



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THÈSE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLÔME DE DOCTORAT (LMD)

Spécialité: TOXICOLOGIE

Intitulé

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.

Presentée par: M^{lle}. OUIBRAHIM Amira

Membre de Jury:

DJEBAR Mohamed-Réda	Prof	Président	Université de Annaba.
TLILI-AIT KAKI Yasmina	Prof	Directeur de thèse	Université de Annaba.
SERIDI Ratiba	Prof	Examineur	Université de Annaba.
ARAB Karim	Prof	Examineur	Université de Boumerdes.
GRARA Nedjoud	MCA	Examineur	Université de Guelma.
MAYACHE Boualem	Prof	Examineur	Université de Jijel.

Année universitaire: 2014 - 2015.

Remerciements

Mes plus vifs remerciements vont d'abord à mon directeur de thèse M^{me} Yasmina TLILI AIT-KAKI (Professeur de l'Université d'Annaba) de m'avoir fait l'honneur et le plaisir de diriger ce travail. Elle a su me guider avec patience, compréhension et rigueur. Je lui en serai toujours reconnaissante.

J'exprime toute ma gratitude à M^r Mohamed Réda DJEBAR (Professeur de l'Université d'Annaba) pour avoir accepté de présider ce jury et pour sa grande disponibilité et pour son total dévouement.

Mes remerciements s'adressent aussi à:

M^r Karim ARAB (Professeur de l'Université de Boumerdes) de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être membre du jury, également je le remercie pour son agréable accueil lors de mon passage à Boumerdes.

M^r Bouelem MAYACHE (Professeur de l'université de Jijel) d'avoir accepté de se déplacer et d'être membre du jury.

M^{me} Ratiba SERID (Professeur de l'Université d'Annaba) de nous avoir accordé du temps afin d'examiner notre travail.

M^{lle} Nedjoud GRARA (Maitre de conférence de l'université de Guelma) d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je ne remercierai jamais assez M^{me} Salima BENNADJA (Professeur de l'Université d'Annaba) pour tout ce qu'elle a pu nous apporter tout au long de ces années. Avec sa modestie, sa gentillesse, sa rigueur scientifique, et surtout sa disponibilité, elle a su nous guider et corriger, puisse Dieu nous permettre de l'imiter.

De même je remercie infiniment M^r Abdelghani DJAHOUDI (Professeur de l'Université d'Annaba) de nous avoir ouvert les portes de son laboratoire. Avec ses qualités humaines et son expérience, il a su nous faire aimer le monde merveilleux des bactéries (большое спасибо).

Egalement, je remercie M^{me} Sabrina AIT KAKI de m'avoir accueilli chaleureusement à Boumerdes et de m'avoir permis de travailler au laboratoire de recherche (LTDVPMB) où j'étais bien entourée.

Je remercie aussi Mr LAREDJH et son équipe du laboratoire de botanique (Département de pharmacie) pour leur sincère collaboration scientifique.

Je tiens à remercier aussi M^{me} MANSOURI Roukaya pour son accueil au sein de son laboratoire également toutes son équipe.

Un chaleureux merci à toutes mes sœurs de cœur que j'adore (elles se reconnaîtront), spécialement à Noussa dont la bonne humeur, l'encouragement et la simple présence me sont indispensables.

Je n'oserai oublier la famille AIT SI MOHAMED, je leur remercie pour leurs aides précieuses dans les moments difficiles.

Je remercie infiniment mon fiancé Saleh pour sa patience, son soutien et surtout de me supporter.

Enfin, je remercie mon père sans lui rien ne serait possible, et ma sœur toujours présentes malgré les nombreuses responsabilités.

Je tiens à exprimer mes sincères gratitude à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

*Je dédie ce travail à mon ange gardien que le temps n'a pas pu
atténuer son absence,*

À MAMOUNICHKA

Résumé

Dans notre étude, trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis*, *Rosmarinus officinalis* et *Ocimum basilicum*) provenant de la région d'El Kala ont fait l'objet d'un décriptage phytochimique et biologique de leurs huiles essentielles.

Ces huiles essentielles extraites par hydrodistillation ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Le criblage phytochimique a permis d'identifier les monoterpènes comme constituants majoritaires des trois extraits. Ainsi, la CG/MS a recensé 34 composés pour l'HE du basilic avec 22,43% de β -linalol, 25 constituants pour l'HE du romarin dont le bornéol (29,54%), et finalement le laurier contenant 17 composés avec 1,8 cinéole (35,31%).

Par la suite, l'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée à travers trois méthodes : le test du piégeage du radical libre DPPH, le test de blanchiment de β -carotène et la réduction du fer. D'après les résultats, les trois extraits sont dotés d'un potentiel antiradicalaire et antioxydant modérée par rapport aux antioxydants standards employés.

La capacité des huiles essentielles à inhiber les micro-organismes a été testé sur une vingtaine de souches bactériennes. L'activité antibactérienne s'est révélée variable selon la nature de la souche et de l'HE avec une prédominance du laurier qui a obtenu les meilleurs résultats.

Les propriétés biologiques observées seraient liées à la complexité de la composition chimique et la synergie entre eux.

Mots clés : Huiles essentielles, *Laurus nobilis*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis*, CG/MS, Activité antimicrobienne, Activité antioxydante.

Abstract

In our study, three aromatic plants (*Laurus nobilis*, *Ocimum basilicum* and *Rosmarinus officinalis*) from the El Kala region have been phytochemically and biologically decrypted of their essential oils.

Essential oils extracted by steam distillation were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The phytochemical screening identified monoterpenes as major constituents of the three extracts. Thus, the GC / MS identified 34 compounds for HE basil with 22.43% of β -linalool, 25 components for which EO rosemary bornéol (29.54%), and finally the bay with 17 compounds with 1,8 cineole (35.31%).

Thereafter, the antioxidant activity *in vitro* was assessed through three methods: testing the free radical scavenging of DPPH, the test of money β -carotene and iron reduction. Based on the results; the three extracts have a potential radical scavenging and antioxidant moderate compared to standard antioxidants employees.

The capacity of the essential oils inhibited microorganisms was tested on twenty bacterial strains. The antibacterial activity was variable depending on the nature of the strain and EO with a predominance in the bay which obtained the best results.

Biological properties observed are related to the complexity of the chemical composition and the synergy between them.

Key words: essential oils, *Laurus nobilis*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis*, GC/MS, antimicrobial activity, antioxidant activity.

الملخص

تهدف دراستنا الى التعرف على الخصائص الكيميائية والنشاط البيولوجي للزيوت العطرية المستخلصة من ثلاث نباتات طبية (*Laurus nobilis*, *Ocimum basilicum* and *Rosmarinus officinalis*) تنمو بمنطقة القالة شرق الجزائر.

الزيوت العطرية المستخلصة بطريقة التدريب على البخار تم تحليلها الكيميائي بواسطة CPG/SM وقد سمح الفحص الكيميائي النباتي بإظهار *monoterpènes* كأهم مكون فعال للزيوت الطيارة الثلاثة. كما امكنتنا طريقة CPG/SM بعزل 34 مكون للزيت الطيار لنبنة *Ocimum basilicum* حيث يظهر β -linalol بنسبة 22.43% اما الزيت الطيار لنبنة *Rosmarinus officinalis* فيظهر *bornéol* بنسبة 29.54% واخيرا *Laurus nobilis* ب17 مكون مع 1,8 *cinéole* بنسبة 35.31%

النشاطية المضادة للاكسدة لهذه المستخلصات تم تقديرها *in vitro* باستعمال: اختبار DPPH, ابيضاض β -carotene والقدرة الارجاعية للحديد. من خلال النتائج المتحصل عليها يتضح بان هذه المستخلصات تملك قدرة مضادة للاكسدة وقدرة ارجاعية معتدلة مقارنة مع مضادات الأوكسدة القياسية الموظفة.

النشاط المضاد للكائنات المجهرية تم اختباره على 20 سلالة بكتيرية. النشاط المضاد للبكتيريا اوضح تباين في النتائج حسب طبيعة البكتيريا وكذلك الزيت الطيار مع نشاط واضح لنبنة *Laurus nobilis* عبرت عنة النتائج.

الخصائص البيولوجية المختلفة الملاحظة خلال هذا العمل ترجع الى مدى تعقيد التركيب الكيميائي.

كلمات البحث : الزيوت العطرية , *Laurus nobilis*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis* , النشاط المضاد للبكتيريا, النشاط المضاد للاكسدة.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale 1

CHAPITRE I : Aperçu bibliographique

Partie I : Description botanique

1. Famille des Lamiacées	4
1.1. Genre <i>Rosmarinus</i>	4
1.1.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	4
1.1.1.1. Description botanique du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	5
1.1.1.2. Répartition géographique	7
1.1.1.3. Composition chimique	7
1.2. Genre <i>Ocimum</i>	7
1.2.1. <i>Ocimum basilicum</i> L.	8
1.2.1.1. Description botanique d' <i>Ocimum basilicum</i> L.	8
1.2.1.2. Répartition géographique	9
1.2.1.3. Composition chimique	9
2. Famille lauraceae	10
2.1. Genre <i>Laurus</i>	10
2.1.1. <i>Laurus nobilis</i> L.....	10
2.1.1.1. Description botanique	11
2.1.1.2. Répartition géographique	13
2.1.1.3. Composition chimique	13

Partie II : Métabolites secondaire et huiles essentielles

1. Généralité	14
2. Origine et localisation des HEs	14
3. Propriété physico-chimique	15
3.1. Propriétés physiques	15
3.2. Propriétés chimiques	15

4. Activité biologique des huiles essentielles	18
4.1. Activité antioxydante	18
4.2. Activité antibactérienne	18
4.3. Activité antifongique	20
5. Toxicité des huiles essentielles	21
6. Situation économique des huiles essentielles	21

CHAPITRE II: Etude anatomique et étude phytochimique des huiles essentielles

1. Introduction	23
2. Matériel et méthodes	23
2.1. Matériel végétal	23
2.2. Coupe histologique	24
2.3. Extraction des huiles essentielles	24
2.4. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles par CPG/MS	26
3. Résultats et discussion	28
3.1. Etude histologique	28
3.2. Rendements	32
3.3. Composition chimique des huiles essentielles	32

CHAPITRE III: Activité antioxydante

1. Introduction	40
2. Matériel et méthodes	43
2.1. Effet scavenger du radical DPPH	43
2.2. Test du blanchissement du β -carotène	44
2.3. Pouvoir réducteur (PR)	45
3. Résultats	47
3.1. Effet scavenger du radical DPPH	47
3.2. Test du blanchissement du β -carotène	49
3.3. Pouvoir réducteur (PR)	50
4. Discussion	51

CHAPITRE IV: Activité antimicrobienne

1. Introduction	54
2. Matériel et méthodes	55
2.1. Activité antibactérienne (Aromatogramme)	57
2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	58
3. Résultats	59
3.1. Activité antibactérienne (Aromatogramme)	59
3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	63
4. Discussion	71
Conclusion générale et perspective	77
Références bibliographiques	81

Liste des figures

Figure 01 :	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	5
Figure 02 :	Aspect morphologique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	6
Figure 03 :	<i>Ocimum basilicum</i> L.....	9
Figure 04 :	<i>Laurus nobilis</i> L.....	11
Figure 05 :	Aspect morphologique de <i>Laurus nobilis</i>	12
Figure 06 :	Différentes structures des monoterpènes	16
Figure 07 :	Différentes structures des sesquiterpènes	17
Figure 08 :	Différentes structures des dérivés du phénylpropane	18
Figure 09 :	Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne	20
Figure 10 :	Localisation géographique du Parc National d'El Kala.....	24
Figure 11 :	Appareil de chromatographie en Phase Gazeuse couplée a la spectrophotométrie de masse.....	27
Figure 12 :	Coupe histologique d'une tige de Laurier noble (X10).....	28
Figure 13 :	Coupe histologique de la tige du Basilic (X10).....	29
Figure 14 :	Coupe histologique de la tige du romarin (X10).....	29
Figure 15 :	Face inférieure de la feuille du Romarin (vue à la binoculaire).....	31
Figure 16 :	Poils épidermiques (tecteurs et sécréteurs) chez le Romarin.....	31
Figure 17 :	Rendements des Huiles essentielles.....	32
Figure 18 :	Pourcentage des composants majoritaires de l'huile essentielle d' <i>O. basilicum</i>	36
Figure 19 :	Pourcentage des composants majoritaires de l'huile essentielle du <i>R. officinalis</i>	37
Figure 20 :	Pourcentage des composants majoritaires de l'huile essentielle du <i>L. nobilis</i>	37
Figure 21 :	Mécanisme réactionnel du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)	43
Figure 22 :	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant (AH).....	46
Figure 23 :	Activité antiradicalaire des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> L., <i>Laurus nobilis</i> L., <i>Ocimum Basilicum</i> L.....	47
Figure 24 :	Activité antiradicalaire du BHT.....	48

Figure 25 : Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des huiles essentielles et du BHT.....	49
Figure 26 : Pouvoir réducteur des huiles essentielles des plantes étudiées et de l'acide ascorbique.....	50
Figure 27 : CMI de l'HE de <i>Laurus nobilis</i> L	65
Figure 28 : CMI de l'HE d' <i>Ocimum basilicum</i> L	66
Figure 29 : CMI de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> L	67
Figure 30 : CMI de l'HE de <i>Laurus nobilis</i> L	68
Figure 31 : CMI de l'HE d' <i>Ocimum basilicum</i> L	69
Figure 32 : CMI de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> L	70

Liste des tableaux

Tableau 01 :	Dose létale de quelque huile essentielle	21
Tableau 02 :	Composition chimique de l'Huile essentielle d' <i>O. basilicum</i>	34
Tableau 03 :	Composition chimique de l'Huile essentielle du <i>R. officinalis</i>	35
Tableau 04 :	Composition chimique de l'huile essentielle du <i>L. nobilis</i>	36
Tableau 05 :	Atteintes engendrées par les ERO.....	41
Tableau 06 :	IC50 des huiles essentielles et du BHT.....	48
Tableau 07 :	Les valeurs d'AAR.....	49
Tableau 08 :	Diamètres d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Laurus nobilis</i> L vis-à-vis des souches bactériennes testées.....	60
Tableau 09 :	Diamètres d'inhibition de l'huile essentielle d' <i>Ocimum basilicum</i> L sur des souches bactériennes testées.....	61
Tableau 10 :	Diamètres d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L sur les souches bactériennes testées.....	62
Tableau 11 :	Concentration minimale inhibitrice (CMI).....	64
Tableau 12 :	Concentration minimale inhibitrice (CMI).....	67

Liste des abréviations

8-OHdG: 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine.

AAR: Activité anti-oxydante relative.

Abs : Absorbance.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

AGPI : Acide gras polyinsaturés.

AH : Antioxydant.

ATCC : American Type Culture Collection.

BHA : Butylhydroxyanisole.

BHT: Butylhydroxytoluène.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CPG/MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

DPPH : 2,2 -diphényl -1- picrylhydrazyl.

DMSO : DiméthylSulfOxyde.

EOR : Radicaux libres oxygénée.

Fe³⁺ : Ion ferrique.

Fe²⁺ : Ion ferreux.

Fe(III)- TPTZ : Complexe tripyridyltriazine ferrique.

FeCl₃ : Chlorure ferrique.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

HE: Huile essentielle.

HER : Huile essentielle du romarin.

HEL : Huile essentielle du laurier.

HEB : Huile essentielle du basilic.

I% : Taux d'inhibition.

IC₅₀ : Concentration à 50% de DPPH perdu.

K₃Fe (CN)₆ : Ferricyanure de potassium.

KPC + : *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase positive

KPC - : *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase négative

L. nobilis : *Laurus nobilis*.

***Laurus nobilis* L.**: *Laurus nobilis* Linné.

M_{HE} : Quantité d'huile essentielle extraite en g.

MRSA : Staphylocoque doré résistant à la méthicilline.

M_s : Quantité de la matière végétale sèche en g.

O. basilicum : *Ocimum basilicum*.

***Ocimum basilicum* L.:** *Ocimum basilicum* Linné.

R. officinalis : *Rosmarinus officinalis*.

Ph : Potentiel d'hydrogène.

PNEK : Parc National d'El Kala.

PR: Pouvoir réducteur.

R : Rendement.

***Rosmarinus officinalis* L. :** *Rosmarinus officinalis* Linné.

rpm : Tour par minute.

S/Emb : Sous embranchement.

S/Classe : Sous classe.

TCA : Acide trichloroacétique.

Introduction générale

Grâce à sa situation géographique lui permettant de jouir d'une grande variation climatique à laquelle s'ajoute des ressources hydriques ; l'Algérie regorgeant d'une richesse floristique importante. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces ressources naturelles sont importantes pour l'économie Algérienne et pour le maintien de l'équilibre écologique de plusieurs régions notamment celle d'El Kala.

Classé par l'UNESCO comme une réserve de la biosphère, le Parc National d'El Kala figure parmi les zones protégées les plus importantes. Le PNEK est situé à l'extrême Nord-est d'Algérie, il s'étend sur une superficie de 78438 ha soit 26% de la surface de la wilaya d'El-Tarf (**Oulmouhoub, 2002**), il est constitué d'une mosaïque d'écosystèmes. Selon **De Belair (1990)**, la flore de la région d'El-Kala compte 850 espèces dont 239 espèces végétales sont des espèces rares, représentant ainsi 15 % des 1611 espèces rares d'Algérie (**Zeraia ,1983**).

Les plantes aromatiques ont l'aptitude à synthétiser de nombreux métabolites secondaires en réponse aux stress biotiques et abiotiques qu'ils peuvent subir. Ces métabolites secondaires posséder diverses propriétés biologiques. Les huiles essentielles ou essences, font partie de ce groupe de métabolite avec les alcaloïdes et les phénols (**Haddouchi et al., 2009**) .

Le choix de nos trois plantes s'est basé sur leurs utilisations fréquentes dans nos traditions locales culinaires et médicinales, afin de revaloriser et redécouvrir notre patrimoine national. De ce fait on s'est focalisé sur l'un de leurs métabolites secondaires : les huiles essentielles.

A l'heure actuelle, plusieurs travaux ont envisagé l'utilisation de ces composés bioactifs comme alternatives aux multiples substances synthétiques. En effet, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques, également la toxicité des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs dans l'industrie agro-alimentaire, sont à l'origine de l'engouement suscité pour les plantes caractérisées par leurs propriétés biologiques. Le terme «biologique» comprend toutes les activités que ces mélanges des composés complexes exercent sur l'organisme.

L'objectif de notre travail est la valorisation de la biodiversité de notre région à travers l'étude des huiles essentielles de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis*, *Rosmarinus officinalis* et *Ocimum basilicum*). La valorisation de ces plantes englobe plusieurs aspects, le criblage phytochimique des huiles essentielles et l'évaluation de leurs activités biologiques (antimicrobienne et antioxydante).

Notre manuscrit est scindé en cinq chapitres :

Le premier chapitre consacré à l'étude bibliographique est divisé en deux parties :

- La première est dédiée à une description botanique générale des espèces étudiées (*Laurus nobilis*, *Rosmarinus officinalis* et *Ocimum basilicum*) et leurs répartitions géographiques.
- La deuxième partie donne un aperçu sur les huiles essentielles et leurs modes d'action.

Dans le deuxième chapitre, nous avons axé notre travail sur une étude histologique des plantes étudiées en premier temps, suivi d'extractions de leurs huiles essentielles et leurs analyses par GC/MS afin de quantifier et d'identifier leurs compositions chimiques.

La mise en évidence *in vitro* du potentiel antioxydant des huiles essentielles extraites est présentée dans le troisième chapitre. Ainsi, nous avons employé trois méthodes : le test du piégeage du radical libre DPPH, le test de blanchiment de β -carotène et la réduction du fer.

Le quatrième chapitre aborde une étude du pouvoir antimicrobien des HEs vis-à-vis d'une vingtaine de souches bactériennes.

Les résultats et la discussion de chaque expérimentation de notre travail, sont exposés dans chaque chapitre qui lui est dédié.

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

CHAPITRE I :
Aperçu bibliographique

Partie I : Description botanique des plantes étudiées

1. Famille des Lamiacées

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. Entre autres, un grand nombre de genres de la famille des Lamiaceae sont des sources de terpénoïdes, flavonoïdes et iridiodes glycosylés.

1.1. Genre *Rosmarinus*

Le genre *Rosmarinus* ne regroupe que trois espèces (**Bärtels, 1997**):

- *Rosmarinus officinalis* Linné, de loin l'espèce la plus aromatique et importante.
- *Rosmarinus eriocalix* Jord. & Fourr.
- *Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath et Maire, morphologiquement très proche de *R. eriocalyx*.

1.1.1. *Rosmarinus officinalis* L.

Le nom latin *Rosmarinus* est interprété, comme dérivé de "*ros*" rosée et "*marinus*" appartenant à la mer autrement rosée marin, ce qui fait référence à la présence du romarin sur les côtes et les îles de la Méditerranée et à diverses légendes liées à cette plante (**Guinochet, 1973**).

➤ **Position systématique (Quezel et Santa, 1963)**

Règne :	Plantae.
Embranchement:	Spermaphytes.
S/Emb :	Angiospermes.
Classe :	Dicotylédones.
S/Classe :	Gamopétales.
Ordre :	Lamiales.
Famille :	Lamiaceae.
Genre :	<i>Rosmarinus</i> .
Espèce :	<i>Rosmarinus officinalis</i> .



Figure 01: *Rosmarinus officinalis* L. (Photo: Ouibrahim, 2012)

1.1.1.1. Description botanique du *Rosmarinus officinalis* L.

Le romarin se présente sous forme d'arbuste, sous arbrisseau ou herbacé, mesurant environ de 0.8 à 2m de hauteur.

La tige est ligneuse et carrée. Les feuilles sessiles et opposées, sont persistantes et vivaces. Elles sont enroulées sur les bords, vertes à la face supérieure, velues et blanchâtres à la face inférieure dont elle est parcourue par une nervure médiane (**Garnier *et al*, 1961**). Elles possèdent des poils sécréteurs qui lui confèrent une odeur aromatique spécifique.

Les fleurs bleu lavande à blanche (variétés albiflorus) sont disposées en courtes grappes à l'aisselle des feuilles, sur la partie supérieure des rameaux (Garnier *et al*, 1961), la floraison a lieu presque toute l'année. Le calice bilabié, pulvérulent, nu à la gorge, présente un tube campanulé à 3 divisions dont la plus large est la lèvre supérieure.

La corolle, plus longue que le calice dont elle s'élargit sur 2 lèvres inégales, la lèvre supérieure à 2 lobes et la lèvre inférieure à 3 lobes qui possède un médian le plus développé et concave (Quezel et Santa, 1963).

L'androcée comporte 4 étamines dont 2 sont stériles et réduites à des crochets. Les 2 autres, saillantes, sont insérées sur la gorge par leur filet muni d'une petite dent. Ces 2 étamines sont des anthères allongées uniloculaires et déhiscentes par une seule fente.

Le gynécée se compose d'un style se terminant par un stigmate qui se développe souvent après les étamines. L'ovaire a 2 carpelles divisés en 2 parties.

Le fruit est tétrakène brun dont chaque partie renferme un seul embryon sans albumen.



Figure 02: Aspect morphologique de *Rosmarinus officinalis* L. (Köhler, 1897)

1.1.1.2. Répartition géographique

Plante indigène poussant spontanément dans toute l'Algérie (**Quezel et Santa, 1963**), le *Rosmarinus officinalis* est originaire du bassin méditerranéen (**Iserin et al., 2001**). Commun dans les maquis, les garrigues et les forêts claires, il est sub-spontané en plusieurs endroits privilégiant un sol calcaire, de faible altitude, ensoleillé et modérément sec (**Schauenberg et Paris, 1977**).

1.1.1.3. Composition chimique

La littérature est particulièrement riche sur les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*, elle en posséderait un rendement de 1 à 2.5%.

En plus de l'huile essentielle, on distingue 2 à 4% de dérivés tritérpéniques tels que : l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acétate de germanicol ; des lactones diterpéniques : picrosalvine, dérivés de l'acide carnosolique, rosmanol, rosmadial , des acides phénoliques , des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque , des acides gras organiques : l'acide citrique, glycolique et glycérique , des stérols, de la choline, du mucilage et de la résine (**Bellakhdar, 1997**).

Entre autre, **Gonzalez trujano** et ses collaborateurs en 2007 ont démontré d'après un criblage phytochimique la présence de flavonoïdes, des tanins, des saponines et l'absence des alcaloïdes.

Concernant les éléments minéraux, la spectrométrie d'émission atomique à pue identifié 18 éléments Al : 146.48 mg/kg ; Ca : 7791.80 mg/kg ; Fe : 330.16 mg/kg ; K : 14916.23 mg/kg ; Mg : 1634.55 mg/kg ; Na : 2711.87 mg/kg ; P : 1474.60 mg/kg ; Cr : 97.36 mg/kg ; Sr : 74 .65 mg/kg (**Arslan et al., 2007**).

1.2. Genre *Ocimum*

Le genre *Ocimum* originaire d'Asie méridionale, d'Iran et du Moyen-Orient ; compte une centaine d'espèces (**Hiltunen et Holm, 1999**). C'est un groupe important de plantes herbacées ou buissonnantes, annuelles ou vivaces. Egalement, les espèces de ce genre sont généralement aromatiques dont les huiles essentielles trouvent diverses utilisations dans la parfumerie, cosmétique et médicinales.

1.2.1. *Ocimum basilicum* L.

Le basilic est une plante aromatique de la famille des Lamiacées. Elle est utilisée dans plusieurs domaines : cuisine, médecine, horticulture, *etc.* Les parties les plus utilisées sont les feuilles et les graines (Arabaci et Bayram, 2004).

➤ **Position systématique (Dupont et Guignard, 2012) :**

Règne:	Plantae.
Embranchement:	Magnoliophyta.
Classe:	Magnoliopsida.
S/Classe:	Asteridae.
Ordre:	Lamiales.
Famille :	Lamiaceae.
Genre :	<i>Ocimum</i> .
Espèce :	<i>Ocimum basilicum</i> L.

1.2.1.1. Description botanique d'*Ocimum basilicum* L.

Les feuilles sont pétiolées, opposées, lancéolées et soyeuses. Elles possèdent des pointes émoussées ou acuminées, entières ou plus ou moins dentées avec des poils sur les bords. De couleur verte, plus ou moins foncée ou parfois rougeâtre. Leurs tailles varient selon les variétés de 2 à 3 cm jusqu'à 7cm.

Les tiges sont simples ou ramifiées, quadrangulaires généralement ligneuses à leur base comme chez beaucoup de lamiacées.

Les fleurs sont petites et regroupées en épis à l'extrémité des rameaux et à l'aisselle des feuilles. Elles sont de couleur crème, blanche, rose ou violacée selon la variété (Arabaci et Bayram, 2004; Koudjéga, 2004) et sont accompagnées de bractées de 1-1,5 cm. Le calice est soudé en 5 lobes: un sépale supérieur arrondi et quatre autres courts et étroits. La corolle porte deux lèvres: une supérieure constituée de quatre lobes et une inférieure plus longue, concave et arrondie. Chaque fleur porte 4 étamines et des stigmates divisés en deux lobes à leur extrémité (Koudjéga, 2004).

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 03: *Ocimum basilicum* L. (Photo: Ouibrahim, 2011)

1.2.1.1. Répartition géographique

Originnaire d'Asie mais cultivé sur tout le pourtour méditerranéen. Le basilic est une plante annuelle en Europe sous climat tempéré, mais vivace sous climat tropical (Botineau, 2010).

1.2.1.2. Composition chimique

L'*O.basilicum* L. contient divers métabolites secondaires tels que les huiles essentielles à des teneurs variant entre 0,5 à 1,5%, et dont la composition diffère selon le chémotype, l'origine et la période de récolte. Ainsi on pourrait retrouver dans les huiles essentielles des HES à 1,8 cinéole, eugénol, méthyl chavicol, linalool et estragol.

Les feuilles de basilic contiennent également environ 5% de tanins, l'acide oléanolique (0,17%) et d'une petite quantité d'acide ursolique, protéines (14%), de glucides (61%), ainsi et des concentrations relativement élevées de vitamine (A, B1, B2, C et E) et l'acide rosmarinique (Leung et Foster 1996).

En outre, elles renferment des flavonoïdes (0,6 à 1,1%) dont flavonoïdes aglycones tels que quercétine et kaempférol (Viorica, 1987).

Les graines de basilic contiennent du mucilage , des polysaccharides et de l'huile fixe qui se compose de l'acide linoléique (50%) , acide linoléique (22%) , acide oléique (15%) , ainsi que 8 % d'acides gras insaturés (**Malik et al. , 1989**).

