Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Kasdi Merbah-Ouargla

Faculté des Mathématiques et des Sciences de la matière

Département de Chimie

Mémoire

Présenté pour l'Obtention du diplôme de Master Académique

Spécialité : Chimie

Option : Chimie appliquée

Par : TLILI Ahlem et BENTAYEB Hadjer

Thème :

Etude analytique comparative et caractérisation de l'huile essentielle des différentes parties d'*Ocimum basilicum* L. cultivées sous climat aride.

Soutenu le : / / 2017 devant la commission d'examen :

Mr HADEF Derradji	**M.A.A**	**Président**
Mme ZENKHRI Louisa	**M.A.A**	**Examinateur**
Mr HADJ-MAHAMMED Mahfoud	**Professeur**	**Rapporteur**
Mme SLOUGUI Nabila	**M.C.B**	**Co- Rapporteur**

Année universitaire : 2016 / 2017

DEDICACE

A l'aide de Dieu le tout puissant, qui m'a donné la force et la patience pour pouvoir réalisé ce travail que je dédie :

À mes très chers parents

À mon très cher mari : Mr Abdelmalek

À mon frère Lalmi

À mes sœurs et leurs maris

À mes amis et mes collègues

Spéciale dédicace À mon binôme Ahlem

Sans oublier tous mes professeurs de primaire, du moyen, du secondaire et de l'enseignement supérieur.

À tous ceux qui aiment la science

Hadjer

DEDICACE

À mon père : Mohammed Abdelkader

À ma mère : Leila

Ahlem

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience pour terminer ce travail.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Monsieur ***HADJ MAHAMMED Mahfoud****, Professeur à la faculté des Mathématiques et des Sciences de la Matière de l'Université KASDI MERBAH-Ouargla. Nous tenons à lui exprimer notre reconnaissance pour sa disponibilité, sa compréhension, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour notre sujet de recherche. Nous le remercions pour son accueil au laboratoire de Biogéochimie des Milieux Désertiques de l'université KASDI MERBAH, Ouargla.*

N*ous exprimons Nos vifs remerciements à Madame* ***SLOUGUI Nabila.,*** *Maître de Conférences (B) à la faculté des Mathématiques et des Sciences de la Matière de l'Université KASDI MERBAH-Ouargla pour avoir co-dirigé ce travail, pour son aide et ses conseils en nous faisant bénéficier de son expérience, sa compétence et de sa rigueur scientifique durant la réalisation de ce travail.*

Monsieur ***HADEF Derradji*** *à la faculté des Mathématiques et des Sciences de la Matière de l'Université KASDI MERBAH-Ouargla, nous fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Qu'il nous permette de lui exprimer notre respectueuse gratitude.*

Nous remercions Mme ***ZENKHRI Louisa*** *à la faculté des Mathématiques et des Sciences de la Matière d'avoir accepté d'examiner ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de notre grande considération.*

Nous exprimons toute notre reconnaissance à nos collègues de la promotion 2016/2017 et nous leur souhaitons la réussite et une bonne continuation dans la vie.

Nos vifs remerciements vont à toute l'équipe du laboratoire Biogéochimie des milieux désertiques en particulier : ***Amina****, Houria et Fatiha*

Un grand merci Au personnel du laboratoire de bactériologie de l'hôpital Mohammed BOUDIAF à Ouargla pour leur aide.

À toute personne ayant participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

ABS : Absorbance de la solution DPPH sans l'échantillon (contrôle négatif).

ABS0 : Absorbance de la solution DPPH en présence de l'échantillon.

AFNOR : Association Française de NORmalisation.

ATCC : American Type Culture Collection.

AFSSAPS : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.

C : Concentration [µg/ml].

° C : est l'unité de l'échelle de température Celsius.

CC : chromatographie sur colonne.

CCM : chromatographie sur couche mince.

CE_{50} : Concentration efficace de substrat pour produire 50% de réduction du DPPH.

CPG : Chromatographie en phase gazeuse (CPG).

CPG/SM : Le couplage chromatographe en phase gazeuse - spectromètre de masse.

CI_{50} : Concentration permettant d'inhiber 50% du signal de référence.

d : La densité.

D : le diamètre.

DCM : dichlorométhane.

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (α, α-diphenyl-β picrylhydrazine).

DPPH• : radical libre (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle).

EtOAc : acétate d'éthyle.

E/Z : l'isomérisation photochimique d'une double liaison est à l'origine du processus de la vision.

f : fraction.

GN : Gélose Nutritive.

H (%) : Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans la matière végétale.

HE_{11} : huile essentielle de l'été des feuilles.

HE_{12} : huile essentielle de l'été des fleurs.

HE_{21} : huile essentielle de l'automne des feuilles.

HE_{22} : huile essentielle de l'automne des fleurs.

HE_{31} : huile essentielle de l'hiver des feuilles.

HE_{32} : huile essentielle de l'hiver des fleurs.

I % : Pourcentage D'inhibition.

IFRA : International Fragrance Association.

ISO : l'Organisation internationale de normalisation.

IR : spectre infrarouge.

L : Le grand nomenclateur Linné.

mf : masse du matériel végétal frais en gramme (g).

MH : La gélose Mueller Hinton.

m(HE) : masse d'huile essentielle obtenue en gramme (g).

m(MS) : masse de matériel végétal sec utilisé en gramme (g).

ms : masse du matériel végétal séché en gramme (g).

NIST: National Institute of Standards and Technology.

R : Rendement exprimé en pourcentage (%).

R_f : facteur de rétention

RMN : La Résonance Magnétique Nucléaire.

ROS : Reactive Oxygen Species.

SM : Spectre de Masse.

UV : Rayonnement Ultraviolet.

v : vibrateurs (cm^{-1}).

Liste des figures

Figure 01 : Facteurs de variabilité des huiles essentielles. **05**

Figure 02 : Exemples de structures de monoterpènes rencontrés dans les huiles essentielles. **06**

Figure 03 : Exemples de structures de sesquiterpènes rencontrés dans les huiles essentielles. **07**

Figure 04 : Exemples de structures de composés aromatiques rencontrés dans les huiles essentielles. **07**

Figure 05 : Dispositif de l'hydrodistillation. **08**

Figure 06 : Dispositif de l'entrainement à la vapeur. **08**

Figure 07 : Dispositif de l'hydrodistillation et l'entrainement à la vapeur au laboratoire **09**

Figure 08 : Dispositif de l'hydrodistillation par micro-onde. **10**

Figure 09 : Schéma de l'extraction au CO_2 supercritique. **10**

Figure 10 : Schéma de fonctionnement d'une chaîne chromatographique gazeuse. **12**

Figure 11 : Le basilic commun. – *Ocimum basilicum.* **16**

Figure 12 : Aspect morphologique de l'*Ocimum basilicum* L. **17**

Figure 13 : Basilic nain compact. **21**

Figure 14 : Basilic marseillais. **21**

Figure 15 : Basilic grand vert. **22**

Figure 16 : Basilic pourpre. **22**

Figure 17 : Basilic cannelle. **22**

Figure 18 : Basilic citron. **22**

Figure 19 : Localisation géographique du site de prélèvement. **26**

Figure 20 : La zone agricole d'Oum-Erraneb. **27**

Figure 21 : L'*Ocimum basilicum* L. Genovese : Le basilic grand vert**.** **28**

Figure 22 : Les différentes parties d'*Ocimum basilicum* L. Genovese**.** **29**

Figure 23 : Le montage d'hydrodistillation (type Clevenger). **31**

Figure 24 : Le basilic avant la floraison (mois d'avril) **34**

Figure 25 : Analyse des chromatogrammes sous UV. **41**

Figure 26 : Huile essentielle (**HE_{21}**) utilisée pour la séparation. **46**

Figure 27 : La colonne utilisée. **47**

Figure 28 : Les fractions obtenues. **47**

Figure 29 : Plaques CCM récapitulatives des fractions **D_1** et **D_2**. **49**
Figure 30 : Spectre IR de la fraction **D_1**. **49**
Figure 31 : Spectre IR de la fraction **D_2**. **50**
Figure 32 : Spectre IR du linalol pure. **51**
Figure 33 : Spectre IR du groupe **E.** **51**
Figure 34 : Les fractions isolée : 411, 412 (**F_1**, **F_2**, **F_3**, **F_4**). **52**
Figure 35 : Plaques CCM récapitulatives des fractions (**F_1**, **F_2**, **F_3**, **F_4**). **52**
Figure 36 : Spectre IR de la fraction **F_1**. **53**
Figure 37 : Spectre IR de la fraction **F_2**. **53**
Figure 38 : Spectre IR de la fraction **F_3**. **53**
Figure 39 : Spectre IR de la fraction **F_4**. **53**
Figure 40 : Spectre IR d'eugénol pur. **54**
Figure 41 : Résumé les résultats de la colonne **55**
Figure 42 : Structure chimique du radical libre DPPH•. **58**
Figure 43 : Spectrophotomètre UV pour l'évaluation de l'effet antioxydant. **58**
Figure 44 : Activité antioxydante de l'acide ascorbique. **61**
Figure 45 : Activité antioxydante d'**HE_{11}.** **61**
Figure 46 : Activité antioxydante d'**HE_{12}.** **61**
Figure 47 : Activité antioxydante d'**HE_{21}.** **62**
Figure 48 : Activité antioxydante d'**HE_{22}.** **62**
Figure 49 : Activité antioxydante d'**HE_{31}.** **62**
Figure 50 : Activité antioxydante d'**HE_{32}.** **63**
Figure 51 : Activité antioxydante de l'huile essentielle d'*O. Basilicum* L Comparée à de la vitamine C à des concentrations allant de 8 à 32µg/ml. **63**
Figure 52 : CI_{50} des huiles essentielles et de l'acide ascorbique. **64**
Figure 53 : Les souches bactériennes utilisées. **68**
Figure 54 : La gélose Muller-Hinton. **68**
Figure 55 : les zones d'inhibition, incluant le disque (L'essai antibiotique à droite et les huiles à gauche) **69**

Liste des tableaux

Tableau 01 : Planning de récolte dans les quatre saisons. **28**

Tableau 02 : Conditions opératoires pour l'hydrodistillation. **32**

Tableau 03 : Rendement des HE des différentes parties d'*O. basilicum* L., chaque saison. **34**

Tableau 04 : Taux d'humidité d'*Ocimum basilicum* L. *Genovese*, pour chaque saison. **36**

Tableau 05 : La densité des différentes parties d'*O. basilicum* L. *Genovese*, de chaque saison **37**

Tableau 06 : Couleurs des huiles essentielles obtenues des différentes parties **38**

Tableau 07 : Regroupement des fractions. **48**

Tableau 08 : Fréquences de groupe actives dans de linalol. **50**

Tableau 09 : Les R_f des fractions du méthanol. **52**

Tableau 10 : Les principaux vibrateurs (cm^{-1}) présents sur les quatre fractions. **53**

Tableau 11 : Fréquences de groupes fonctionnels dans l'eugénol. **54**

Tableau 12 : L'activité antioxydante de l'HE du basilic **60**

Tableau 13 : L'activité antioxydante de l'acide ascorbique **60**

Tableau 14 : CI50 des huiles essentielles et de l'acide ascorbique **64**

Tableau 15 : Les noms botaniques et les références des souches bactériennes utilisées. **67**

Tableau 16 : Liste des antibiotiques testés pour les souches bactériennes utilisées **70**

Tableau 17 : Diamètres des zones d'inhibition (incluant le disque 6 mm) des HE d'*O.basilicum* L **70**

Tableau 18 : Teneur en chémotype hybride linalol-eugénol des huiles essentielles d'*Ocimum basilicum* L. analysées par CPG sur 3 colonnes de polarité différentes. **72**

Liste des Courbes

Courbe 01 : Cinétique d'extraction de l'huile essentielle **(HE11)** lors de l'hydrodistillation des feuilles *d'O basilicum* L. *Genovese.* **33**

Liste des Schémas

Schéma 01 : Organigramme de la méthodologie de l'étude. **30**

Tables des matières

Introduction générale ***01***

Synthèse bibliographique ***02***

1. GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES **03**

1.1. Définition

1.2. Propriétés physiques générales **03**

1.3. Propriétés chimiques **04**

1.4. Obtention à partir de la plante **04**

1.4.1. Identification botanique **04**

1.4.2. Partie de la plante utilisée **05**

1.4.3. Conditions optimales de cueillette **05**

1.5. Composition chimique **06**

1.5.1. Terpènoïdes **06**

1.5.2. Composés aromatiques **07**

1.5.3. Autres composés des HE **07**

1.6. Procédés d'obtention **08**

1.7. Conservation **11**

1.8. Toxicité **11**

1.9. Identification **12**

1.10. Activités biologiques **13**

1.11. Utilisations **14**

2. GENERALITES SUR L'*OCIMUM BASILICUM* L. **16**

2.1. Historique **16**

2.2. Systématique **16**

2.3. Description **17**

2.4. Culture **18**

2.5. Récolte et conservation **18**

2.6. Utilisation **19**

2.7. Variétés **21**

2.8. Travaux sur le Basilic **23**

Partie expérimentale 25

Chapitre I : Matériel végétal & Extraction 25

1. PRESENTATION DE LA ZONE DE CULTURE **26**

1.1. Localisation géographique **26**

1.2. Caractéristiques climatiques de la wilaya d'Ouargla **27**

1.3. Conditions de culture **27**

1.4. Date de récolte **27**

2. PRESENTATION DU MATERIEL VEGETAL D'ETUDE **28**

3. CONSERVATION DE LA PLANTE **29**

4. PROTOCOLE EXPERIMENTAL **30**

5. EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES **31**

5.1. Les conditions opératoires de l'extraction **32**

5.2. Etude cinétique du rendement **32**

5.3. Rendement des huiles essentielles **33**

5.4. Taux d'humidité **35**

5.5. La densité **35**

5.6. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles **37**

Chapitre II : Les méthodes de séparation (CCM & CC) 39

1. LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM) **40**

1.1. En phase normale **41**

1.2. En phase inverse **43**

2. SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE **45**

2.1. La chromatographie sur colonne **45**

2.2. Identification spectrale par la spectroscopie infrarouge (IR) **45**

2.3. Chromatographie sur colonne de l'huile HE_{21} **46**

2.4. Préparation de la colonne **47**

2.5. Récupération des fractions **47**

2.6. Etude des fractions regroupées **48**

Chapitre III : Activités biologiques (Antioxydante & Antibactérienne) 56

INTRODUCTION **57**

1. ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET LES ANTIOXYDANTS **57**

1.2. Principe de la méthode **58**

1.3. Protocole **58**

1.4. Calcul du pourcentage d'inhibition (I %) et de la concentration inhibitrice minimale (IC_{50}) **59**

1.5. Résultats du test DPPH **59**

2. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES HE **67**

2.1. Souches bactériennes testées et conditions de culture **67**

2.2. Les milieux de culture utilisés **68**

2.3. Méthode de l'aromatogramme **69**

2.4. Résultats de l'aromatogramme **69**

Conclusion générale ***73***

Référence bibliographique ***76***

Introduction générale

L'Algérie présente une situation géographique lui permettant de jouir d'une grande variation climatique à laquelle s'ajoutent des ressources hydriques. Ces ressources naturelles sont importantes pour son économie et pour le maintien de l'équilibre écologique de plusieurs régions notamment celui d'Ouargla. Parmi ses richesses ont cite les plantes aromatiques, telles que les variétés du basilic. Elles ont une aptitude à synthétiser de nombreux métabolites secondaires en réponse aux stress biotiques et abiotiques qu'elles peuvent subir. Ces métabolites secondaires possèdent diverses propriétés biologiques.

Le basilic est une plante aromatique et médicinale, connu pour ses effets thérapeutiques comme le traitement des affections respiratoires, céphalées et ulcères. Il constitue une importante source d'huiles essentielles riches en mono- et sesquiterpènes, et doué de diverses activités biologiques : antimicrobienne, antifongique, antiseptique….

A l'heure actuelle, Plusieurs études comparatives sont effectuées sur la composition des huiles essentielles du basilic cultivé à Ouargla (entre les différentes variétés et différentes régions).

Dans le but d'assembler tous les facteurs influents sur la composition des huiles essentielles du basilic et compléter des travaux antérieurs, nous avons orienté notre travail vers l'étude de l'influence des parties et des saisons sur la qualité, la quantité et la composition des différentes essences du basilic grand vert cultivé à Ouargla.

Notre étude se divise en deux parties :

La première partie consacrée à l'étude bibliographique est divisé en deux étapes :

- La première est dédiée à des généralités sur les huiles essentielles
- La deuxième est consacrée à la plante *Ocimum basilicum* L.

La deuxième partie représente la partie expérimentale scindée en 3 chapitres :

- Chapitre I : Matériel végétal et extraction des huiles essentielles.
- Chapitre II : Les méthodes de séparation (CCM, CC).
- Chapitre III : Evaluation de l'activité biologique des HE de la plante étudiée.

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

Synthèse bibliographique

1. GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES

1.1. Définitions

Les définitions suivantes proviennent des pharmacopées françaises et européennes, des normes AFNOR et ISO, ainsi que de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) et du code de la santé publique. **[1]**

❖ **Huile essentielle**

« *L'huile essentielle est un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir de matière végétale botaniquement définie :*

- *Soit par entrainement à la vapeur (le plus fréquent).*
- *Soit par distillation sèche, (quelques cas, dont l'huile essentielle de cade utilisée en dermatologie).*
- *Soit par procédé mécanique approprié sans chauffage des agrumes (uniquement pour le genre Citrus).*

La matière première végétale utilisée peut être fraiche, flétrie, sèche, entière, pulvérisée, à l'exception des fruits du genre Citrus qui sont traités à l'état frais.

L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition.». **[1]**

1.2. Propriétés physiques générales :

Les huiles essentielles forment un groupe relativement homogène quant à leurs propriétés physiques :

- Ce sont des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluides (assez mobiles à quelques exceptions près : huile essentielle de santal est très visqueuse ; celle de rose et de gaïac sont parfois d'aspect butyreux), voire rétinoïde, très odorantes.
- Elles se distinguent des huiles fixes et des principaux lipides en ce sens qu'elles se volatilisent sous l'action de l'air et de la chaleur.
- La coloration varie de l'incolore au brun clair ; l'huile de matricaire est bleu-vert, de même que celle de patchouli.
- La densité est en général inférieure à celle de l'eau (de 0,750 à 0,990) sauf pour les huiles essentielles de cannelle, girofle, sassafras ; la plus dense étant l'huile essentielle de wintergreen (d=1.187).

- Le point d'ébullition est toujours supérieur à 100 °C.
- Elles ont un indice de réfraction élevé, le plus souvent, sont douées de pouvoir rotatoire.
- Les huiles essentielles sont solubles dans les graisses et les solvants apolaires, la solubilité est plus ou plus ou moins grande dans les alcools à différents titres ; il y a une très légère solubilité dans l'eau.**[1-3]**

1.3. Propriétés chimiques

Les huiles essentielles s'oxydent à la lumière et se résinifient en absorbant de l'oxygène en même temps que leur odeur se modifie, leur point d'ébullition augmente, leur solubilité diminue. Elles absorbent le chlore, le brome, l'iode avec dégagement de chaleur. Elles peuvent se combiner à l'eau pour former des hydrates. **[2]**

Elles ont un indéniable pouvoir de pénétration percutanté qui est objectivé par le fait qu'un individu qu'on frictionne à l'euclyptol présente, quelques instants après, une haleine très odorante. **[2]**

1.4. Obtention à partir de la plante

1.4.1. Identification botanique

La connaissance de l'origine botanique de la plante destinée à l'obtention de son huile essentielle est nécessaire aussi bien pour les applications futures, en parfumerie, en cosmétique, en pharmacie et même en agroalimentaire. L'identité de la matière première initiale (plante ou partie de plante) est indispensable pour la traçabilité et pour éviter les éventuelles fraudes. L'identification est effectuée par le fournisseur qui doit présenter un certificat d'analyse. **[1]**

Grace à une étude rigoureuse de ses caractères macro- et microscopiques, on signalera, pour la plante étudiée, d'abord le nom de la famille, puis son genre et enfin son espèce. Il ne faudra pas oublier de noter, à la suite, le nom du premier botaniste descripteur de cette plante. **[1]**

1.4.2. Partie de la plante utilisée

L'huile essentielle se trouve dans des cellules sécrétrices spécifiques. Ce sont des structures histologiques spécialisées servant à leur synthèse et à leur stockage. Les cellules sécrétrices sont rarement à l'état isolé, mais plus souvent regroupées dans des poches

(Myrtacées, Rutacées), dans des canaux sécréteurs (Apiacées, Composées) ou dans des poils sécréteurs (Lamiacées). Ces cellules sont le plus souvent à la périphérie, des organes extérieurs de la plante. **[1]**

La partie de la plante (feuilles, fleurs, tiges, ..) utilisée pour obtenir les huiles essentielles doit être précisée, soit pour des questions de rendement, soit parce que la composition chimique de la partie considérée conduira à une application spécifique très intéressante. **[1]**

1.4.3. Conditions optimales de cueillette

Les différents paramètres suivants doivent être considérés :

- La période de l'année. Par exemple pour les labiées, le plus souvent, pendant la période de floraison.
- La plante doit contenir le moins d'impureté possible. Par exemple, la terre, la poussière, les pesticides et les herbicides doivent être éliminés.
- Il faut éviter les proliférations microbiennes et fongiques au cours de la conservation, et ainsi éviter les activités enzymatiques non souhaitées.
- Enfin, les conditions climatiques, géographiques et agronomiques pourront intervenir sur la composition chimique de l'huile essentielle. **[1]**

Cette variation peut être due à des nombreux facteurs, dont nous citons les plus importants :

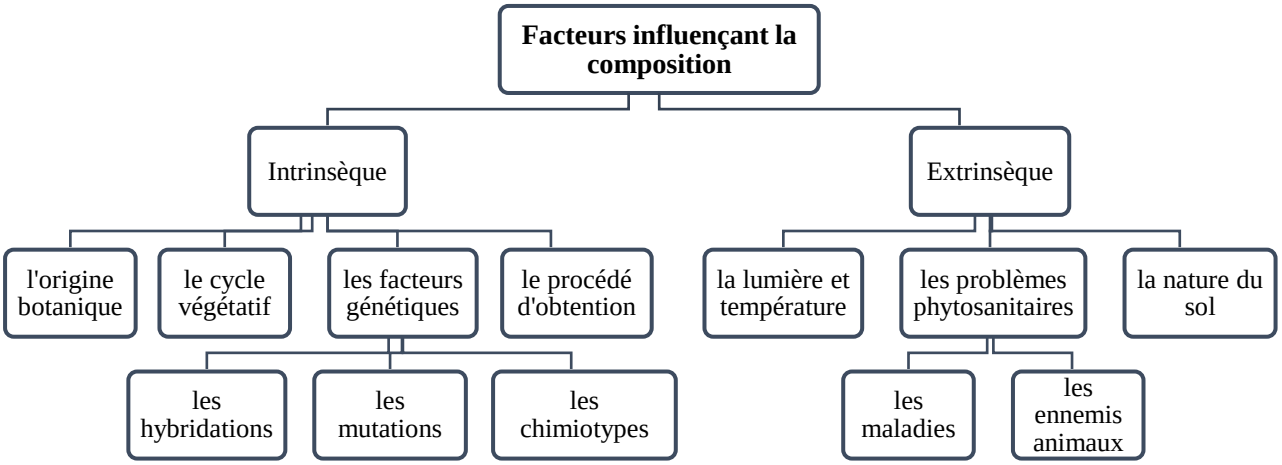


Figure 01 : Facteurs de variabilité des huiles essentielles. **[4]**

1.5. Composition chimique

Il est généralement admis que les constituants des huiles essentielles sont répartis en trois groupes :

- