

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

Leila Maidi<sup>(1)</sup>, Mustapha Dahia<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Département de Biologie, université de Ghardaïa

<sup>(2)</sup>Département de Biologie, université de Djelfa

**Résumé.** Aujourd'hui, la phytothérapie a prouvé son efficacité et ses bienfaits incontestables dans notre vie quotidienne, confirmant que les plantes guérissent. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés aux huiles essentielles d'une plante médicinale, *Ocimum basilicum*, espèce locale et l'étude de leurs effets biologiques comme l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne.

La première partie de cette étude, concerne l'extraction par l'hydrodistillation des huiles essentielles, puis nous avons étudié le pouvoir antioxydant en utilisant le radical libre DPPH'. Dans la dernière partie, nous avons étudié le pouvoir antimicrobien des huiles contre les bactéries (Cinq bactéries Gram -, Cinq bactéries Gram +) par la méthode de diffusion sur milieu gélosé et le test de dilution sur milieu liquide et contre deux champignons par la méthode de contact direct.

La teneur en HES a été calculé par rapport à la masse des parties aériennes de la plante (tiges et feuilles) est égale à 2,047±0,48% donc a révélé un rendement considérable En comparant avec ceux issus de la littérature. Pour l'activité antioxydante de notre huile essentielle par le test DPPH a révélé une activité antioxydante très faible. .

L'étude de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur gélose a montré une action légèrement variable semblaient être préférentiellement plus actives sur les Gram- surtout vis avis *Salmonella typhi* par un diamètre 27,66±2,51 mm.

Les valeurs des CMI obtenues par la méthode de dilution varient entre 0,125 mg/ml chez le *Bacillus cereus* et 2 mg/ml pour la plupart des souches, Cette huile a révélé une action inhibitrice et bactéricide contre la majorité des souches bactériennes testées.

L'activité antifongique s'avère plus importante sur la souche fongique *Fusarium culmorum* que sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*

Suivant les résultats qu'on a obtenus expérimentalement, nous pouvons prédire que les huiles essentielles de *Ocimum basilicum*, sont des agents antioxydants et antimicrobiens importants, d'où vient la nécessité de valoriser les différentes sources naturelles renfermées dans la flore locale d'Algérie.

**Mots clés:** *Ocimum basilicum*, Hydrodistillation, Les huiles essentielles, Activité antioxydante, activité antibactérienne, activité antifongique

### 1. Introduction

Les plantes médicinales font partie du savoir de base de toutes les sociétés humaines, puisqu'elles s'en servent pour se nourrir, se soigner et parfois dans les rites religieux...l'homme utilise les plantes médicinales pour traiter les maladies depuis des millénaires, et l'histoire des substances naturelles s'identifie en partie à celle de la pharmacie, dont une discipline, la pharmacognosie, qui répertoriait les végétaux dans leurs aspects thérapeutiques et étudie les poisons et les remèdes naturels [1]. Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Parmi ces composés, on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires comme les huiles essentielles qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La Pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse[2]. Par ailleurs, il y a une préoccupation concernant les infections bactériennes par les espèces pathogènes qui ont acquis une résistance multiple, d'où l'importance d'orienter les recherches vers les phytomolécules issues des plantes médicinales qui ont toujours constitué une

source d'inspiration de nouveaux médicaments. De plus, la présence des antioxydants naturels dans l'alimentation est devenue essentielle pour la qualité et la sécurité de l'aliment. Les effets négatifs des antioxydants synthétiques encouragent à leur substitution par des agents naturels à partir des plantes médicinales.

Dans le monde, il existe 250 000 à 500 000 espèces de plantes, seul un nombre relativement faible des plantes ont été étudiées pour d'éventuelles applications médicales. Les données relatives à l'innocuité et à l'efficacité sont disponibles pour un nombre encore plus restreint de plantes, leurs extraits et principes actifs et les préparations qui les contiennent[3]. Les Lamiaceae, quatrième famille des quatre premières familles importantes pour le pharmacien avec plus de 5000 espèces, sont des plantes aromatiques et ont également donné des huiles essentielles commercialement importantes[4].

L'Algérie, de part sa position biogéographique, et grâce à ses différentes zones bioclimatiques (humide, sub-humide, semi-aride, aride ou désertique), offre une très grande diversité de végétaux (plus de 3000 espèces et 1000 genres) avec un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales spontanées et cultivées [5, 6]. Le basilic, *Ocimum basilicum*, classé parmi les plantes les plus utilisées en Algérie [5], peut offrir des avantages non négligeables, par le fait de sa disponibilité, et sa capacité à fournir des huiles essentielles, ou extraits, largement demandés dans les industries alimentaire ou pharmacologique. La région de Laghouat à caractéristiques sahariennes et à situation géographique et position climatique (étage bioclimatique aride), offre une richesse floristique considérable. Certaines de ses espèces végétales sont connues par leurs vertus aromatiques et/ou médicinales, alors l'origine géographique de notre plante, la chaleur et l'exposition aux rayons solaires peuvent influencer le développement des mécanismes de protection, basés sur la synthèse de métabolites secondaires spécifiques, avec des caractéristiques et des activités biologiques à rechercher. L'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme les activités antioxydante et antimicrobienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation importante dans les traditions médicinales. qui représentent une source de composés actifs. En effet, les métabolites secondaires restent l'objet de nombreuses recherches in vivo comme in vitro, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels les huiles essentielles, qui constituent des produits à forte valeur ajoutée "qui peuvent être par la suite valorisés dans différents domaines d'activités : pharmacie, parfumerie, cosmétique ou agroalimentaire".

