plusieurs chercheurs ont eu recours à des systèmes combinés l'HE avec d'autres moyens de conservation. **Djenane et al., (2002)** ont rapporté que les viandes traitées avec des antioxydants naturels, emballées sous atmosphère modifiée (AM), ont montré une stabilité chimique et microbiologique durant une longue période par rapport aux viandes non traitées. L'utilisation par exemple de l'acide lactique combiné avec de l'HE a permis de diminuer la charge bactérienne de *Brochothrix thermosphacta* et *Pseudomonas spp* au-dessous du seuil d'altération (< 7 log₁₀ UFC/cm²) et augmente la durée de conservation des produits sans altérer leurs propriétés sensorielles.

***Conclusion
générale***



CONCLUSION

Les HE sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe, ce qui leur confère des propriétés antibactériennes et antioxydantes très intéressantes à mettre à profit dans la préservation des produits alimentaires.

D'une part l'extraction de l'HE d'*O. basilicum* originaire de la région de Ain Defla, est effectuée par hydrodistillation. La détermination du rendement en huile essentielle a montré une rentabilité égale à 1,2%.

Les analyses physico-chimiques réalisées sur l'HE montrent que les cinq paramètres étudiés (pH, IR, IA, IS et IE) correspondent aux références de la littérature.

D'autre part, les travaux menés par notre étude ont permis de mettre en évidence les activités antibactériennes et antioxydantes des extraits d'*O. basilicum* étudiés. Ainsi, l'HE d'*O. basilicum* a exercé une importante activité antibactérienne à l'encontre des bactéries étudiées par rapport à l'extrait aqueux. Nous avons constaté que les souches les plus sensibles à cette HE sont : *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. En revanche *Listeria monocytogenes* et *E. coli* ont manifesté une résistance à l'égard de l'extrait aqueux. Pour l'activité antioxydante, nous avons remarqué que l'HE présente une forte capacité antioxydante par rapport à l'extrait aqueux.

Quant aux résultats des tests de la bioconservation de la viande de poulet, l'HE d'*O. basilicum* s'est révélée très intéressante par son pouvoir antibactérien.

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que l'HE d'*O. basilicum* semble être appropriée comme agent naturel dans la préservation des volailles.

De nouvelles perspectives peuvent être envisagées par une étude plus poussée de l'activité antibactérienne, et antioxydante non seulement sur les extraits utilisés seules ou leurs composants majoritaire, mais également en mélange, permettant ainsi une éventuelle synergie.

Il serait intéressant de continuer ces travaux notamment sur d'autres bactéries pathogènes, afin de confirmer l'efficacité ou non des extraits d'*O. basilicum*.

Conclusion générale

L'utilisation des films d'emballage naturels biodégradables et bioactifs après l'incorporation des extraits végétaux antimicrobiens et/ou antioxydants pour assurer l'innocuité et augmenter significativement la durée de la conservation des aliments à la place de certains conservateurs ou antioxydants de synthèse pourrait être envisagée dans le domaine agroalimentaire.

Référence bibliographiques

- Additifs alimentaires; **Microsoft® Encarta²®** 2009. © 1993-2008 Microsoft Coporation
- ADEOLA S.A., FOLORUNSO O.S. et AMISU K.O., (2012).** Antimicrobial Activity of *Ocimum basilicum* and its Inhibition on the Characterized and Partially Purified Extracellular Protease of *Salmonella typhimurium*; *Research Journal of Biology*. 02(05): 138-144
- AFNOR., (1986).** Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles; *AFNOR*; Paris. 57p.
- AGENCE FRANÇAISE DE SECURITE SANITAIRE DES PRODUITS DE SANTE (AFSSAPS), (2008).** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles ; bd Anatole France - F-93285 Saint-Denis cedex ; 143/147
- AHAMET Z.S., (2003).** Etude phytochimique et des activités biologiques de *Balanites aegyptiaca* L. (*Balanitaceae*). Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako : 117 P.
- ANTHOULA. A., (2003).** Plantes Aromatiques & Médicinales; Ministère De L'agriculture; Direction des Etudes et de La Coordination
- ANTON R., LOBESTEIN. A., (2005).** Plantes aromatiques, Edition Tec et Doc Paris
- ARABICI O. ET BAYRAM E., (2004).** The effect of nitrogen and different plant density on some agronomic and technologic characteristic of *Ocimum basilicum* L. (Basil); *Asian Network for Scientific Information*; 3(4): 255-262.
- BAJPAI V.K. ET KANG S.C., (2010).** Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides*; *Miki ex Hu. J. Am. Oil. Chem. Soc*; Vol. 87: pp. 327-336
- BARENES E. M., (1960).** Bacteriological problems in broiler preparation and storage. *R. Soc. Health J.* 8, 3, 145-148.
- BASER K.H.C. et Buchbauer G., (2010).** Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications; Ed. Taylor and Francis Group, LLC; *United States of America*; P: 994.
- BASSOLE H.N., KABORE Z. ET TRAORE A.S., (2002).** Étude des profils bactériostatiques et bactéricides d'extraits végétaux vis-à-vis de germes pathogènes impliqués dans la contamination des denrées alimentaires d'origine animale; *Pharm.Med.trad.afr*; Vol.11, pp. 113-122.

- BEKKALI F., AVERBECK S., AVERBECK L., (2008).** «Review MI-Biological effects of essential oils A Review Food and Chemical Toxicology»; Vol 46; p: 446-475; 2008
- BELHADJ S. K., MAHDJOUB M.A., AMMAR S., CHRAIEF I., MIGHRI Z. ET AOUNI M., (2006).** Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle de *Coridothymus capitatus* (L.). Univ. Monastir, Tunisie; P: 73-80.
- BENBROOK M., (2005).** Accroître la teneur antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques ; Ed. The organic center ; P: 6-8.
- BENTCHICOU A., (1999).** Extraction, caractérisation et analyse de l'huile essentielle de thym d'Algérie par chromatographie en phase gazeuse (CPG); *Thèse d'ingénieur* ; Univ. Médéa
- BEZANGER L., BEAUQUESNE L., PINKAS M. ET TORCK METOTROUTIN F., (1990).** Plantes médicinales des régions tempérées ; Ed. Maloine
- BOIS., (2004).** Détermination de l'humidité. ED : AFNOR. 3P
- BOTINEAU M., (2010).** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs ; Ed. TEC et DOC, Lavoisier, Paris. P : 1021-1043
- BOTREL A., (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales ; Ed. Larousse, France ; p 228
- BOUGANDOURA N., BENDIMERAD N., (2013).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.) Briq*; *Nature & Technologie*; (9): 15p
- BOUHDID S., IDOMAR M., ZHIRI A., BAUDOUX D., SKALI N.S., ABRINI J., (2006).** Thymus essential oils : chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities; *Congrès international de biochimie*, Agadir, Maroc; P : 9-12.
- BOUZOUITA N., et AL., (2008).** Composition chimique et activités antioxydants, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phœnicea*; *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 10, 119-125.
- BOYADZHIEV L. ET DIMITROVA V., (2006).** Extraction and Liquid Membrane Preconcentration of Rosmarinic Acid Form Plant Lamiacea; *Separation science and Technology*; Vol 41, P 877-886.
- BOZIN B., MIMICA-DUKIC N., SIMIN N., 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; *J. Agric. Food Chem*; 54: 1822-1828.
- BRADA M., KHELIFA L.H., ACHOUR D., WATHELET J.P. AND LOGNAY G., (2011).** Essential Oil Composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L.

Journal of Essential Oil Bearing Plants ; ISSN Print: 0972-060X Online: 0976-5026 from Algeria. *Jeobp.* **14(6)**: 810 – 814.

BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M E., BERSET C., (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie.* (28): 25-30.

BRUNETON J., (1987). Elément de Phytochimie et Pharmacognosie; Ed. Tech. Et Doc, Ed. Lavoisier 1^{er} édition, Paris. P 585

BRUNETON J., (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales ; Tec. Et Doc. Lavoisier. 3^{eme} édition ; P: 484-488.

BRUNETON J., (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales ; Ed. Tec Et Doc, Ed. Lavoisier. 4^{eme} édition. Paris; P 1292.

BURT S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: *Rev. Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253

CAILLET S. ET LACROIX M., (2007). Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire ; Ed.Laboratoire de recherche en sciences Appliquées à l'alimentation (RESALA) de l'INRS-Institut Armand-Frappier, Univ. Laval (Quebec).

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**: pp. 261-268.

CANIOVA A. AND BRANDSTETEROV E. A., (2001). HPLC Analysis of Phenolic Acids in *Melissa Officinalis*, *J. Liq. Chrom. & Rel Technol.*, 24 (17) 2647 – 2659.