2. Famille lauraceae

Dans l'ordre des laurales on retrouve la famille des lauraceae. Considéré comme parmi les plus primitifs des angiospermes. Cette famille comporte 2000 à 2500 espèces réparties en cinquantaine de genre dont *Cinnamomum* (cannelle), *Cryotocarya*, *Laurus* (laurier) et *Persea* (avocatier) (**Spichiger et al., 2002**).

Principalement composé de plantes ligneuses, arbres ou arbustes odorants (rarement liane parasite (cassytha)) (**Spichiger et al., 2002**). La plupart de ses espèces sont aromatiques (feuilles ou écorces).

2.1. Genre *Laurus*

Le genre est originaire des îles Canaries et du bassin méditerranéen comprend trois espèces d'arbres ou d'arbustes persistants : *Laurus nobilis*, *Laurus azorica* et *Laurus novocanariensis*.

2.1.1. *Laurus nobilis* L.

Consacré à Apollon et Esculape « dieux de la santé et de la médecine » chez les grecs, en couronnant les empereurs et les héros chez les romains ; le laurier noble jouit d'une place importante tant dans le domaine mythologique, culinaire et médicinale depuis l'antiquité (**Vetvicka et Matousova, 1991**).

Le laurier, ou laurier-sauce (*laurus nobilis* L.) est un arbuste ou un arbre de la famille des Lauraceae, à feuilles persistantes et coriaces (**Vetvicka et Matousova, 1991**). Etymologiquement, le nom latin laurus signifiant « toujours vert » fait allusion au feuillage persistant de la plante et nobilis du latin « fameux » (**Pariente, 2001**). Son nom et aussi symbole du succès dans nos jours à travers le baccalauréat du latin « Bacca Lauri » soit baies de laurier (**Zhiri et al., 2005**).

➤ **Position systématique**

La classification botanique de *Laurus nobilis* L. d'après (Quezel et santa, 1962)

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



Figure 04: *Laurus nobilis* L. (Photo : Ouibrahim, 2011).

2.1.1.1. Description botanique

Le laurier est un arbuste ou arbre aromatique de 2 à 10m de hauteur à croissance lente, et au tronc droit ramifié dès la base avec un sommet conique, et s'arrondissant en fil du temps. L'écorce est noire à gris foncé et lisse. Ces branches remontent en oblique avec des jeunes pousses fines, glabres et brun rougeâtre dont les bourgeons sont étroits, verts rougeâtres et longs de 0,2 à 0,4cm (Quezel et santa, 1963).

Le feuillage est persistant avec des feuilles aromatiques, simples, alternes et coriaces dont le pétiole mesure de 2 à 5cm, longues de 5 à 12cm et large de 2 à 6cm. Elles sont lancéolées, légèrement ondulées et entaillées au bord; de couleur vertes foncées, brillantes sur la face supérieure et verte clair au-dessous avec des nervures latérales pennées et rougeâtres (Quezel et santa, 1963).

Les fleurs sont dioïques de 0,4 à 0,8cm unisexuées avec une couleur jaune verdâtre, à périanthe simple soudé à la base. Groupé en 4 à 6 ombelles. Les fleurs mâles possèdent 8 à 12 étamines rudimentaires et les fleurs femelles sont dotées d'un ovaire hypogyne à un compartiment avec un stigmate en trois parties.

Le fruit est une baie ovoïde, soutenue par le tube périanthaire peu dilaté. De 2cm de longueur à 1cm de largeur, le fruit est noir vernissé renfermant une seule graine libre (Beloued, 2005). Le mésocarpe charnu renferme de l'huile et des cellules à huile essentielle. Les cotylédons épais sont également riches en lipides (Myose et Paris, 1976).



Figure 05 : Aspect morphologique de *Laurus nobilis* (Beloued, 2005).

2.1.1.2. Répartition géographique

Le laurier est la seule espèce représentant la famille lauracées dans la région méditerranéenne d'où elle est originaire. Actuellement, la plante est largement cultivée comme plante ornementale et pour la production commerciale dans beaucoup de pays tels que l'Algérie, la Turquie, la France, la Grèce, le Maroc, l'Amérique centrale et les Etats-Unis Méridionaux (**Demir et al., 2004; Barla et al., 2007**).

2.1.1.3. Composition chimique:

Les feuilles du *Laurus nobilis* renferment plusieurs substances actives dont les huiles essentielles. Cette dernière représente 1 à 3% du poids sec, elle contient 30 à 70% de 1-8 cinéol (eucalyptol), ainsi que plusieurs composés terpéniques : linalol (8 à 16%), sabinène,, géraniol, eugéol 3%, pinène et terpinène (**Bruneton 1993**).

Entre autres, on retrouve dans les feuilles également des alcaloïdes aporphiniques, comme la cryptodorine ou l'actinodaphnine (**Kivçak et Mert, 2002**), des flavonoïdes polaires (dérivées glycosylées de quercétine, kaempferol et de catéchine) et apolaires (quatre dérivés acylés de kaempferol) (**Fiorini et al., 1998 ; Kivçak et Mert, 2002**) et sesquiterpènes lactones. Les feuilles peuvent aussi contenir des tanins.

Partie II : Huile essentielle

1. Généralité

L'huile essentielle, essence ou également appelé huile volatile, est l'ensemble d'extraits volatils de composition complexe obtenu des plantes aromatiques. D'après l'Association Française de Normalisation (AFNOR, Edition 2000), a défini les huiles essentielles comme étant : *des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques.*

L'odeur et la volatilité des essences contribuent dans les interactions entre les végétaux également entre végétal et l'animal ou elles constituent un moyen de défense avec sont action répulsive contre les prédateurs (micro-organismes, champignons, bactéries, animaux herbivores). Elles peuvent également participé à l'attraction des insectes pollinisateurs.

2. Origine et localisation des HEs :

Les huiles volatiles peuvent être considérées comme des résidus du métabolisme végétal. Suite à la photosynthèse au niveau des chloroplastes, l'énergie produite (sous forme de glucides, NADPH et d'ATP) contribue au développement de la plante et indirectement à la biosynthèse de multiples composés secondaires parmi elles les huiles essentielles (**Narishetty et Panchagnula, 2004**).

Les essences sont synthétisées par les végétaux supérieurs, il y aurait environ 17 500 espèces aromatiques réparties dans une cinquantaine de familles dont les Lamiaceae, les Asteraceae, les Rutaceae et les Lauraceae. Ces espèces sont caractérisées par la présence d'organes spécifiques responsables de la synthèse et de stockage des huiles essentielles : les poches (Myrtacées, Rutacées) ou les canaux sécréteurs, les poils sécréteurs (Lamiaceae) et les cellules sécrétrices (Zingiberaceae, Lauraceae) (**Bruneton, 1993**). L'accumulation des HEs peut être dans toutes les parties de la plante : sommités fleuries (lavande), écorces (cannelier), rhizomes (Gingembre), fruits (Anis)...*etc.*

3. Propriétés physico-chimiques

3.1. Propriétés physiques

Les propriétés physiques des huiles essentielles se résument en leurs indices, pouvoir rotatoire, viscosité, densité, solubilité dans l'alcool, point d'ébullition et congélation.

Généralement incolores ou jaune pâle, les essences sont liquides à température ambiante. La nature huileuse des HEs, la rend liposoluble ainsi elles sont peu solubles dans l'eau mais le sont dans les solvants organiques apolaires, les huiles grasses, et dans les alcools.

Les huiles essentielles sont extrêmement volatiles et sensibles à l'oxydation. Elles ont tendance à se polymériser en donnant lieu à la formation de produits résineux ce qui induit à la perte de ses propriétés.

Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (à l'exception des huiles essentielles de saffran, de girofle ou de cannelle constituent des exceptions). Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée (**Baser et Buchbauer, 2010**).

3.2. Propriétés chimiques

Les huiles essentielles peuvent contenir une centaine de composés différentes, appartenant à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques spécifiques : les terpènes et les dérivés du phénylpropane biosynthétisé essentiellement à partir de l'acide shikimique (**Bruneton, 1993**).

3.2.1. Les terpènes

Les huiles essentielles sont constituées d'un certain nombre de composés terpéniques, généralement les plus volatils dont la masse moléculaire n'est pas élevée. Ces constituants proviennent de l'isoprène répondant à la formule générale $(C_5H_8)_n$, ils sont également nommés isoprénoïdes ou terpénoïdes. Le terme « terpénoïde » définit l'ensemble des terpènes oxygénés et non oxygénés, alors que le terme « terpène » ne tient pas compte de la présence d'oxygène (**Baser et Buchbauer, 2010**).

Ainsi, on distingue selon le nombre de carbone: les monoterpènes (C 10), les sesquiterpènes (C 15), et moins fréquemment les diterpènes (C 20), les triterpènes (C 30) et les tétraterpènes (C 40).

Certains composés terpéniques peuvent être toxiques, répulsives ou attractifs pour d'autres organismes, d'où leurs rôles dans les interactions entre les plantes et plantes-animaux

3.2.1.1. Monoterpènes

On y rencontre des monoterpènes acycliques (myrcène, ocimène), monocycliques ou bicycliques (pinènes, 3-carène, camphène, sabinène). Grace à la réactivité des cations intermédiaires de ces terpènes, elles peuvent se rattache à un certain nombre de molécules (Bruneton, 2008).

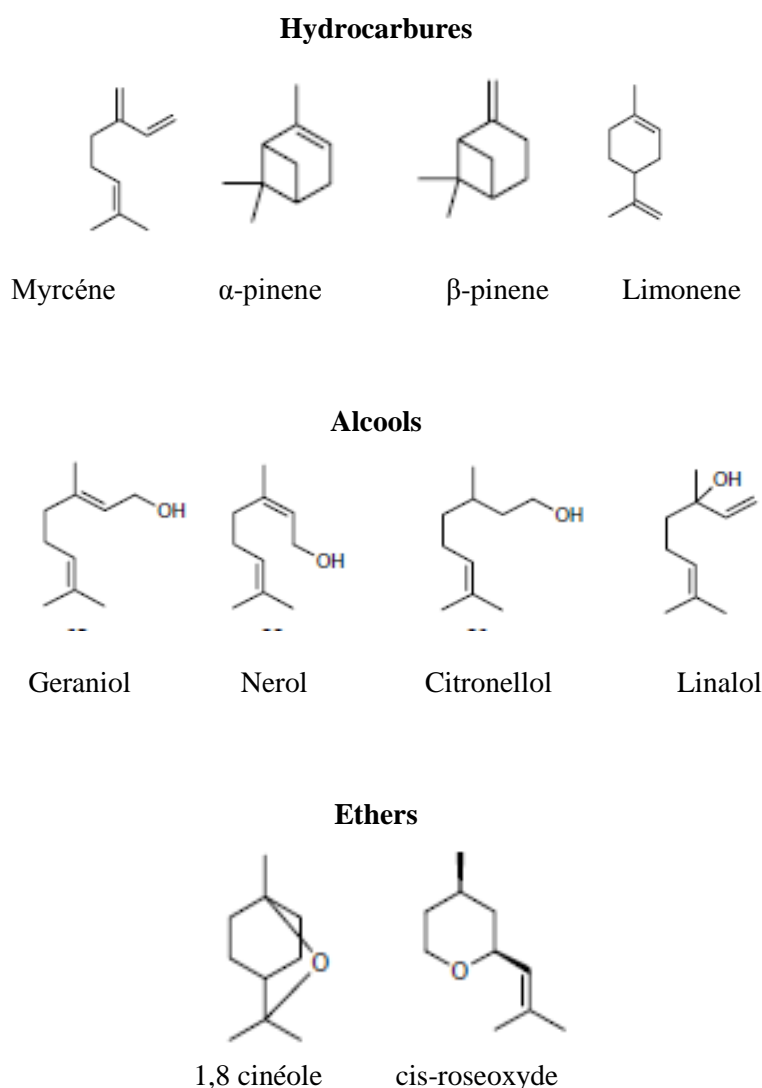
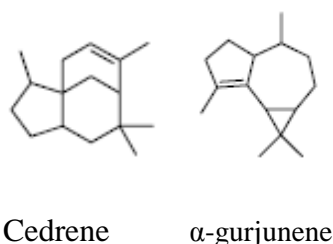


Figure 06: Différentes structures des monoterpènes (Baser et Buchbauer, 2010).

3.2.1.2. Sesquiterpènes

L'allongement de la chaîne des sesquiterpènes amplifie le nombre des cyclisations possible, plus d'une centaine de squelettes différents ont été décrits. On trouvera également des sesquiterpènes avec des fonctions chimiques caractéristiques : alcool (farnésol, carotol), carbures (β -caryophyllène), cétones, ester.

Hydrocarbures



Alcools

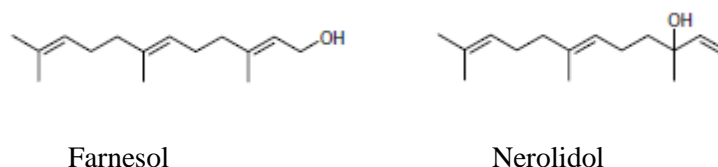


Figure 07: Différentes structures des sesquiterpènes (Baser et Buchbauer, 2010).

3.2.2. Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C₆-C₃), ou composés phénoliques s'agissant le plus fréquemment d'allyl ou propénylphébols, et ou aldéhydes. La biosynthèse par voie phenylpropanoïdes débute par des aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine, Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle. Egalement, la synthèse de ces constituants nécessite une série d'acides dont l'acide shikimique et l'acide cinnamique. Les phénylpropanoïdes sont moins répondu dans l'HE que les terpènes, néanmoins elles sont caractéristiques dans certaines huiles essentielles d'Apiaceae (anis, fenouil, persil, cannelles (eugénole, myristicine, asarones, cinnamaldéhyde)) (Bruneton, 1999).

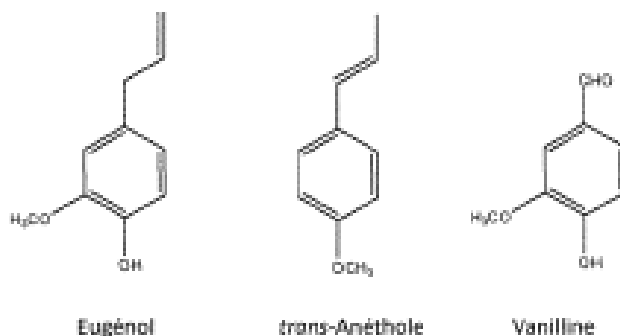


Figure 08 : Différentes structures des dérivés du phénylpropane (Baser et Buchbauer, 2010).

4. Activité biologique des huiles essentielles

4.1. Activité antioxydante

Les antioxydants sont des substances capables de protéger l'organisme contre les effets du stress oxydatif (Beirão & Bernardo-Gil, 2006).

On distingue trois types d'antioxydants : les antioxydants enzymatiques, les enzymes de réparation, et les antioxydants non enzymatiques. Les substances naturelles dont les huiles essentielles sont classées entant qu'antioxydants non enzymatiques.

L'activité antioxydante peut être primaire ou préventive (indirecte), cette dernière est capable de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la réduction d'oxygène (Madhavi *et al.*, 1996).

Par contre les antioxydants à action directe sont capables de donner des électrons à l'oxygène radicalaire afin qu'ils puissent le piéger, empêchant ainsi la destruction des structures biologiques. Ils peuvent agir comme agents réducteurs capables de passer leurs électrons aux ROS et les éliminer (Kohen et Nyska, 2002).

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

4.2. Activité antibactérienne

L'une des premières mises en évidences *in vitro* de l'activité antibactérienne des HEs date de la fin du XIX^{ème} siècle, lorsque Buchholtz a étudié la croissance des propriétés inhibitrices de l'huile des graines de carvi et de l'huile de thym en 1875. Toutefois, il aura fallu attendre le début du XX^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (**Cox et al, 2000**). Dés lors, plusieurs recherches ont démontré le pouvoir antimicrobien de certaines essences sur une large palette de micro-organismes, y compris sur des bactéries résistantes aux antibiotiques.

Néanmoins, le mécanisme d'action des HEs sur les cellules bactériennes et fongiques reste difficile à cerner, compte tenu de la composition complexe des huiles volatiles (**Burt, 2004**). La variabilité des constituants des huiles suggère qu'elles agissent sur plusieurs sites d'action dans les micro-organismes, étant donné que chaque composé possède son propre mode d'action (**Guinoiseau, 2010**).

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 (**Guinoiseau, 2010**).

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 (**Wendakoon et Sakaguchi, 1995 ; Tsuchiya et al., 1996**). Egalement, une perturbation chémo-osmotique et une fuite de potassium intra-cytoplasmique peuvent subvenir, suivi de la libération d'acides nucléiques, de L'ATP, et du phosphate inorganique (**Tsuchiya et al., 1996 ; Hammer et al., 1999 ; Daroui-Mokaddem, 2011**).

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 Koike, 1982, Knoblocet *al.*, 1989**).

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

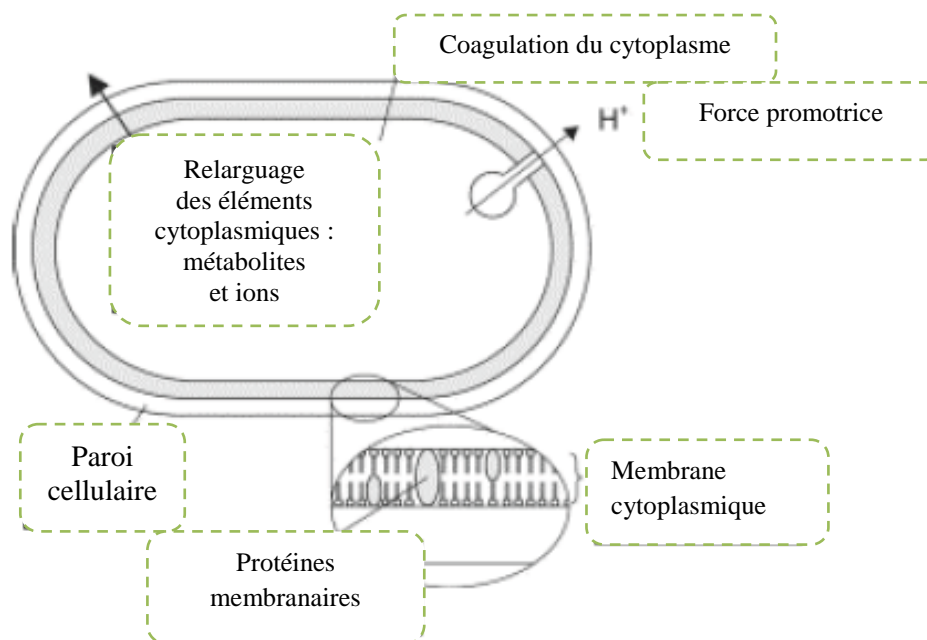


Figure 09: Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).

4.3. Activité antifongique

De plus en plus, les essences sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire comme aromes également comme conservateurs alimentaires. Les huiles essentielles agissent sur un large spectre de moisissure et de levure en inhibant la croissance des levures et la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

Comme pour l'activité antibactérienne, le pouvoir antifongique est attribué à la présence de certaines fonctions chimiques dans la composition des HEs. Plusieurs travaux ont révélé que le pouvoir inhibiteur était essentiellement dû à la réactivité de la fonction aldéhyde avec le groupement thiol des acides aminés impliqués dans la division cellulaire (**Kurita *et al.*, 1979**).

D'autres auteurs ont démontré que la formation d'un complexe entre le donneur d'électrons et l'aldéhyde induit un changement de l'état ionique de la membrane traduisant par un déséquilibre d'échange avec le milieu extérieur. Ce déséquilibre entraîne la mort cellulaire (**Baser et Buchbauer, 2010**).

Cependant, les phénols (eugénol, chavicol 4-allyl-2-6- diméthoxyphénol) sont plus antifongiques que les aldéhydes testés (cinnamique et hydro cinnamique) (**Laib, 2010**).

5. Toxicité des huiles essentielles

Certains constituants aromatiques des HEs possèdent de multiples vertus, cependant elles peuvent présenter une toxicité à très forte dose (essentiellement les cétones mono terpéniques) ; suivant la citation de Pracelse : « Tout est poison, rien n'est poison, seule la dose compte ». Généralement, les huiles essentielles ingérées par voie orale ont une toxicité aiguë faible (Tableau 01).

Ainsi l'ingestion massive peut conduire à une neurotoxicité issue des HEs à thylene (thuya, absinthe, sauge) ou à pinocamphone. Ces cétones peuvent provoquer des crises épileptiformes et tétaniformes, des troubles sensoriels.

Tableau 01 : Dose létale de quelque huile essentielle (Bruneton, 1999)

Plantes	DL ₅₀
Anis, Eucalyptus, Girofle	2 à 5 g/kg
Camomille, Citronnelle, Lavande, Marjolaine	<5 g/kg
Basilic, Estragon, Hysope	1 à 2 g/kg
Origan	1,5ml/kg
Sassafras	1,9 g/kg
Wintergreen	0,9 à 1,25 g/kg

6. Situation économique des huiles essentielles

Les huiles volatiles sont des matières premières importantes pour la parfumerie, le cosmétique, l'industrie des arômes. Ces substances sont également utilisées dans l'industrie pharmaceutique aussi bien comme sources de substances actives que pour l'aromatization de divers produits (**Moretti et al. 2002**).

La production des HEs produites dans le monde varie considérablement, annuellement elles peuvent dépasser 35 000 tonnes tandis que d'autres ne peuvent atteindre que quelques kilogrammes (**Baser et Buchbauer, 2010**). Cette variabilité de production revient essentiellement à la disponibilité des plantes. Egalement, la production est très limitée quasi impossible dans les pays nordiques couverts de neige en permanence. Chaque région possède ses propres flores caractéristiques. Quelques plantes peuvent être endémiques, se limitant à une zone particulière telle que *Santalum album* en Inde et au Timor en Indonésie, *Pinus mugo* dans les Alpes européennes, *Thymus numidicus* dans le Maghreb.

Les principaux pays producteurs d'HE en Afrique sont l'Algérie, le Maroc, la Tunisie, l'Égypte et la Côte d'Ivoire. En Europe ce sont les pays méditerranéens : Italie, Espagne, Portugal, France, Croatie, Albanie et Grèce, qui produisent tous des huiles essentielles en quantités industrielles. Egalement les pays d'Europe centrale et de l'Est, tels que la Bulgarie, la Roumanie, la Hongrie et l'Ukraine, l'immense Fédération de Russie. Ces derniers jouissent d'une ressource de plantes sauvages importante grâce à leurs vastes zones de terres cultivées.

En Asie, la diversité du climat permet une production d'HEs importante. La Chine et l'Inde jouent un rôle majeur suivies de l'Indonésie, le Sri Lanka et le Vietnam (**Baser et Buchbauer, 2010**).

CHAPITRE II : Etude anatomique et étude phytochimique des huiles essentielles

1. Introduction :

Les végétaux supérieurs peuvent produire deux sortes de métabolites: les métabolites primaires (protéines, polysaccharides..*ect*) nécessaires à la croissance et au développement de l'organisme ; et les métabolites secondaires dont les huiles essentielles.

Les métabolites secondaires sont synthétisés et employés par les végétaux dans des multitudes fonctions adaptatives notamment en réponse aux stress biotiques et abiotiques qu'ils peuvent subir. Ces substances constituent une source de molécules bioactives, avec des propriétés physico-chimiques diverses et multiples vertus biologiques (antimicrobien, antioxydant, anti-tumorale et anti-inflammatoire...). D'où l'intérêt, d'effectuer des analyses qualitatives et quantitatives des constituants des métabolites secondaires.

Vu la complexité de la composition chimique des huiles essentielles, dans ce chapitre le rendement et le criblage phytochimique par CPG/MS des trois huiles essentielles testées ont été effectué et comparé avec la littérature.

2. Matériel et méthode

2.1. Matériel végétal

Les feuilles de *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. et d'*Ocimum basilicum* L. ont été récoltées au Parc National d'EL KALA dans la wilaya d'EL TAREF (latitude de 36°52 Nord et à une longitude de 8°27 Est), au mois d'avril 2012. L'identification des espèces végétales est réalisée au laboratoire de botanique médicale de l'université de médecine d'Annaba.

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

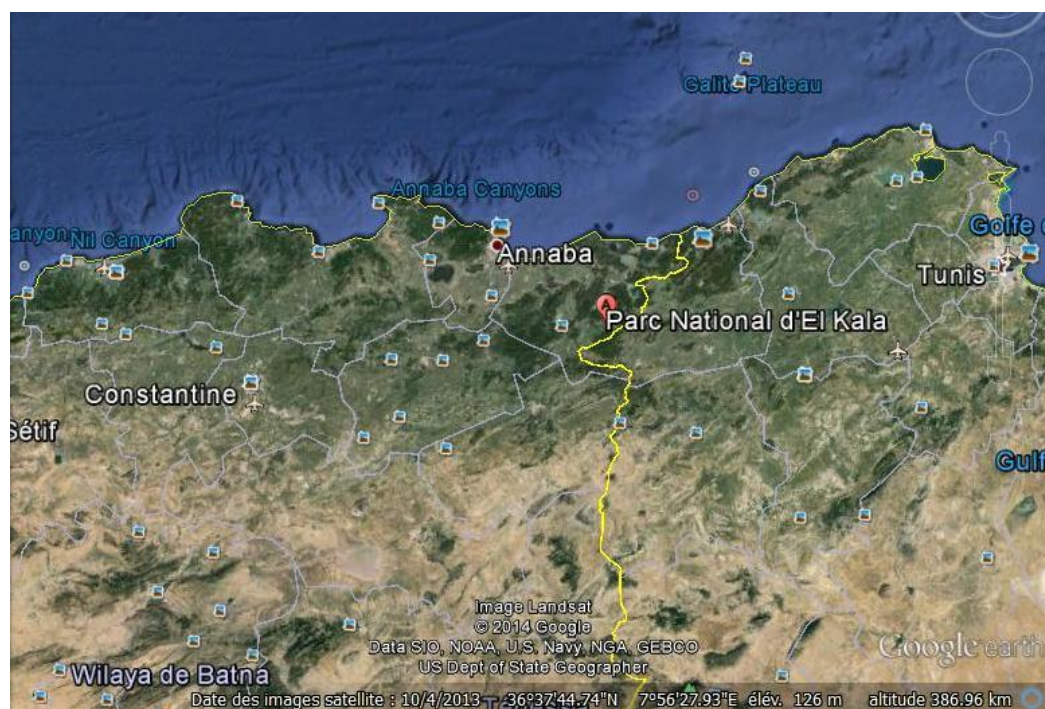


Figure 10: Localisation géographique du Parc National d'El Kala (Google earth).

2.2. Coupe histologique

Afin de mettre en évidence les différents types tissulaires de nos plantes ainsi que les organes responsables de la production des huiles essentielles, nous avons réalisé une étude histologique sur les feuilles et les tiges. Ces dernières sont utilisées à l'état frais, ensuite coupées et conservées dans l'éthanol à 75%.

➤ Principe

La technique employée est la double coloration vitale (double coloration des parois). Cette méthode a pour but de renforcer le contraste et de rendre plus évident les différents constituants tissulaires. Grâce à la réaction successive sur les coupes fines des solutions d'hypochlorite de sodium et d'hydroxyde de sodium dilué, résultant la destruction des organites cellulaires et la conservation des parois cellulaires.

On obtiendra la coloration en rose des membranes celluloseuses (parenchyme cellulosique, liber et collenchyme) et en vert les membranes lignifiées ou sclérifiées (bois, sclérenchyme).

➤ **Mode opératoire**

• **Réalisation des coupes**

A l'aide d'un bistouri, on découpe des feuilles et des tiges sélectionnées d'une manière à obtenir des tranches transversales très fines. Ces coupes sont déposées dans des tamis prêts à la coloration.

• **Double coloration**

Les coupes obtenues sont placées successivement dans :

- Hypochlorite de sodium (eau de javel) pendant 15 min afin d'éliminer le contenu cellulaire et n'avoir que les parois squelettiques.
- Lavés soigneusement les échantillons à l'eau distillée pour enlever l'excès d'hypochlorite.
- Deuxième lavage à l'eau distillée.
- Vert de méthyle pendant 10 à 15 min qui colore les parois lignifiées et les tissus sclérifiés en vert, bleu ou violet.
- Lavage et placer les coupes dans la solution de rouge du Congo (8 à 10min) pour colorer les tissus celluloses en rose.
- Dernier lavage et monter finalement les coupes entre lame et lamelle au microscope optique au grossissement 10 et 40.

2.3. Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles des trois plantes étudiées ont été extraites par hydrodistillation grâce à un appareil du type Clevenger. Cette technique est basée sur l'immersion d'un échantillon solide dans l'eau portée à ébullition. La vapeur saturée d'huiles essentielles traverse un serpentin ou elle se condense pour donner deux produits: l'eau florale et l'huile essentielle.

➤ **Mode opératoire**

Les feuilles séchées ont été mises dans une fiole de 1000ml qui fut remplie avec 700ml d'eau distillée; la fiole avec son contenu a été mise sur le chauffe-ballon. Les huiles essentielles entraînées par les vapeurs d'eau générées dans la fiole sont dirigées vers le col de cygne (le coude) qui relie la fiole avec le réfrigérant.

Une fois arrivées dans le réfrigérant, elles se condensent rapidement et se retrouvent dans l'ampoule à décantation qui permet la séparation immédiate de l'essence par sa densité. Après 2 heures d'extraction, l'huile essentielle a été recueillie dans un petit flacon en verre hermétique et recouvert de papier aluminium pour le protéger de la lumière. On le conserve au réfrigérateur.

➤ **Calcul de rendement**

Le rendement de l'HE est défini comme étant le rapport entre la masse d'HE obtenue et la masse du matériel végétal traité (AFNOR, 1986). Le rendement est exprimé en pourcentage :

$$R(\%) = M_{HE} / M_S \times 100$$

R : Rendement de l'HE en %.

M_{HE} : Quantité d'extraits récupérée en g.

M_S : Quantité de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.

2.3. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles par CPG/MS

La détermination de la composition chimique des huiles essentielles a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).

➤ **La chromatographie en phase gazeuse :**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique couramment utilisée pour la séparation, l'identification et le dosage des constituants chimiques. La chromatographie consiste à séparer les composés d'un mélange en fonction des vitesses d'entraînement à travers une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile gazeuse (gaz vecteur) (Arpino et al., 1995).

La possibilité de coupler les chromatographes à divers spectromètres augmente considérablement la quantité et la qualité des informations obtenues. En CPG/SM, la comparaison informatique des spectres d'un pic inconnu avec une ou plusieurs références permet son identification (Brunneton, 1993).



Figure 11: Appareil de chromatographie en Phase Gazeuse couplée a la spectrophotométrie de masse (Photo : Moussaoui, 2011).

➤ **La spectrophotométrie de masse :**

La spectrophotométrie de masse repose sur l'ionisation et la fragmentation des molécules. Leur ionisation entraîne en effet une accumulation d'énergie qui en se dissipant, peut provoquer la rupture des liaisons interatomiques et donner naissance à des fragments caractérisés par le rapport de leur masse et leur charge. Les différents fragments ainsi produits, sont accélérés avant de parvenir à un analyseur appelé filtre de masse, qui les sépare. Le recueil sélectif des différents ions permet l'établissement d'un spectre caractéristique appelé : spectre de masse.

➤ **Mode opératoire :**

Les constituants de l'huile essentielle ont été identifiés par CPG/MS. L'analyse a été réalisée par un chromatographe à phase gazeuse du type Shimadzu couplé à un spectromètre de masse. La colonne capillaire était du type QP 2010 S de 25 m longueur, diamètre 0.25 mm. Le débit du gaz porteur (hélium) était de 1,5 ml / min. 1µl d'huile essentielle a été injecté, en utilisant le mode split. La température de la colonne a été maintenue à 60°C pendant 5 min puis augmentée de 5°C par min jusqu'à 220°C. Le détecteur était à l'ionisation de flamme (FID).

3. Résultats et discussion

3.1. Etude histologique

Dans l'ensemble, les coupes histologiques de nos trois plantes semblent posséder la même organisation tissulaire, mais chaque plante se caractérise par une forme, une taille et quelques tissus cellulaires (poils sécréteurs et poche) propres à la famille à laquelle elle appartient. Ces caractéristiques résultent également des adaptations aux facteurs environnementaux.

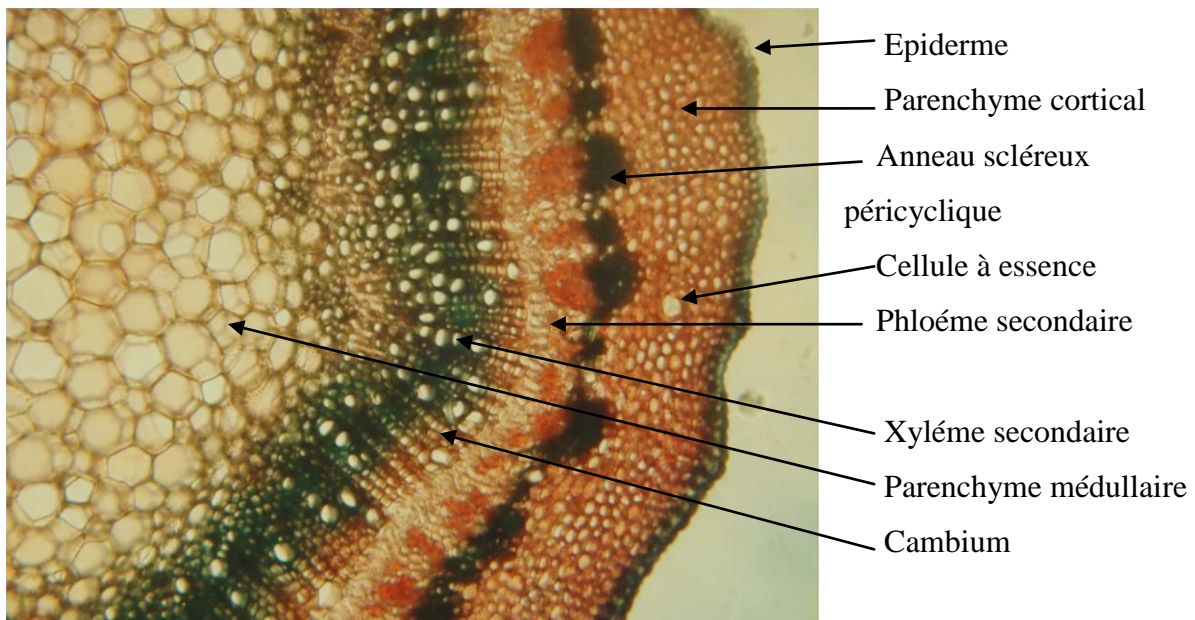


Figure 12: Coupe histologique d'une tige de Laurier noble (X10).

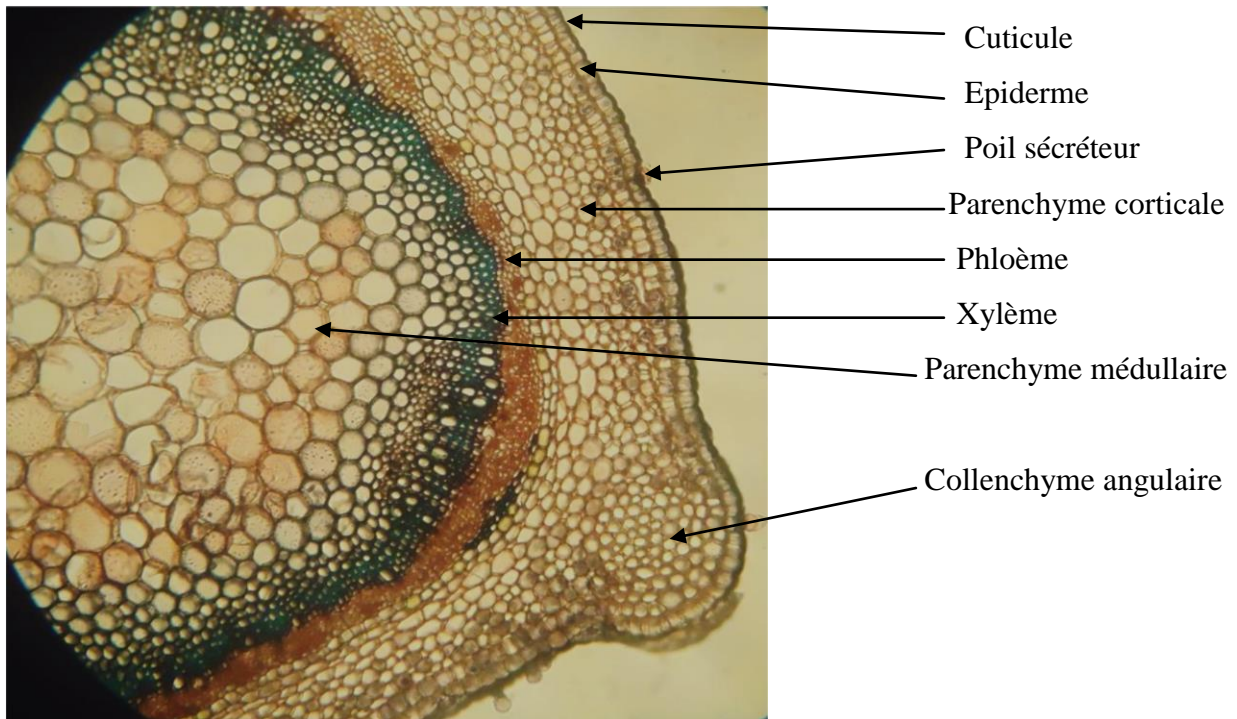


Figure 13: Coupe histologique de la tige du Basilic (X10).

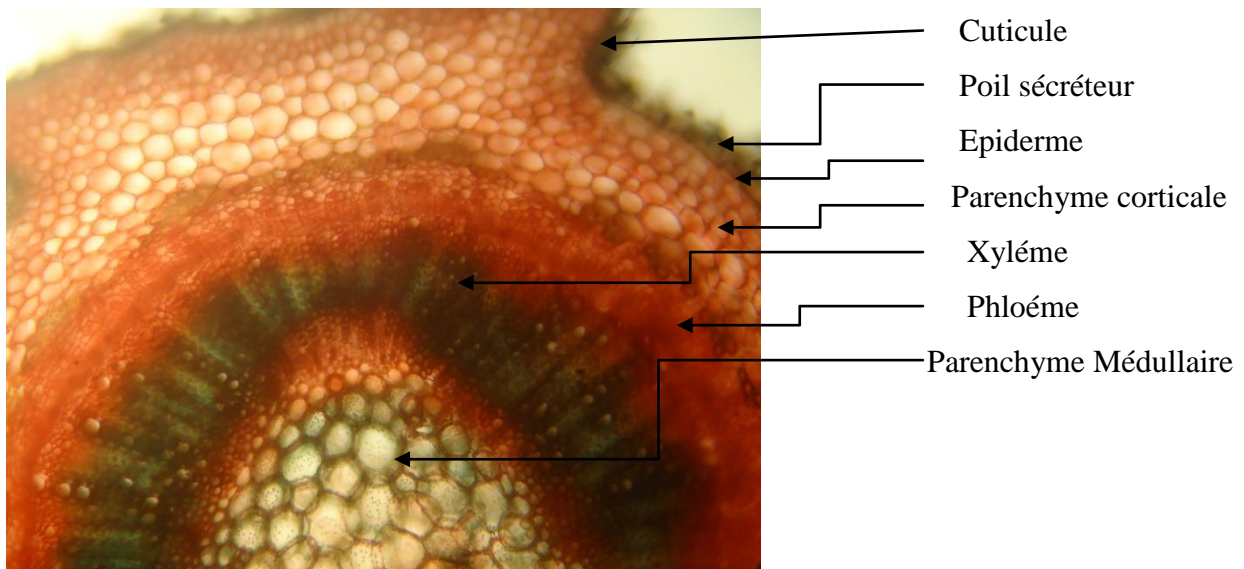


Figure 14: Coupe histologique de la tige du romarin (X10).

Les tiges du laurier, basilic et romarin sont sub-cylindriques, mais les deux dernières présentent quatre angles peu marqués typiques de la famille des lamiacées. Les amas de collenchyme angulaire sous épidermique sont responsables de l'aspect quadrangulaire.

Concernant les feuilles, elles sont du type dicotylédone avec une nervure principale formée essentiellement par un faisceau cribro-vasculaire. Pour le romarin, la structure de la feuille est adaptée à la sécheresse par sa cuticule épaisse sur la face supérieure et sa forme à bord enrôlés vers l'intérieur.

Les coupes transversales montrent de l'extérieur vers l'intérieur les tissus suivants:

Tissu de revêtement : Représenté par l'épiderme dans les trois plantes sur leurs feuilles et sur leurs tiges. Il est constitué d'une seule assise cellulaire recouverte d'une cuticule.

Précédemment citée, la feuille du romarin possède un épiderme inférieur cutinisé avec un feutrage dense de poils tecteurs afin de limiter la perte d'eau par évaporation. Il porte également des stomates qui permettent les échanges gazeux.

Tissu de remplissage : Présent dans toutes les coupes, c'est le parenchyme.

Au niveau des feuilles, le mésophylle des trois plantes est composé d'un parenchyme lacuneux à la face dorsale et un parenchyme palissadique chlorophyllien à la face ventrale (siège des échanges gazeux).

Concernant les tiges, on note la présence du parenchyme cortical sur les trois coupes, délimité par l'épiderme à l'extérieur formé par des cellules à paroi mince et cellulosique, allongées et au centre de la tige on retrouve un parenchyme médullaire.

Tissu de soutien : Formé par le collenchyme qui soutient les faisceaux cribro-vasculaires des nervures dans les feuilles de toutes les coupes. Dans les tiges, le soutien est assuré par des fibres péricycliques essentiellement dans le basilic et le romarin ; par contre chez le laurier, il s'agit d'un anneau scléreux péricyclique hétérogène résultant de l'encastrement des paquets de fibres.

Tissu conducteur : Le système vasculaire est formé par le faisceau libero-ligneux, ce dernier est composé de phloème et de xylème ainsi qu'une structure secondaire (xylème II et phloème II) séparée par le cambium.

Tissu sécréteur : Les plantes de la famille des lamiacées sont caractérisées par les poils sécréteurs qu'on retrouve dans le basilic et le romarin (**Marin et al., 2006 ; Bottega et Corsi, 2000**). Ce sont des trichomes glandulaires capités pouvant synthétiser et contenir l'huile essentielle, elles sont constituées d'une seule cellule basale encreée

dans l'épiderme, d'un cou porteur court unicellulaire ou bicellulaire et d'une large tête sécrétrice constituée d'une ou de huit cellules sécrétrices disposées en rosaces.

La récupération des lors de l'extraction des huiles essentielles se fait par rupture de la cuticule (**Wagner *et al.*, 2004 ; Sharma *et al.*, 2003**).

Chez le laurier, la structure sécrétrice est une cellule à essence localisée dans le parenchyme des deux organes.

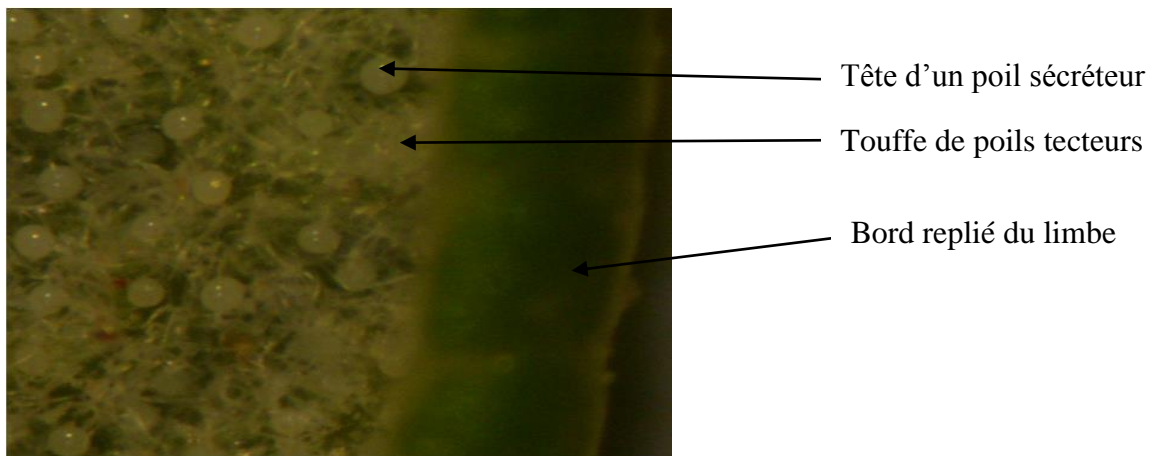


Figure 15 : Face inférieure de la feuille du Romarin (vue au binoculaire).

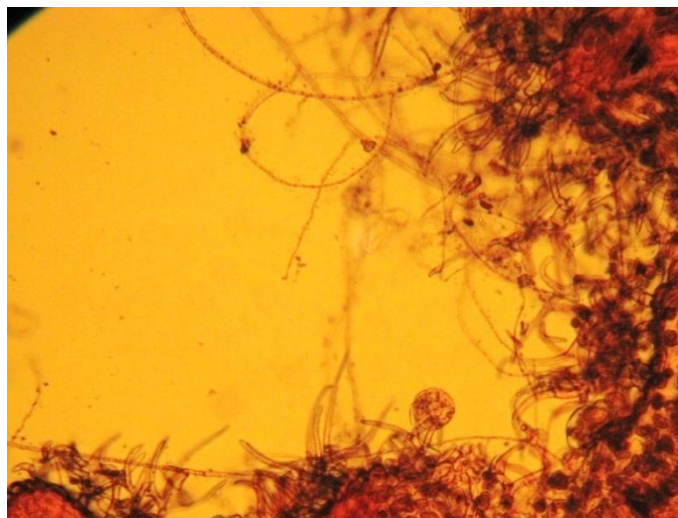


Figure 16: Poils épidermiques (tecteurs et sécréteurs) chez le Romarin.

3.2. Rendements

Les rendements en huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L., *Ocimum basilicum* L. et *Laurus nobilis* L. issues de l'hydrodistillation, ont été estimée respectivement à 0,36%, 0,6% et 0,71%.

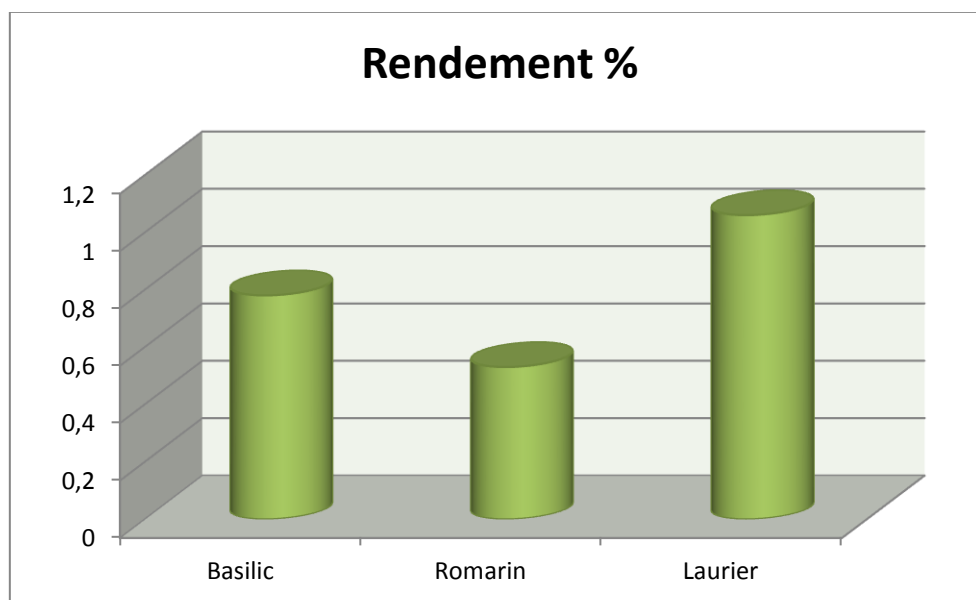


Figure 17: Rendements des Huiles essentielles.

Ces résultats sont inférieurs à ceux signalés dans d'autres régions de l'Algérie. D'après **Djeddi et al. (2007)**, le rendement du romarin d'Alger a été estimé à 0,82%, et celui de Tlemcen à 0,6% d'après **Atik Bekkara et al, (2007)** à 0,6%. La teneur en HE du romarin a été également en dessous de celle du Maroc avec 0.54% (**Derwich et al., 2011**).

Concernant le rendement de l'essence volatile du basilic, **Brada et al. (2011)** ont relevé un rendement de $0.7 \pm 0.1\%$ dans la région d'Ain-Defla. Le laurier provenant de Tlemcen a quant à lui exprimé un taux de 1,2% (**Haddouchi et al., 2009**).

Le faible rendement des HES du romarin et du laurier par rapport à d'autres travaux, peut-être due à la forte humidité qui caractérise la région d'El Kala. Il est connu que les rendements maximaux sont obtenus par temps sec. Par contre le rendement du basilic est dans les normes, car il se développe dans son biotope. La récolte des trois plantes a été effectuée pendant le stade végétatif, ce qui peut aussi expliquer le faible rendement obtenu.

En fait, le rendement en huile essentielle est sous la dépendance de l'origine géographique, le stade phénologique et les facteurs environnementaux tels que la température et la qualité du sol (Bruneton, 1993; Bennadja *et al.*, 2013).

3.3. Composition chimique des huiles essentielles

Les résultats de l'identification des composés chimiques par CPG/SM des HES des 3 plantes de la région d'El Kala sont représentés dans les tableaux 02, 03 et 04.

L'analyse chimique a fait ressortir 34 constituants pour l'huile essentielle d'*O. basilicum*, ce qui correspond à 98,71% du total d'huile de la plante. Elle est constituée majoritairement de monoterpènes dont β -linalol (22,43%), β -myrcène (12,48%), Alpha Terpinéol acétate (10,82%), linalol acétate (9,49%), myrcenol (9,18 %) et 1,8-cinéole sont les principaux composants (figure 18).

En plus, la CPG/SM a permis de recenser 25 composés à partir de l'essence de *R. officinalis* ; dont le bornéol, 1-verbenone, β -linalol, camphre et acétate de bonyle sont les constituants majoritaires représentés avec des pourcentages de 29,54%, 12,41%, 11,14%, 10,45% et 6,28%. Les composants identifiés constituent 98,83% de l'huile (figure 19).

Finalement, 17 substances ont été dénombrées pour l'HE de *L. nobilis*, dominée par la présence de 1,8-cinéole (35.31%), β -linalol (22.52%), eugenol méthylether (9.17%), camphène (7.37%) et 3-carène (5.39%), ce qui représente 96,95% du total (figure 20).

A l'issue de ces résultats, il ressort que les trois HES sont composés de différentes classes terpéniques principalement les hydrocarbures monoterpéniques, également on retrouve les sesquiterpènes, alcools et oxydes.

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

Les composants	Le temps de rétention	Surface du pic	Quantité en %
4-carène	3.622	26194	0.0017
Linalol	4.426	393600	0.0300
β -pinène	4.585	3235797	0.2100
β -Myrcène	4.997	190342071	12.4800
Limonène	5.934	54141107	3.5500
1,8-cinéole	6.332	97938972	6.4200
BOcimène	6.758	12714983	0.8300
α -Terpinolène	7.568	18103844	1.1900
Ocimène	9.543	6234862	0.4100
3- octanol acétate	9.965	43797311	2.8700
β -Linalol	10.405	342512852	22.4300
Ester de linalyl	10.59	6245222	0.4100
β -Terpineol	12.792	6556300	0.4300
Isopinocamphe	13.252	3021165	0.2000
α -Terpinèol	13.466	892873	0.0600
Myrcénol	14.154	140010528	9.1800
Acétate de linalyl	15.353	144823804	9.4900
Nerol	15.933	15649821	1.0300
Trans-geraniol	17.202	55318160	3.6300
Acétate de Bornyle	17.892	1280477	0.0800
α -Terpineol acétate	19.146	165112441	10.8200
Transpinocarpyl acetate	19.741	7890273	0.5200
Geraneol acétate	19.982	44308014	2.900
Asolinène	20.105	16041120	1.0500
Nero I acétate	20.807	89249305	5.8500
α -Bisabolène	21.354	679116	0.0400
α -Caryophyllène	21.622	1426155	0.0900
Bbisabolène	21.741	1471211	0.1000
Germacrène	22.823	21206880	1.3900
Cis jasmone	23.629	2696783	0.1800
Δ -cadinène	23.960	893608	0.0060
Limonène acide	24.261	1642828	0.1100

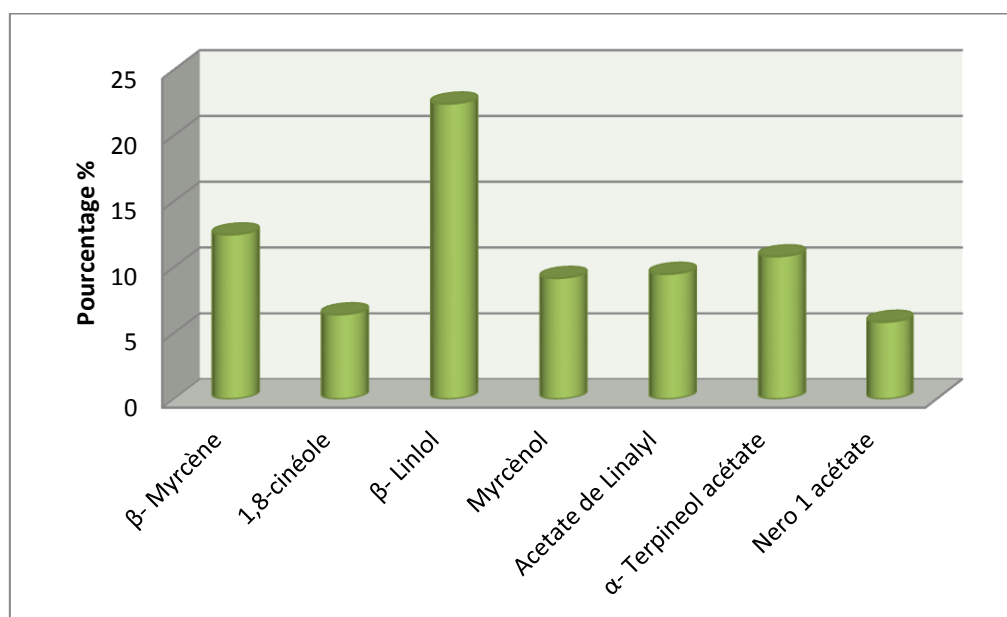
α -Azulene	29.043	10912242	0.7200
Cis geranyl acetone	30.095	957493	0.0060
Total			98.7137

Tableau 03: Composition chimique de l'Huile essentielle du *R. officinalis*.

Les composants	Le temps de rétention	Surface du pic	Quantité en %
α -Pinène	3.493	2431848	3.79
β -Myrcene	4.444	347729	0.54
3-Carène	4.857	665071	1.04
1,8-cinéole	5.198	3737253	5.83
γ -Terpinène	5.946	65073	0.10
Terpineol, cis-.beta.-	6.057	146074	0.23
(+)-4-Carène	6.747	347831	0.54
β -Linalol	6.998	7140776	11.14
Chrysanthenone	7.312	312897	0.49
Camphre	7.843	6697594	10.45
Iso pinocarveol	7.977	218018	0.34
(S)-cis-Verbenol	8.212	2882674	4.50
3-Decyn-2-ol	8.348	35577	0.06
Limonène époxyde	8.596	149211	0.23
Bornéol	8.819	18934943	29.54
1-Terpinène-4-ol	9.276	1054460	1.65
α -Terpinéol	9.683	1846379	2.88
l-Verbenone	9.880	7952559	12.41
1,6-Dihydrocarveol	11.396	2189970	3.42
trans-Géraniol	12.252	106282	0.17
Bergamiol	12.424	780539	1.22
Acétate de Bornyle	13.224	4022148	6.28
(-)-cis-Myrtanyl acétate	16.267	195875	0.31
Isoeugenyl methyl ether	17.425	129683	0.20
Caryophyllène	18.570	902097	1.41
TOTAL			98,77

Tableau 04: Composition chimique de l'Huile essentielle du *L. nobilis*.

Les composants	Le temps de rétention	Surface du pic	Quantité en %
α - pinène	3.663	12748929	0.89640921
3-Carène	4.497	76733841	5.39534904
α -limonène	5.891	43240398	3.04034096
1,8-cinéole	6.285	502269866	35.3158555
γ -terpinène	7.562	14651194	1.03016224
β -Linalol	10.412	320365784	22.5257227
4-terpineol	12.833	29790547	2.09464816
α -terpineol	14.196	45293431	3.18469486
α -terpineolacetate	17.929	4247002	0.29861737
Camphène	19.165	104923164	7.37741112
Isoeugenol	22.17	41769277	2.93690275
Eugenol methyl ether	23.434	130506761	9.17625807
Δ -cadinène	24.007	4574595	0.32165126
α -caryophyllène	24.786	3206549	0.22546051
Isopulegol acetate	25.855	8603251	0.60491618
α -spathulenol	29.137	20397912	1.43422841
α -cadinol	31.79	12296625	0.86460658
TOTAL			96,95

Figure 18 : Pourcentage des composants majoritaires de l'huile essentielle d'*O. basilicum* L.

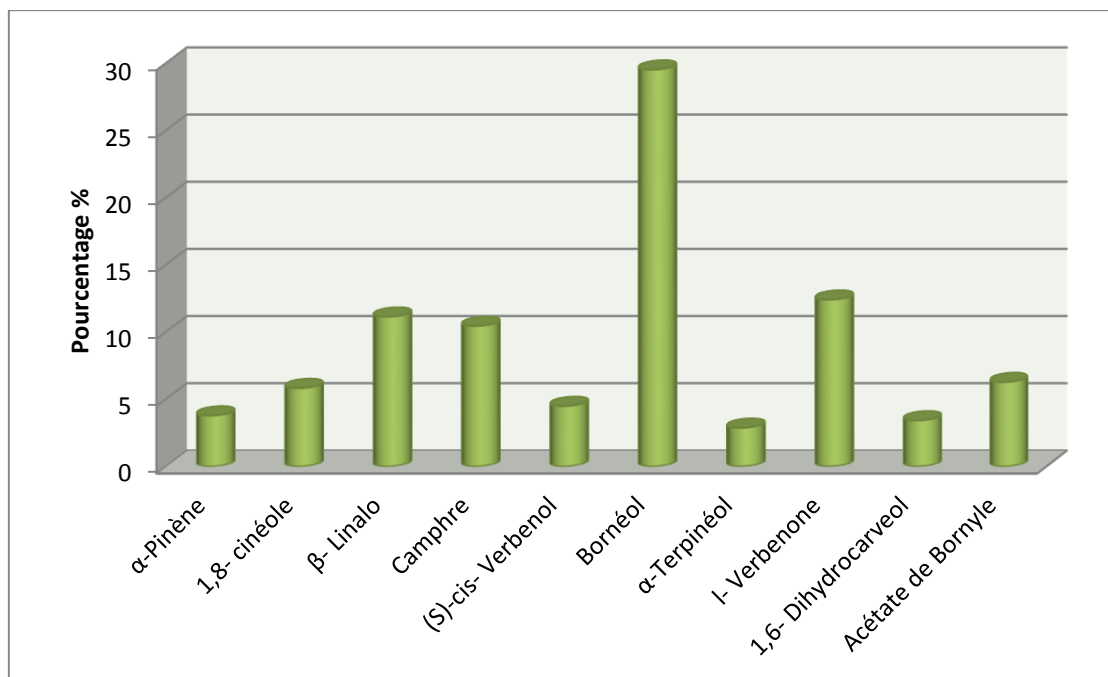


Figure 19 : Pourcentage des composants majoritaires de l'huile essentielle du *R. officinalis* L

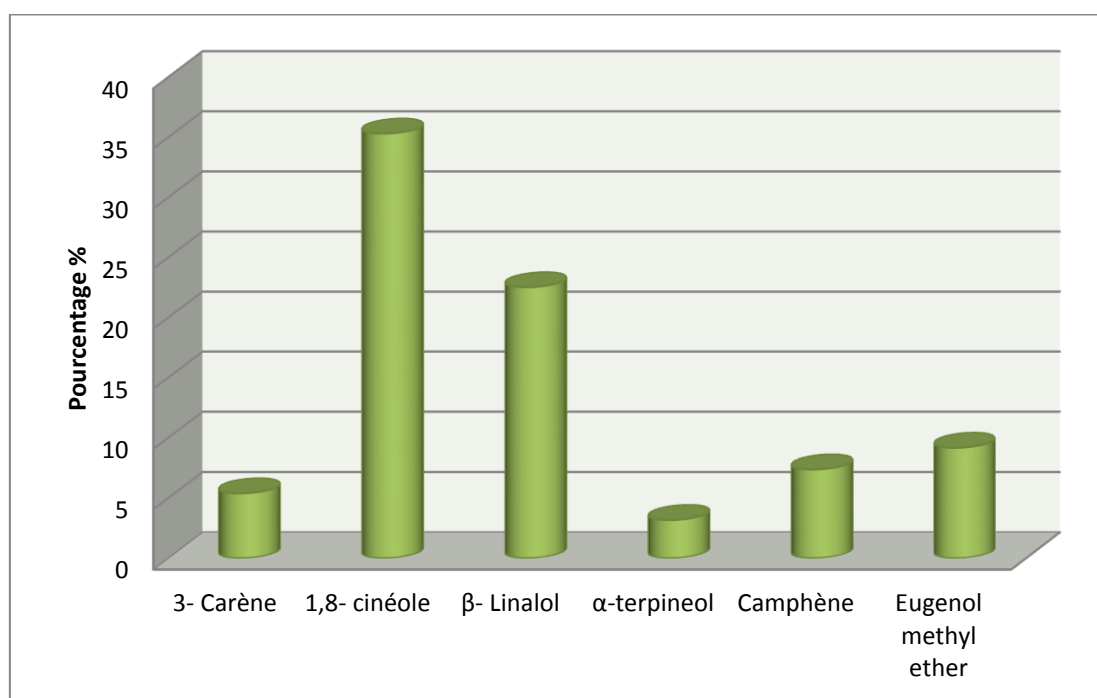


Figure 20 : Pourcentage des composants majoritaires de l'huile essentielle du *L. nobilis* L.

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'existence de multiples chémotypes d'huile essentielle de *R. officinalis* dans différentes régions d'Algérie. D'après les résultats obtenus, la notre s'avère être du type Bornéol/ I-Verbenone car ces deux molécules sont majoritaires dans l'HE.

D'après les résultats obtenus par **Atik Bekkara et al. (2007)**, l'HE du romarin spontané de la région de Tlemcen est caractérisé par la présence de α -pinéne (23,1%) suivi de camphre (15,3%), par contre celle du romarin cultivé est riche en camphre (13,8%) et α -pinéne (12,6%). D'autre part, l'essence volatile d'Alger possède le 1,8 cinéole (52,4%) comme constituant majoritaire (**Boutekedjiret et al., 1998**), de même que celle d'Oued Souf qui est caractérisée par le 1,8 cinéole (29,5%) comme composant principal suivi de 2-éthyl-4,5-diméthylphénol (12,0%), du camphre (11,5%) et le bornéol (9,4%) (**Touafek et al., 2004**). **Benhabiles et Aït Ammar (2001)**, ont étudié les HEs de deux espèces de romarin provenant de l'Est Algérien; dans cette région *Rosmarinus officinalis* s'est avéré du type β -Caryophyllène (13,9 %), camphre (12,1 %) et bornéol (10,1 %).

Dans une étude antérieure, cinq chémotypes d'HE du romarin ont été répertoriés en Algérie (**Lograda et al., 2013**), ce qui explique la grande variabilité des résultats.

Concernant l'huile essentielle d'*O. basilicum* de la région d'El Kala, elle est de chémotype β -linalol. D'après **Telci et al. (2006)**, quatre chémotypes de basilic ont été identifiés :

- Le chémotype européen ayant le linalol comme composant principal (Italie, France, Bulgarie, Egypte et Afrique du Sud).
- Le chémotype tropicale, riche en cinnamate de méthyle (Inde, Pakistan et Guatemala).
- Le chémotype de la Réunion possédant le méthyl chavicol comme constituant majoritaire (Madagascar, Thaïlande, et Vietnam) (**Vernin et Metzger, 1984; Simon et al, 1999**).
- Le chémotype eugénol d'Afrique du Nord et de la Russie (**Vernin et Metzger, 1984**).

Hadj Kelifa et ses collaborateurs (2012), ont également identifié le linalol comme composant principal avec un taux de 32,83% suivi d'acétate de linalyle 16%), lors d'une étude sur l'huile essentielle du basilic issu de la région de Khemis Miliana. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par **Brada et al. (2011)** sur l'HE du basilic

de la région de Chlef. Ainsi il ressort que l'HE du basilic de différentes régions d'Algérie est de chémotype européen.

On notera également, que les monoterpènes oxygénés constituent le groupe chimique majoritaire dans cette HE, suivi d'hydrocarbures monoterpènes et d'autres classes chimiques.

Nos résultats concernant le profil chimique de l'huile de *L. nobilis*. Concordent avec plusieurs investigations qui dénotent la forte teneur de cette huile essentielle en 1,8-cinéole. Les monoterpènes les plus prédominants dans l'huile volatile du laurier, sont le β -linalol (22,52%) et le camphène (7,37%). La classe des sesquiterpènes est principalement représentée par les lactones sesquiterpènes notamment le Cardinène (0,32%) et le caryophyllènes (0,22%).

Mediouni Ben Jemâa et al. (2012), ont démontré que les principaux composés communs de trois HEs de lauriers provenant de l'Algérie, de la Tunisie et du Maroc sont le 1,8-cinéole, le linalol et l'isovaléraldéhyde. **Marzouki et al. (2009)** ont également rapportés que les HEs de *L. nobilis* cultivé en Tunisie et en Algérie n'ont pas révélé de différences dans leur composition chimique. Les deux huiles contiennent les principaux constituants dans des proportions variables. Le 1,8-cinéole représente 31,0% de l'huile dans les échantillons tunisiens et seulement 17,0% dans l'huile algérienne. En outre, **Ozcan et Chalchat (2005)** soulignent que la variation quantitative et qualitative des huiles essentielles de *L. nobilis* concerne principalement les composés mineurs.

Les variations observées dans la composition chimique des HEs testées sont certes dus à des facteurs génétiques, mais également à des facteurs géographiques, bioclimatiques ainsi qu'aux conditions de récolte et de stockage de la plante (**Hussain et al., 2008; Anwar et al., 2009**).

CHAPITRE III: Activité antioxydante

1. Introduction

La détérioration des denrées alimentaires constitue une préoccupation de santé publique. En effet, lors du traitement de la matière première, et du stockage du produit fini; une peroxydation lipidiques peut survenir sous l'action des radicaux libres oxygénée (EOR). Dans l'organisme, ces EOR en faibles concentrations jouent un rôle dans de multiples mécanismes physiologiques, elles peuvent être considérées comme des messagers secondaires importants impliqués dans l'activation de diverses voies de signalisation intracellulaires. Cependant, une surproduction des EOR provoque une toxicité à l'origine de diverses pathologies (**Meziti, 2009**).

Les espèces oxygénées réactives (EOR) englobent les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote, *etc...*) mais également certains dérivés réactifs non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène et le peroxydinitrite (**Bartosz, 2003 ; Haton, 2005**). Les EOR sont des espèces chimiques, possédant un ou plusieurs électron(s) libre(s) non apparié(s) sur leurs couches externes (**Gueye, 2007**). Cet état leur octroie une instabilité énergétique et cinétique, ce qui les rend extrêmement réactifs (**Dacosta, 2003**). Leur hyperréactivité, les entraîne à appairer leurs électrons célibataires en attaquant toute molécule susceptible de se faire extirper un électron (**Lehucher-Michel et al., 2001**) ; et acquérir enfin une stabilité. La molécule dépouillée de son électron devient à son tour un radical libre (**Kocchilin-Ramonatxo, 2006**), entraînant une réaction en chaîne générant de nouvelles espèces chimiques radicalaires (**Curtay et Robin, 2000**).

Dans l'organisme les EOR cibleraient différentes biomolécules causant des dégâts cellulaires ainsi que tissulaires souvent irréversibles (tableau 05).

Tableau 05 : Atteintes engendrées par les ERO.

Biomolécules	Constituants cibles	Conséquences
PROTEINE	Acides aminés (liaison peptidique et chaîne latérale)	<ul style="list-style-type: none"> - Morcellement de la chaîne (Berlett et Stadtman, 1997). - Production des groupements d'hydroxyles et carbonyles suite à une oxydation des acides aminés. - Vulnérabilité aux protéases et dégradation protéolytique au niveau du protéasome (Lehucher-Michel et al., 2001 ; Valko et al., 2007, Jung et al., 2007). - Perturbation et inactivation enzymatique.
ACIDE NUCLEIQUE (ADN)	Bases puriques Base pyrimidiques Désoxyribose	<ul style="list-style-type: none"> - Cassure des brins. - Convection des bases. Ex : Guanine est transformée en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OHdG) qui est éliminé par les enzymes de réparation. - Altération des enzymes de réplication, de réparation et du matériel génomique ; qui peuvent être des facteurs de risque dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (Lehucher-Michel et al., 2001 ; Favier, 2003 ; Valko et al., 2006).
LIPIDE	Acide gras polyinsaturés (AGPI)	<ul style="list-style-type: none"> - Peroxydation lipidique membranaire. - Libération de lipoperoxydes et aldehydes instables (membranes) également du matériel à partir du compartiment subcellulaire - Diminution de la fluidité membranaire. - Perturbation enzymatique et des récepteurs de la membrane. - Dysfonctionnement et altération cellulaire. (Beckman et Ames, 1998 ; Lehucher-Michel, 2001, Favier, 2003).

Le stress oxydatif engendré par L'accumulation des EOR et le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites, est le déclencheur de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose, les atteintes hépatiques, les maladies pulmonaires, les affections rénales, le diabète et le vieillissement (**Favier, 2003**).

Afin d'inhiber la production des EOR et les neutraliser, on a recours aux antioxydants. Les antioxydants synthétiques sont couramment utilisés dans l'industrie alimentaire comme additifs pour retarder l'oxydation lipidique. En raison des risques toxicologiques potentiels de ces molécules antioxydantes (tels que le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT)), leurs utilisations sont remises en cause et des recherches d'alternatives naturelles sont effectuées (**Amarowicz *et al.*, 2000**).

Les substances naturelles telles que les huiles essentielles, constituent une source de molécules actives largement étudiées pour leurs vertus antimicrobiennes, insecticides, antifongiques (**Faleiro *et al.*, 1999**). D'où leurs intérêts socioéconomiques.

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante d'un composé.

Dans ce chapitre, les huiles essentielles de trois plantes de la région d'EL KALA (*L. nobilis*, *R. officinalis* et *O. basilicum*) ont fait l'objet d'une évaluation *in vitro* de leur capacité antioxydante à travers trois méthodes :

- Test du piégeage du radical libre DPPH.

- Test de blanchiment de β -carotène.

- Réduction du fer.

2. Matériel et méthodes

La mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* des huiles essentielles des trois plantes testées a été réalisée par trois méthodes: le piégeage du radical libre DPPH, le test de blanchiment de β -carotène et la réduction du fer.

2.1. Effet scavenger du radical DPPH

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 williams, 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.

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

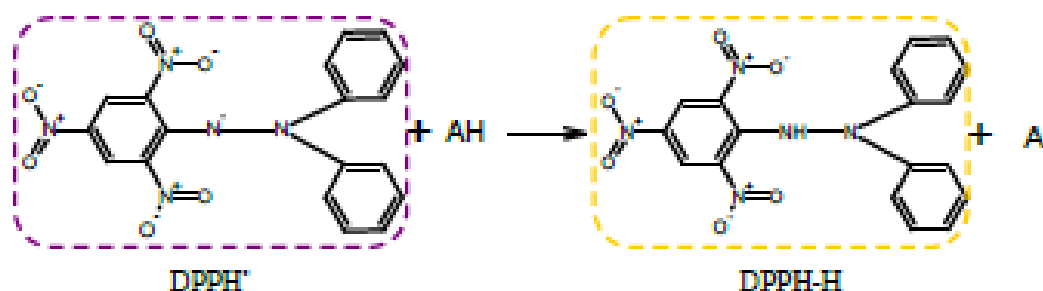


Figure 21: Mécanisme réactionnel du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH) (Michel, 2011).

➤ **Mode opératoire :**

Le pouvoir antiradicalaire a été testé en employant la méthode dictée par **Brand- Williams *et al.* (1995)**.

La solution de DPPH a été préparée par la solubilisation de 2,4mg de DPPH dans 100ml de méthanol (elle ne se conserve pas plus de 4-5jours à -5C° et à l'obscurité). Un volume de 100µl d'huiles essentielles (à différentes concentrations) a été ajouté à 2ml de la solution de DPPH. Le mélange réactionnel a été agité vigoureusement et incubé 30 min à l'obscurité. Les absorbances ont été mesurées à 517nm contre le blanc (solution DPPH/méthanol).

Le BHT a été utilisé comme antioxydant synthétique de référence.

La capacité de l'antioxydant à piéger le radical libre est estimée en pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. Le pourcentage d'activité antioxydante a été déterminé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Activité antioxydante} = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 517nm.

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.

2.2. Test du blanchissement du β -carotène

L'activité antioxydante a été déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

En effet, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes suite à l'abstraction des atomes d'hydrogène à partir de groupements méthylènes. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm (**Shon *et al.*, 2003**). Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (**Deba, 2008**).

➤ **Mode opératoire**

La capacité antioxydante a été déterminée par la méthode détaillée par **Kartal et al., 2007**. L'émulsion de β -carotène/acide linoléique a été préparée par solubilisation de 0,5mg de β -carotène dans 1ml du chloroforme. 25 μ l d'acide linoléique et 200mg de Tween 40 ont été additionnés, le chloroforme a été complètement évaporé au rotavapor, par la suite 100ml d'eau distillée saturée en oxygène (H_2O_2) ont été ajoutés. L'émulsion résultante a été agitée vigoureusement. 350 μ L d'huile ou d'antioxydant de référence (BHT) solubilisé dans du méthanol (1 mg/ml) ont été additionnés à 2,5ml de la solution précédente.

Un autre tube a été aussi préparé dans les mêmes conditions, sans antioxydant (contrôle négatif) où l'échantillon est remplacé par 350 μ l de méthanol.

La cinétique de l'activité a été suivie à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures. L'activité antioxydante relative des extraits (AAR) a été calculée selon l'équation suivante (**Tepe et al., 2006**) :

$$\text{AAR} = \text{Abs}_{t=48h}(\text{échantillon}) / \text{Abs}_{t=48h}(\text{BHT}) \times 100.$$

AAR: Activité anti-oxydante relative.

Abs (Echantillon) : Absorbance de l'échantillon après 48 heures.

Abs (BHT) : Absorbance de BHT après 48 heures.

2.3. Pouvoir réducteur (PR)

Le pouvoir réducteur a été déterminé selon la méthode d'**Oyaizu (1986)**, elle est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}). Cette réaction se manifeste par l'apparition d'une coloration verte dont l'intensité est proportionnelle au potentiel réducteur.

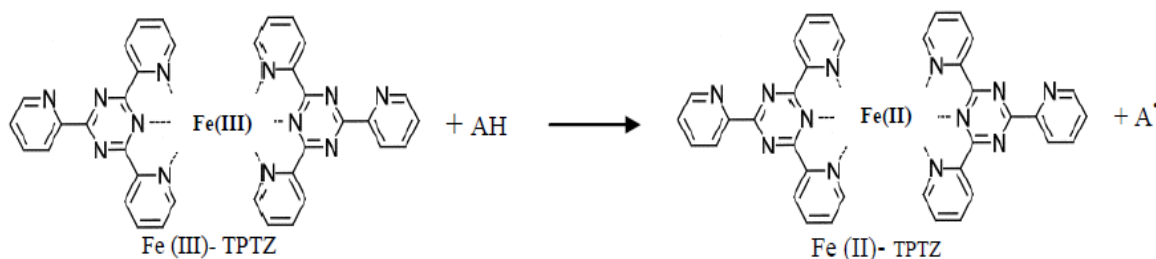


Figure 22: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant (AH) (Djahra, 2013).

➤ Mode opératoire

Les huiles essentielles diluées dans du méthanol (0,5ml) ont été mélangées avec 1,25ml de la solution tampon phosphate (0,2M, pH 6,6) et 1,25ml de ferricyanure de potassium ((K₃Fe (CN)₆) à 1%). L'ensemble a été incubé à 50° C pendant 20 min. Ensuite, 1,25ml d'acide trichloroacétique (TCA) (10%) a été additionné au mélange, le tout centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm. L'eau distillée (1,25ml) et le chlorure ferrique (FeCl₃) (250µl à 0,1%) ont été ajoutés à 1,25ml du surnageant. L'absorbance a été mesurée à 700 nm contre un blanc. L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif et dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

Pour toute l'expérimentation, chaque test est réalisé en triplicata et les résultats ont été calculés par la moyenne des trois essais.

3. Résultats

3.1. Effet scavenger du radical DPPH

Le DPPH est un radical libre nous permettant de déterminer le potentiel de piégeage de nos huiles essentielles grâce à sa sensibilité à détecter les composants actifs à des basses concentrations (Yi *et al*, 2008). L'activité antiradicalaire a été estimée spectrophotométriquement en suivant la réduction du DPPH à 517nm (Maisuthiaskul, 2007).

Les figures 23 et 24 illustrent l'efficacité des huiles essentielles et du BHT à piéger le radical DPPH, traduite par le taux d'inhibition (I%) en fonction des différentes concentrations. D'après les résultats, l'évolution de l'activité antiradicalaire est dose-dépendante, car elle augmente avec l'augmentation des concentrations des huiles essentielles dans le milieu réactionnel.

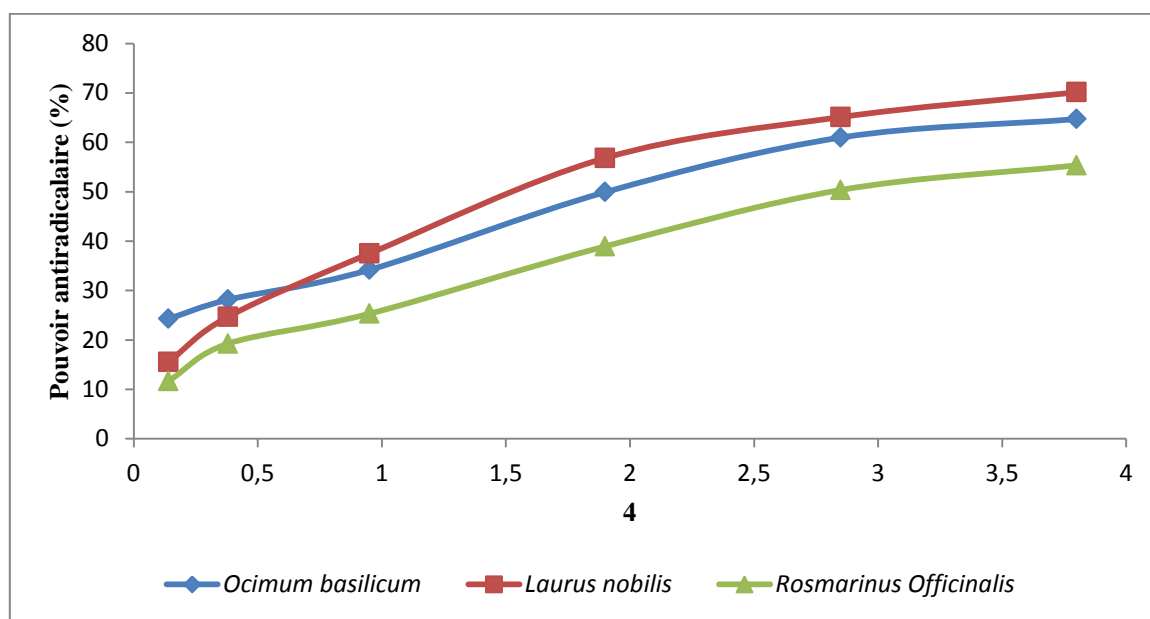


Figure 23: Activité antiradicalaire des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L., *Laurus nobilis* L., *Ocimum Basilicum* L. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD)

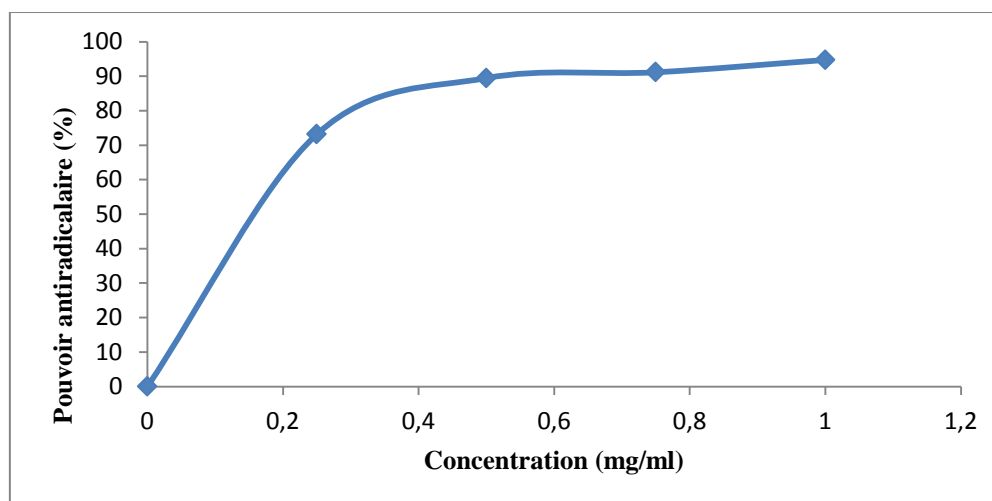


Figure 24: Activité antiradicalaire du BHT
(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD)

Tableau 06: IC50 des huiles essentielles et du BHT

	IC 50 (mg/ml)
BHT	0,17 \pm 0,02
H.E L	1,55 \pm 0,14
HEB	2,0 \pm 0,04
HER	3,09 \pm 0,72

Le pourcentage d'inhibition augmente graduellement ou progressivement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'enrayement presque total du DPPH• présent dans le milieu.

A partir des courbes des taux d'inhibition, nous avons pu déduire graphiquement les valeurs d'IC50 du BHT et des HES; représentées dans le tableau 06. La valeur de L'IC50 est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante (taux d'inhibition I%) d'un composé, car elle reflète la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu. Plus la valeur d'IC50 est faible, plus l'activité antiradicalaire d'un composé est appréciable.

Le potentiel antiradicalaire global des huiles essentielles testées a été inférieur à celui du BHT dont l'IC₅₀ est de $0,17 \pm 0,02$ mg/ml. Parmi ces trois HEs, Le *Laurus nobilis* arrive en tête des résultats avec un IC₅₀ égal à $1,55 \pm 0,02$ mg/ml, suivie d'*Ocimum basilicum* avec une valeur de $2,0 \pm 0,04$ mg/ml et finalement *R. officinalis* qui semble être la moins performante avec un IC₅₀ de $3,09 \pm 0,72$ mg/ml.

3.2. Test du blanchissement du β -carotène

La cinétique de la décoloration du β -carotène, en présence des trois huiles et du BHT, ainsi que le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique (AAR) sont regroupés dans la figure 25 et le tableau 07. La capacité d'HE à ralentir la vitesse de l'oxydation des lipides est indiquée par l'abaissement de l'absorbance dans le temps représenté dans la figure 25.

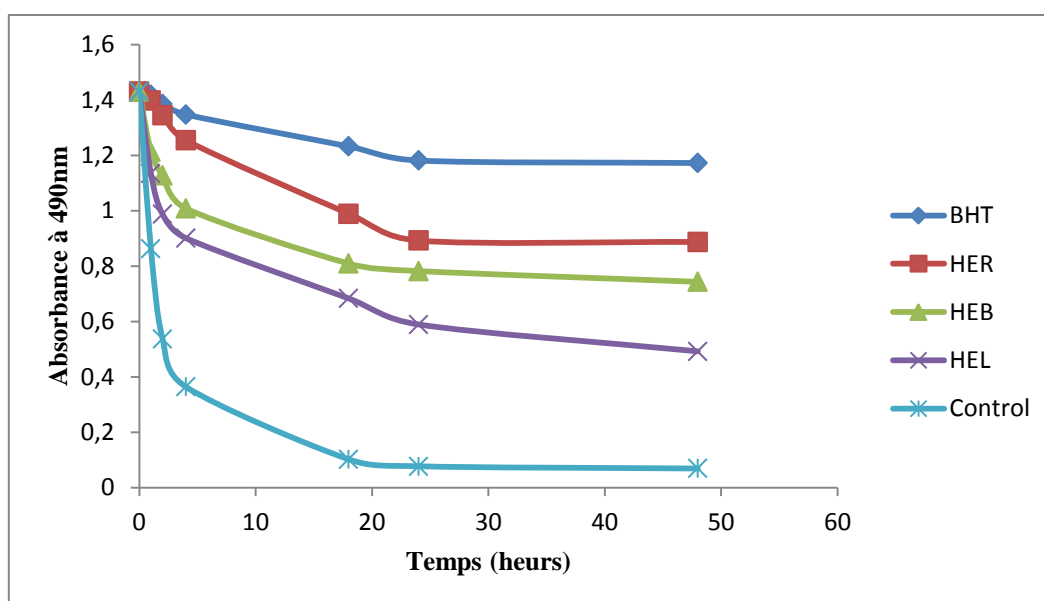


Figure 25: Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des huiles essentielles et du BHT. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

Tableau 07 : Les valeurs d'AAR.

	AAR%
HER	75,68
HEB	63,39
HEL	41,97

D'après les courbes de cinétique de blanchissement du β -carotène obtenues (figure 25), on constate l'action des HEs et du BHT contre l'oxydation du β -carotène par les radicaux peroxydes, en comparaison avec le contrôle négatif. Selon les résultats, l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* a manifesté la plus forte aptitude à inhiber la formation des radicaux par l'acide linoléique avec un pourcentage d'inhibition égal à 75,68%, suivie de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* dont le taux est de 63,39%.

L'HE du *Laurus nobilis* a manifesté une activité antioxydante modeste par rapport aux deux autres plantes testées avec un taux de 41,97%.

3.3. Pouvoir réducteur

Les résultats de l'activité réductrice des huiles essentielles et de l'acide ascorbique sont représentés dans la figure 26.

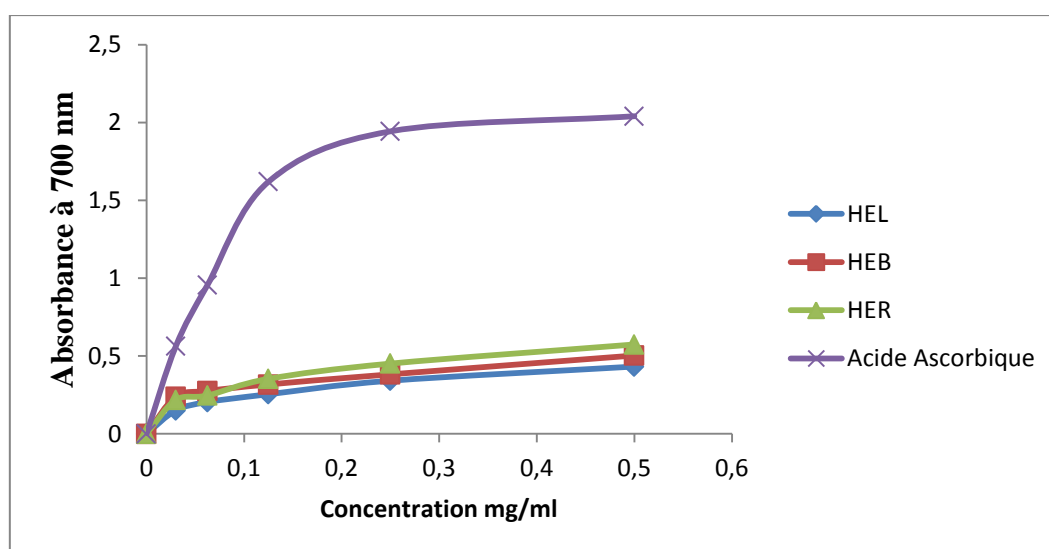


Figure 26: Pouvoir réducteur des huiles essentielles des plantes étudiées et de l'acide ascorbique. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

Les absorbances du pouvoir réducteur des huiles essentielles des trois plantes testées (laurier, basilic et romarin) se sont respectivement élevées à 0,432, 0,503 et 0,574 à la concentration 0,5 mg/ml respectivement (figure 18). Ainsi, on constate que l'HE de *R. officinalis* possède une activité réductrice supérieure aux HEs d'*O. basilicum* et *L. nobilis*, néanmoins, faible par rapport à l'acide ascorbique qui s'est élevé à 1,94 à 0,25mg/ml.

4. Discussion

Le pouvoir antioxydant des composés peut être estimé soit *in vivo*, sur des organismes vivants, soit *in vitro*, en utilisant des tests qui miment les phénomènes physiologiques. Vu que les antioxydants agissent par divers mécanismes afin de prévenir ou limiter les dommages occasionnés par des EOR, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes (radicaux libres, complexes métalliques oxydés) avec un échantillon qui contient des antioxydants capables de neutraliser la formation des radicaux. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs (**Prior et al., 2005**) : soit par transfert d'atome d'hydrogène, soit par transfert d'électron. Les méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène mesurent la capacité globale d'un antioxydant à réprimer les radicaux libres par donation d'un atome d'hydrogène, alors que les méthodes basées sur le transfert d'électron mesurent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron qui réduira n'importe quel composé, incluant les métaux, les carbonyles et les radicaux (**Michel, 2011**).

Dans la présente étude, trois méthodes complémentaires ont été utilisées afin de témoigner de l'activité anti-oxydante des huiles essentielles de notre région : le piégeage du radical libre DPPH, la réduction du fer et le test de blanchiment du β -carotène.

Nos résultats rejoignent ceux de **Gachkar et al., (2007)** qui attestent de la mauvaise performance de l'huile essentielle du romarin. **Wang et ses collaborateurs** ont constaté quant à eux l'efficacité antiradicalaire de celle-ci avec un taux d'inhibition de $62,45\% \pm 3,42\%$, (cette valeur reste tout de même inférieure à celle de l'acide ascorbique qui est de $86,93\% \pm 3,21\%$). Ces derniers résultats, rejoignent ceux de **kadri et al., (2011)** qui ont trouvé un IC50 égal à $110,20 \mu\text{g/ml}$, ce qui est trois fois supérieur à celui du BHT, l'antioxydant synthétique dont l'IC50 est de $40,5 \mu\text{g/ml}$.

Egalement, l'HE d'*Ocimum basilicum* a fait l'objet de nombreux travaux dont les résultats sont variables. Les travaux d'**Ijaz Hussain et al., (2008)**, sur les HEs d'*Ocimum basilicum* à différentes périodes de l'année, démontrent que les HEs 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'IC50 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 HEs ainsi que sur leurs activités biologiques.

Une autre étude a montré une similitude des IC50 entre HEs 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**). Malgré le fait que l'HE d'*O. basilicum* de la région d'El Kala possède une capacité de réduction du DPPH, celle-ci reste inférieure à celles rapportées dans la littérature.

Concernant *Laurus nobilis*, peu de travaux se sont penchés sur l'activité antioxydante de ses HEs. D'après les résultats, l'HE du laurier a généré le plus fort potentiel antiradicalaire comparé aux deux autres HEs. Les bons résultats qu'a présenté le laurier sont compatibles avec ceux trouvés par **Kang et al, 2002** et **Simic et al, 2003**.

Outre l'activité antiradicalaire, le pouvoir anti-péroxydation lipidique des HEs a été évalué par la méthode de blanchissement du β -carotène. Une des réactions les plus importantes de la peroxydation lipidique est l'auto-oxydation des acides gras insaturés, incriminée dans de nombreuses atteintes cellulaires (**Santoyo et al, 2006**).

D'après nos résultats, l'HE de *Rosmarinus officinalis* possède une activité antiradicalaire faible. Cependant, il s'est avéré être un bon inhibiteur de l'oxydation de l'acide linoléique. Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres travaux. À titre d'exemple, ceux de **Gachkar et al, (2007)** dont l'aptitude du romarin à réduire l'oxydation de l'acide linoléique est meilleure que son potentiel antiradicalaire. Une autre étude a prouvé que les composants de *R. officinalis* ont une capacité à inhiber les inducteurs de la peroxydation lipidique dans les microsomes hépatiques (**Aruma et al., 1992**). Il a été aussi rapporté que les hépatocytes isolets, les extraits aqueux de *R. officinalis* ont un impact sur la réduction de tert-butylhydroperoxyde (TBHP) résultant de la peroxydation lipidique (**Joyeux et al., 1990**).

L'*O. basilicum*, a présenté une bonne activité antioxydante dans différentes régions. Les deux études de **Singh et Marimuthu (2006)** et **Ijaz Hussain et al, (2007)**, ont démontrés l'efficacité d'*O. basilicum* à inhiber la dégradation du β -carotène.

Contrairement au test de DPPH, l'HE de *L. nobilis* s'est avéré moins efficace dans le test de blanchissement du β -carotène. **Ozcan et ses collaborateurs (2010)**, ont trouvé que le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique était de 64,28%, nettement supérieur au 1% à celui de la région d'El Kala.

Hinneburg et al, (2006) ont également observé qu'un gramme d'extrait de *L. nobilis* était aussi efficace que 212mg de Trolox dans la prévention de la peroxydation lipidique.

Le troisième test utilisé consiste à déterminer la capacité des HE à apporter des électrons. Les propriétés de réduction d'antioxydants sont généralement associées à la présence de réductones, tels que l'acide ascorbique (**Duh et al., 1999**). Ainsi, les antioxydants réducteurs déclenchent la transformation de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ fournissant des électrons. Les trois huiles essentielles ont montré une activité réductrice modérée et nettement inférieure à l'acide ascorbique.

D'une manière générale, les huiles essentielles testées issu de la région d'El Kala ont manifesté un potentiel antioxydant modeste en employant les trois méthodes.

L'activité antioxydante est attribuée à la composition chimique des huiles essentielles. Cependant, elle peut être due à l'un des constituants majoritaires ou à d'autres constituants minoritaires ou également à une synergie entre eux (**Wang et al., 2008**).

Nos trois HEs contiennent des monoterpènes à des taux assez élevés. Dans une étude antérieure, les huiles avec une prédominance monoterpénique ont montré une activité assez modeste (**Gachkar et al., 2007**). En contradiction avec les travaux de **Tepe et al, (2004)**, où ils ont démontré une grande activité antioxydante des huiles essentielles contenant des monoterpènes et / ou des sesquiterpènes oxygénés. Ainsi une corrélation existe entre l'activité antioxydante des essences et la teneur de monoterpènes oxygénés (**Miladi et al., 2013**).

Concernant l'HE de *L. nobilis*, **Ruberto et Barata, (2000)** ont attribué son modeste potentiel antioxydant à la présence de monoterpènes oxygénés dont le 1,8-cinéole, ce dernier a été considéré comme un faible antioxydant avec un IC50 assez élevé 9,360mg/ml.

Par contre le linalol, jouit d'un pouvoir antioxydant appréciable (**Aazza et al., 2011**). Cette observation contredit l'étude menée par **Ruberto et Barata, (2000)** où ils ont affirmé que le linalol n'avait pas d'activité et ont compté ce composé comme un pro-oxydant. Cependant, la présence de linalol dans l'HE du basilic avec un taux de 22,43% n'interfère pas négativement sur la capacité d'HE.

CHAPITRE IV: Activité antibactérienne

1. Introduction :

La thérapie des maladies infectieuses se base principalement sur l'usage des antibiotiques. Leur prescription à volonté est souvent inappropriée surtout quand il s'agit d'infections virales. L'emploi abusif et le non respect des doses ont entraîné l'apparition de souches résistantes rendant les traitements inefficaces. A cet effet, il est nécessaire d'orienter les recherches vers de nouvelles voies thérapeutiques et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments à partir de produits du métabolisme secondaire tel que les huiles essentielles, produites comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques, ces substances aromatisantes et parfumantes possèdent de nombreuses vertus ce qui justifie leur utilisation dans de nombreux domaines comme la parfumerie, l'industrie alimentaire, le cosmétique voir même comme agents antimicrobiens en médecine populaire. Signalons par ailleurs que de nombreux travaux récents ont mis en évidence, *in vitro*, l'activité antimicrobienne de certaines huiles essentielles ce qui a donné un grand intérêt et essor à l'aromathérapie et en industrie alimentaire (**Hammer et al., 1999; Cassella et al., 2002**).

Depuis la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1929, jusqu'à nos jours les antibiotiques sont utilisés massivement contre les infections bactériennes. En raison de cette utilisation excessive, une résistance bactérienne s'est développée contre la majorité des antibiotiques (**Gopal Rao, 1999**). Staphylocoque doré résistant à la méthicilline (MRSA), les entérocoques résistant à la vancomycine et des souches résistantes de *Pseudomonas* sont des exemples de bactéries multirésistantes qui deviennent un véritable problème de santé publique. Les MRSA sont probablement les bactéries résistantes les plus communs trouvés dans les hôpitaux, responsable d'infection nosocomiale (**Grundmann et al., 2006**).

Outre la résistance aux antibiotiques, ces derniers peuvent être à l'origine d'effets néfastes sur les patients tels qu'une hypersensibilité, une immunosuppression, des réactions allergiques. Par conséquent, le développement du traitement alternatif semble être nécessaire d'où l'intérêt croissant aux pouvoirs antimicrobiens des substances biologiquement actives issues des plantes aromatiques.

Des travaux récents ont mis en évidence l'emploi des huiles essentielles comme additifs pour la sécurité et la préservation de denrées alimentaires (**Burt, 2004; Dorman et Deans, 2000; Fisher et Phillips, 2008**).

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre est d'évaluer l'activité antibactérienne des trois huiles essentielles sur une vingtaine de souches bactériennes ; et ce par deux méthodes : qualitativement par la méthode de diffusion sur gélose, et quantitativement par la méthode de dilution en milieu solide qui vise à déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

2. Matériel et méthodes :

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Laurus nobilis L.*, *Rosmarinus officinalis L.* et *Ocimum basilicum L.* a été évaluée par deux méthodes :

- La méthode de diffusion en milieu solide.
- La méthode de dilution en milieu solide (incorporation). qui permet la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentration des huiles dans le milieu de culture.

Cette étude a été accomplie au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté de Médecine d' Annaba.

➤ **Choix des souches :**

Les souches ont été aimablement fournies par le laboratoire de microbiologie de la faculté de Médecine d'Annaba. On a essayé d'élargir la gamme de bactéries testées : à Gram positifs et à Gram négatif:

❖ **Bactérie à GRAM-:**

Enterobacteriaceae : *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella OMA 04*, *Citrobacter Freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Kpc⁺*, *Kpc⁻*, *Providencia alcalifaciens*, *Salmonella sp.*, *Serratia marcescens*, *Shigella sp*, *Proteus mirabilis*.

Pseudomonadaceae : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa*.

Moraxellaceae : *Acinetobacter baumannii*.

❖ Bactérie à GRAM + :

Enterococcaceae : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Micrococaceae : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, M.R.S.A ATCC 43300.

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis*.

➤ Milieux de culture :

Selon les méthodes employées, nous avons utilisé les milieux de cultures suivants:

- Gélose Nutritive : Milieu d'isolement et de conservation non sélectif.
- Gélose Mueller Hinton.

➤ Conservation des souches :

Les souches bactériennes ont été conservées à 5C° dans des tubes stériles contenant 10ml de gélose nutritive incliné.

➤ Préparation de l'inoculum :**• Préparation de la préculture :**

L'activité antibactérienne doit être réalisée sur des souches bactériennes jeunes en phase de croissance exponentielle. La réactivation des cultures est effectuée par repiquage à la surface de la gélose nutritive pré coulée en de Petri ensuite incubée à 37C° pendant 18 à 24h.

• Préparation de la suspension bactérienne :

Dans de l'eau physiologique stérile, 3 à 5 colonies similaires bien isolées sont déchargées. Après homogénéisation de la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex, la standardisation à 10⁶ UFC/ml a été réalisée par spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620nm. La *Do* obtenu doit être comprise entre 0,08 et 0,1 ce qui correspond à une concentration de 10⁷ à 10⁸ UFC/ml selon Mc Ferland.

2.1. Activité antibactérienne (Aromatogramme):

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Aromatogramme), méthode décrite par **Vincent (1991)** et revu par **Djahoudi**. 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 à Pétri, avec la création d'un gradient de concentration entre le composé et le microorganisme cible.

L'apparition et l'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflète l'impact des HEs sur les souches bactériennes. Ainsi, ces dernières seront qualifiées de sensibles ou très sensibles, ou résistantes.

➤ **Préparation des dilutions de l'huile essentielle :**

Une série de dilution d'HE a été réalisée allant de 1/2 à 1/8 avec un solvant organique (Dimethyl sulfoxyde (DMSO)). On a opté pour le DMSO pour son innocuité vis-à-vis des microorganismes, et pour l'absence d'interférence avec l'HE.

➤ **Ensemencement :**

Dans des boîtes de Pétri, le milieu de culture gélosé Mueller Hinton en surfusion a été coulé aseptiquement à raison de 15ml par boîte. Après la solidification, un écouvillon stérile a été imbibé dans la suspension bactérienne et étalé à la surface de la gélose à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application dans le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum.

➤ **Application des disques et incubation :**

Les disques stériles imprégnés de différentes dilutions d'huiles essentielles à raison de 10µl par disque (Ngameni *et al.*, 2009) ; ont été déposés à l'aide d'une pince sur la surface de la gélose. Des témoins imbibés seulement par le DMSO ont été réalisés. Les boîtes ont été incubées 24 h à 37 °C.

➤ **Expression des résultats :**

Les diamètres des zones d'inhibition lorsqu'elles existent ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse.

La nature de l'activité antibactérienne (Bactéricide ou Bactériostatique) ; un prélèvement de la zone d'inhibition a été réalisé et repiqué sur une gélose nutritive (Haddouchi *et al.*, 2009).

2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en extrait pour laquelle, aucune croissance visible à l'œil nu n'est observée (**Skandamis et Nycha ; 2001**), elle a été déterminée par la méthode de dilution en milieu solide ; décrite par **Benjlali et al., (1986)** et rapporté par **Billerbeck et al (2002)**, et qui consiste à disperser l'extrait à des concentrations variables dans le milieu gélosé avant sa solidification, donc une gamme de concentration de l'huile essentielle diluée dans le DMSO a été préparée, chaque dilution d'HE (500µl) a été incorporée à 19,5ml de MH maintenu en surfusion. Aussitôt, le mélange a été réparti dans des boîtes de Pétri.

Après solidification du milieu, l'ensemencement a été exécuté par des spots à l'aide d'une pipette Pasteur. L'ensemble a été incubé 24h à 37C°. Un témoin de croissance a été réalisé.

3. Résultats :

3.1. Aromatogramme:

L'activité antimicrobienne des HEs a été testée par la méthode de l'aromatogramme. La sensibilité des souches se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques. Rappelons que chaque disque contient 10 μ l d'HE à différentes dilutions. La concentration minimale inhibitrice a été déterminée en exposant les souches à diverses concentrations d'huile essentielle.

Le potentiel antibactérien des huiles essentielles de *L. nobilis*, *O. basilicum* et *R. officinalis* de la région d'El kala a été évalué sur 22 bactéries, dont 17 de Gram – et 5 de Gram +, provenant de la collection du laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine.

Les résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle de *L. nobilis* sont regroupés dans le tableau 08. D'après les valeurs enregistrées, la quasi-totalité des souches bactériennes testées à l'exception de *P.aeruginosa* ont montrées une sensibilité à l'HE de laurier. Les zones d'inhibitions varient entre 11,4mm pour *P.aeruginosa* ATCC 27853 et 22,4mm pour *Enterobacter sp* avec l'HE brute. Les micro-organismes les plus sensibles sont *Enterobacter sp* (22,4mm), *Shigella sp* (21,4mm); suivie de *K. oxytoca* (17,6mm), *K. pneumoniae* (18mm) et *MRSA* (17,6mm).

Concernant l'HE d'*O. basilicum*, les résultats de l'évaluation qualitative de l'activité antibactérienne sont représentés dans le tableau 09. L'étude a démontré un pouvoir antibactérien modéré sur la majorité des souches testées; excepté *P.aeruginosa* et *P.aeruginosa* ATCC 27853 dont la croissance n'a pas pu être inhibée. Parmi les souches bactériennes les plus sensibles on retrouve *Shigella sp*, *K. pneumoniae* et *S. aureus* dont les diamètres des halos d'inhibitions sont respectivement de 19,9mm, 18,8mm et 16m. Les micro-organismes les plus résistants sont *Citrobacter Freundii* (8,4mm), KPC- (9,8mm) et *S. aureus* ATCC 25923 (9,75mm) et ce face à l'extrait brut.

Finalement, l'huile essentielle de *R. officinalis* L. a révélé une activité antibactérienne modérée sur l'ensemble des bactéries testées (tableau 10). Les résultats de l'aromatogramme témoignent que les souches *Shigella sp*, *E. coli*, *MRSA* et *S. aureus* ATCC 25923 ont été assez

sensibles vis-à-vis de l'H.E de *R. officinalis L.*, avec des zones d'inhibition de 16,4mm, 15,9mm, 14,3mm et 14mm. Contrairement aux souches de *P. aeruginosa* ATCC 27853, KPC+ et *Citrobacter Freundii* qui ont montré de faibles diamètres de 9,3mm, 9,2mm et 8,7mm.

Tableau 08: Résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle de *Laurus nobilis L.*

		$\bar{\phi}$ (mm)			
		<i>Laurus nobilis L.</i>			
		B	1/2	1/4	1/8
GRAM -	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	15,9	12,05	11,85	11,75
	<i>Salmonella OMA 04</i>	14	11,2	9,1	/
	<i>Proteus mirabilis</i>	16,25	12,6	11,45	10,7
	<i>Escherichia coli</i>	14,1	11,5	11,3	11
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17,6	15,6	13,7	13
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	18	13,05	13,35	11,2
	<i>Enterobacter sp</i>	22,4	22	20,4	16,8
	<i>Providencia alcalifaciens</i>	16,2	14,4	13,2	11,1
	<i>Shigella sp</i>	21,1	19,3	18,4	16,3
	<i>Salmonella sp.</i>	17,1	14,1	11,5	10,8
	<i>Serratia marcescens</i>	16,4	12,1	11,8	10,3
	<i>Citrobacter Freundii</i>	15	14,3	13,1	12,2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	11,4	8,3	8,2	8
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	/	/	/	/
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	16,8	16	14,1	12,5
	KPC +	12,1	10,5	8,1	9,2
	KPC-	13,5	12,6	10,1	8,6
GRAM +	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	12,5	11,3	11,3	11,1
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15	9,1	8,3	7,4
	M.R.S.A	17,6	13,3	9,5	9,3
	<i>Staphylococcus aureus</i>	15,6	12,6	10,3	9,9
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13,1	12	8,4	8,2

Diamètre des zones d'inhibition (mm) incluant le disque 6 mm.

Tableau 09: Résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* L.

		Ø (mm)			
		<i>Ocimum basilicum</i> L			
Nom de la souche		B	½	¼	1/8
GRAM -	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	13,8	13,5	11	10,7
	<i>Salmonella</i> OMA 04	12	9,8	9,2	8,9
	<i>Proteus mirabilis</i>	12,6	11	13,1	11,3
	<i>Escherichia coli</i>	11,8	10,65	9,05	9
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18,8	17,2	13,3	10,1
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	10	10,2	9,45	8,5
	<i>Enterobacter</i> sp	13,6	13,1	13	11,3
	<i>Providencia alcalifaciens</i>	16	12,1	11,3	9,8
	<i>Shigella</i> sp	19,9	13,7	12,4	12,2
	<i>Salmonella</i> sp.	15,3	10,8	10,7	10,1
	<i>Serratia marcescens</i>	12	10,4	9,2	8,7
	<i>Citrobacter Freundii</i>	8,4	8,2	7,3	7
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	/	/	/	/
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	/	/	/	/
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	14,5	11,3	9,5	9,4
	KPC+	11,7	9,3	9,1	7,2
	KPC-	9,8	9,7	9,2	8,1
GRAM +	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	9,4	9,4	11	11
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	9,75	9,7	9,5	9
	M.R.S.A	13,5	12,2	11,2	10,1
	<i>Staphylococcus aureus</i>	16	14,5	13,5	11,1
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12,9	13,3	10,8	9,4

Diamètre des zones d'inhibition (en mm) incluant le disque 6 mm.

Tableau 10 : Résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.

		\varnothing (mm)			
		<i>Rosmarinus officinalis</i> L			
	Nom de la souche	B	1/2	1/4	1/8
GRAM -	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	13,5	10,2	10,3	8,9
	<i>Salmonella</i> OMA 04	11,5	9,8	9,8	9
	<i>Proteus mirabilis</i>	11,1	9,2	12,9	9,8
	<i>Escherichia coli</i>	15,9	12,15	11,45	11
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	11,6	11,3	10,8
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	11	13,25	11,6	8,85
	<i>Enterobacter sp</i>	12,7	11	9,4	9
	<i>Providencia alcalifaciens</i>	11,4	10,5	10,2	10,1
	<i>Shigella sp</i>	16,4	14,3	12,6	11,3
	<i>Salmonella sp.</i>	12,5	11,6	11,4	10,4
	<i>Serratia marcescens</i>	11,5	9,3	8,9	8,4
	<i>Citrobacter Freundii</i>	8,7	8,3	8,2	8,2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	9,8	10,8	9,1	/
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	/	/	/	/
	KPC+	9,3	/	/	/
KPC-	10,3	/	/	/	
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	9,2	9,1	9,1	9
GRAM +	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	11,3	10,3	12,5	9,6
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	14	12,4	8,7	8,4
	M.R.S.A	14,3	11,4	11,2	11
	<i>Staphylococcus aureus</i>	12,9	11,5	10,7	10,1
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12,7	10,8	10,8	10,6

Diamètre des zones d'inhibition (mm) incluant le disque 6 mm.

Les trois HEs testées ont présenté un large spectre d'action; agissant aussi bien sur les bactéries à Gram + que sur les bactéries à Gram -. Néanmoins, les diamètres des auréoles d'inhibitions des trois HEs, n'ont pas dépassé 22,4mm. Notons que le pouvoir antibactérien de l'HE de *L. nobilis* s'est révélé plus important que celui des deux autres plantes de la famille des lamiacées.

On note également que l'activité antibactérienne est proportionnelle à la concentration. Plus l'HE est concentrée, plus la zone d'inhibition est étendue ce qui indique la diminution de la croissance bactérienne.

La souche de *P. aeruginosa* jouit en revanche d'une grande résistance vis-à-vis des huiles essentielles de *L. nobilis*, *O. basilicum* et *R. officinalis*. Contrairement à *Shigella sp.* qui a manifesté une sensibilité aux trois huiles testées.

Après l'aromatogramme, on a procédé au repiquage des souches à partir des zones d'inhibition sur la gélose nutritive afin de déterminer la nature de l'activité antibactérienne des trois huiles essentielles. Après l'incubation (24h), la totalité des souches bactériennes repiquées avaient poussé, ce qui indique l'effet bactériostatique des HEs sur les micro-organismes.

3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

L'ensemble des concentrations minimales inhibitrices obtenu sont consignés dans les tableaux 11 et 12.

L'étude a révélé des valeurs de CMI relativement élevées pour les trois huiles, ce qui témoigne d'un pouvoir antibactérien modéré. L'HE de *L. nobilis* reste toutefois la plus active.

Cette dernière a présenté un effet sur la croissance bactérienne à la dilution 0,25%, ce qui correspond à la concentration de 1,36mg/ml, et ce contre *Shigella sp.*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* ATCC 29212, *Enterobacter sp.*, *E. coli* et KPC-. Suivie de 0,5% soit 2,72mg/ml sur *E. coli* ATCC25922, *Serratia marcescens*, *M.R.S.A*, *Salmonella sp.*, *K. pneumoniae*, KPC+ et *K. oxytoca*. La valeur de CMI la plus élevée a été enregistrée chez les souches d'*E. coli* (CipR), *Salmonella OMA 04*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii* et *Citrobacter freundii*, sur qui l'efficacité de l'huile essentielle n'a pu être observée qu'à la dilution de 1%, soit 5,4 mg/ml.

L'HE d'*O. basilicum*, malgré son potentiel antibactérien modéré atteint la concentration minimale inhibitrice la plus faible. La souche qui s'est montrée la plus sensible est *E. coli* avec une CMI de 1,23mg/ml, suivie d'*E. faecalis ATCC 29212*, *Citrobacter Freundii*, *Salmonella sp* et *KPC+* dont la croissance a été inhibée à la concentration de 4,95mg/ml (0,25%). Notons, que les CMI d'*Acinetobacter baumannii*, *S. aureus*, et *Enterobacter sp* n'ont pas pu être déterminées.

L'huile essentielle de *R. officinalis* a quant à elle manifesté un effet inhibiteur jusqu'à la dilution de 0,25%, et ce vis-à-vis des souches de *E. coli* et *KPC-*. Des valeurs de CMI assez élevée ont été enregistrées chez *Salmonella OMA 04*, *Acinetobacter baumannii*, *M.R.S.A ATCC 31*, *Enterobacter sp*, *K. oxytoca* et *E. coli (Cip)*.

En raison de la nature d'activité bactériostatique et les valeurs de CMI élevées, la concentration minimale bactéricide ne peut pas être évaluée.

Tableau 11: Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Position	Souche bactérienne	CMI					
		<i>Laurus nobilis</i>		<i>Ocimum</i>		<i>Rosmarinus</i>	
		<i>L</i>		<i>basilicum L</i>		<i>officinalis L</i>	
		%	mg/ml	%	mg/ml	%	mg/ml
1	<i>Shigella sp</i>	0,25	1,36	0,25	2,47	0,5	3,43
2	<i>Salmonella OMA 04</i>	/	/	1	9,5	1	6,85
3	<i>S. aureus</i>	0,25	1,36	/	/	0,5	3,43
4	<i>E. coli ATCC25922</i>	0,5	2,72	1	9,5	0,5	3,43
5	<i>Proteus mirabilis</i>	/	/	1	9,5	0,5	3,43
6	<i>Serratia marcescens</i>	0,5	2,72	0,25	2,47	0,5	3,43
7	<i>S. epidermidis</i>	0,25	1,36	1	9,5	0,5	3,43
8	<i>E. faecalis ATCC 29212</i>	0,25	1,36	0,5	4,95	0,5	3,43
9	<i>A. baumannii</i>	/	/	/	/	1	6,85
10	<i>Citrobacter Freundii</i>	/	/	0,5	4,95	0,5	3,43
11	<i>M.R.S.A</i>	0,5	2,72	1	9,5	1	6,85
12	<i>Enterobacter sp</i>	0,25	1,36	/	/	1	6,85

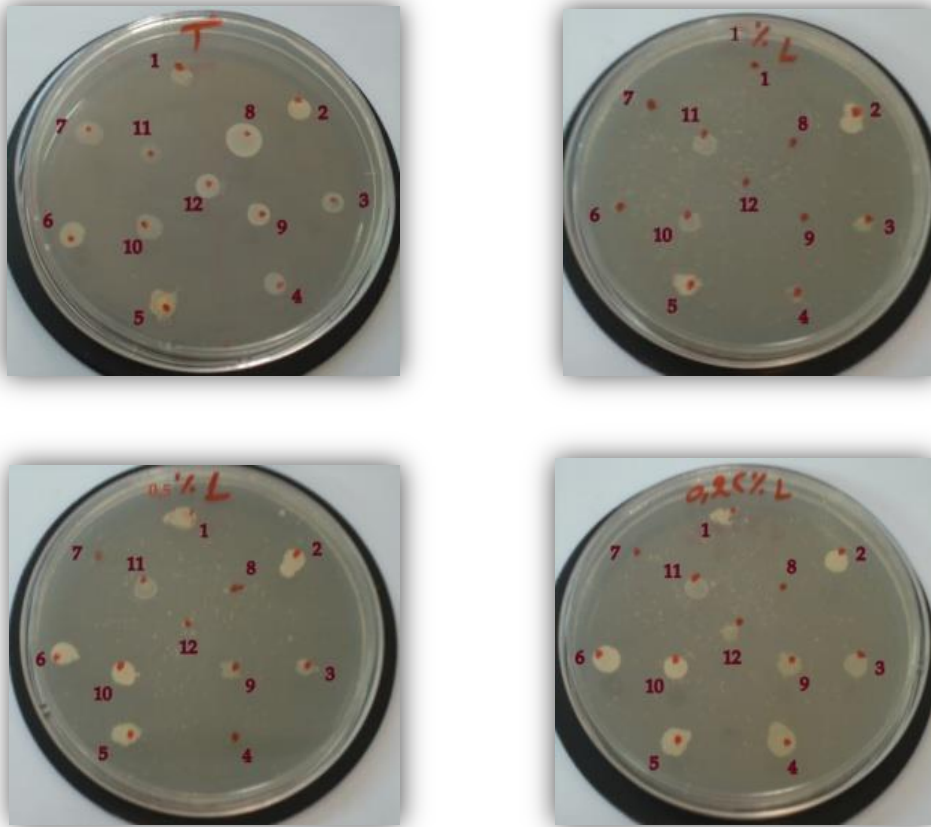


Figure 27: CMI de l'HE de *Laurus nobilis* L.

- 1 :** *Shigella* sp., **2 :** *Salmonella* OMA 04, **3 :** *S. aureus*, **4 :** *E. coli* ATCC22, **5 :** *Proteus mirabilis*,
6 : *Serratia marcescens*, **7 :** *S. epidermidis*, **8 :** *E. faecalis* ATCC 29212, **9 :** *A. baumannii*,
10 : *Citrobacter Freundii*, **11 :** M.R.S.A, **12 :** *Enterobacter* sp.

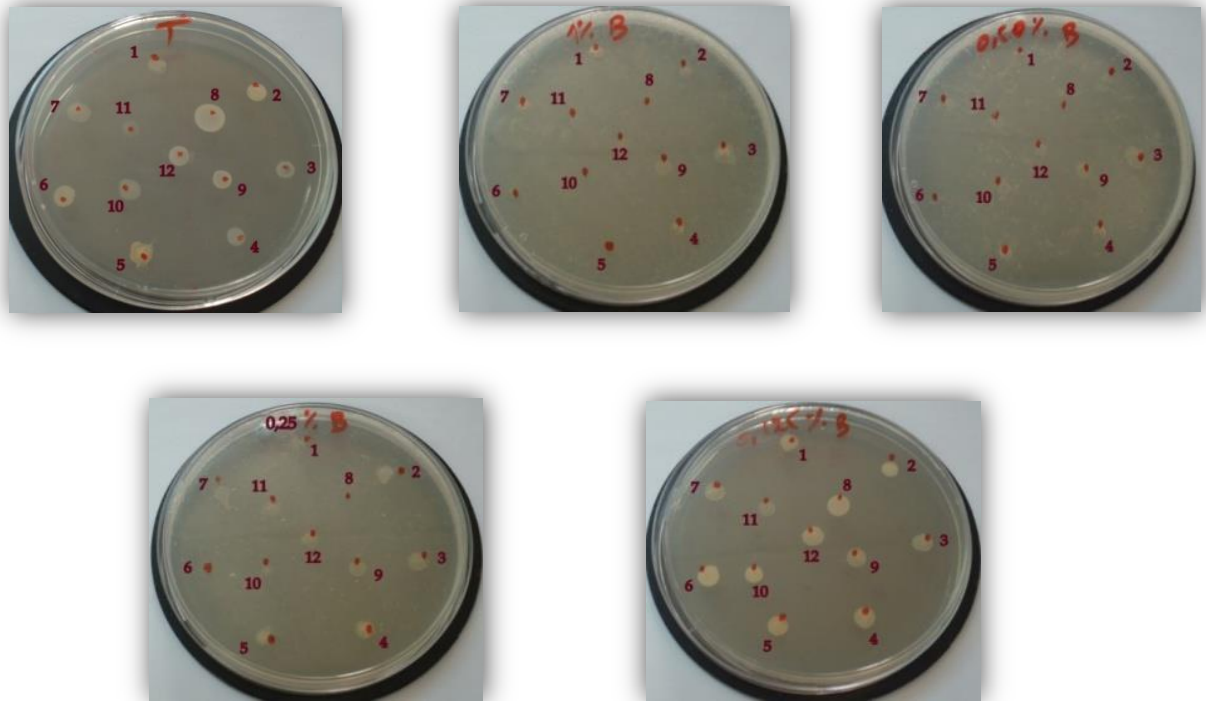


Figure 28: CMI de l'HE d'*Ocimum basilicum* L.

- 1 :** *Shigella* sp., **2 :** *Salmonella* OMA 04, **3 :** *S. aureus*, **4 :** *E. coli* ATCC22, **5 :** *Proteus mirabilis*,
6 : *Serratia marcescens*, **7 :** *S. epidermidis*, **8 :** *E. faecalis* ATCC 29212, **9 :** *A. baumannii*,
10 : *Citrobacter Freundii*, **11 :** M.R.S.A, **12 :** *Enterobacter* sp.

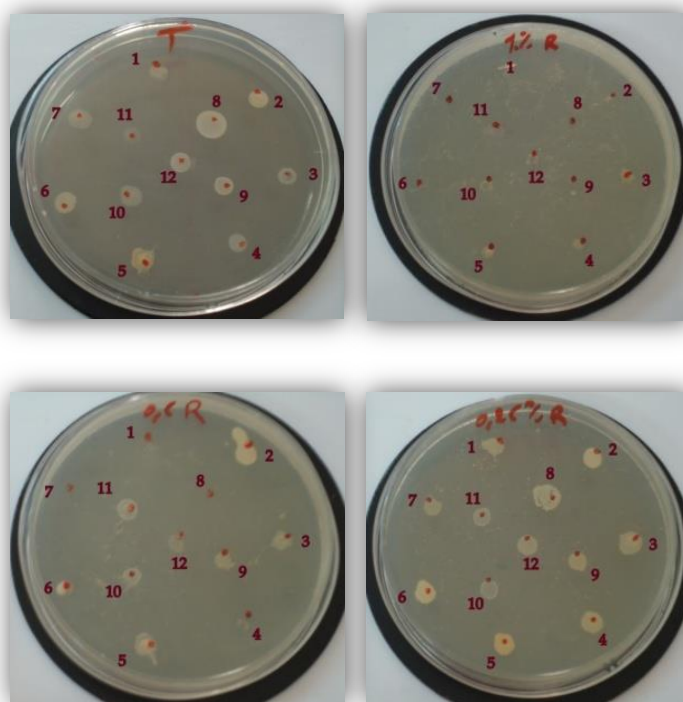


Figure 29 : CMI de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L.

1 : *Shigella* sp., 2 : *Salmonella* OMA 04, 3 : *S. aureus*, 4 : *E. coli* ATCC22, 5 : *Proteus mirabilis*,
 6 : *Serratia marcescens*, 7 : *S. epidermidis*, 8 : *E. faecalis* ATCC 29212, 9 : *A. baumannii*,
 10 : *Citrobacter Freundii*, 11 : *M.R.S.A*, 12 : *Enterobacter* sp.

Tableau 12: Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Position	Souche bactérienne	<i>Laurus nobilis</i> L		<i>Ocimum basilicum</i> L		<i>Rosmarinus officinalis</i> L	
		%	mg/ml	%	mg/ml	%	mg/ml
1	<i>Salmonella</i> sp	0,5	2,72	0,5	4,95	0,5	3,43
2	<i>K. pneumoniae</i>	0,5	2,72	1	9,5	0,5	3,43
3	<i>E. coli</i>	0,25	1,36	0,12	1,23	0,25	1,71
4	KPC-	0,25	1,36	0,25	2,47	0,25	1,71
5	KPC+	0,5	2,72	0,5	4,95	0,5	3,43
6	<i>E. coli</i> (<i>cipR</i>)	1	5,4	1	9,5	1	6,85
7	<i>K. oxytoca</i>	0,5	2,72	1	9,5	1	6,85

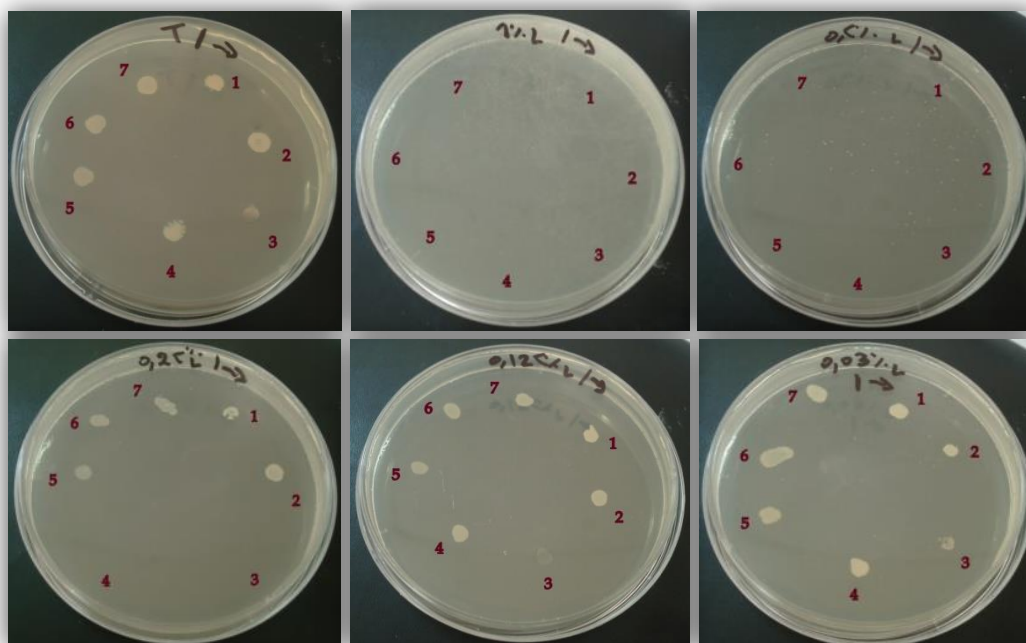


Figure 30 : CMI de l'HE de *Laurus nobilis* L.

1 : *Salmonella* sp, 2 : *K. pneumoniae*, 3 : *E. coli*, 4 : KPC-, 5 : KPC+, 6 : *E. coli* (*cipR*),
7 : *K. oxytoca*.

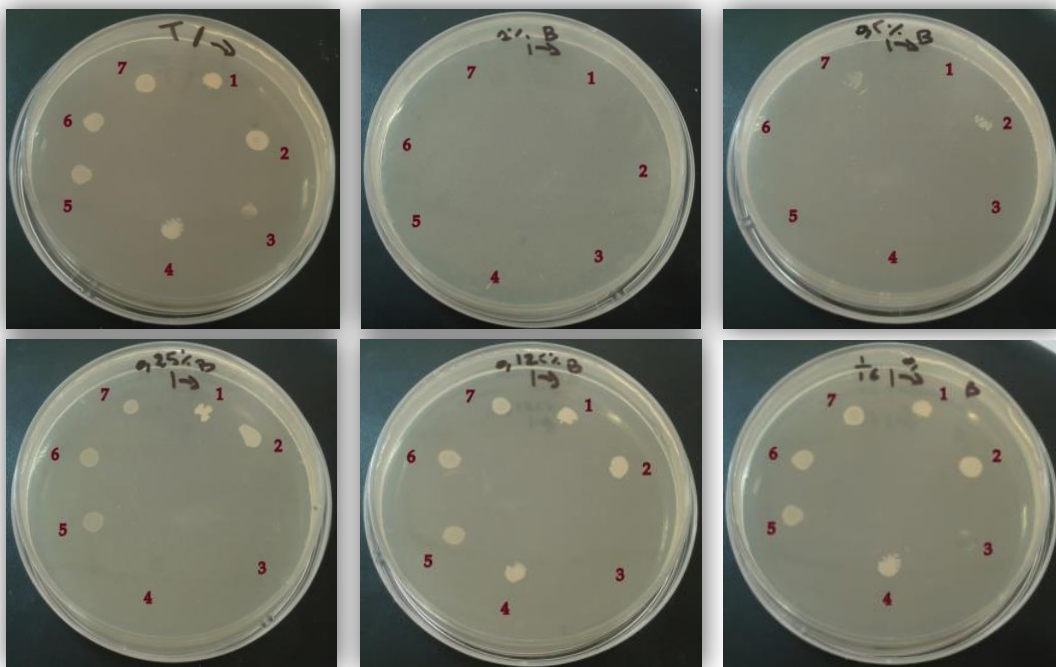


Figure 31: Détermination de la CMI de l'HE d'*Ocimum basilicum* L.

1 : *Salmonella* sp, **2 :** *K. pneumoniae*, **3 :** *E. coli*, **4 :** KPC-, **5 :** KPC+, **6 :** *E. coli* (*cipR*),
7 : *K. oxytoca*.

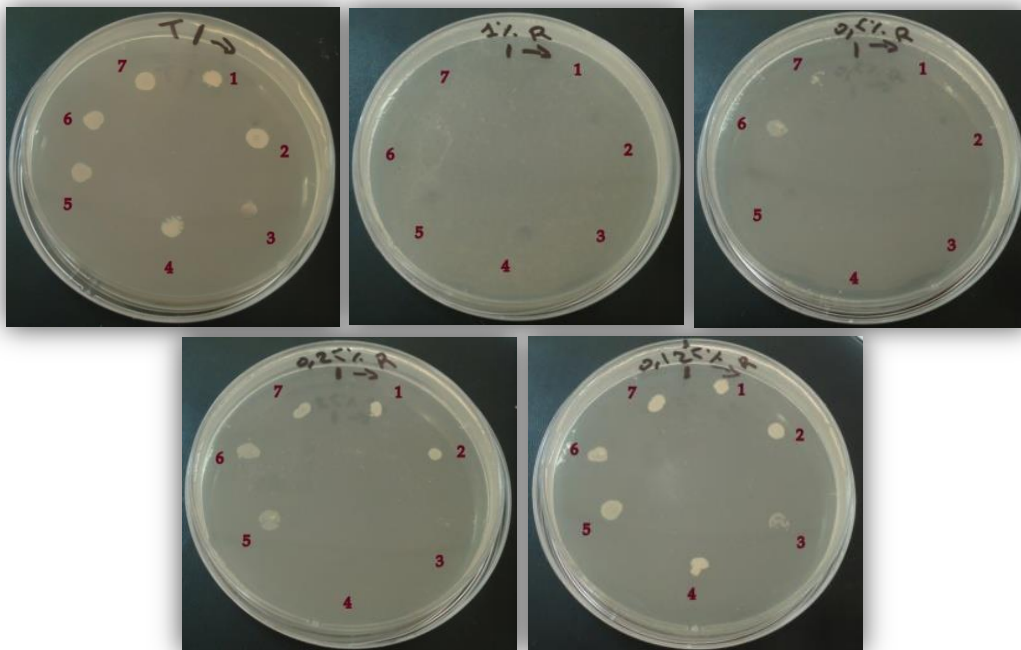


Figure 32 : CMI de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L.

1 : *Salmonella* sp, **2 :** *K. pneumoniae*, **3 :** *E. coli*, **4 :** KPC-, **5 :** KPC+, **6 :** *E. coli* (*cipR*),
7 : *K. oxytoca*.

4. Discussion :

Le potentiel antibactérien a été évalué dans ce chapitre afin de valoriser trois espèces répondues dans notre région. Rappelons l'intérêt de redécouvrir ces espèces connues dont la capacité à inhiber les micro-organismes diffère d'une plante à une autre. Les propriétés des huiles essentielles varient en fonction de l'origine géographique (**Chalchat et al., 1993; Elamrani et al., 2000 ; Pintore et al., 2002; Serrano et al., 2002 ; Angioni et al., 2004**), des facteurs environnementaux et agronomiques (**Moghtader et al., 2009 ; Jordán et al., 2013**) ; du stade de développement des plantes (**Ruberto et Baratta, 2000**) et de la méthode d'extraction des huiles essentielles (**Hosni et al., 2013**). Aussi il a été démontré que dans la famille des lamiaceae, la durée de la journée et la luminosité augmentent la teneur en HE et la qualité des matières actives (**Moghaddam et al., 2011**) ce qui est valable pour les autres familles.

Les souches bactériennes testées et la méthode utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne peuvent également être la cause de divergences dans les résultats (**Hammer et al., 1999**).

La famille des lamiacées regroupe de nombreuses espèces à huiles aromatiques dont *R. officinalis* et *O. basilicum*. Les huiles essentielles des espèces de cette famille sont connues pour leurs multiples vertus dont l'activité antibactérienne.

Un certain nombre d'auteurs ont mentionné la forte activité antimicrobienne de l'HE d'*O. basilicum* contre un large éventail de micro-organismes pathogènes (**Suppakul et al., 2003 ; Lopez et al., 2005 ; Bozin et al., 2006 ; Sokovic et al., 2006**). D'autres chercheurs ont mis en évidence le potentiel antibactérien modéré à faible d'HE du basilic (**Wannissorn et al., 2005 ; Di Pasqua et al., 2005 ; Shan et al., 2007; Runyora et al., 2009**), ce qui concorde avec nos résultats.

Dans les travaux de **Shiraz et al., 2014**, l'HE du basilic a affiché des concentrations minimales inhibitrices nettement inférieures à nos CMI donc une activité meilleure; allant de 62 à 500 µl/ml à l'encontre de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*. Ces résultats sont similaires aux **Hossain et al., (2010)**.

Providencia alcalifaciens s'est montré sensible à notre HE de basilic contrairement à l'HE du Nigeria (**Adeola et al., 2012**), qui a été inefficace vis-à-vis de *Providencia rettgeri*. On retrouve également dans cette étude, une certaine sensibilité des souches de *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, dont les diamètres des zones d'inhibition se rapprochent des nôtres. En revanche, la croissance bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa* a été inhibée à l'inverse de *P. aeruginosa* exposée à l'huile volatile de notre région.

L'effet bactériostatique et la forte capacité antibactérienne de l'huile essentielle du basilic d'Iran, ont été démontrés par **Moghddam et al., (2011)** sur *Escherichia coli* (PTCC 1535) *Staphylococcus aureus* (PTCC 1112) et *Bacillus cereus* (PTCC 1015). Les résultats des tests de diffusion en milieu gélosé avaient affiché des zones d'inhibition comprises entre 29,20 et 30,56 mm pour les souches de *S. aureus*, entre 10,66 et 16,11 pour *B. cereus* et entre 17,48 et 23,58 mm pour les souches d' *E. coli*. Les valeurs de CMI ont été estimées à 36 à 18 µl/ml pour: *B. cereus*, 18 µl/ml pour *S. aureus*, et l'*Escherichia coli* CMI équivalant à 18-9 µl/ml, bien inférieurs à nos résultats.

Une autre étude de **Hussain et al., (2008)** sur la composition chimique et l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle recueillie saisonnièrement au Pakistan a démontré le fort pouvoir inhibiteur contre neuf micro-organismes pathogènes. Les résultats obtenus ont indiqué que *S. aureus* et *B. subtilis* ont été les micro-organismes les plus sensibles montrant des zones d'inhibition (plus 22.2-24.4 mm), (20.4-26.1 mm), et CMI équivalente à (0,9 mg / ml), (0,8 mg / mL), respectivement. Ces observations rejoignent ceux de **Moghddam et al., 2011**.

On a noté que l'HE du basilic d'El Kala, a été actif à la fois sur les bactéries à Gram + et à Gram-. Ce qui est également rapporté par **Usman et al., 2013 ; Adeola et al., 2012** et **Inouye et al., 2001**.

La deuxième espèce étudiée dans le présent travail, le *R. officinalis*, a montré un large spectre d'action d'après plusieurs auteurs (**Erdogrul, 2002 ; Gachkar et al., 2007 ; Jiang et al., 2011 ; Khosravi et al., 2013**). D'autres travaux ont cependant signalé une activité modérée comme ceux **Celiktas et al., 2007** ; ou encore ceux de Sardaigne **Angioni et al., 2004 ; Lopez et al., 2005** qui ont travaillé respectivement sur l'espèce provenant de Turquie

et de Sardaigne. L'HE de notre région (El Kala) a eu un effet sur la quasi-totalité des souches testées mais à faible intensité.

Nos résultats sur l'activité antibactérienne de l'HE du romarin concordent avec ceux obtenus par **Lograda et ses collaborateurs (2014)**. Dans cette étude, les auteurs ont testé l'huile aromatique du romarin provenant de plusieurs régions de l'Est Algérien (Kherrata (Bedjaia), Boutaleb (Sétif), Bibans (Bourdj Bou-Arriridj), Agmeroual et N'gaous (Batna), et Boussaâda (M'sila)). Les diamètres des zones d'inhibition obtenus n'ont pas dépassé les 20 mm, ils se rapprochent de nos résultats et reflètent le potentiel antibactérien modeste voir faible de l'huile essentielle de *R. officinalis* de l'Est Algérien. Par contre, **Djeddi S. et ses collègues (2007)** ont signalé la forte activité antibactérienne de l'HE du *R. officinalis* issu du Park national d'El Hamma (Alger).

S. aureus et *E. coli* ont été moyennement sensibles à l'extrait volatil du romarin, ce qui rejoint les observations faites par **Barreto et al., 2014 ; Sienkiewicz et al., 2013** et **Van Vuuren et al., 2009**.

L'huile essentielle du *L. nobilis* d'une autre région de l'Est algérien, plus précisément de Bejaia a également été étudiée pour son action sur cinq souches bactériennes de références : *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC27853, *E. coli* NAR, *K. pneumoniae* E47 et *Listeria innocua* CLIP74915 (**Kheyer et al., 2014**). L'HE a été efficace sur la totalité des micro-organismes testés, donnant des diamètres d'inhibitions nettement supérieurs aux nôtres ; soient 29,5 mm pour *E. coli* NAR, 26,5 mm pour *K. pneumoniae* E47 et 29,5 mm pour *S. aureus*. La souche de *P. aeruginosa* ATCC27853 a été plus résistante à l'HE du laurier de Bejaïa qu'à la nôtre.

Dans la même année, **Nehir El** et ses collègues (2014) ont rapporté la bonne activité antibactérienne de l'HE du laurier de Turquie obtenue par deux méthodes d'extraction (hydrodistillation et assistée par micro-ondes).

Les résultats obtenus dans notre étude concordent aussi avec ceux de **Bennadja et al., 2013**, car tous deux attestent de l'efficacité de l'huile essentielle de *L. nobilis*.

Moghtader et al., 2013 ont démontré l'efficacité de l'HE du laurier issu de la province du Kerman (Iran) sur plusieurs souches de Gram- et Gram +. Ils ont enregistré des zones d'inhibition de croissance de 29, 26 et 18 mm sur *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. faecalis*, respectivement. Egalement, 24, 27, 21, 18, 26 et 28mm sur des bactéries de Gram- qui sont *P. aeruginosa*, *S. flexneri*, *K. pneumoniae*, *S. typhi*, *S. marcescens* et *E. coli*. L'effet de l'huile essentielle de *L. nobilis* sur les souches bactériennes était supérieur à celui de la tétracycline et également supérieur aux valeurs retrouvées dans nos résultats.

De même, l'HE du laurier du Portugal présente une forte activité antibactérienne contre toute détérioration d'origine alimentaire et bactéries pathogènes (**Ramos et al., 2012**).

La sensibilité de *S. aureus* à l'huile essentielle de *L. nobilis* observée dans notre étude a été également constatée par **Derwich et al., 2009**. L'activité antibactérienne de *L. nobilis* provenant du Maroc a été étudiée in vitro sur trois souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* et *Klebsiella pneumoniae*, l'huile essentielle testée a montré une meilleure action sur les souches de *S. aureus* avec une zone d'inhibition de 13 mm et une CMI équivalente à 0,35mg/ml. Contrairement aux résultats obtenus dans notre étude, la souche de *Klebsiella pneumoniae* a quant à elle exprimé une résistance accrue à l'HE de *L. nobilis* du Maroc.

Les activités bactériostatiques et bactéricides de 22 huiles essentielles dont le laurier contre sept souches bactériennes (*Aerobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus albus* et *Staphylococcus aureus*) ont été évalués par **Kivanc et Akgul, 1986** en Turquie. Le *L. nobilis* s'est montré actif contre toutes les bactéries testées avec une sensibilité prononcée pour *S. aureus* et *P. vulgaris*.

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont la réputation d'être des germes résistants aux agents biocides, cela est lié à leur grande capacité à développer des résistances vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens, leur implication fréquente dans les infections nosocomiales (**Mann et al., 2000**). Plusieurs auteurs rapportent la faible sensibilité des souches de *P.aeruginosa* vis-à-vis des huiles essentielles, notamment celles de *L. nobilis*, *O. basilicum* et *R. officinalis* (**Moghaddam et al., 2011** ; **Pintore et al., 2002**, **Dorman et al., 2000**, **Wilkinson et al., 2003**).

D'après plusieurs travaux, les bactéries à Gram- sont censées être plus résistantes que les Gram+, ceci est dû aux différences structurales de leurs membranes externes (**Inouye et al., 2001, Lopez et al., 2005, Bozin et al., 2006**), la pénétration des composés actifs présents dans les HE est donc différente (**Kheyer et al., 2014**). Chez les bactéries Gram -, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace ; riche en lipopolysaccharide dont les charges négatives de surface empêchent la diffusion des molécules hydrophobes (**Nikaido et al., 2003**), toutefois, quelques composés phénoliques de faible poids moléculaire peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires à l'aide de leurs groupes fonctionnels et se faufiler jusqu'à la membrane intérieure plus vulnérable (**Dorman et al., 2000**). Autrement dit, les composés hydrophobes sont capables de perturber la membrane plasmique et la membrane externe des bactéries Gram - en induisant sa perméabilité et la mort cellulaire (**Wang et al., 2012**).

De nombreux auteurs, ont constaté que le changement dans la composition chimique des huiles essentielles affecte directement leurs propriétés biologiques (**Celiktas et al., 2007 ; Van Vuuren et al., 2007**). Ce qui mène à attribuer l'activité antibactérienne aux composants chimiques des HEs.

Dans notre étude, l'HE de *R. officinalis* a été la moins performante des trois huiles testées, elle a tout de même pu inhiber la quasi-totalité des micro-organismes. Cette activité est attribuée à la présence de bornéol, l-Verbenone, β -linalol, camphor et à d'autres composés phénoliques. Cette observation a été également faite par **Santoto, 2005**. D'autres travaux, attribuent l'activité antibactérienne du romarin au 1,8 cinéole (**Miladi et al., 2013**) qui est l'un des composants minoritaires dans notre plante.

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**).

L'HE du laurier a montré meilleure capacité antibactérienne par rapport aux deux autres plantes. Ce pouvoir est dû principalement à la présence de 1,8 cinéole.

On note que les trois HEs étudiées contiennent le 1,8 cinéole à des teneurs différentes. Plusieurs recherches ont mis en évidence son effet sur plusieurs souches telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, et *Bacillus subtilis* (**Sivropoulou et al., 1997**). L'huile essentielle de *L.nobilis* a été la plus performante des trois huiles, vu sa forte teneur en 1-8 cinéol.

Pour résumer, les huiles essentielles sont riches en monoterpènes hydrocarbures, terpinènes qui sont dotés d'une grande activité antibactérienne contre les bactéries Gram- et + (**Oyedeji et al., 2005**). Ces composants chimiques exercent leur activité antimicrobienne sur les micro-organismes par la perturbation de l'intégrité membranaire. (**Knobloch et al., 1989**).

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.

Conclusion générale et perspectives

La flore de la région d'El Kala jouie d'une biodiversité considérable, elle possède de nombreuses plantes aromatiques et médicinales riches en métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques. Dans le cadre d'une valorisation de ces ressources, trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis*, *Rosmarinus officinalis* et *Ocimum basilicum*) ont fait l'objet d'une étude phytochimique de leurs huiles essentielles et d'une évaluation de leur potentiel antioxydant et antibactérienne.

Dans un premier temps, notre travail s'est consacré à l'observation des coupes histologiques des feuilles et des tiges des trois plantes étudiées afin d'identifier et de localiser les structures responsables de la production et du stockage des huiles essentielles. Les deux plantes de la famille des lamiacées (*R. officinalis* et *O. basilicum*), détiennent des trichomes glandulaires (poils sécréteurs) spécifiques à cette famille. Concernant le laurier noble, on a retrouvé des cellules à essence située dans le parenchyme.

Par la suite, une extraction et un criblage phytochimique par CPG/MS des huiles essentielles ont été réalisés, dans le but d'identifier et de quantifier les constituants chimiques des essences.

Le rendement de l'HE de *L. nobilis* s'est élevé à 0,7% et la CPG/SM a permis d'identifier 17 composés dont 1,8-cinéole (35.31%), β -linalol (22.52%), eugenol méthylether (9.17%), camphène (7.37%) et 3-carène (5.39%) sont les composés majoritaires.

Pour l'*O. basilicum* avec un rendement de 0,6% son HE est constitué de 34 composants dont β -linalol (22,43%), β -myrcène (12,48%), Alpha Terpinéol acétate (10,82%), linalol acétate (9,49%), myrcenol (9,18 %) et 1,8-cinéole sont les constituants principaux.

Finalement, l'huile essentielle du *R. officinalis*, on avait obtenu un rendement de 0,3% le plus faible comparant les deux autres essences. Elle contient 25 substances dominées

par la présence de bornéol (29,54%), 1-verbenone (12,41%), β -linalol (11,14%), camphre (10,45%) et acétate de bonyle (6,28%).

Ces résultats ont pu mettre en évidence la variabilité de la composition chimique des trois huiles essentielles par rapport à d'autres régions d'après la littérature. Egalement la prédominance des composés monoterpéniques des trois HEs.

En troisième temps, une étude de l'activité antioxydante *in vitro* a été réalisée en employant trois méthodes : test du piégeage du radical libre DPPH, test de blanchiment de β -carotène et la réduction du fer ; chacune cible un mécanisme d'action des antioxydants.

Les trois tests ont montré que le pouvoir antioxydant est proportionnel à l'augmentation de la concentration des huiles volatiles.

Selon les résultats obtenus du test de l'effet scavenger du radical DPPH, les HEs testées jouissent d'un potentiel antiradicalaire appréciable surtout pour l'HE du laurier avec un IC50 de $1,55 \pm 0,02$ mg/ml, suivie d'*Ocimum basilicum* IC50 à égal à $2,0 \pm 0,04$ mg/ml et finalement *R. officinalis* avec IC 50 de $3,09 \pm 0,72$ mg/ml.

La cinétique de la décoloration du β -carotène a permis de mettre en évidence l'aptitude des HEs à inhiber la formation des radicaux libres par l'acide linoléique. L'essence de romarin a enregistré le plus fort taux d'inhibition 75,68%, suivie de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* avec la valeur de 63,39% et au dernier l'HE du laurier un taux de 41,97%.

Le pouvoir réducteur des huiles essentielles a été évalué et représenté par les absorbances notées, on a enregistré respectivement 0.432, 0.503 et 0.574 à la concentration 0.5 mg/ml pour les HEs du laurier, basilic et romarin. L'HE de *R. officinalis* possède une activité réductrice supérieure aux HEs d'*O. basilicum* et *L. nobilis*, mais inférieur à l'acide ascorbique qui s'est élevé à 1,94 à 0,25mg/ml.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons déduire que les essences isolées à partir des trois plantes (*L. nobilis*, *R. officinalis* et *O. basilicum*) sont pourvues d'une activité antioxydante modérée. Néanmoins, cette activité reste bien inférieure aux antioxydants standards utilisés.

Pour clore ce travail, l'activité antimicrobienne a été évaluée en utilisant une gamme de microorganismes afin de donner une idée sur l'étendue du champ d'activité antimicrobienne de nos essences. Ainsi nous avons testé nos HEs sur vingt deux souches bactériennes dont six de référence: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella OMA 04*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, M.R.S.A ATCC 43300, *Citrobacter Freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Kpc⁺*, *Kpc⁻*, *Providencia alcalifaciens*, *Salmonella sp.*, *Serratia marcescens*, *Shigella sp*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*.

D'après les résultats de l'aromatogramme, les trois HEs ont présenté un pouvoir inhibiteur modéré contre la majorité des souches bactériennes testées, à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Pseudomonas aeruginosa*. L'inhibition de la croissance a varié en fonction de l'espèce bactérienne, de la nature et de la concentration des huiles volatiles testées. Les valeurs des CMI (concentrations minimales inhibitrices) relativement élevées pour les trois huiles.

Les propriétés biologiques des huiles essentielles de manière globale seraient liées à la complexité de la composition chimique et la synergie entre les composants majoritaires et minoritaires.

L'orientation des recherches afin d'approfondir les aspects entrevue dans ce travail, également l'exploration d'autres facettes des propriétés biologiques de ces trois plantes aromatiques pourrait être réalisée. Ainsi un certain nombre de perspectives peuvent être envisagées :

- Evaluation de l'activité antioxydante *in vivo* sur un modèle biologique, après leur métabolisation par la cellule.
- Une étude de l'effet cytoprotecteur sur des cellules en culture soumises à un stress oxydant.
- Une étude de l'activité anticytotoxique sur des cellules cancéreuses.

- Déterminer les fractions les plus actives et éventuellement de caractériser les molécules responsables de ces activités.

- Application des huiles essentielles ou leurs vapeurs directement sur les denrées alimentaires durant le stockage.

Références bibliographiques

A

Aazza S., Lyoussi B. and Miguel MG., 2011. Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Activities of Some Commercial Essential Oils and Their Major Compounds. *Molecules*. **16**: 7672-7690.

Adeola SA., Folorunso OS. and Amisu KO., 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, 2000 : Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthode d'analyse 471 P. Tome 2 – Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles 323 P. Tome 2 – Volume 2 Monographie relative aux huiles essentielles 663 P.

AFNOR, 1986. Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57p.

Amarowicz R., Naczek M., Shahidi F., 2000. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**: 2755–2759.

Angioni A., Barra A., Cereti E., Barile D., Coisson DJ., Arlorio M., 2004. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52(11)**: 3530–3535.

Anwar F., Ali M., Hussain AI. and Shahid M., 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. *Flavour and Fragrance Journal*. **24**: 170-176.

Arabici O. and 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

Arpino P., Prevot A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A. et Wittier P., 1995. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed. Masson, Paris.

Arslan D. and Musa Ozcan M., 2007. Evaluation of drying methods with respect to drying kinetics, mineral content and colour characteristics of rosemary leaves. *Energy Conversion and Management*.

Aruma OL., Halliwell B., Aeschbach R., Loligers J., 1992. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: Carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*. **22**: 257-268.

Atik Bekkara F., Bousmaha L., Taleb Bendiab SA., Boti JB. et Casanova J., 2007. Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé*. **7**: 6-11.

B

Barla, A., Topcu G., Oksuz S., Tumen G. and Kingston DGI., 2007. Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis*. L. *Food Chem*. **104**: 1478-1484.

Barreto HM., Filho ECS., de O. Lima E., Coutinho HDM., Morais-Braga MFB., Tavares CCA., Tintino SR., Rego JV., de Abreu APL., Lustosa MdCG., Oliveira RWG., Citó AMGL., Lopes JAD., 2014. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Industrial Crops and Products*. **59**: 290–294.

Bärtels A., 1997. Guide des Plantes du Bassin méditerranéen. Editions Ulmer.

Bartosz G., 2003. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. **9**: 5-21.

Baser KHC. and Buchbauer G., 2010. Handbook of Essential oils : Science, Technology and Applications. CRC Press. UK.

Beckman KB., Ames BN., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*. **78**: 547-581.

Beirão ARB. and Bernardo-Gil MG., 2006. Antioxidants from *Lavandula luisieri*. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering. Portugal. 8p.

Belakhdar J., 1997. Pharmacopée marocaine traditionnelle, Paris, Édition Ibis Pres, 764 p.

Beloued A., 2005. Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires. Alger. 124p.

Benhabiles NEH. and Aït Ammar H., 2001. Comparative study of Algeria's *Rosmarinus eriocalys* and *Rosmarinus officinalis*. *Perfumer & Flavorist*. **26**: 40 – 48.

Benjilali B., Tantaoui-Elarki A., Ismaili-Alaoui M., 1986. Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélose. *Plant MédPhytothér.* **20**: 155-167.

Bennadja S., Tlili Ait Kaki Y., Djahoudi A., Hedef Y. and Chefrou A., 2013. Antibiotic activity of the essential oil of laurel (*Laurus nobilis* L.) on eight bacterial strains. *Journal of Life Sciences*. **7(8)**: 814-819.

Berlette BS. and Stadtman ER., 1997. Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*. **272**: 20313-20316.

Billerbeck VG., Roques C., Vanière P., Marquier P., 2002. Activité antibactérienne et antifongique des produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes X-n°3*: 248-251.

Boutekdjiret C., Bentahar F., Belabbes R., Bessière JM., 1998. The essential oils from *Rosmarinus officinalis* L. in Algeria. *J. Essent. Oil Res.* **10**: 680-682.

Botineau M., 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Ed TEC&DOC, Lavoisier, Paris. 1021-1043p.

Bottega S. and Corsi G., 2000 : Structure, secretion and possible functions of calyx glandular hairs of *Rosmarinus officinalis* L. *Botanical J. Linnean Soc.* **132**: 325–335.

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 LH., Achour D., Wathelet JP. and Lognay G., 2011. Essential Oil Composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Algeria. *Jeobp.* **14(6)**: 810 – 814.

Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel- Wissenschaft und –Technologie.* **28**: 25–30.

Brunneton J., 1993. Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. Edition. Technique et documentaire, 3^{ème} édition. 484,489,548,555,634 p.

Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. Tec. Et Doc. Lavoisier. 3eme édition. 1999, P: 484-488.

Bruneton J., 2008. Pharmacognosie – Phytochimie, plantes médicinales, 2eme Ed, Paris, Tec & Doc – Edition médicales internationales. 1188p.

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

C

Cassella S., Cassella JP. and Smith I., 2002. Synergistic antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oils against dermatophyte infection. *The International Journal of Aromatherapy.* **12**: 2-15.

Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser KHC., 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry.* **100**: 553–559.

Chalchat JC., Gary RP., Michet A., Benjilali B., Chabart, JL., 1993. Essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). The chemical composition of oils of various origins (Morocco, Spain, France). *Journal of essential oil research.* **5(6)**: 613-618.

Cox SD., Mann CM., Markham JL., Bell HC., Gustafson JE., Warmington JR. and Wyllie SG., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology.* **88**: 170-175.

Curtay JP. et Robin JM., 2000. Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie Info.* 4p.

D

Dacosta E., 2003. Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta. Paris. 317p.

Daroui-Mokaddem H., 2011. Etude phytochimique et biologique des espèces : *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniololus olusatrum* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum trifurcatum* (Asteraceae). Thèse de Doctorat. Option : Biochimie appliquée. Université Badji-Mokhtar, Annaba.

De Belair G., 1990. Structure, fonctionnement et perspectives de gestions de quatre éco-complexes lacustres et marécageux (El-Kala, Est algérien) Thèse doc.Univ. Montpellier. 193 p.

Deba F., Dang Xuan T., Yasuda M., Tawata S., 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control.* **19**: 346-352.

Delattre J., Beaudoux JL., Bonnefont-Rousselot D., 2005. Radicaux libres et stress oxydant. Aspect biologique et pathologiques. Ed Lavoisier, Paris.

Demir V., Guhan T., Yagcioglu A.K., Degirmencioglu A., 2004. Mathematical modeling and the Determination of some Quality Parameters of Air-dried Bay leaves. *Biosystems Engineering.* **88** (3): 325-335.

Derwiche E., Zineb B., Abdellatif B., 2009. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Leaves Essential Oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* **3**(4): 3818-3824.

Derwich EH., Benziane Z., Chabir R., Taouil R., 2011. In vitro antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oil extract of leaves of *Rosmarinus Officinalis* grown in Morocco. *Int J Pharm Pharm Sci.* **3**(3): 89-95.

Di Pasqua R., De Feo V., Villani F., Mauriello G., 2005. In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean *Apiaceae*, *Verbenaceae* and *Lamiaceae* against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Annals of Microbiology.* **55**(2): 139-143.

Djahra AB., 2013. Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. These de doctorat, option biologie végétale. Univ. Badji Mokhtar, Annaba. 54p.

Djeddi S., Bouchenah N., Settar I., Skaltsa HD., 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chem. Natural Comp.* **43**(4): 487-490.

Dorman HJD. and Deans SG., 2000. Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology.* **88**(3): 308-316.

Duh PD., Tu YY. and Yen GC., 1999. Antioxidant activity of the aqueous extract of harn jjur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*. **32**: 269-277.

Dupond F. et Guignard JL., 2012. Abrégés de pharmacie. Botanique- Familles des plantes. Ed. Elsevier Masson 15^e édition.

E

Elamrani A., Zrira S., Benjilali B., Berrada M., 2000. A study of Moroccan rosemary oils. *Journal of essential oil research*. **12(4)**: 487-495.

Erdogrul OT., 2002. Antibacterial activities of some plant extracts used in Folk medicine. *Pharm. Biol.* **40**: 269-273.

F

Faleiro L., Miguel GM., Guerrero CAC., Brito JMC., 1999. Antimicrobial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus mastichina* (L.) L. ssp. *Mastichina* and *Thymus albicans*. In: Proceedings of the II WOCMAP congress on medicinal and aromatic plants, part 2: pharmacognosy, pharmacology, phytomedicine, toxicology.

Favier A., 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108-115p.

Fisher K., Phillips C., 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer. *Trends in Food Science & Technology*. **19**: 156-164.

Fiorini C., David B., Fouraste I., Vercauteren J., 1998. Acylated kaempferol glycosides from *Laurus nobilis* leaves. *Phytochemistry*. **47**: 821-824.

G

Gachkar L., Yadegari D., Rezaei MB., Taghizadeh M., Astaneh SA., Rasooli I., 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*. **102**: 898-904.

Garnier G., Bezanger-Beauquesne L., Debraux G., 1961. Ressources Médicinales de la Flore Française, Tome II. Ed Vigot Freres, Paris.

Gonzalez-Trujano ME., Pena EI., Martinez AL., Moreno J., Guevara-Fefer P., Deciga-Campos M., Lopez-Munoz FJ., 2007. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol.* **111**: 476-482.

Gopal Rao G., 1999. Risk Factors for the Spread of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Drugs*. **55**: 323-330.

Grundmann H., Aires-de-Sousa M., Boyce J., Tiemersma E., 2006. Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *The Lancet*. **368**: 874–885.

Gueye PM., 2007. Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-erythrocytaire sur le globule rouge .Thèse de Doctorat de l'Université Louis Pasteur Strosbourg. 247p.

Guinochet T., 1973. Phytosociologie, Ed. Masson, France, 227p.

Guinoiseau E., 2010. Molécules, antibactérienne issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, option : Biochimie- Biologie moléculaire, France. 50p.

Gulcin I., Mshvildadze V., Gepdiremen A. and Elias R., 2003. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F. *Planta Med.* **70**: 561-563.

H

Haddouchi F., Lazouni HA., Meziane A., Benmansour A., 2009. Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique SCIENCE*. **05(2)**: 246 – 259.

Hadj Khelifa L., Brada M., Brahmi F., Achour D., Fauconnier ML. and Lognay G., 2012. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil of *Ocimum basilicum* Leaves from the Northern Region of Algeria. *Topclass Journal of Herbal Medicine*. **1(2)**: 53-58.

Hammer KA., Carson CF., Riley TV., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 985–990.

Haton C., 2005. Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, France. 43p.

Hinneburg I., Dorman HJG. and Hiltunen, R., 2006. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.* **97**: 122-129.

Hiltunen R. and Holm Y., 1999. *Basil: The Genus Ocimum*. Harwood Academic publishers, Amsterdam, The Netherlands. 182 p.

Hosni K., Hassen I., Chaâbane H., Jemli M., Dallali S., Sebei H., 2013. Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Ind. Crop Prod.* **47**: 291–299.

Hossain MA., Kabir MJ., Salehuddin SM., Rahman SM., Das AK., Singha SK., 2010. Antibacterial properties of essential oils and methanol extracts of sweet basil *O.basilicum* occurring in Bangladesh. *Pharm. Biol.* **48**: 504–511.

Hussain AI., Anwar F., Sherazi STH. and Przybylski R., 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem.* **108**: 986-995.

Hussain AI., 2009. Characterization and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae. Thèse de Doctorat. Pakistan. 257p.

Hussain AI., Anwar F., Chatha SAS., Jabbar A., Mahboob S. and Nigam PS., 2010. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology.* **41**: 1070-1078.

I

Ijaz Hussain A., Anwar F., Iqbal T., and Bhatti IA., 2011. Antioxidant attributes of four *lamiaceae* essential oils. *Pak. J. Bot.* **43(2)**: 1315-1321.

Inouye S., Takazawa T. and 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.

Iserin P., 2001. Encyclopédie des plantes médicinales, Tome 2. Ed. Larousse. Londres. 143-225-226p.

J

Jiang Y., Wua N., Fua YJ., Wang W., Luo , M., Zhaoa CJ., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environ. Toxicol.Pharmacol.* **32**: 63–68.

Johansen, C., Verheul Gram, L., Abee, T., 1997. Protamine-induced permeabilization of cell envelopes of Gram-positive and Gram- negative Bacteria. *App. Env. Micobio.* **63**: 1155-1159.

Jordán MJ., Lax V., Rota MC., Lorán S., Sotomayor JÁ., 2013. Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Control.* **30**: 463–468.

Joyeux M., Rolland A., Fleurentin J., Mortler F., Dorfman P., 1990. *tert*-butylhydroperoxide- induced injury in isolated rat hepatocytes: a model for studying antihepatotoxic crude drugs. *Planta Med.* **56**: 171-4.

Jung T., Bader N., Grune T., 2007. Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **462**: 231-237.

K

Kadri A., Zarai Z., Chobba B., Bekir A., Gharsallah N., Damak M. and Gadoura R., 2011. Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from south-western of Tunisia. *J. Med. Plants Res.* **5(29)**: 6502-6508.

Kang HW., Yu KW., Jun WJ., Chang IS., Han SB., Kim HY., Cho HY., 2002. Isolation and characterization of alkyl peroxy radical scavenging compound from leaves of *Laurus nobilis*. *Biol Pharm Bull.* **25**: 102-108.

Kartal N., Sokmen M., T epe B., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A., 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry.* **100**: 584–589.

Kheyer N., Meridja D., Belhamel K., 2014. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia. *Algerian Journal of Natural Products.* **2(1)**: 18-26.

Khosravi AR., Shokri H., Farahnejat Z., Chalangari R., Katalin M., 2013. Antimycotic efficacy of Iranian medicinal plants towards dermatophytes obtained from patients with dermatophytosis. *Chin. J. Nat. Med.* **11**: 43–48.

Kivanc M., Akgul A., 1986. Antibacterial activities of essential oils from Turkish spices and citrus. *Flavour Fragr. J.* **1(4)**:175-179.

Kivcak B., Mert T., 2002. Preliminary evaluation of cytotoxic properties of *Laurus nobilis* L. leaf extracts. *Fitoterapia.* **73**: 242-243.

Knobloch, K.A., Pauli, B., Iberl, H., Weigand, N., Weis. 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. of Ess. Oil Res.* **1**: 119-123.

Koehlin-Ramonatxo C., 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme.* **20**: 165–177.

Kohen R., Nyska A., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology.* **30**: 620-650.

Koudjéga 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, 96p.

Koutsoudaki C., Krsek M., Rodger A., 2005. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **53**: 7681-7685.

Kurita, N., myaji, M., kurane, R., Takahara, Y., Ichimara, K., 1979. Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds rom oils of higher plants. *Agric. Boil. Chem.* **43**: 2365-2371

Kurita, N., Koike, S., 1982. Synergetic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components. *Agric. Bil. Chem.* **46**: 159-165.

L

Laib I., 2010. Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs séchées de *Lavandula Officinalis* sur les moisissures des légumes secs. Mémoire de Magister. Option : Technologie alimentaire. Université Mentouri Constantine.

Lehucher-Michel MP., Lesgards JF., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., 2001. Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale.* **30**: 1076-1081.

Leung AY. and Foster S., 1996. *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Lograda T., Ramdani M., Chalard P., Figueredo G., 2014. Characteristics of essential oils of *Rosmarinus officinalis* from eastern Algeria. *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine.* **2**: 794-807.

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.

M

Madhavi DL., Deshpande SS. & Salunkhe DK., 1996. Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc. New York. 65p.

Malik MS., Sattar A., Khan SA., 1989. The fatty acids of indigenous resources from possible industrial applications. Part XVII: The fatty acid composition of the fixed oils of *Ocimum basilicum* and *Ocimum album* seeds. *Pakistan J Set Ind Res.* **32**: 207–208.

Maisuthisakul P., Suttajit M., Pongsawatmanit R., 2007. Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chem.* **100**:1409-1418.

Mann CM., Cox SD., Markham JL., 2000. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett Appl Microbiol.* **30**: 294-297.

Marin M., Koko V., Duletić-Laušević S., Marin P.D., Rančić D. et Dajicstevanovic Z., 2006 . Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and histochemistry. *S.African J. Botany.* **72**: 378 – 382.

Marzouki H.,Khaldi A.,Chamli R., Bouzid S., Piras A., Falconieri D.,Marongiu B., 2009. Biological activity evaluation of the oils from *Laurus nobilis* of Tunisia and Algeria extracted by supercritical carbon dioxide. *Natural Product Research.* **23**: 230-237.

Mason TL. and Wasserman BP., 1987. Inactivation of red beet beta-glucan synthesis by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry.* **26**: 2197-2202.

Mediouni Ben Jemâa J., Tersim N., Taleb Toudert K., Larbi Khouja M., 2012. Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition. *Journal of Stored Products Research.* **48**: 97-104.

Meziti A, 2009. Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L Étude *in vitro* et *in vivo*. Mémoire de magister en biochimie appliquée option : Molécules Bioactives. Université EL-HAJ LAKHDAR, Batna. 18p.

Michel T., 2011. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Thèse pour l'obtention du grade de : Docteur de l'université d'Orléans. Discipline : Chimie Analytique – Phytochimie. France. 181-182p.

Miladi H., Ben Slama R., Mili D., Zouari S., Bakhrouf A., Ammar E., 2013. Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Natural Science.* **5(6)**: 729-739.

Moghaddam AMD., Shayegh J., Mikaili P. and Sharaf JD., 2011. Antimicrobial activity of essential oil extract of *Ocimum basilicum* L. leaves on a variety of pathogenic bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research.* **5(15)**: 3453-3456.

Moghtader M. and Farahmand A., 2013. Evaluation of the antibacterial effects of essential oil from the leaves of *Laurus nobilis* L. in Kerman Province. *Journal of Microbiology and Antimicrobials.* **5(2)**: 13-17.

Molyneux P., 2004. The use of the stable free radical diphenyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of science technology.* **26(2)**: 211-219.

Moretti M.D.L., Sanna-Passino G., Demontis S. Bazzoni E., 2002. Essential Oil Formulations Useful as a New Tool for Insect Pest. *Pharm. Sci. Control Tech.* **3**: 13-2.

Myose M. et Paris R., 1976 Précis de matières médicales. Ed Masson. 161-162p.

N

Narishetty STK., Panchagnula R., 2004. Transdermal Delivery of Zidovudine: Effects of Terpenes and Their Mechanism of Action. *Journal of Controlled Release*. **95**: 367-379.

Nehir El S., Karagozlu N., Karakaya S. and Sahm S., 2014. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils Extracted from *Laurus nobilis* L. Leaves by Using Solvent-Free Microwave and Hydrodistillation. *Food and Nutrition Science*. **5**: 97-106.

Ngameni B., Kuete V., Simo IK., Mbaveng AT., Awoussong PK., Patnam R., Roy R., Ngadjui BT., (2009). Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae). *S. Afr. J. Bot.* **75**: 256–261.

Nikaido H., 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **67(4)**: 593-656.

O

Oulmouhoub S., 2002. Contribution à l'étude des subéraies de la région d'El Kala : dynamique post-incendie des successions végétales et leurs biodiversités. Mémoire de Magister. INA. Alger. 88 p.

Oyaizu M., 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap. J. Nutr.* **44**: 307-315.

Oyedeji OA., Adeniyi BA., Ajayi O. and Konig WA., 2005. Essential oil composition of *Piper guineense* and its antimicrobial activity. Another chemotype from Nigeria. *Phytotherapy Research*. **19**: 326-364.

Ozcan M., Chalchat J., 2005. Effect of different locations on the chemical composition of essential oils of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves growing wild in Turkey. *Journal of Medicinal Food*. **8**: 408-411.

Ozcan B., Esen M., Sangun MK., Coleri A. and Caliskan M., 2010. Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil. *Journal of Environmental Biology*. **31**: 637-641.

P

Pariente L., 2001. Dictionnaire des sciences pharmaceutiques et biologiques. 2ème Ed Académie nationale de pharmacie. Paris. 1643p.

Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., Chessa M., Cerri R. and Casanova J., 2002. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*. **17**: 15-19.

Politeo O., Jukic M., Milos M., 2007. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry*. **101**: 379–385.

Prior RL., Wu X. and Schaich K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53(10)**: 4290-4302.

Q

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

Quezel P. et Santa, S., 1963. La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II. Ed CNRS. Paris. 360-361 p.

R

Ramos C., Teixeira B., Batista I., Matos O., Serrano C., Neng N.R., Nogueira JMF., Nunes ML., & Marques M., 2012. Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay leave *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. *Natural Product Research*. **6**: 518-529.

Roginsky V. and Lissi EA., 2005. Review of method to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*. **92**: 235-254.

Ruberto G., Baratta MT., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem*. **69**: 167-174.

S

Sanchez-Moreno 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.

Santoyo S., Lioria R., Jaime L., Ibanez E., Senorans FJ. and Reglero G., 2006. Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis* L. Chemical and functional characterization. *European Food Res. Technol*. **224**: 75–81.

Sartoratotto A., Machado ALM., Delarmelina C., Figueira GM., Duarte MCT., Rehder VLG., 2006. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. **35**: 275-280.

Schauenberg O. and Paris F., 1977. Guide to Medicinal Plants. Keats, New Canaan, CT.

Serrano E., Palma J., Tinoco T., Venancio F., Martins A., 2002. Evaluation of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from different zones of "Alentejo" (Portugal). *Journal of Essential Oil Research*. **14**(2): 87-92.

Shan B., Cai YZ., Brooks JD. and Corke H., 2007. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int. J. Food Microbiol.* **117**: 112-119.

Sharma S., Sangwan NS. et Sangwan RS., 2003 : Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current sci.* **84** : 544 – 550.

Shon MY., Kim TH., Sung NJ., 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (Phellinus of Hymenochaetaceae) extracts. *Food Chem.* **82**: 593-597.

Sienkiewicz M., Lysakowska M., Pastuszka M., Bienias W., Kowalczyk E., 2013. The Potential of Use Basil and Rosemary Essential Oils as Effective Antibacterial Agents. *Molecules.* **18**: 9334-9351.

Simic M., Kundakovic T., Kovacevic N., 2003. Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitoterapia.* **74**: 613-616.

Simon JE., Quinn J., Murray RG., 1999. Basil: a source of essential oils. In: Janick, J., Simon, J.E. (Eds.), *Advanced in New Crops*. Timber Press, Portland. 484-489p.

Singh G. and Marimuthu P., 2006. Antioxidant and Biocidal Activities of *Carum nigrum* (Seed) Essential Oil, Oleoresin, and Their Selected Components. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 174-181.

Sivropoulou A., Nikolaou C., Papanikolaou E., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M., 1997. Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 3197-3201.

Skandamis PN. and Nychas GJE., 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *J. Applied Microbiol.* **91**: 1011-1022.

Sokovic M., Griensven LJLDV., 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.

Spichiger RE., Savolainen VV., Figeat M., Jeanmonod D., 2002. Botanique systématique des plantes à fleurs. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes. 413p.

Suppakul P., Miltz J., Sonneveld K., Bigger SW., 2003. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *J. Arg. Food Chem.* **51**: 3197-3207.

T

Telci I., Bayram E., Yilmaz G., Avci B., 2006. Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). *Biochem. Syst. Ecol.* **34**: 489–497.

Tepe B., Donmez E., Unlu M., Candan F., Daferera D., Vardar-Unlu G., Polissiou M. and Sokmen A., 2004. Antibacterial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* p (Vahl). *Food Chemistry.* **84**: 519-525.

Tepe B., Sokmen M., Akpulat HA., Sokmen A., 2006. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem.,* **95**: 200-204.

Touafek O., Nacer A., Kabouche A., Kabouche Z., and Bruneau C., 2004. Chemical composition of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* cultivated in the Algerian Sahara. *Chemistry of Natural Compounds.* **40(1)**: 28-29.

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.

U

Usman LA., Ismaeel RO., Zubair MF., Saliu BK., Olawore NO., 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.

V

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin MTD., Mazur M., Telser J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell.* **39**: 44-84.

Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact.* **160**: 1–40

Van Vuuren SF., Suliman S., Viljoen AM., 2009. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett.Appl. Microbiol.* **48**: 440–446.

Viorica H., 1987. Polyphenols of *Ocimum basilicum* L. *Chujul Med.* **60**: 340-344.

Vernin G., Metzger J., 1984. Analysis of basil oils by GC/MS data bank. *Perfum. Flavor.* **9**: 71-86.

Vetvicka V. et Matousova V., 1991. Arbres et Arbustes: 256 illustrations en couleurs. Ed GRÜND. 112p.

W

Wang W., Wu N., Zu YG. and Fu YJ., 2008. Antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis* L oil compared to its main compounds. *Food chemistry.* **108** (3): 1019-1022.

Wannissorn B., Jarikasem S., Siriwangchai T., Thubthimthed S., 2005. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia.* **76**: 233-236.

Wagner G.J., Wang E. et Shepherd RW., 2004. New Approaches for Studying and Exploiting an Old Protuberance, the Plant Trichome. *Ann. Bota.* Vol. 93 N°1, pp : 3-11.

Wendakoon, 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.

Wilkinson JM., Hipwell M., Ryan T., and Cavanagh HMA., 2003. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **51**:76-81.

Y

Yi Z., Yu Y., Liang Y., and Zeng B., 2008. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT.*, **41**, 597-603.

Z

Zeraia L., 1983. Liste et localisation des espèces assez rares, rares et rarissimes. I.N.F. Alger. 136 p.

Zhiri A., Baudoux D., Breda ML., 2005. Huile essentielles chémotypées et leurs synergies. Ed. Inspir développement. 46p.

Full Length Research Paper

Evaluation of antibacterial activity of *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L. from Northeast of Algeria

A. Ouibrahim^{1*}, Y. Tlili-Ait-kaki², S. Bennadja^{2,3}, S. Amrouni⁴, A. G. Djahoudi⁴ and M. R. Djebar¹

¹Laboratory of Cellular Toxicology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University of Annaba, 23000, B.P. 12, Algeria.

²Laboratory of Medical Botany, Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, Badji Mokhtar University of Annaba, 23000, B.P. 12, Algeria.

³Laboratory of Biochemistry and environment Toxicology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University of Annaba, 23000, B.P. 12, Algeria.

⁴Laboratory of Microbiology, Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, Badji Mokhtar University of Annaba, 23000, B. P. 12, Algeria.

Accepted 25 June, 2013

Rosmarinus officinalis L., *Laurus nobilis* L. and *Ocimum basilicum* L. are widespread herbs in Algeria. The essential oils of the three species were extracted from leaves by hydrodistillation. The yields were respectively 0.36, 0.6 and 0.71%. The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of these essential oils against twenty bacterial strains: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA ATCC 31 (*Méthicilino*), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus avium*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* OMA 04, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* sp., *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. and *Providencia alcalifaciens*. The essential oils were used in different concentrations. The diffusion tests on solid medium were efficient in all tested bacterial strains except *Pseudomonas aeruginosa*. The activity was more pronounced with the essential oil of Laurel. Indeed, the results of diffusion tests showed zones of inhibition as follows: Laurel, 8.4 to 22.4 mm; Rosemary, 8.4 to 16.4 mm and Basil, 7 to 19.9 mm. This study shows bacteriostatic effect of the three oils on all tested bacteria. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the dilution on solid medium method.

Key words: *Rosmarinus officinalis* L., *Laurus nobilis* L., *Ocimum basilicum* L., essential oils, antibacterial activity, minimum inhibitory concentration (MIC), Algeria.

INTRODUCTION

In recent years, multiple antibiotic resistances of pathogenic bacteria have been exacerbated by the excessive and inappropriate use of commercial antimicrobial drugs commonly used in the treatment of

infectious diseases (Davis, 1994; Service, 1995). Renewed interest has grown in medicinal plants to counter resistance and find an alternative to antibiotics (Kalemba and Kunika, 2003; Juliani and Simson, 2002;

*Corresponding author. E-mail: Ouibrahim_amira@hotmail.com.

Falerio et al, 2003).

Medicinal plants contain many phytochemicals components such as flavonoids, alkaloids, tannins and essential oils. Among these plants, *Rosmarinus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Laurus nobilis* are widespread in the Mediterranean Basin (Quezel and Santa, 1963).

The three plants were harvested in El Kala National Park ranked Biosphere Reserve by UNESCO in 1990. Its area is 76,438 Ha (Aouadi, 1989). It has a rich flora of about 850 species (De Belair, 1990) and characterized by a sub-humid Mediterranean climate.

Ocimum basilicum and *Rosmarinus officinalis* belong to Lamiaceae that include the most commonly used medicinal plants in the world as a spice and as a source of extract with strong antibacterial and antioxidant properties.

Rosemary is a shrub (Atik Bekkara et al., 2007), with 0.8 to 2m height (Trujano-Gonzalez et al., 2007) and rich in essential oils (1 to 2.5%). It has three chemotypes: cineol, camphor and verbenone (Santoyo et al., 2005; Graven et al., 1992); it contains also triterpene derivatives (2-4%), flavonoids, tannins and saponins.

Basilicum Ocimum (Basil) is an aromatic plant (20 to 60 cm high), used as antispasmodic, aromatic, carminative, digestive, galactagogue, stomachic and tonic (Chiej, 1984; Lust, 1983; Duke and Ayensu, 1985). It contains 0.4 to 0.7% of essential oil, phenolic acids like rosmarinic acid, lithospermic acid B, vanillic acid, hydroxybenzoic acid, syringic acid, ferulic acid, protocatechuic acid, caffeic acid and gentisic acid, chicoric acid (Bais et al., 2002; Lee and Scagel, 2010); flavonoids and tannins (Grayer et al., 1996); cinnamic acid ester, triterpenoids and steroidal glycosides (Siddiqui et al., 2007).

Laurus nobilis belongs to Lauraceae. This aromatic tree is 2 m to 10 m high, it contains about 1.3% essential oils and polar flavonoids mono and sesquiterpenes (Novák, 1985; Appendino et al., 1992; Dall'Acqua et al., 2006), alkaloids (Kivçak and Mert, 2002), glycosylated flavonoids (Fiorini et al., 1998) and megastigmane and phenolic components (De Marino et al., 2004). It is known to have various pharmacological effects, including antimicrobial (Fraga, 2003), cytotoxic (Barla et al., 2007) and immune modulating (Park et al., 1996) activities.

The aim of this work was to evaluate the antibacterial activity of essential oils of these three plants against 20 bacterial strains: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSAATCC 31 (*Méthicilino*), *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus avium*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* OMA 04, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* sp., *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. and *Providencia alcalifaciens*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The leaves of *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L. were collected in April 2012 at El Kala National Park located at latitude 36° 52' north and longitude 8° 27' East. Laurel is spontaneous in the park; however, Basil and Rosemary are cultivated. The plants were dried in the shade in order to preserve the integrity of their molecules.

Extraction of essential oils

The extraction of essential oils was carried out by hydro-distillation using Likens Nickerson apparatus for 2 h. We introduced 100 g of dry leaves in a flask filled with 3/4 distilled water and then heated to boil. The water and oil are separated during the condensation of vapour loaded onto the oils (Chiej, 1984). Essential oils have been recovered in small opaque bottles and kept away from light, at a temperature of 4°C. The yield was expressed in percentage.

Evaluation of antibacterial activity

Bacterial strains

The bacterial strains tested were provided by the Laboratory of Medical Microbiology, Faculty of Medicine Annaba. They are: Gram-positive *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSAATCC 31 (*Méthicilino*), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus avium*.

Gram-negative *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* OMA 04, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* sp., *Citrobacter Freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp *Providencia alcalifaciens*. The bacterial strains were maintained and grown in a nutrient agar medium.

Disk diffusion method

The antibacterial activity was tested using the disk diffusion method (Davis, 1994). Bacterial cultures were reactivated by sub culturing on nutrient agar and incubated for 24 h at 37°C. From these, pure cultures were prepared by releasing bacterial inoculum strains in physiological water. The homogeneous suspension was equivalent to 0.5 Mc Farland, so an OD of 0.08 to 0.10 was read at 625 nm.

Each essential oil was used at different concentrations: pure oil, diluted oil in DMSO (Dimethyl sulfoxide) to ratio 1/2, 1/4 and 1/8. Discs of 6 mm in diameter, previously sterilized, were used. 10 µl of essential oils was put on each disc and placed on agar. A witness disc (soaked in DMSO) was incubated under the same conditions to ensure that DMSO was devoid of antibacterial activity.

After incubation for 24 h in an oven at 37°C, reading was done. The effect of essential oils on bacteria was estimated by the appearance of clear zones around the discs. The diameter of the halo of growth inhibition was measured and expressed in mm (including the diameter of the disc of 6 mm).

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The minimum inhibitory concentration (MIC) is the smallest concentration of essential oil, in which no growth is visible compared to the control without extract. It was evaluated on twelve tested strains by disc diffusion test. We used the dilution method on solid medium (incorporation) (Billerbeck et al., 2002; Marino et al.,

2001).

Serial dilutions of essential oils were performed with DMSO for 2 h. Each dilution was incorporated into *Mueller-Hinton* medium, maintained, super cooled and poured into Petri dishes. The concentrations (in percent), of essential oils used are respectively: 1, 0.5, 0.25, 0.01, 0.125, 0.06 and 0.03. Witness discs containing culture medium and only DMSO were also prepared.

Seeding was done as a deposit of bacterial suspension. After incubation at 35°C for six days, the growth was compared to the control.

RESULTS AND DISCUSSION

Essential oil yield

The yields of essential oils from the dry matter of *Rosmarinus officinalis* L., *Laurus nobilis* L. and *Ocimum basilicum* L. were respectively 0.36, 0.6 and 0.71%. These results are lower than those found in other regions of Algeria. The yield of Rosemary in Algiers found by Djeddi (2007) was 0.82% and Laurel in Tlemcen was 1.2% (Haddouchi et al., 2009). These differences may result from the high moisture that characterizes the study's area; because it is known that maximum yields are obtained by dry weather. Concerning Basil, the yield obtained is normal because it develops in its natural habitat. Harvesting for the three plants was conducted during the vegetative stage, which has generated a relatively low yield (Bruneton, 1993).

Antibiotic activity

The antibacterial activity of the three essential oils and MIC values are grouped in Tables 1 and 2.

All organisms are sensitive to the three oils except *P. aeruginosa* (Gram negative) which is more and more responsible for nosocomial infections. It has an intrinsic resistance to a wide range of antibiotics (April et al., 1992) and also to essential oils. This resistance is due to the impermeability of the wall of this bacterium (Djeddi et al., 2007; Dorman and Deans, 2000; Duke and Ayensu, 1985).

The essential oil of *L. nobilis* L. has demonstrated a strong activity on the majority of tested strains; the highest sensitivity was in *Enterobacter* sp. that has an inhibition diameter of 22.4 mm, 16.8 mm pure oil and 1/8 dilution. The most resistant strain was *P. aeruginosa*. These results are in concord with those of Dadalioglu and Evrendilek (2004). 1,8 cineole has a part in this activity since it has antimicrobial activity against several strains such as *E. coli*, *P. aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* (Sivropoulou et al., 1997).

The synergy between terpenes (linalool), lactones, oxides (1, 8 cineole) and monoterpenes (camphene, alpha-pinene) gives to the essential oil of Laurel a good antibacterial activity. The MIC equals 2.72 (10³ micrograms/ml) except in *E. faecalis* ATCC 2921, *S. aureus*,

S. epidermidis, *P. mirabilis* and *S. marcescens* where it was 1.36 (10³ micrograms / ml).

The essential oil of *Rosmarinus officinalis* also has an inhibitory power. The most sensitive strain is *Shigella* sp. (16.4 mm and 11.3 mm). The MIC values are quite high, ranging from 3.43 (10³ mg / ml) in *E. faecalis* ATCC 29212, *S. Aureus*, *S. Epidermidis*, *E. coli* ATCC 25922 *Proteus mirabilis*, *C. freundii*, *S. marcescens* and *Shigella* sp. to 6.85 (10³ mg / ml) in *Salmonella* OMA 04 *Enterobacter* sp., *A. baumannii* and *M.R.S.A* ATCC31.

Our results are in agreement with those found by other authors such as Santoyo et al. (2005), Faleiro et al. (2003) and Gachka (2007) Fiorini et al. (1998) with respect to the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* against this oil. Celikta (2007) found a moderate activity against *E. faecalis* and *Proteus* sp., however Jiang et al. (2011) obtained pronounced antibacterial activity.

Santoyo et al. (2005) and Graven (1992) attributed the antimicrobial properties of the essential oil of *R. officinalis* to the presence of α -pinene, 1,8-cineol, borneol and camphor. Even minor components have a significant contribution to the antibiotic activity (Wang et al., 2012).

Finally, with the essential oil of *Ocimum basilicum*, we found good inhibition zones. The most sensitive bacterial strain (*Shigella* sp.) presented an inhibition diameter ranging between 12.2 mm and 19.9 mm.

Suppakul et al. (2003) reported, also, that Basil has good antimicrobial activity against a wide range of microorganisms. This activity is due in part to the presence of linalool (Koutsoudaki et al., 2005; Sartoratotto et al., 2004; Sokovic and Van Griensven, 2006; Suppakul et al., 2003). The MIC is equal to 9.5 (10³ mg/ml).

This study shows that Gram negative bacteria and Gram positive bacteria are both sensitive to the three essential oils.

It is known that Gram negative bacteria are more resistant to essential oils than Gram positive bacteria (Loópez et al., 2005; Marino et al., 2001). This resistance is due to the nature of these group of cellular membranes of bacteria, because their external structures make them to have highly hydrophobic surfaces (Smith-Palmer et al., 1998). One important characteristic of essential oils and their components is their hydrophobicity, which allows them to partition the lipids of the bacterial cell membrane and mitochondria, disturbing the cell structures and making them more permeable (Sikkema et al., 1994).

Dorman and Deans (2000) indicate that the antimicrobial activity depends, not only, on the chemical composition of the essential oil, but also on lipophilic properties and power of functional groups or aqueous solubility. The mixture of compounds with different biochemical properties can improve the effectiveness of essential oils.

Conclusion

R. officinalis L., *Laurus nobilis* L. and *O. basilicum* L. are

Table 1. Diameter of inhibition of essential oils against the bacterial strains (mm).

Bacterial strain	<i>Laurus nobilis</i> L				<i>Rosmarinus officinalis</i> L				<i>Ocimum basilicum</i> L			
	B	1/2	1/4	1/8	B	1/2	1/4	1/8	B	1/2	1/4	1/8
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	12.5	11.3	11.3	11.1	11.3	10.3	12.5	9.6	9.4	9.4	11.2	11
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	15	9.1	8.3	7.4	14	12.4	8.7	8.4	9.75	9.7	9.5	9
<i>M.R.S.A</i> ATCC 31	17.6	13.3	9.5	9.3	14.3	11.4	11.2	11	13.5	12.2	11.2	10.1
<i>S. aureus</i>	15.6	12.6	10.3	9.9	12.9	11.5	10.7	10.1	16	14.5	13.5	11.1
<i>S. epidermidis</i>	13.1	12	8.4	8.2	12.7	10.8	10.8	10.6	12.9	13.3	10.8	9.4
<i>Enterococcus avium</i>	12.8	12.1	10.7	10.3	10.4	8.2	8.1	8.1	10.2	10.1	9.4	9
<i>E. coli</i> ATCC 25922	15.9	12.05	11.85	11.75	13.5	10.2	10.3	8.9	13.8	13.5	11	10.7
<i>Salmonella</i> OMA 04	14	11.2	9.1	/	11.5	9.8	9.8	9	12	9.8	9.2	8.9
<i>E. coli</i>	14.1	11.5	11.3	11	15.9	12.15	11.45	11	11.8	10.65	9.05	9
<i>Klebsiella oxytoca</i>	18	13.05	13.35	11.2	11	13.25	11.6	8.85	10	10.2	9.45	8.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17.6	15.6	13.7	13	12	11.6	11.3	10.8	18.8	17.2	13.3	10.1
<i>Proteus mirabilis</i>	16.25	12.6	11.45	10.7	11.1	9.2	12.9	9.8	12.6	11	13.1	11.3
<i>Enterobacter</i> sp.	22.4	22	20.4	16.8	12.7	11	9.4	9	13.6	13.1	13	11.3
<i>Citrobacter Freundii</i>	15	14.3	13.1	12.2	8.7	8.3	8.2	8.2	8.4	8.2	7.3	7
<i>P. aeruginosa</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Acinetobacter baumannii</i>	16.8	16	14.1	12.5	9.2	9.1	9.1	9	14.5	11.3	9.5	9.4
<i>Serratia marcescens</i>	16.4	12.1	11.8	10.3	11.5	9.3	8.9	8.4	12	10.4	9.2	8.7
<i>Salmonella</i> sp.	17.1	14.1	11.5	10.8	12.5	11.6	11.4	10.4	15.3	10.8	10.7	10.1
<i>Shigella</i> sp.	21.1	19.3	18.4	16.3	16.4	14.3	12.6	11.3	19.9	13.7	12.4	12.2
<i>Providencia alcalifaciens</i>	16.2	14.4	13.2	11.1	11.4	10.5	10.2	10.1	16	12.1	11.3	9.8

Table 2. Activity of essential oils incorporated in the solid medium (MIC).

Percentage Extract (H.E)	1%			0.5%			0.25%			0.125%		
	B	R	L	B	R	L	B	R	L	B	R	L
Concentration (10 ³ µg/ml)	9.5	6.85	5.4	4.95	3.43	2.72	2.47	1.71	1.36	1.23	0.85	0.68
Gram positive												
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
<i>M.R.S.A</i> ATCC 31	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Gram negative												
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> OMA 04	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>Citrobacter Freundii</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Shigella</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+

-: No culture; +: presence of culture

widespread herbs in Algeria. The samples used have been harvested in the National Park of El Kala where Basil and Rosemary are cultivated and Laurel is spontaneous. The essential oils from leaves of Rosemary, Laurel and Basil were extracted by hydro-distillation using Likens Nickerson apparatus for 2 h.

The aim of this study was to evaluate the three essential oils against 20 bacterial strains. For 12 strains we have determined the minimum inhibitory concentration (MIC). The three oils showed good antibacterial activity against both Gram negative and Gram positive bacteria. Laurel oil is the most efficient, *Shigella* sp. has

the highest sensitivity to the three oils and *Pseudomonas aeruginosa* is the most resistant to them. Among the three oils, Laurel gives the lowest MIC against *E. faecalis* ATCC 29212, *Enterobacter* sp., *Shigella* sp., *S. aureus* and *S. Epermidis* (0.25%).

REFERENCES

- Aouadi H (1989). La Végétation de l'Algérie Nord-orientale: Histoire des Influences Anthropiques, et Cartographie à 1/200 000. Ph.D. Thesis. Univ. Joseph Fourier, Grenoble 1: Sciences, Technologie, Médecine.
- Appendino G, Tagliapietra S, Nano GM, Cisero M (1992). A sesquiterpene alcohol from the fruits of *Laurus nobilis*. *Phytochemistry* 31:2537-2538.
- Atik Bekkara F, Bousmaha L, Taleb Bendiab SA, Boti JB, Casanova J (2007). Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie Santé* 7(1):6-11.
- Bais HV, Walker TS, Schweizer HP, Vivanco JM (2002). Root specific elicitation and antimicrobial activity of Rosmarinic acid in rainy root cultures of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Plant Physiol. Biol. Chem.* 40:983-995.
- Barla A, Topçu G, Öksüz S, Tümen G, Kingston DGI (2007). Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis* L. *Food Chem.* 104:1478-1484.
- Billerbeck VG, Roques C, Vanière P, Marquier P (2002). Activité antibactérienne et antifongique des produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes X-n°3:248-251*.
- Bruneton J (1993). Pharmacognosy. *Phytochemistry. Plants médicinales*. 2ème edition TEC & DOC-Lavoisier.Paris. 406-417.
- Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser KHC (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry* 100:553-559.
- Chiej R (1984). *Encyclopaedia of Medicinal Plants*. MacDonald. ISBN 0-356-10541-5, Little, Brown.
- Dadalioglu I, Evrendilek GA (2004). Chemical composition and antibacterial effect of essential oils of Turkish Oregano (*Origanum minutifolium*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum vulgare*), on common Foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 52:8255-8260.
- Dall'Acqua S, Viola G, Giorgetti M, Loi MC, Innocenti G (2006). Two new sesquiterpene lactones from the leaves of *Laurus nobilis*. *Chem. Pharm. Bull.* 54:1187-1189.
- Davis J (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264:375 - 382.
- De Belair G (1990). Structure, fonctionnement et perspective de gestion de quatre ecocomplexes lacustres et marécageux (El Kala Est Algérien). Ph.D. Thesis. Univ. Sci. Tech. Languedoc. Montpellier.
- De Marino S, Borbone N, Zollo F, Lanaro A, Di Meglio P, Iorizzi M (2004). Megastigmane and phenolic components from *Laurus nobilis* L. leaves and their inhibitory effects on nitric oxide production. *J. Agric. Food Chem.* 52:7525-7531.
- Djeddi S, Bouchenah N, Settar I, Skaltsa HD (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chem. Natural Comp.* 43(4):487-490.
- Dorman HJD, Deans SG (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88:308-316.
- Duke JA, Ayensu ES (1985). *Medicinal Plants of China*. Reference Publications. Inc. ISBN 0-917256-20-4. Reference Publications, Algonac, MI (USA).
- Faleiro ML, Miguel MG, Ladeiro F, Venâncio F, Tavares R, Brito JC, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 36:35-40.
- Fiorini C, David B, Fouraste I, Vercauteren J (1998). Acylated kaempferol glycosides from *Laurus nobilis* leaves. *Phytochemistry* 47:821-824.
- Fraga BM (2003). Natural sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 20:392-413.
- Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. *Food Chemistry* 102:898-904.
- Garcia R, Alves ES, Santos MP, Viégas Aquije GMF, Fernandes AAR, Santos RB, Ventura JA, Fernandes PMB (2008). Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. *Braz. J. Microbiol.* 39:163-168.
- Graven EH, Deans SG, Svoboda K, Mavi S, Gundidza MG (1992). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Artemisia afra*. *Flav Fragra J.* 7:121-123.
- Grayer RJ, Bryan SE, Veitch NC, Goldstone FJ, Paton A, Wollenweber E (1996). External flavones in sweet basil *Ocimum basilicum*, and related taxa. *Phytochemistry* 43:1041-1047.
- Haddouchi F, Lazouni HA, Meziane A, Benmansour A (2009). Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique SCIENCE* 05(2):246 - 259.
- Jiang Y, Wu N, Fu YJ, Wang W, Luo M, Zhao CH, Zu YG, Lio XL (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 1417:6.
- Juliani HR, Simon JE (2002). Antioxidant Activity of Basil. *Trends in new crops and new uses*. J. Janick and A. Whipkey (eds.). ASHS Press, Alexandria, VA. pp. 575-579.
- Kalamba D, Kunicka A (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10:813-829.
- Kivcak B, Mert T (2002). Preliminary evaluation of cytotoxic properties of *Laurus nobilis* L. leaf extracts. *Fitoterapia* 73:242-243.
- 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.
- Lee J, Scagel CF (2010). Chicoric acid levels in commercial basil (*Ocimum basilicum*) and *Echinacea purpurea* products. *J. Functional Foods* 2:77-84.
- Loápez P, Saánchez C, Battle R, Nerián C (2005). Solid- and Vapor-Phase Antimicrobial Activities of Six Essential Oils: Susceptibility of Selected Foodborne Bacterial and Fungal Strains. *J. Agric. Food Chem.* 53(17):6939-6946.
- Lust J (1983). *The Herb Book*. Bantam books:ISBN 0-553-23827-2, New York.
- Marino M, Bersani C, Comi G (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int. J. Food Microbiol.* 67:187-195.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2002). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests of bacteria that grow aerobically. Approved Standard M100-S12. Wayne, PA, NCCLS.
- Novák M (1985). A monoterpene alcohol from *Laurus nobilis*. *Phytochemistry* 24:858.
- Park HJ, Jung WT, Basnet P, Kadota S, Namba T (1996). Syringin 4-O-bglucoside, a new phenylpropanoid glycoside, and costunolide, a nitric oxide synthase inhibitor, from the stem bark of *Magnolia sieboldii*. *J. Nat. Prod.* 59:1128-1130.
- Quezel P, Santa S (1963). New flora of Algeria and southern desert regions. Edition. Natl. Centre Sci. Res. 2:276.
- Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibanez E, Senorans FJ, Reglero G (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *J. Food Protect.* 68 (4):790-795.
- Sartoratotto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 35:275-280.
- Service RF (1995). Antibiotics that resist resistance. *Science* 270:724-727.
- Siddiqui BS, Aslam H, Ali ST, Begum S, Khatoon N (2007). Two new triterpenoids and a steroidal glycoside from the aerial parts of *Ocimum basilicum*. *Chem. Pharm. Bull.* 55:516-519.
- Sikkema J, De Bont JAM, Poolman B (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269:8022-8028.

- Sivropoulou A, Nikolaou C, Papanikolaou E, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M (1997). Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 45:3197-3201.
- Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food borne-pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 26:118-122.
- Sokovic M, Van Griensven LJ (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.
- Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW (2003). Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packing. *J. Agric. Food Chem.* 51:3197-3207.
- Trujano-Gonzalez ME, Pena EI, Martinez AL, Moreno J, Guevara-Fefer P, Déciga-Campos M, Lopez-Munoz FJ (2007). Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 111 :476-482.
- Wang W, Li N, Luo M, Zu Y, Efferth T. (2012). Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil Compared to that of its main component. *Molecules.* 17:2704-2711.