Alors sur la base de ce contexte que s'inscrit cette étude, nous essayerons d'apporter une contribution à vouloir caractériser et valoriser une substance extraite à partir de *Ocimum basilicum L.* locale par une meilleure connaissance des données phytochimiques relatives à ce patrimoine et la mise en évidence des métabolites secondaires de cette plante à savoir les huiles essentielles, l'évaluation de leurs pouvoirs antioxydants et antimicrobiens. Ce travail a été entrepris sur la base des données de la médecine traditionnelle qui indiquent que le basilic sert au traitement de plusieurs troubles (antispasmodiques, stomachiques, carminatives, sédatives, antiseptiques...) [7]. De plus, peu de travaux ont été consacrés à l'étude des huiles essentielles et leurs pouvoirs antioxydant et antimicrobien dans notre région. Si *Ocimum basilicum L.*, collecté en Algérie, a déjà fait l'objet d'études concernant sa composition chimique et son activité antioxydante [8] et activité antimicrobienne [9].

## **2. Matériel et Méthode**

### **2.1. Matériel biologique**

**2.1.1. La plante étudiée :** Dans ce travail, nous avons étudié une seule espèce de la famille des Lamiaceae, il s'agit d'*Ocimum basilicum L* (Le basilic) recolté de la région d'El Assafia, Wilaya de Laghouat

**2.1.2. Les souches microbiennes :** Les souches microbiennes ayant fait l'objet de cette étude font parties de trois groupes de microorganismes et ont été fournies par différents laboratoires. Le choix des microorganismes a été porté sur Treize souches microbiennes. Onze d'entre-elles sont fréquentes en pathologies humaine et animale, appartenant à différentes familles (Cinq bactéries à Gram négatif, Cinq bactéries à Gram positif et une levure : *Staphylococcus aureus*, *MRSA*, *MSSA*, *Bacillus cereus* et *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* *Salmonella enteritidis* et *Candida albicans*) et deux champignon phytopathogènes : un champignon isolé d'un rachis de palmier dattier atteint de la maladie Bayoud (*F oxysporum f.sp. albedinis*) qui nous a été fourni par la Station Régionale de la Protection des Végétaux de Ghardaïa et l'autre (*F culmorum*), isolé de la graine de Blé tendre et nous à été fourni par l'Institut Nationale de Recherche Agronomique (INRA) Bourdeaux (France) .

## **2.2. Méthodologie**

**2.2.1. Récolte de plante :** La plante fraîchement collecté à été séchée à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité, dans un endroit sec et aéré. Puis broyée manuellement avec un mortier pour la préparation à l'hydrodistillation.

**2.2.2. Extraction :** Les huiles essentielles sont obtenues par hydrodistillation avec un appareil de type « Clevenger », pendant une durée de trois à quatre heures, l'hydrodistillat obtenu est séché par du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Elles sont conservées dans des tubes en verre fumé à l'abri de la lumière et à une température de 4 °C.

## **3. L'évaluation de l'activité antioxydante**

### **3.1. Le protocole expérimental du test DPPH**

Des dilutions d'huiles essentielles et des extraits ont été préparées dans de méthanol afin de tester le pouvoir antioxydant. Un millilitre d'une solution méthanolique du DPPH (100µM) est ajouté à 1 ml de chaque dilution. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, les absorbances des échantillons ont été lues à 517nm [10] Le pouvoir antiradicalaire des huiles est calculé en déterminant le facteur EC<sub>50</sub>, à partir de la courbe de la variation du pourcentage d'inhibition (I %) des radicaux libres de DPPH, en fonction des concentrations des huiles essentielles [10] .Chaque absorbance correspond à un pourcentage d'inhibition calculé par la relation suivante :

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

Où : A<sub>0</sub> est l'absorbance de la solution de DPPH sans l'huile essentielle, A est l'absorbance de la solution de DPPH en présence de l'huile essentielle. Nous avons tracé le graphique de la variation de l'absorbance, en fonction de la concentration des échantillons des huiles essentielles. Cette courbe nous a permis de déterminer les valeurs d'EC<sub>50</sub> [11]. La vitamine C et la vitamine E ont été utilisés comme antioxydants de référence. EC<sub>50</sub> est définie comme étant la concentration en (mg/ml) de l'extrait capable d'inhiber 50% des radicaux libres.

## **4. etude de l'activité antimicrobienne**

### **4.1. L'évaluation de l'activité antibactérienne :**

Les tests d'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles ont été réalisés avec deux méthodes : La première de diffusion sur milieu solide (méthode de Vincent) [12] .la seconde de

dilution, en milieu liquide, afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ainsi que les concentrations minimales bactéricides (CMB), pour les extraits actifs [13].

#### **4.1.1. Méthode de diffusion (méthode de Vincent)**

L'étude est réalisée par la méthode de diffusion, qui est initialement conçue pour les antibiotiques (antibiogramme) mais en substituant les disques d'antibiotiques par d'autres imprégnés par de l'huile essentielle (aromatogramme) [13]. Cette technique permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque. Les huiles essentielles ont été diluées préalablement dans le DMSO (un émulsifiant). Trois dilutions (v/v) ont été choisies pour les huiles : 1/2, 1/4 et 1/10 (v/v)[14].

A partir une suspension bactérienne préparée dans l'eau physiologique et ajustée à  $10^8$  cellules/ml, nous avons ensemencé par un écouvillon une gélose Muller-Hinton (pour les bactéries) et Sabouraud (pour le *Candida albicans*), puis nous avons organisé les disques stériles sur la gélose. Ces disques sont formés par des papiers filtre stérilisés de 6 mm de diamètre [15]. Nous avons imbibé chaque disque d'un volume fixe de 15  $\mu$ l de l'huile ; l'opération a été répétée 3 fois pour chaque dilution (3 disques de la même dilution par boîte).

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

Des témoins sans extrait ont été réalisés : \*contrôle - : des disques imprégnés par le DMSO (sans huile essentielle) \*control + : par des antibiotique, A la fin de l'incubation, nous avons noté l'activité des HEs, en mesurant les zones d'inhibition, claire, autour des disques, à l'aide d'un pied à coulisse. Les résultats de la lecture sont exprimés selon trois niveaux d'activité : Résistant ( $D = 6$  mm) Intermédiaire ( $6 \text{ mm} < D \leq 13\text{mm}$ ) Sensible ( $D > 13\text{mm}$ ) [16].

#### **4.1.2. La détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide :**

Nous avons procédé à la détermination des CMI des HEs, révélés actifs, selon la méthode de dilution en milieu liquide [17, 13].

Une solution mère a été préparée préalablement, en faisant dissoudre l'HE de la plante dans une solution de DMSO 10% pour réaliser des dilutions successives [18] (les concentrations des huiles sont décroissantes de 6 à 0,062 mg/ml). Pratiquement, les bactéries sont cultivées sur du bouillon nutritif. Des volumes constants de milieu de culture liquide (3.2 ml) ont été répartis dans des tubes à essai, pour obtenir une charge de  $10^5$  cellules/ml, nous les avons inoculés avec une suspension bactérienne. Ensuite, nous avons ajouté dans les tubes les solutions avec concentration croissantes ; le volume injecté dans chaque tube étant de 668 $\mu$ l. Un tube servant de témoin négatif est ensemencé sans l'huile. Les tubes à essai, ainsi préparés, sont incubés pendant 24h à 37°C pour les bactéries et pendant 48h à 25°C pour le *Candida albicans*. Les résultats sont notés à l'oeil nu. Ainsi, nous avons déterminé la CMI (la concentration la plus faible présentant une inhibition de la croissance en comparaison avec le témoin négatif).

Après avoir révélé la CMI, nous avons procédé à la détermination de la CMB (c'est la plus faible concentration pour laquelle 99,99% de l'inoculum initial a été tué [19, 15]. Les tubes ayant un aspect clair ont été ensemencés à la surface de la gélose nutritive pour les bactéries et le milieu Sabouraud pour l'espèce *Candida* afin de déterminer la CMB.

#### **4.2. L'évaluation de l'activité antifongique :**

En utilisant la méthode du contact direct pour évaluer l'activité antifongique, rapportée par [20]. Des dilutions sont préparées au 1/2 à 1/1000<sup>e</sup> des huiles essentielles dans la solution d'agar 0,2%. Dans des tubes à essai contenant chacun 13,5 ml du milieu solide PDA (Potato Dextrose Agar), stérile à

l'autoclave pendant 20 min à 121 °C et refroidis à 45 °C, puis on ajoute aseptiquement 1,5 ml de chacune des dilutions de façon à obtenir les concentrations finales allant de 1/20 à 1/10000 (v/v) [21,22,23,24,25] . Chaque tube est homogénéisé instantanément par agitation puis son contenu est versé dans une boîte de Pétri. Le mélange ainsi versé et laissé au repos jusqu'à refroidissement et des témoins, contenant le milieu de culture et la solution d'agar à 0,2 % seule, sont également préparés. Après solidification du milieu, l'ensemencement se fait par un disque de mycélium, provenant d'une culture de 7 jours, et déposé au centre de la boîte. Après, on procède à une incubation de 7 jours (25°C). Quotidiennement, la croissance du filament sur chaque boîte est relevée et il est procédé, à la fin du temps approprié d'incubation, à une mesure des diamètres de mycélium pour calculer le taux d'inhibition (I%)  $I\% = \frac{Da - Db}{Da} \times 100$  [26]

Ou : I% pourcentage d'inhibition exercé par l'huile sur le mycélium, Da Diamètre de mycélium témoin, Db Diamètre de mycélium

La lecture des résultats nous a permis de déterminer la CMI (la plus faible concentration pour laquelle on n'observe pas de croissance, visible à l'oeil nu, sur le milieu PDA ; c'est une action fongistatique après 6 jours d'incubation. La CMF (définie comme étant la plus faible concentration des extraits détruisant le champignon ; c'est une action fongicide). Elle a été déterminée par la réponse (absence de croissance) du repiquage à partir de cultures, de 7 j, n'ayant donné aucune croissance fongique.

## 5. Résultat

### 4.1. La teneur en huiles essentielles :

Les teneurs en HEs ont été calculées par rapport à la masse des parties aériennes de la plante (tiges et feuilles). La durée d'extraction des huiles essentielles est de 4 heures, l'extrait est un liquide jaune avec une forte odeur. la teneur en l'huiles essentielles de basilic est égale à  $2,047 \pm 0,48\%$  , qui est proche de celui déterminé par Khelifa *et al* (2012)[8] à partir d'un échantillon collecté dans la région de Khemis Miliana où le rendement était de 1,98 %., Özcan et Chalchat (2002)[27], ont obtenu un rendement égal à 1,25% . Le rendement égal à 1,7% des huiles essentielles de basilic collectée dans une région de l'Egypte [28].

Le rendement en huiles essentielles est lié à plusieurs paramètres, l'environnement, le génotype, l'origine géographique, l'âge de la plante, la période de récolte, le séchage, lieu de séchage, le procédé d'extraction utilisé, la température, la durée de séchage, les parasites, les virus, les traitements phytosanitaires et les stress hydrique,[29,30,31,32,33]. Du fait que notre espèce était collectée de la région de Laghouat située dans des contextes écologiques différents, on constate que la grande variabilité entre les rendements en huiles essentielles est peut être fonction de l'impact de ces facteurs. En comparant nos résultats avec ceux issus de la littérature, nous pouvons conclure que notre *O. basilicum* est très riche en huiles essentielles.

### 4.2. Résultat de l'activité antioxydante :

Nous avons employé le test chimique DPPH, afin d'étudier l'activité antioxydante, exprimant la capacité de réduction des radicaux libres. Les valeurs obtenues (I% de chaque extrait), nous ont permis de tracer les graphes illustrant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'HE, ainsi que la variation des pourcentages d'inhibitions (I%) en fonction des concentrations des deux antioxydants standards choisis pour cette étude à savoir, la vitamine C et la vitamine E fig 1. Le tableau 1 renferme les valeurs des EC50 des huiles essentielles et les valeurs des EC50 de quelques antioxydants de référence, en guise de comparaison.. Ces valeurs correspondent aux concentrations nécessaires en substrat pour piéger 50% du radical libre DPPH•.

Maidi et Dahia, *Journal of Advanced Research in Science and Technology*, 2022, 8(2), 45-59.

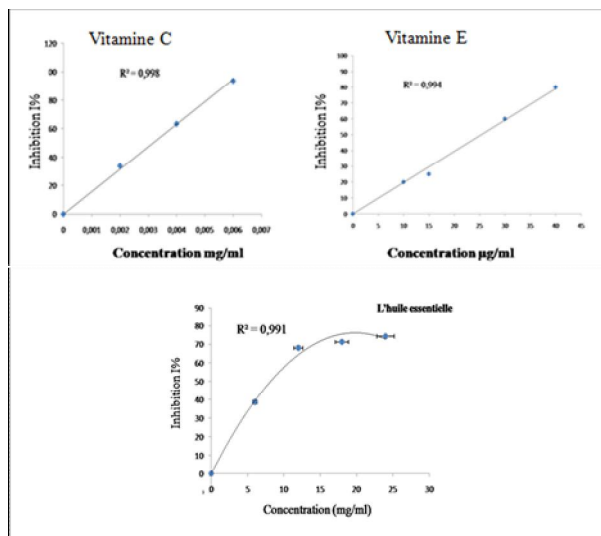


Figure 1 : Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration des huiles essentielles et en Vitamine C et VitamineE

Tableau 1 : les valeurs des EC<sub>50</sub> des huiles essentielles et les antioxydants de référence

Les huiles essentielles et les antioxydants de référence	EC <sub>50</sub> (mg/ml)	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
Les huiles essentielles	8,11±0,25	8110±250
Vitamine C	0,00317±0,000152	3,17±0.152
Vitamine E	0,022±0,0002	22,13 ±0,2

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que l'activité antiradicalaire des huiles essentielles plus faible avec EC<sub>50</sub> de l'ordre de 8,11mg/ml comparable avec celui des antioxydants de référence utilisés dans ce test. La vitamine C (0,00317mg/ ml) et de la vitamine E (0,022mg/ ml).

L'activité antioxydante des HES s'est montrée assez faible pour la réduction des radicaux libres du DPPH. L'absence d'une activité antioxydante dans l'huile essentielle, est effectivement liée à sa composition chimique. La comparaison de notre étude avec celle de Khelifa et *al.*, (2011)[8] utilisant le même test (DPPH), pour l'activité antioxydante des huiles essentielles de *O. basilicum* de la région de Khemis Miliana (Nord alger), montre que les valeurs de la EC<sub>50</sub> varient selon la composition chimique des plantes. Elle est de 83,54 mg/ml. Les mêmes auteurs ont montré que la présence de linalol en tant que composé majoritaire (32,83 %) avec la diminution de eugénol, dans leur composition chimique est la cause de cette diminution. Dabiré et *al* (2011)[34] , ont étudié l'influence de séchage d'*O. basilicum* sur l'activité antioxydante des huiles essentielles. Ils ont montré que la diminution du taux de l'eugénol dans l'huile essentielle (en présence de linalol) à cause de la longue durée de séchage

de la plante provoquant une diminution de plus de 87% de ses propriétés antioxydantes. On peut conclure que la faible activité antioxydante des huiles essentielles de basilic est peut être causée par la longue durée de séchage (plus de dix jours) qui a affecté la composition des huiles. La plante risque, ainsi, de perdre quelques constituants importants

### 4.3. Résultats de l'activité antimicrobienne

#### 4.3.1. L'activité antibactérienne

##### 4.3.1.1. Par la méthode de diffusion sur gélose

Les résultats obtenus dans le test de l'activité antibactérienne par la méthode des disques sont présentés dans le tableau 2

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

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

Tableau 2: Les diamètres des zones d'inhibition de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.

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

Les huiles essentielles testées sur les différentes bactéries à Gram positifs et négatifs ont montré une action légèrement variable. les HEs de basilic, semblaient être préférentiellement plus actives sur les

Gram-, ceci peut être traduit par la présence de composés ressemblant à Carvacole ou thymol car les deux composants sont capables de désintégrer la membrane externe des bactéries Gram- , en libérant les lipopolysaccharides (LPS), ce qui permet l'augmentation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique[35]

De plus, nos résultats concordent avec ceux de Carovic-Stanko et al (2010) [36] ayant rapporté dans leurs travaux sur les huiles essentielles de *O. basilicum* et montrent que l'activité observée contre *E. coli* est la plus importante avec une concentration de 400ppm. Selon Adeola et al (2012)[37] , dans une étude sur *O. basilicum* L de Nigeria ; ont montré que le diamètre d'inhibition le plus grand est de (19,5 mm) pour *P. aeruginosa* et le plus petit est pour *S. aureus* (10,5 mm), ceci pourrait être due à une composition chimique particulière. Les huiles ont aussi montré une action contre *Candida albicans* avec des zones d'inhibition d'environ 6 et 14,33 mm pour les trois dilutions. Bousbia(2011)[38] ont suggéré que le mode d'action de composés de l'huile contre les levures pourrait être dû à l'affaiblissement des processus enzymatiques impliqués dans la production énergétique et dans la synthèse des composantes structurales de levure.

**4.3.1.2. Par la méthode de dilution en milieu liquide :** La détermination des CMI et CMB ont été réalisées seulement pour les souches pour lesquelles nous avons noté des diamètres d'inhibition importants tableau 3.

**Tableau 3 : les CMI (mg/ml) et le CMB(mg/ml)**

	<i>S typhi</i>	<i>S enteritidis</i>	<i>K pneumonia</i>	<i>P aerogenosa</i>	<i>E coli</i>	<i>E faecalis</i>	<i>B cereus</i>	<i>S aureus</i>	<i>MSSA</i>	<i>C albicans</i>
CMI(mg/ml)	1	2	2	/	2	/	<b>0,125</b>	2	1	1
CMB(mg/ml)	2	2	2	/	2	/	1	2	3	1
CMB/CMI	2	1	1	/	1	/	8	1	3	1

/ teste non réalisé

Afin d'évaluer l'activité de l'huile en terme bactéricides ou bactériostatique, le rapport CMB/CMI a été calculé selon Razafint salama et al(2013)[39] : un extrait est considéré comme substance bactéricide si le rapport CMB/CMI est inférieur à 4 sinon, il est bactériostatique (CMB/CMI  $\geq$  4). les valeurs des CMI obtenues varient entre 0,125 mg/ml pour *Bacillus cereus* et 2 mg/ml pour la plupart des souches. Les valeurs de CMB se rangent entre 1 mg/ml (pour *B. cereus* et *C. albicans*) et 3mg/ml (pour *MSSA*). Cette huile a révélé une action inhibitrice et bactéricide contre toutes les souches bactériennes testées à l'exception de *B. cereus* dont l'huile a révélé une action bacteriostatique.

Nous avons comparé nos résultats avec ceux de Ouibrahim et al, (2013)[9] , qui ont déterminé la CMI de l'huiles essentielle de *O. basilicum* du Nord -Est d'Algérie sur plusieurs souches microbiennes, il à enregistré les valeurs de CMI varient entre 4,95mg/ml pour *E. faecalis* et 9,5mg/ml pour le reste des souches (*MRSA*, *Salmonella sp*, *E. coli*...). Hussain et al (2008)[40] ont révélé les CMI des huiles essentielles *O. basilicum* d'Iran sur plusieurs souches microbiennes, notamment *E. coli* et *S. aureus*. Ils ont enregistré la valeur de CMI pour *S. aureus* de 1,5 mg/ml, et 2,1mg/ml pour *E.coli*, Sur la base de ces études, nous pouvons constater que l'HE de basilic de la région de Laghouat est la plus active vis-à-vis des microorganismes.

D'une façon générale, l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *O. basilicum* peut s'expliquer d'une part, par les composés majoritaires et les alcools terpéniques et autres hydrocarbures et phenols [41] et d'autre part, par la synergie entre tous les constituants volatils et peuvent être l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible pour les composés



majoritaires[35, 14,42]De plus, la variabilité du pouvoir bactéricide est due certainement à la sensibilité des microorganismes aux différents composés chimiques qui dépendent de la nature de l'espèce végétale, des chémotypes et des conditions climatiques[43]

#### 4.3.2. L'évaluation du pouvoir antifongique :

Rappelons que la méthode employée est celle de contact direct, la lecture des résultats nous a permis de déterminer la CMI (la plus faible concentration en extrait pour laquelle on n'observe pas de croissance visible à l'oeil nu, sur le milieu PDA ; c'est une action fongistatique) après 6 jours d'incubation, les résultats sont regroupés dans le tableau 4. La CMF (définie comme étant la plus faible concentration des extraits détruisant de champignon ; c'est une action fongicide) a été déterminée par la réponse (absence de croissance) du repiquage à partir de culture de 7 j, n'ayant donné aucune croissance fongique. L'activité antifongique a été estimée comme suit

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

Les résultats de la recherche des concentrations minimales fongicides et fongistatique des huiles essentielles contre les souches fongiques testées sont alignés dans le tableau 4

Tableau 4 : Effet des huiles essentielles de basilic sur le diamètre (mm) des colonies mycéliennes de *Fusarium oxysporum f. sp. Albedinis* et *Fusarium culmorum*

		<i>Fusarium oxysporum f.sp. albedinis</i>		<i>Fusarium culmorum</i>	
Les concentrations en		Témoin :73±1		Témoin :79±1,8	
%	µl/ml	Diamètre	I%	Diamètre	I%
1/20 (5%)	50	0	<b>100</b>	0	<b>100</b>
1/50 (2%)	20	0	<b>100</b>	0	<b>100</b>
1/100 (1%)	10	0	<b>100</b>	0	<b>100</b>
1/250 (0,4%)	4	0	<b>100</b>	0	<b>100</b>
1/500 (0.2%)	2	25±6	<b>65,75</b>	0	<b>100</b>
1/1000 (0.1%)	1	43±4	41,09	13 5±0	<b>82,91</b>
1/2000 (0.05%)	0,5	47,5±0,5	34,93	60,5±7,5	23,41
1/5000 (0.02%)	0,2	49,33±7,37	32,42	75,5±3,5	4,43
1/10000 (0.01%)	0,1	64,33±1,52	11,87	75±5	5,06

I% : taux d'inhibition des colonies mycélienne

D'après nos résultats, nous constatons que le *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* et le *Fusarium culmorum* sont sensibles vis-à-vis des huiles essentielles d'*Ocimum basilicum*. Les HEs présente des

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

Les taux d'inhibition pour *F. oxysporum f. sp. Albedinis* sont variables entre 11,87 à 100% une inhibition totale avec une concentration supérieure ou égale à 0,4%(4µl/ml)., les taux d'inhibition pour les concentrations (0,001% à 0,1%) ont eu un effet moyen ou nul, la concentration 0,2% (2µl/ml) a révélé une inhibition active avec un taux d'inhibition de 65,75%. Les activités remarquables aussi sont enregistrées avec *F. culmorum*, dont la concentration à l'ordre de 0,1% (1µL/ml), le taux d'inhibition est très important est à l'ordre de 82,91%, et l'HE est très active avec une inhibition totale aux concentrations supérieures à 1µl /ml,

Le développement de *F. culmorum* n'est pas affecté par les faibles quantités (0,1µl/ml à 0,5µl/ml) des huiles essentielles. Par contre, à la plus forte concentration (1µL/ml et plus), l'effet inhibiteur est obtenu sur cette souche. Cela se traduit par une inhibition du développement du thalle de 82,91 % à 100%, Nous avons procédé aussi à la détermination de la CMF en effectuant un repiquage à partir des cultures fongiques présentant une inhibition de croissance. Lorsqu'il s'agit d'une activité fongistatique, le mycélium, ainsi repiqué, donne naissance à un thalle à croissance normale ; le thalle croît peu ou pas si c'est une activité fongicide. Après incubation, aucune croissance n'est notée. le tableau N°5 résume les CMI et le CMF.

Les figures 2 et 3 élucident clairement cette activité des huiles essentielles à différentes doses sur les deux souches.

**Tableau 5** :CMI et CMF de *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* et *Fusarium culmorum*

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

L'action fongistatique des huiles essentielles a été détecté pour une CMI égale à 0,2% (2µl /ml) enregistrée pour *F. culmorum* et 0,4% (4µl/ml) pour *F. oxysporum f. sp. Albedinis*. Il est à noter également, que les huiles essentielles agissent sur la croissance du mycélium. La CMF estimée est d'une concentration à 4 µl/ml. Pour *F. oxysporum f. sp. albedinis* et 2µl/ml pour le *F. culmorum*. D'après ces résultats, il s'avère que l'activité de notre huile est plus importante sur la souche fongique *Fusarium culmorum* que sur *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*, nous pensons que cette différence entre les résultats dépend à la variété et la pathogénéicité des souches fongiques. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de (Edris et Farrag (2003)[44] qui constatent que les vapeurs de cette huile essentielle et de son composé majoritaire, le linalol, peuvent inhiber la croissance de *Mucor sp. et Rhizopus stolonifer*. Les travaux de Gbogboci et al (2006)[45] , sur l'effet des HEs de basilic sur des micromycètes des champignons phytopathogènes et toxigenes, compris *Fusarium oxysporum* sp, ont constaté qu'à la concentration maximale testée (1,14µl/l) des huiles essentielles de *Ocimum basilicum*, tous les isolats ont dépassé un pourcentage d'inhibition de 94%.

Plusieurs études ont également signalé que l'activité antifongique des huiles essentielles de *O. basilicum* et la présence de haute teneur en linalol, composé majoritaire, peuvent être la cause de cette activité [40]

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

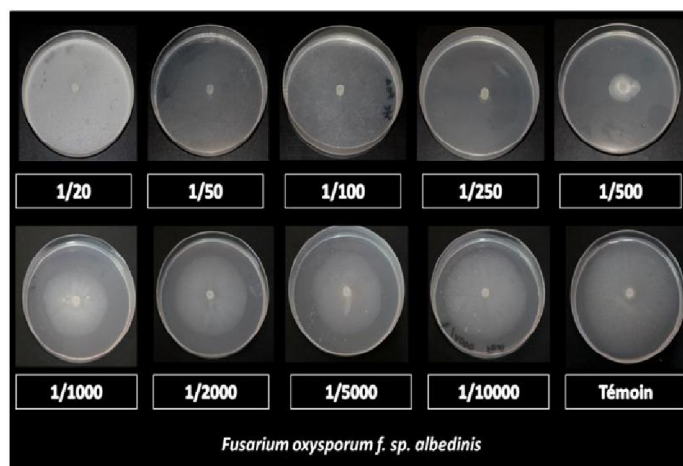


Figure 2 :test de contact direct de l'HE sur *Fusarium oxysporum f. sp. Albedinis*

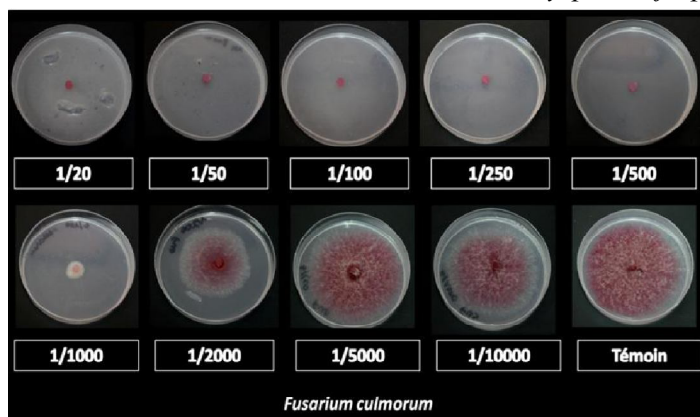


Figure 3 : Test de contact direct des HEs sur *Fusarium culmorum*

## 6. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons étudié *Ocimum basilicum*, une plante très utilisée en pharmacopée traditionnelle pour ses vertus thérapeutiques. Ce travail nous a permis de mettre en évidence le rendement des huiles essentielles ainsi que leurs activités biologiques. La détermination de rendement en l'huile essentielle a montré une rentabilité de 2,047% ce qui est très important en comparaison avec la rentabilité issue d'autres études. L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode du DPPH a confirmé les propriétés faibles que possèdent les huiles essentielles est à l'ordre de 8,11 mg/ml. L'effet antimicrobien des huiles de notre plante a été mis en évidence in vitro en utilisant différentes méthodes. L'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles par la méthode de diffusion sur milieu gélosé vis-à-vis les souches étudiées (*Staphylococcus aureus*, *MRSA*, *MSSA*, *Bacillus cereus* et *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis* et *Candida albicans*), a révélé une action inhibitrice contre la plupart des germes et beaucoup plus sur les Gram-, les CMI par le test de dilution sur milieu liquide

comprises entre 0,125mg/ml et 1mg/ml, En comparaison avec la bibliographie, il parait que notre l'huile présentant une activité antimicrobienne importante.

Les champignons phytopathogène (*F oxysporum f.sp. albedinis* et *F culmorum*) se sont plus sensibles que les bactéries, vis-à-vis les huiles essentielles par la méthode de contact direct sur milieu solide. Les CMF intéressantes, avec une forte activité observée pour les huiles essentielles (2µl/ml et 4µl/ml), Suivant les résultats qu'on a obtenu expérimentalement, nous pouvons prédire que les huiles essentielles sont plutôt des antimicrobiennes

### Référence

- [1] Cabalion P., 1990 - Les substances naturelles végétales, leur intérêt biologique, leurs perspectives d'application., *Bull .Soc. industr. Mulhouse*, 4 :65-69
- [2] Bahorun, T. 1997- Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle, *Food and Agricultural Research*,6 : 83-94
- [3] Rates S.M.K., 2001- Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39: 603–613
- [4] Gurib-Fakim A., 2006- Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of medicine*. 27: 1-93
- [5] Reguieg L., 2011- Using medicinal plants in Algeria . *Am. J. Food. Nutr*, 3: 126-127.
- [6] Bouabdelli F., Djelloul A., Kaid-Omar Z., Semmoud A et Addou A., 2012-Antimicrobial Activity of 22 Plants used in Urolithiasis Medicine in Western Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 530-535
- [7] Bellakhdar J., 2006-Plantes médicinales au Maghreb et soins de base. Précis de phytothérapie moderne.Edition le Fennec. Casablanca, Maroc,385p.
- [8] Khelifa L. H., Brada M., Brahmi F., Achour D., Fauconnier M.L et Lognay G., 2012-Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil of *Ocimum basilicum* Leaves from the Northern Region of Algeria. *Topclass Journal of Herbal Medicine*, 2: 25-30
- [9] OuibrahimA., Tlili-Ait-kakiY., BennadjaS., AmrouniS et DjahoudiAG., 2013- Evaluation of antibacterial activity of *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L. from Northeast of Algeria... *African journal of microbiology research*, 42: 4968-4973
- [10] Molyneux P., 2004- The use of the stable free radical diphenyl picryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin, Sci. Technol*,26: 211-219.
- [11] Sharma O.P et Bhat T.K., 2009- DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113 : 1202–1205
- [12] Bekhechi C., F. Atik-Bekkara et D. E. Abdelouahid., 2008- composition et activité antibacterienne des huiles essentielles d'*Origanum glondulosum* d'Alger. *Phytotherapie*, 6 : 153–159
- [13] Rios J.L., Recio, M.C et Villar A., 1988-Screening Methods for Natural Products with Antimicrobial Activity: A Review for the Literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23: 127-149.
- [14] Lahlou M., 2004- Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother. Res*, 18 : 435-448

- [15] Ayadi S., Jerribi C et Abderrabba M., 2011- Extraction et Etude Des Huiles Essentielles De *Rosmarinus officinalis* cueillie dans trois régions différentes de La Tunisie. *J.Soc.Alger.Chim*, 21 : 25-33
- [16] Billerbeck V.G., 2007- Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Pharmacognosie Phytothérapie*, 5 : 249–253.
- [17] Janssen A.M., Scheffer J.J.C et Baerheim Svendsen A., 1976-Antimicrobial activity of essential oils: a 1976–1986 literature review. Aspect of the test methods. *Planta Medica*, 53: 395–398
- [16] Cao L., Young Si.J., Liu Y., Sun H., Jin W., Li Z., Zhao X.H. et Le Pan R., 2009- Essential oil composition antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. *Food chemistry*, 115: 801-805
- [19] Canillac N et Mourey A., 2001-Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbial*, 18: 261–268.
- [20] Remmal A., Tantaoui-el araki A., Bouchikhi T., Rhayour K et Ettayebi M.,1993-Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oil in Agar medium. *J Essenti Oils Res*, 5: 179-184.
- [21] Satrani B., Ghanmi M., Abdellah Farah A., Aafi A., Fougrach H., Bourkhiss B., Bousta D et Talbi M., 2007-Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bull. Soc. Pharm*, 146: 85-96.
- [22] El Ajjouri M., Satrani B., Ghanmi M., Aafi A., Farah A., Rahouti M., Amarti F et Aberchane M., 2008- Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* L. Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'oeuvre. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 12: 345-351.
- [23] Hadizadeh I., Peivastegan B et Hamzehzarghani H., 2009- Antifungal Activity of Essential Oils from Some Medicinal Plants of Iran against *Alternaria alternate*. *American Journal of Applied Sciences*, 5: 857-861
- [24] Bourkhiss M., Hnach M., Lakhlifi T., Bourkhiss B., Ouhsine M et Satrani B., 2010-Production et caractérisation de l'huile essentielle de la Sciure de bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 79 : 4 - 11.
- [25] Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Abdellah Farah A., Aafi A., Lotfi Aarab L., El Ajjouri M et Chaouch A., 2010- Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. Du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 14 : 141-148.
- [26] Cheng S.S., Liu J.U., Chang E.H et Chang S.T., 2008. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*, 99: 5145-5149.
- [27] Özcan M et Chalchat J.C., 2002. Essential Oil Composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. *Czech J. Food Sci*, 20: 223–228
- [28] Ismail M., 2006- Central Properties and Chemical Composition of *Ocimum basilicum* Essential Oil. *Pharmaceutical Biology*, 44: 619-626
- [29] Grayer R.J., Kite G.C., Goldstone F.J., Bryan S., Paton A et Putievsky E., 1996- Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum Basilicum*. *Phytochemistry*, 43: 1033-1039.

- [30] Svoboda K.P et Hampson J.B., 1999- Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland*, 5:1-17.
- [31] Smallfield B., 2001- Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research*, 45: 4p.
- [32] Bruneton J., 2009- Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Medicinales. Techniques et Documentation, 4ème Edition. Lavoisier, Paris
- [33] Ekren S., Sönmez C., Özcalak E., Kurttas Y.S.K., Bayram E et Gürgülü H., 2012-The effect of different irrigation water levels on yield and quality characteristics of purple basil (*Ocimum basilicum* L.). *Agricultural Water Management*, 109: 155-161
- [34] Dabire C., Nebie R.H.C., Belanger A., Nacro M et Sib F.S., 2011-Effect of drying the plant material on the chemical composition of the essential oil and antioxidant activity of extracts of *Ocimum basilicum* L. *Int. J. Biol. Chem. Sci*, 5(3).
- [35] Burt S., 2004- Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food Microbiol*, 94: 223-253
- [36] Carovic'-Stanko K., Orlic S., Politeo O., Frane S., Ivan K., Milos M et Zlatko Satovic., 2010-Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. *Food Chemistry*, 119: 196-201
- [37] Adeola S.A, Folorunso O.S, et Amisu K.O., 2012- Antimicrobial Activity of *Ocimum basilicum* L and its Inhibition on the Characterized and Partially Purified Extracellular Protease of *Salmonella typhimurium*. *Research Journal of Biologie*, 5:138-144.
- [38] Bousbia N., 2011- Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse Doctorat, INA El Harrach. Alger, 175p
- [39] Razafintsalama V ., Starter S., Mambu L., Randrianarivo R., Petit T., Rajaonarison J.F., Mertz C., Rakoto D et Jeannoda V., 2013- Antimicrobial activities of *Dilobeia thouarsii* Roemer and Schulte, a traditional medicinal plant from Madagascar. *South African Journal of Botany*, 87: 1–3.
- [40] Hussain A.I., Anwar F., Sherazi S.T.H et Przybylski R., 2008- Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depend on seasonal variations. *Food Chemistry*. 108: 986-995.
- [41] Goetz P et Ghedira K., 2012- Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles, *Collection Phytothérapie Pratique*, p193-208
- [42] Zhiri A et Baudoux D., 2005- Huiles Essentielles Chémotypées et leurs synergies. *Edition Inspir Development*. Luxembourg, 80p
- [43] Rasooli I., 2005- Antibacterial and Chemical Properties of *Thymus persicus* Essential Oils at Pre and Flowering Stages. Targeted Screening of MAPs, *Economics & Law*, 4:139-147.
- [44] Edris A.E. & E.S. Farrag, 2003.- Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Nahrung*, 2 :117-21
- [45] Gbogboci K. A., Batawilae K., Ananici K., David M. P ., Gbeassore M., Bouchet P et Akpaganae K., 2006- Activité antifongique des huiles essentielles de *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) et

*Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng. (Poaceae) sur des micromycètes influencant la germination du Maïs et du Niebe. *Acta Bot. Gallica*, 153: 115-124