CARNAT A. P., CARNAT A., FRAISSE D., RICOUX L. AND LAMAISON J. L., (1998). The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 72 (5), 301-305.

CARSON C.F., HAMMER K.A. & RILEY, T.V., (19956). Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca allernifoha* (tea tree oil). *Microbios* **82**, 181-5

CATHERINE P., (2009). Petit Traité Savant Du Basilic. Ed. Equinoxe.

CAVALLO J.D., CHARDON H., CHIDIAC C., CHOUTET P., COURVALIN P., DABERNAT H. ET AL. (2006). Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Staphylococcus* ssp. *Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie* ; **119** (1) : 33-5.

CÉCILE LAHELLEC C., MEURIER M., CATSARAS, MARIE-THERESE BONNET P., GOGÉ P., QUEMENEUR, ANNICK R., (1972). La flore psychrotrophe des carcasses de volailles. I. – Evolution aux différents postes d'une chaîne d'abattage ; *Annales de Recherches Vétérinaires*, INRA Editions, 3(3), pp.421-434.

CHARAFATI –CHALESTORI R., ROKNI N., RAFIEIAN-KOPAEI M., DREES. F., AND SALEHI E., (2015). Antioxidant and Antibacterial Activity of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Essential Oil in Beef Burger; *J. Agr. Sci. Tech.* Vol. 17: 817-826

CONSTANTIN D., ROGER H.C., NEBIE, ANDRE B., MOUHOUSINE N. ET FAUSTIN S. SIB., (2011). Effet du séchage de la matière végétale sur la composition chimique de l'huile essentielle et l'activité antioxydante d'extraits de *Ocimum basilicum*L. ; *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5(3): 1082-1095

DARBONNE C., (2002). *Sacré Basilic*. Edition LPM

DAROUI-MOKADDEM H., (2011). Etude phytochimique et biologique des espèces : *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniololus atrum* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum trifurcatum* (Asteraceae); *Thèse de Doctorat*, Option : Biochimie appliquée. Univ. Badji-Mokhtar, Annaba

DE BILLERBECK V.G., ROQUES C., VANIERE P. ET MARQUIER P., (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles; *Rev. Hygiène* ; Vol. X - N°3, pp. 248-254.

DERWICH E., BENZIANE Z. ET BOUKIR A., (2010). GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco; *Res. J. Agric. & Biol. Sci.*, 6 (3):pp. 191-198.

DETRAZ P., (2001). *Catalogue des basilics*. Jardin des saveurs.

DIARRA Y., (2006). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Acanthospermum hispidum* dc. (Asteraceae) et *Curculigo pilosa* Schum. et Thonn. (Hypoxidaceae), deux plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'hypertrophie bénigne de la prostate (hbp). *Thèse de doctorat* en pharmacie. Université de Bamako : p47.

DJENANE D., SANCHEZ-ESCANTE A., BELTRAN J.A. & RONCALÉS P., (2002). Ability of α -tocopherol, taurine and rosmarinic acid, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry*, 76, 407- 415.

DR MAX FESNEAU., (2008). Les Huiles Essentielles de A à Z -Pierre de LAROCHEPIQUET : "La Nature au service de la vie, les essences végétales

naturelles"©copyright1999-2008

EI ABED D. ET KAMBOUCHE N., (2003). « Les huiles essentielles; Ed. Dar El Gharb ; Oran.

EL KALAMOUNI C., (2010). Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits aromatiques oubliées de Midi- Pyrénées ; *thèse de doctorat* ; université de Toulouse

ERIK L., (2001). L'ABC daire des plantes aromatiques et médicinales ; Ed. Flammarion, France (Paris); P : 120(29-31)

EYMARD S., (2003). Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conversation et de la transformation de chinchard (*Trachurus trachurus*), choix des procédés; *Thèse de Doctorat* en Génie des procédés; Ecole Doctorale en Génie des Procédés : Spécialité Biochimie ; Nante ; France

FELLAH A. ET MOUAICI N., (2015). Etude d'extraction et del'activité antioxydante et antibactérienne des extraits de la verveine "*Lippia citriodora* " ; *Mémoire de master* ; univ. Djilail bou Naama .Khemis Miliana.

FESTY D., (2013). Ma bible des huiles essentielles. Ed. Quotidien malin

FIRROZI R., AZADBAKHT M. & NABINDJAD A.M., (1998). Anti-Listerial activity essential oils of some plants. *Journal of Appleid Animal Research*, 14, 75-80.

FISHER K. ET PHILIPS C., (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *campylobacter jejuni* , *E.coli* O157, *Listeria monocytogenes* , *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* , in vitro and in Food systems; *Journal of Applied Microbiology*; 101(6); 1232 -1240.

FRIES R., (2002) : Réduction du transfert de *Salmonella* au cours de la production industrielle de viande de volaille. *World's Poultry Science Journal* 58: 527-540

GACHKAR L., YADEGARI D., REZAEI M.B., TAGHIZADEH M., ASTANEH S.A. ET RASOOLI I., (2007). Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminumand Rosmarinus officinalis essential oils; *Food Chem*; 102: pp.898-904.

GUINOISEAU E., (2010). Molécules, antibactérienne issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. *Thèse de Doctorat*, Univ. Corse; Option: Biochimie- Biologie moléculaire ; France ; P50

GULCIN I., MSHVILDADZE V. ET GEPDIREMEN A., (2003). Antioxydant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(b-D-glucopyranosyl)-hederagenin »; *Phytother; Rev* 20; pp 130-134.

GUNDERSON M. F., MAC FADDENENT H. W., KVLE T. S., (1954). The

bacteriology of commercial poultry L processing. Burgess Publishing Co., Minneapolis, États-Unis.

HADJ KHELIFA L., BRADA M., ACHOUR D., WATHELET J.P. ET LOGNAY G., (2013). Composition Chimique et Activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ocimum basilicum* d'Ain Deffa ;

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. ET ARNOMA O.L., (1987). The deoxyribose method: A simple test tube assay for the determination of rate constant for reaction of hydroxyl radical. *Anal Biochem*; (1): 215-219

HAMEURLAINE S., (2009). Mise en évidence des huiles essentielles contenues dans les plantes *Pituranthos scoparius* et *Rhantherium adpressum* de la région de Ghardaia; *mémoire de magister*; Univ. Kasdi Merbah-Ouargla.

HAMMER K.A., CARSON C.F. ET RILEY T.V., (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts; *Journal of Applied Microbiology*; Vol. 86, Issue 6: pp.985-990.

HAMOUDI N., (2012). Caractéristiques des huiles essentielles et son application antimicrobienne de la plante « *Ocimum basilicum* »; *mémoire DEUA* ; Univ. Khemis-Miliana.

HEINRICH G., SCHULTZE W., PFAB I. ET BOETTGER M., (1983).The site of essential oil biosynthesis in *Poncirus trifoliata* and *Monarda fistulosa*. *Physiologie Vegetale*; P : 257-268

HERNANDEZ-OCHOA L.R., (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combine «Solvant/ Actif». D'origine végétale. *Thèse de Doctorat* de l'Institut National Polytechniques de Toulouse. France.

HOLLEY R.A. & PATEL D., (2005). Improvement of shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oil and smoke antimicrobials. *Food microbiology*, 22, 273-292.

HUBERT R., (2007). Les plantes aromatique et huiles essentielles à Grasse, Quatrième partie : les Lamiacée, Les basilics''*Ocimum ssp*'' , ''Botanique- culture-chimie-production et marché'' ; Ed. L'Harmattan, France (paris) ; P : 414

Huiles essentielles ; **Microsoft ® Encarta¹ ® 2009.** © 1993-2008 Microsoft Corporation

HURTEL M.J., « Phytothérapie, plantes médicinales, aromathérapie, huiles essentielles » ; Copyright 2000

HUSSAIN A.I., (2009). Caractérisation and biological activities of essential oil of some species of Lamiaceae. *Thèse de doctorat.* Pakistan. 257p

HUSSAIN A.I., ANWAR F., CHATHA S.A.S., JABBAR A., MAHBOOB S., ET NIGHAM P.S., (2010). *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 1070-1078

IDIR L., (2010). Activité antibactérienne de quelques huiles essentielles extraites à partir des espèces végétales de la région de la kabyle. *Mémoire de Magister. Option Technologie Alimentaire*. Université M'hamed Bougara. Boumerdes.

INOUYE S., TAKAZAWA T. ET YAMAGUCHI H., (2001). Antimicrobial activity of the essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact; *Journal of Antibacterial Chemotherapy*; 47: 565-573.

JAYASINGHE C., GOTOH N., AOKI T. ET AL (2003)., Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Agric Food Chem*; 51:4442-4449.

JEANNE ROSE., (1999). « 375 » Essential Oils and Hydrosols, Frog, Ed. Berkeley, California

JOHANSEN C., VERHEUL GRAM L., ABEE T., (1997). Protamine-induced permeabilization of cell envelopes of Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *App. Env. Microbio.* **63**: 1155-1159

JULIANI R.H., KOROCH A., SIMON J.E, HITIMANA N., DAKA A., RANARIVELO L. et LANGENHOVEN P., (2006). Quality of geranium (*Pelargonium* sp) : Case studies in southern and eastern Africa. *Journal of Essential oil Research* 18: 116-121.

KATEB J., (1989). « Le travail sur la culture des plantes médicinales » ; Ed. Masson ; Paris.

KAVBOUCHE Z., BOUTAGHANE N., LAGGOUNE S. ET KABOUCHE K., (2005). *International Journal of Aromtherapy*; Vol. **15**; pp. 129-133.

KELEN M. ET TEPE B., (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora; *Bioresource Technology*; **99**,4096-4104

KHAMOULI O. ET GRAZZA B., (2007). Détection et comparaison de composition chimique de plusieurs variétés de basilic « *Ocimum basilicum* L.» cultivées en trois régions différentes de sud d'Algérie ; Univ. kasdi merbah ouargla; *mémoire d'Etudes Supérieures en Biologie*.

KIM J.M., MARSHALL M.R. ET WEI C.I., (1995a). Antibacterial activity of some

essential oil components against five food borne pathogens; *Jour of Agricultural and food chemistry*; 43, 2839-2845.

KIM J.M., MARSHALL M.R., CORNELL J.A., PRESTON J.F. ET WEI C.I., (1995b). Antibacterial activity of crvacrol , citral, and geraniol against *Salmonelle Thyphimurium* on culture medium and on fish cubes; *Journal of Food Science*; 60(6); 1364-1374.

KNOBLOCH K.A., PAULI B., IBERL H., WEIGAND N. ET WEIS., (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components; *J. of Ess. Oil Res*; 1: 119-123

KOKOU AGBEKONYI AGBODAN, KOKOUI DOTSE ET KOSSI HONORE K., (2014). Activités antioxydantes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques acclimatées au Togo, *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 8(3): 1103-1110.

KOTHE H.W. (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales ; Ed. Terres; P : 336(220)

KOUDJEGA K. (2004). Développement de stratégies de gestion intégrée de la fertilité des sols pour le basilic (*Ocimum basilicum L.*) Sur les exploitations de Darégal Equatorial ; *Mémoire d'Ingénieur Agronome, IFDC Afrique / ESA -UL*, P : 96

KOUTSOUDAKI C., KRSEK M., RODGER A., (2005). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus Var. J.* *Agric. Food Chem.* 53:7681-7685

KULKARNI R.N., BASKARAN K., RAMESH S. et KUMAR S., (1996). Intra-clonal variation for essential oil content and composition in plants derived from leaf cutting of roses cented geranium. *Industrial corps and products.*6: 107-112

KURITA N., MYAJI M., KURANE R., TAKAHARA Y. ET ICHIMARA K., (1979). Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds rom oils of higher plants. *Agric. Boil.Chem.* 43: 2365-2371

LABUZA T.P., (1971). Kinetics of lipid oxidation in foods; *Critical Reviews in Food and Technology*; P: 355-405.

LAMAISON J. L., PETITJEAN-FREYTET C., CARNAT A., (1990). Rosmarinic acid, total hydroxycinnamic derivatives and antioxidant activity of Apiaceae, Borraginaceae and Lamiceae medicinals, *Ann Pharm Fr.*, 48(2), 103-8.

LAMAISON J.L., PETITJEAN-FREYTET C., CARNAT A., (1991). Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid, *Pharm Acta Helv.*, 66(7) 185-8.

- LARSON R.A. (1997).** Naturally Occurring Antioxidants; Ed. Boca raton; *Le réseau de la botanique francophone.*
- LAZOUNI, H.A., BENMANSOUR A., TALEB-BENDIAB S.A., AND CHABANE SARI D., (2007).** Composition des constituants des huiles essentielles et valeurs nutritives du *Foeniculum vulgare* Mill. *Sciences & Technologie*, 25: 7-12
- LEE S.J., UMANO K., SCHIBAMOTO T. ET LEE K.G., (2005).** Identification of Volatils composants in basil (*Ocimum basilicum* L.) And thyme Leaves (*thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties – *Food Chemistry*; Vol 91; p: 131 -137; 2005
- LIN Y-T., LABBE R.G. ET SHETTY K., (2004).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Fish and meat systems using Oregano and Cranberry synergies *Applied and Environnement Microbiogy*, 70, 5672-5678.
- LOPEZ P, SANCHEZ C., BATLLE R., NERIN C., (2005).** Solid and vapor phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected food borne bacterial and fungal strains; *J. Agric. Food Chem*; 53: 6939- 6946.
- MACKEE H. S., (1994).** Catalogue des plantes introduites et cultivées en Nouvelle-Calédonie. Deuxième édition. Flore de Nouvelle-Calédonie et Dépendances. *Muséum national d'Histoire naturelle*, Paris. Hors-série: 164 pp.
- MAILHEBIAU P., (1994).** La nouvelle aromathérapie : biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne. P : 635.
- MAKHOULFI A., (2010).** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar(*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. *doctorat d'état* en biologie ; univ Aboubaker Belkaid ; Tlemcen
- MASON T.L. ET WASSERMAN B.P., (1987).** Inactivation of red beet beta-glucan synthesis by native and oxidized phenolic compounds; *Phytochemistry*; P26: 2197-2202.
- MAYACHIEW P. et DEVAHASTIN S., (2008).** Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts; *Food Science and Technology*; Vol.41; pp. 1153-1159.
- MCGRAW-HILL., (2007).** Encyclopedia of Science and Technology, 10th Edition
- MEDDOUR A., YAHIA M., BENKIKI N., AYACHI A., (2013).** Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du capparispinusosa l; *Lebanese Science Journal*; Vol 14 (1): 52p
- MELET I. ET BENCHABANE N., (1997).** Contribution a l'extraction et l'étude de l'huile

essentielle d'eucalyptus ; *Thèse d'ingénieur d'état*; Univ. Médéa

MOHAMED N., BOUKHATEM M., FAIROUA S.H. ET YAHIA H., (2010). «Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens L.*) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie) »; Univ. Saad Dahleb de Blida.

MOLLA B. AND MESFIN A., (2003): A survey of *Salmonella* contamination in chicken carcass and giblets in Central. *Ethiopia Revue Méd. Vét.*, 154, 4, 267-270

MOLYNEUX P., (2004). The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* , 26 (2), 211-219.

MOLYNEUX P., (2004). The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26 (2), 211-219.

MULTON J.L., (2002). Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Ed. Lavoisier, Paris ; P : 207- 231.

NAGHIBI F, MOSADDEGH M, MOHAMMADI M.S ET GHORBANI A. (2005). Labiatae Family in folk Medicine: Form Ethnobotanyto Pharmacology Iranian *Journal of Pharmaceutical Research*; Vol.2, P63-79

NFT 75 103, 1982

NFT 75 104, 1982

NFT 75 112, 1977

NOUN A., (2013). « Etude de l'extraction et de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *rosmarinus officinalis L.* de la région d'Ain defla » ; *mémoire de master* ; univ. Khemis Miliana

ORMENO E., FERNANDEZ C. ET MEVY J., (2007). Plant coexistence alters terpene emission and content of mediterranean species-Phytochemistry; Vol. **68** ; pp 840-852

OUIBRAHIM A., (2015). « Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis L., Ocimum basilicum L. et Rosmarinus officinalis L.*) de l'Est Algérien » ; *Thèse de doctorat* ; Univ. Badji Mokhtar – Annaba.

OUSSALAH M., CAILLET S., SAUCIER L. ET LACROIX M., (2006). Mechanism of action of spanish oregano, chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157 :H7 and *Listeria monocytogenes*; *Journal of Food protection*; 96(5); P: 1046-1055.

OUSSOU K.R., KANKO C., GUESSENND N., YOLOU S., KOUKOUA G., DOSSO M., N'GUESSAN Y.T., FIGUEREDO G., CHALCHAT J.C., (2004). Activités

antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte d'Ivoire ; *C.R. Chimie* pp 292-297

PASTRE J. ET PRIYMENKO N., (2007). Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Rev. Méd. Vét* ; (4), P : 187.

PAULETTE V., (2006). Sections Le basilic au fil du temps, Usages culinaires, Conservation, Jardinage biologique, Écologie et environnement

PELLECUER J., JACOB M., SIMEON BOUCHBERG M., (1980). Essais d'utilisation d'huiles essentielles des plantes aromatiques méditerranéennes en odontologie conservatrice ; *Plant Médicinales Phytothérapie* ; P : 83-98

PETERSEN M. AND SIMMOUNDS M.S.J., (2003). Rosmarinic acid, *Phytochemistry*, 62 121-125

Pharmacopée européenne. 2001; 4ème édition; P22- 43.

Pharmacopée française. Ed, 1965

PIBIRI M.C., (2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. *Thèse de doctorat.* Ecole polytechnique fédérale de Lausanne.

PINTORE G., USAI M., BRADESI P., JUILIANO C., BOATTO G., TOMI F., CHESSA M., CERRI R. ET CASSANOVA J., (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica; *Flower and Fragrance Journal*; 17;P: 15-19 .

POKORNY J., YANISHLEIVA N. ET GORDON M., (2001). Activity antioxydant in food, Pratical applications. *Woolhead Publishing Limited.* ISBN : 185573-463x

PONCE A.G., FRITZ R, DEL VALLE C. ET ROURA S.I., (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard; *Lebensm.-Wiss.u.-Technol*; 36, pp.679-684.

POUSSET L.J., (2004). « Plantes médicinales d'Afrique : comment les reconnaître et les utiliser ? » ; Ed. La calade, UE ; P : 287 (187-188)

PRIETO P., PINEDA M., AND AGUILAR M., (1999). Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E; *Analytical Biochemistry* 269, 337–341

RAJESWARA RAO B.R., BHATTACHRYA A.K., KAUL P.N., CHAND S. et RAMESH S., (1993). Changing in profiles of essential oil rose sented germanium

(*Pelargonium sp*) during leaf ontogeny. *Journal of Essential oil Research*. 5: 301-304.

RIAZ M., QAMAR S., CHOUDHARY F.M. ET PACK. J., (1999). *Sci. Ind – Res*; Vol 6; P: 332

RIBEIRO M.A., BERNARDO-GIL M.G. AND ESQUIVEL M.M., (2011). *Melissa officinalis, L.* Study of antioxidant activity in supercritical residues, *Journal of Supercritical Fluids*, 21 51 –60.

ROGINSKY V. ET LISSI EA., (2005). Review of method to determine chain-breaking

antioxidant activity in food; *Food chemistry*; **92**: 235-254.

Rolland Y., (2004). Actualités des lipides en cosmétique .Antioxydants naturels végétaux ; *OCL* ; Vol 11(6) : 419 - 424.

SALIOU N., FATOU D.F., MOUSSOUKHOYE D., PROBST J.M.K. ET ABDOULOYE S., (2012). Composition chimique et propriétés physico-chimiques des huiles essentielles d'*Ocimum basilicum* et d'*Hyptis suaveolens(L.)* point récoltes dans la région de Dakar au Sénégal; *Bulletin de la société Royale des sciences de Liège* ; vol.**21**; P : 166-175.

SANCHEZ M.C., (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems; *International Journal of Food Science and Technology*; **8**: 121-137

SARTORATOTTO A., MACHADO A.LM., DELARMELINA C., FIGUEIRA G.M., DUARTE M.C.T., REHDER V.L.G., (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 35:275-280

SCARPATI M. AND ORIENTE G., (1958). Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *Rosmarinus off*) *Ric. Sci.*, 28: 2329-2333.

SCHAUENBERGE P. (2006). Guide des plantes médicinales : Analyse, description et utilisation de 400 plantes ; Ed. Ferdinand ; Paris ; P : 396

SIPAILIENE A., VENSKUTONIS P.R., BARANAUSKIENE R. ET SARKINAS A., (2006). Antimicrobial Activity of Commercial Samples of Thyme and Marjoram Oils. *Journal of Essential Oil Research*; P: 698-703

SKANDAMIS P.N. ET NYCHAS G.J.E., (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres; *J. Applied Microbiol*; Vol.**91**: 1011-1022.

SMITH-PALMER A., STEWART J. ET FYFE L., (2001). The potential application of

plant essential oil as natural Food preservatives in soft cheese; *Food Microbiology* ;18; P: 463-470

SOKOVIC M., VAN GRIENSVEN L.J., (2006). Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Eur. J. Plant Pathol.* 116:211-224

SYLVIE L. et BERTRAND C., (2001). Le Basilic. Ed. Aubanel, P117

SYLVIE VERBOIS., (2001). Huiles Essentielles et Parfums qui Guérissent et qui Relaxent, La Voie De l'Ayurveda, Ed. Trajectoire

TANGUY M., (2009). Antioxydants Première partie : Les antioxydants dans l'alimentation. Médecine ; Vol 5 (6): 256-260.

TASSOU C.C., DROSINOS E.H. & NYCHAS G.J.E., (2000). Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, 33, 273-280.

The Editors of **Encyclopædia Britannica**; ©2016 Encyclopædia Britannica, Inc

TSUCHIYA H., SATO M., MIYAZAKI T., FUJIWARA S., TANIGAKI S., OHYAMA M., TANAKA T., LINUMA M., (1996). Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; *J.Ethnopharmacol*; 50: 27-34

USMAN L.A., ISMAEEL R.O., ZUBAIR M.F., SALIU B.K., OLAWORE N.O., ELELU N., (2013). Comparative studies of constituents and antibacterial activities of leaf and fruit essential oils of *Ocimum basilicum* grown in north central Nigeria; *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences.* 3: 47-52

VALNET J., (2010). L'Aromathérapie : se soigner par les huiles essentielles. Ed. Livre de Poche.

VEKIARI S.A., PROTOPAPADAKIS E.F., PAPADOPOULOU P., PAPANICOLAOU D, PANOU C. ET VAMVAKIAS M., (2002). Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a lemon variety; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **5(1)**, 147-153

VERMA D.K., SINGH S.K. et TRIPATI V., (1997). A Rare antibacterial flavone glucoside from *Lantana camara*. *Indian drugs*,34 : 332-335.

VINCENT M.C., 1991. L'aromatogramme. Encyclopédie de médecine naturelle, phytothérapie, aromathérapie. 4, Paris 6.

WALKER H., AYRES J. C., (1956). Incidence and kinds of microorganisms associated

with commercially dressed poultry. *Appl. Microbiol.*, 4, 345

WANG H.F., YIH K.H. AND HUANG K.F., (2010). Comparative study of the antioxidant activity of forty-five commonly used essential oils and their potential active components. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 18, №1, pp. 24-33

WANG W., LIN, LUO M., ZUY, EFFERTH T., (2012). Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis L.* essential oil Compared to that of its main component. *Molecules*. 17:2704-271

WENDA KOON C.N., SAKAGUCHI M., (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices; *J. of Food Protection*; 58: 280-283

YANISHKIEVA N. ET MARINOVA E., (1995). Antioxydant activity of selected species of the family Lamiaceae grown in Bulgaria, *Die Nahrung*; vol.39, P: 458-463.

YOUNGER-COMATY J., (2001). *Growing, Selecting and Using Basil*. HYG-1644-94, Ohio state University Extension Fact Sheet.

ZGORKA G. AND GLOWNIAK K., (2001). Variation of free phenolic acid in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family, *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26:79 – 87.

Glossaire

Antibactérien : Il qualifie toute ce qui sert à lutter contre les bactéries.

Antioxydant : Est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques.

In vitro : Signifie un test en tube, ou, plus généralement, en dehors de l'organisme vivant ou de cellule.

In vivo : Est une expression latine qualifiant des recherches ou des examens pratiqués sur un Organisme vivant, par opposition à in vitro ou ex vivo.

Pathogène : Un agent pathogène est tout facteur capable d'engendrer une lésion ou de cause une maladie.

Anti-inflammatoire : Qui atténue les tuméfactions et les rougeurs provoquées par une agressions chimique ou microbienne.

Antimicrobienne : Est une famille de substances qui tuent ou ralentissent la croissance des microbes.

Astéracées : La famille des Astéracées (Composées) est la plus vaste famille de la division des spermatophytes, avec plus de 900 genres et au moins 12 000 espèces répandues sur tout le planet

Apiacées: constituant les plantes aromatiques médiévales est la famille des Apiacées (Apiaceae), appelée anciennement Ombellifère (Umbelliferae). Elle comprend près de 3000 espèces réparties en 420 genres qui sont surtout présentes dans les régions tempérées du monde. C'est une famille relativement homogène, caractérisée notamment par son inflorescence typique, l'ombelle.

Flavonoïdes : sont des pigments donnant la coloration aux fleurs et dans certains cas aux feuilles. Ces substances peuvent être jaunes (origine du mot flavo), rouges, bleues ou violettes. Les flavonoïdes représentent la plus grande famille des composés phénoliques. Les phénols et acides phénols (composés phénoliques) contiennent des atomes qui forment des cercles

L'acide rosmarinique : Son nom provient du nom de la plante à partir de laquelle il a été isolé, le romarin (*Rosmarinus Officinalis*). L'acide rosmarinique est un ester de l'acide caféique et de l'acide 3,4-dihydroxyphenyllactique

Acide mévalonique : L'acide mévalonique est très soluble dans l'eau et dans les solvants organiques polaires. Il existe en équilibre avec la forme lactone, appelée mévalolactone, formée par condensation interne de son alcool terminal avec sa fonction acide carboxylique. C'est le précurseur dans la voie métabolique appelée la voie de l'HMG-CoA réductase, qui produit les terpènes et les stéroïdes.

Molécules bioactives : Molécules qui possèdent des propriétés biologiques ou des substances biologiquement actives dans un but curatif ou préventif.

Altération alimentaire : C'est une modification que subit un corps par rapport à sa constitution spécifique. L'aliment altéré a une incidence directe sur la santé du consommateur et peut provoquer souvent des intoxications graves voire même mortelles.

Auto-oxydation : La plupart des aliments contiennent des traces de métaux résultant de l'emballage ou de stockage ou même de la composition alimentaire. Des traces de métal dans l'aliment avec des concentrations inférieures à 0,5ppm sont suffisantes pour catalyser l'oxydation des lipides. Le métal le plus actif est celui qui est capable de subir une réaction de transfert d'électron (Redox).

Isoprène : structure de base à cinq carbones (C₅H₈), communément appelée isoprène.

Biomasse végétale : Désigne la masse de matière vivante végétale présente à un moment donné dans un milieu donné.

Métabolites secondaires : ces métabolites secondaires exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement. Ils participent ainsi, de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaques de pathogènes, prédateurs d'insectes, sécheresse, lumière UV...). D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on retrouve chez les plantes médicinales. La grande valeur thérapeutique de certains de ces métabolites. Ils ont un rôle défensif pour les plantes.

Les radicaux libres : sont des molécules chimiques instables produites en faible quantité par l'organisme. Ils sont principalement synthétisés dans la cellule lors de réactions avec l'oxygène.

Rancissement : Altération des aliments contenant des matières grasses, caractérisée par l'apparition de goût et d'odeur désagréables et parfois par une modification de la couleur.

Polymérisation : désigne une réaction chimique, en fonction du temps et de la température, conduisant la matrice ou la résine à se solidifier de manière irréversible (valable uniquement pour les thermodurcissables).

Annexe 1 : Tests des capacités antioxydantes (CAT)

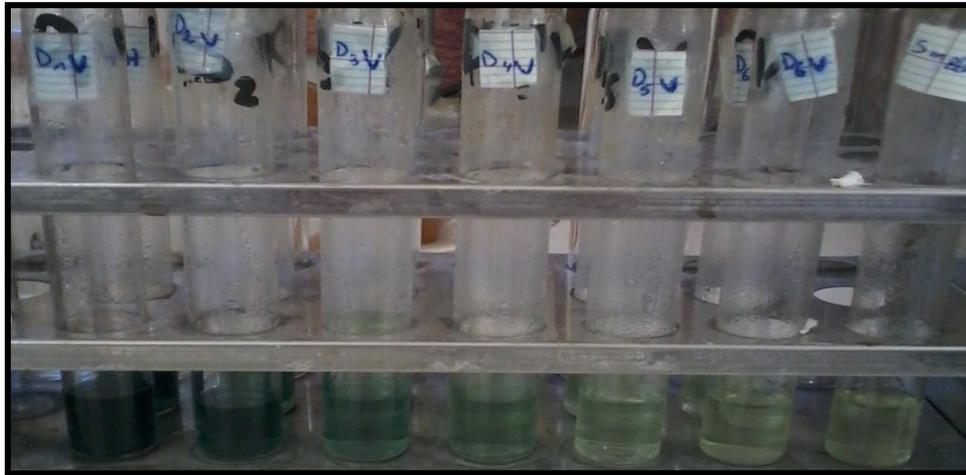


Figure01 : Test de la capacité antioxydante totale pour Vit C

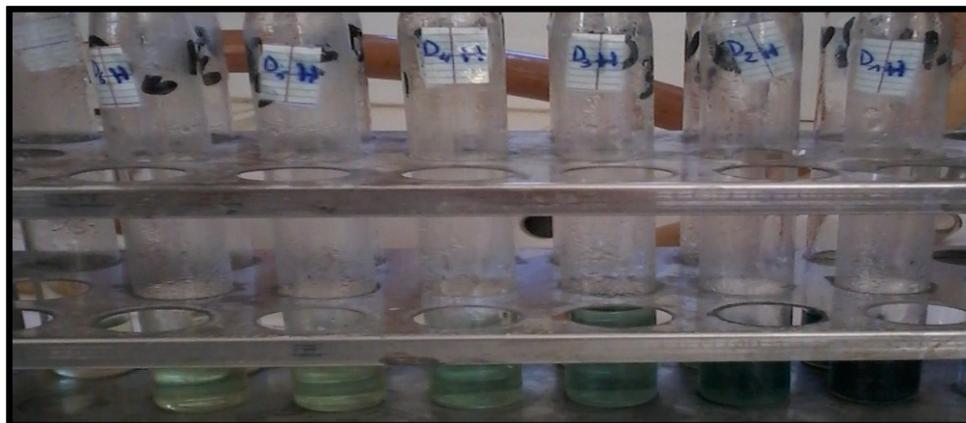


Figure02 : Test de la capacité antioxydante totale pour l'HE

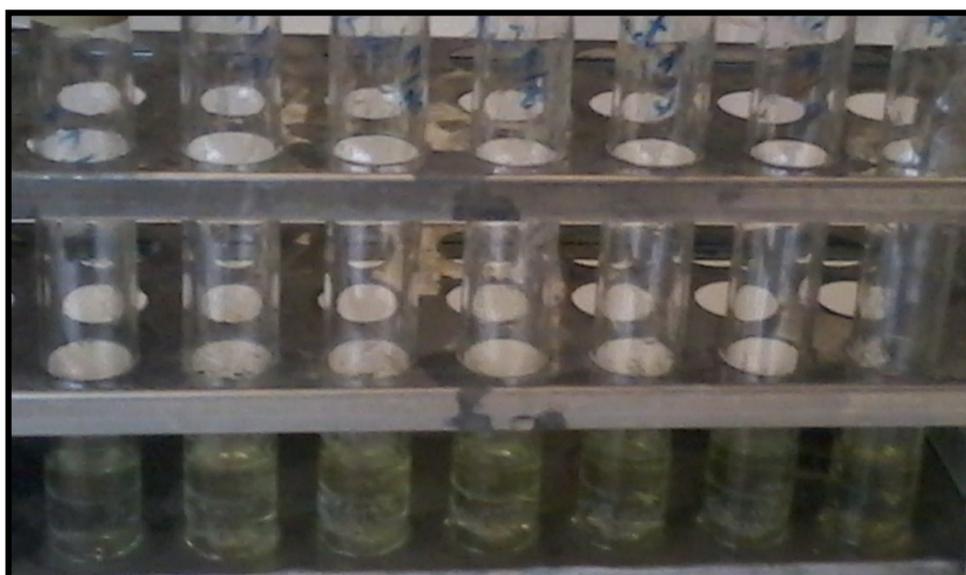


Figure03 : Test de la capacité antioxydant totale pour l'extrait aqueux

Annexe2 : Tests des capacités antioxydantes (DPPH)



Figure04 : Test de DPPH pour l'extrait aqueux



Figure 05 : Test de DPPH pour l'acide ascorbique

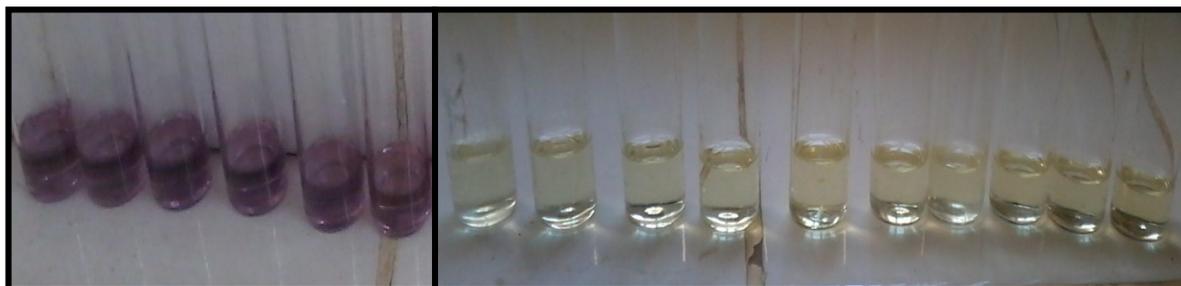


Figure 06 : Test de DPPH pour l'huile essentielle

Annexe 3 : Examen microscopique après coloration de Gram

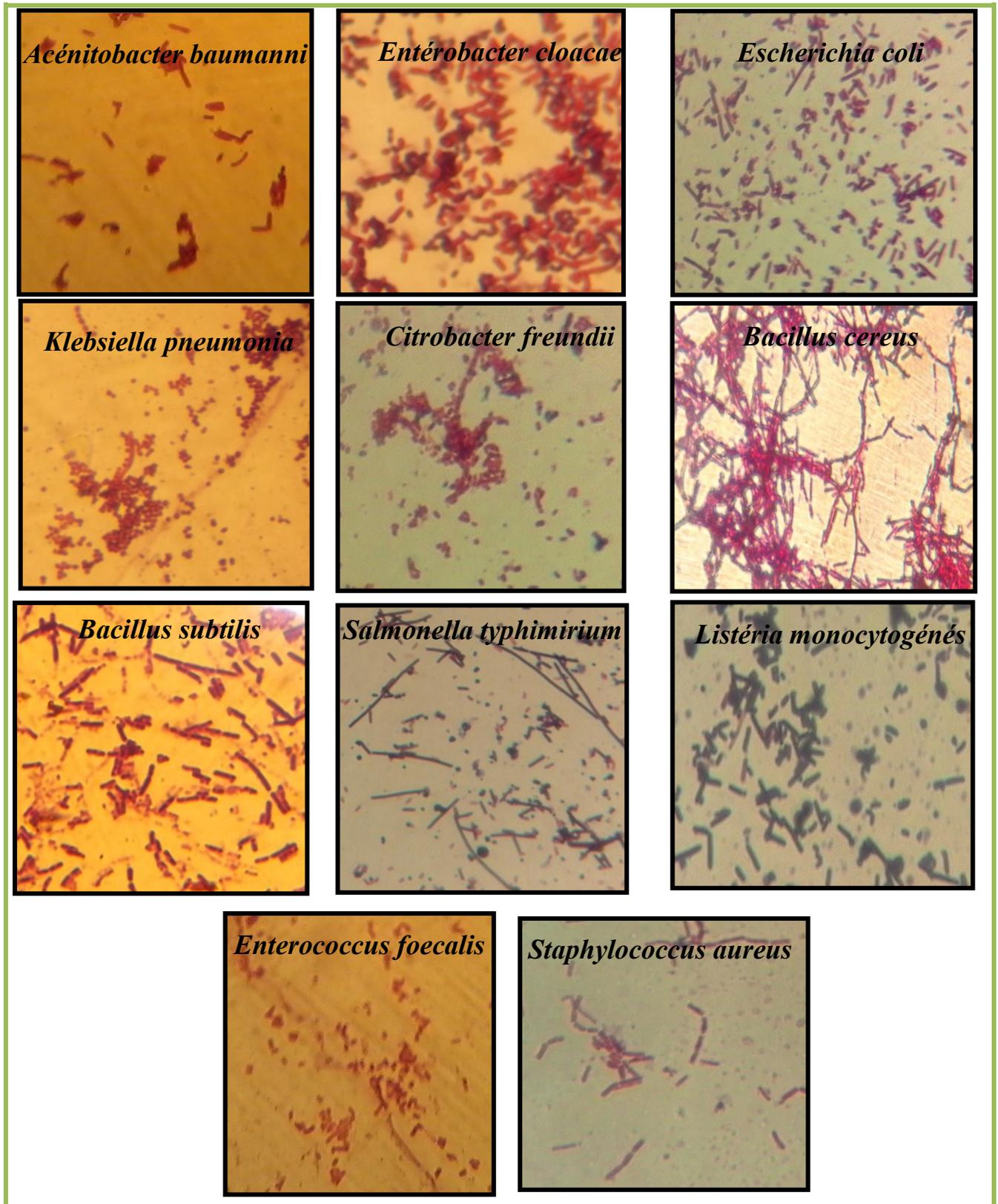


Figure 07 : Examen microscopique après coloration de Gram

Annexe 4 : Ajustement de la concentration bactérienne

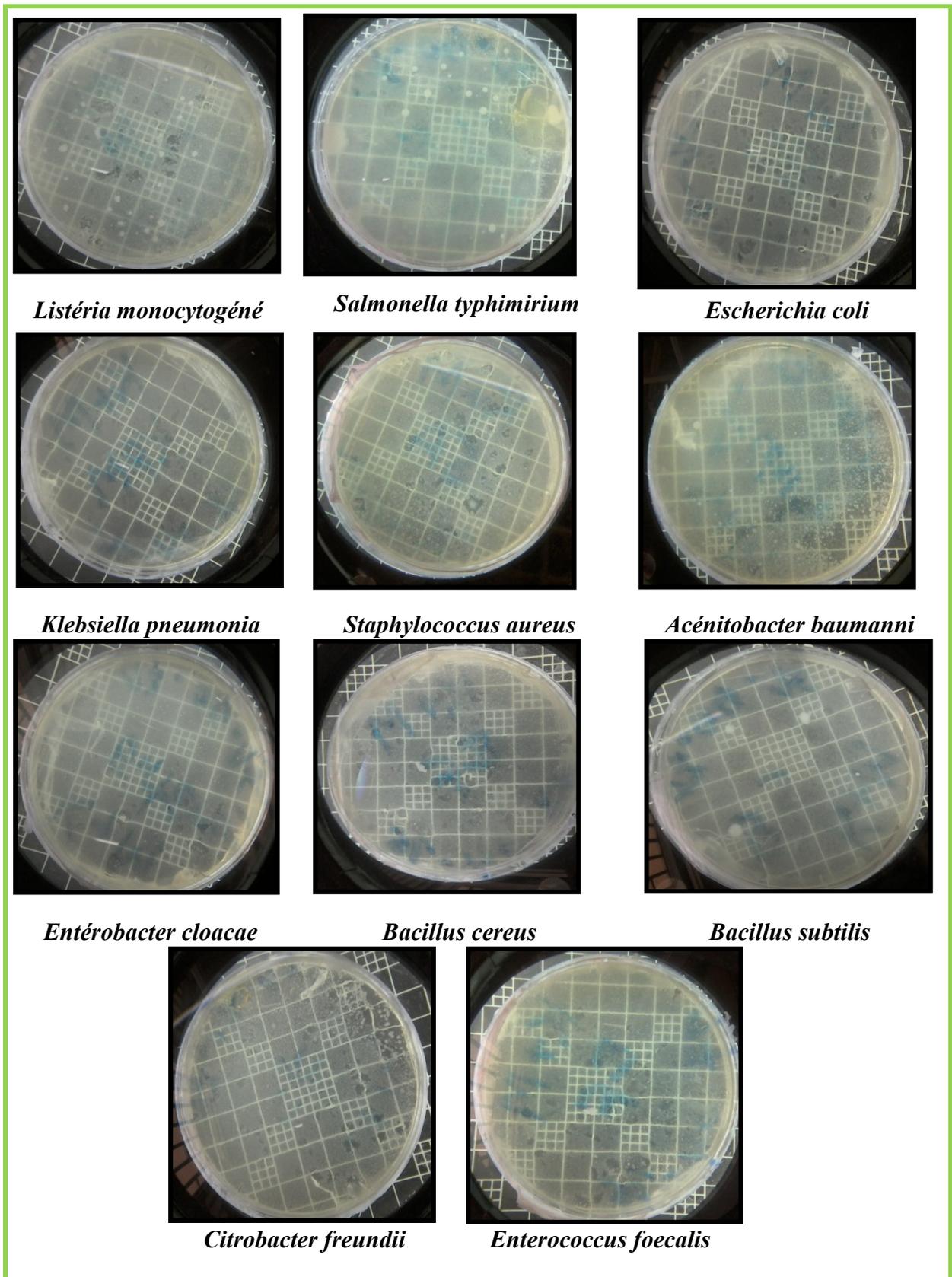


Figure 08 : Examen macroscopique (Test de confirmation)

Annexe 5 : CMI et CMB

Tableau 1 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et Concentration minimale bactéricide (CMB) de l'HE d'*O. basilicum*

Les souches bactériennes	CMI (%)	CMB (%)	CMB / CMI	Type de pouvoir
<i>Klebsiella pneumonia</i>	1/64	1/64	1	Bactéricide
<i>Escherichia coli</i>	1/256	1/256	1	Bactéricide
<i>Acénitobacter baumannii</i>	1/1024	1/1024	1	Bactéricide
<i>Citrobacter freundii</i>	1/32	1/2048	32	Bactériostatique
<i>Entérobacter cloacae</i>	1/128	1/256	2	Bactéricide
<i>Staphylococcus aureus</i>	1/256	1/2048	8	Bactériostatique
<i>Bacillus cereus</i>	1/256	1/256	1	Bactéricide
<i>Salmonella typhimurium</i>	1/128	1/64	0.5	Bactéricide
<i>Enterococcus faecalis</i>	1/256	1/256	1	Bactéricide
<i>Listéria monocytogénés</i>	1/256	1/256	1	Bactéricide
<i>Bacillus subtilis</i>	1/256	1/2048	8	Bactériostatique

Annexe 6 : L'acide rosmarinique

La variation du contenu en acide rosmarinique provenant de 10 plantes de la famille des *Lamiaceae* :

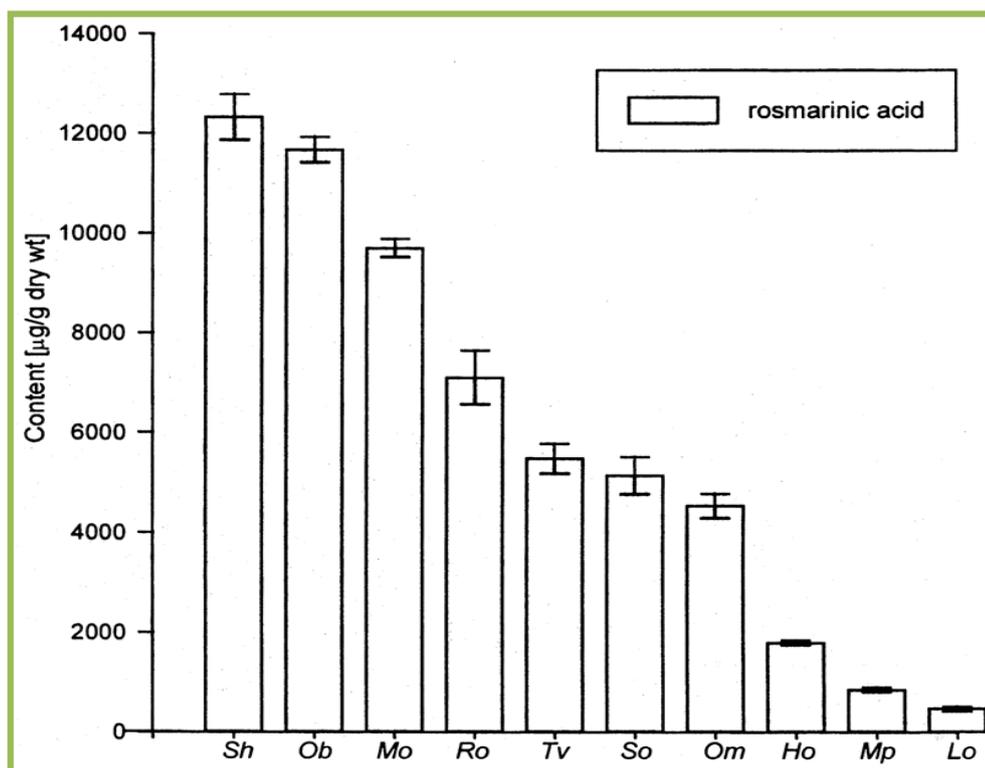


Figure 09 : *Contenu en acide rosmarinique de diverses espèces de la famille des Lamiaceae.*
Sh – Sarriette (Satureja hortensis L.) ; Ob – Basilic (Ocimum basilicum L.) ; Mo – Mélisse (Melissa officinalis L.) ; Ro – Romarin (Rosmarinus officinalis L.) ; Tv – Thym (Thymus vulgaris L.) ; So – Sauge (Salvia officinalis L.) ; Om – Origan (Origanum majorana L.) ; Ho – Hysope (Hyssopus officinalis L.) ; Mp – Menthe (Mentha piperita (L.) ; Hudson) ; Lo – Lavande (Lavandula officinalis Chaix) (G. Zgorka et K. Glowniak,2001)

Annexe 7 : L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne

D'après l'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne donnée par **Ponce *et al.* (2003)** et rapporté par **Mutai *et al.* (2009)** on a classé les souches étudiées selon le diamètre d'inhibition des HE.

Tableau 2 : Classification des souches à testées selon le diamètre d'inhibition d'HE du basilic.

Souches bactériennes	Classement selon Mutai <i>et al.</i> (2009)	Diamètre (mm)	Classement selon Ponce <i>et al.</i> (2003)	Diamètre (mm)
<i>K. pneumoniae</i> , <i>B. cereus</i>	Très fortement inhibées	$D \geq 30$	Extrêmement sensibles	$D \geq 20$
<i>E. cloacae</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i>	Fortement inhibées	$21 \leq D \leq 29$		
<i>A. baumannii</i> ; <i>C. freundii</i> ; <i>S. typhimurium</i> ; <i>E. faecalis</i>	Modérément inhibées	$16 \leq D \leq 20$	Très sensibles	$15 \leq D \leq 19$
<i>L. monocytogénèse</i> ; <i>B. subtilis</i>	Légèrement inhibées	$11 \leq D \leq 16$	Sensibles	$8 \leq D \leq 14$

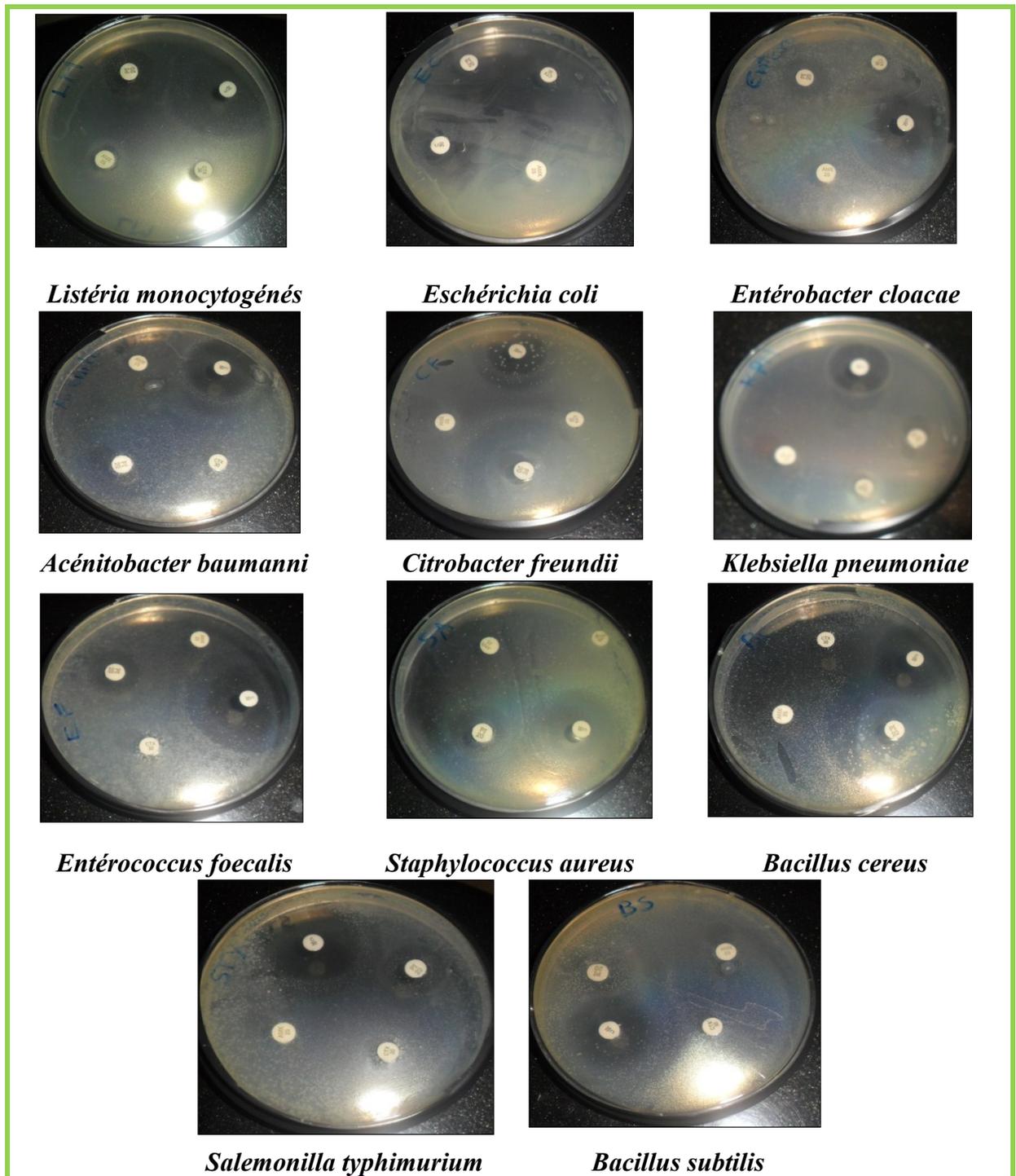
Annexe 8 : L'aromatogramme

Tableau 3 : Résultats de l'aromatogramme des extraits d'*Ocimum basilicum*.

		HE	Ext-aq
Les souches bactériennes		% I	% I
G-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KPM)	43.33	6.67
	<i>Escherichia coli</i> (EC)	24.44	-
	<i>Acénitobacter baumannii</i> (Acénito)	22.22	8.89
	<i>Citrobacter freundii</i> (CF)	18.89	6.67
	<i>Entérocooccus cloacae</i> (Entéro)	24.44	6.67
G+	<i>Bacillus cereus</i> (BC)	36.67	8.89
	<i>Staphylococcus aureus</i> (SA)	27.78	7.78
	<i>Salmonella typhimurium</i> (STY)	22.22	7.78
	<i>Entérobacter faecalis</i> (EF)	21.11	7.78
	<i>Listéria monocytogenes</i> (LM)	13.33	-
	<i>Bacillus subtilis</i> (BS)	13.33	12.22

∅ : Diamètre d'inhibition ; % I : Pourcentage d'inhibition; (-) : Absence de zone d'inhibition

Annexe 9 : L'antibiogramme



CTX. Cefotaxamine 30µg; C3. Chloramphenicol 30µg; PI. Piniciline 20µg ;
AMX. Amoxacilline 25µg.

Figure 10 : Résultats de l'antibiogramme

Annexe 10 : Résultats de CMI des extraits d'*O. basilicum*

Tableau 4 : Détermination des CMI de l'H.E d'*O. basilicum* sur les souches testées

	Les concentrations des dilutions de l'huile essentielle											
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	
<i>K. pneumonia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>A. baumannii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. freundii</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. cloacae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. typhimirium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>L. monocytogénés</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

(-) : Absence des colonies ; (+) : Présence des colonies

Tableau5 : Détermination des CMI de l'Extrait aqueux d'*O. basilicum* sur les souches testées

	Les concentrations des dilutions de l'Extrait aqueux											
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	
<i>K. pneumonia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. baumannii</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. freundii</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. cloacae</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhimirium</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogénés</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(-) : Absence des colonies ; (+) : Présence des colonies

RESUME

Ce travail s'inscrit dans la perspective de la valorisation des extraits huileux et aqueux des feuilles d'*O. basilicum* par l'étude de leurs activités antibactérienne et anti-oxydante et de leurs impacts sur la conservation de la viande de poulet.

On a commencé notre travail par l'extraction et la caractérisation des extraits végétaux (huile essentielle et extrait aqueux) d'*Ocimum basilicum*. Le rendement obtenu est intéressant pour l'exploitation industrielle.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* ont montré que le pouvoir réducteur de DPPH et la capacité antioxydante totale sont remarquables dans les deux extraits avec une primauté notable de l'HE (IC₅₀ avec une concentration de 4.2 µg/ml).

Les tests antibactériens des deux extraits biologiques ont été opérés sur onze souches bactériennes suivant deux méthodes, les résultats montrent que l'HE d'*O. basilicum* a témoigné d'une forte action antibactérienne vis-à-vis des souches étudiées (la gamme des CMI varie de 0.03% à 0.0005%).

Au terme de notre étude nous avons évalué l'activité antibactérienne de l'HE d'*O. basilicum* sur une matrice alimentaire (la viande de poulet). Pour l'activité antibactérienne contre *S. typhimurium* des valeurs de CMI x 1 et CMI x 4 ont été appliquées ainsi qu'un suivi de la cinétique de la croissance bactérienne pendant 7 jours de conservation à 6 ± 1°C. Les résultats obtenus ont révélé que la CMI x4 de l'HE a fortement réduit la croissance de *S. typhimurium* pendant les sept jours de stockage.

Mots clés : *O. basilicum*, extraction, HE, Extrait aqueux, activité antioxydante, activité antibactérienne, bioconservation, poulet, *S.typhimirium*.

ABSTRACT

This work is in preparation for the recovery of oil and aqueous extracts of the leaves of *O. basilicum* by studying their antibacterial and antioxidant activities and their impacts on the conservation of chicken meat.

We started our work by the extraction and characterization of plant extracts (essential oil and aqueous extract) of *Ocimum basilicum*. The yield obtained is interesting for industrial exploitation.

The results of the evaluation of the antioxidant activity in vitro showed that the reducing power of DPPH and total antioxidant capacity are remarkable in both extracts with significant primacy of EO (IC₅₀ at a concentration of 4.2 mcg / ml).

Antibacterial tests of the two organic extracts were operated on eleven bacterial strains using two methods, the results show that EO of *O. basilicum* has displayed a strong antibacterial action for the strains tested (range of MICs ranging from 0.03% to 0.0005%).

At the end of our study, we evaluated the antibacterial activity of EO of *O. basilicum* on a food matrix (chicken meat). For the antibacterial activity against *S. typhimurium* MIC values x 1 and 4 x MIC have been applied as well as monitoring of the kinetics of bacterial growth for 7 days of storage at 6 ± 1 ° C. The results obtained revealed that the MIC x4 of EO *S. typhimurium* has sharply reduced growth during the seven days of storage

Keywords: *O. basilicum*, extraction, EO, Aqueous extract, antioxidant activity, antibacterial activity, conservation, hen, *S.typhimirium*

المخلص

من وجهة نظرنا هذا العمل هو تقييم للمستخلصات الزيتية والمائية لأوراق نبتة الريحان (*O.basilicum*) وذلك بدراسة الأنشطة المضادة للبكتيريا والأنشطة المضادة للأكسدة وأثارها على حفظ لحوم الدجاج.

بدأنا عملنا عن طريق استخراج وتوصيف المستخلصات النباتية (الزيت الأساسي والمستخلص المائي) لنبتة الريحان (*O.basilicum*) المرود المتحصل عليه يشجع على الاستغلال الصناعي.

أظهرت نتائج تقييم النشاط المضاد للأكسدة في المختبر أن قوة الحد من DPPH وإجمالي القدرة المضادة للأكسدة ملحوظة في كلا المستخلصين مع أولوية كبيرة للمستخلص الزيتي (IC_{50} بتركيز 4.2 ميكروغرام / مل)

تم عمل اختبارات مضادة للبكتيريا الخاصة بالمستخلصات العضوية على إحدى عشرة سلالة باستخدام طريقتين، فقد بينت النتائج أن المستخلص الزيتي لنبتة الريحان (*O.basilicum*) أظهر نشاطا قويا مضادا للبكتيريا المدروسة (مجموعة تركيز الحد الأدنى تتراوح من 0.03 % إلى 0.0005 %)

في نهاية دراستنا قمنا بتقييم الأنشطة المضادة للبكتيريا للزيت العطري لنبات *O.basilicum* على مادة غذائية (لحم الدجاج). وذلك عن طريق النشاط المضاد للبكتيريا *S. typhimirium*، وقد تم تطبيق تراكيز بقيم مختلفة $1 \times CMI$ و $4 \times CMI$ وكذلك رصد حركية نمو البكتيريا لمدة 7 أيام من التخزين في 6 ± 1 درجة مئوية. وأظهرت النتائج أن $4 \times CMI$ أحدثت انخفاضا حادا في نمو *S. typhimirium* خلال سبعة أيام من التخزين.

كلمات البحث: *O. basilicum*، الاستخلاص، الزيوت العطرية، مستخلص مائي، النشاط المضادة للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا، الحفظ، دجاج، *S.typhimirium*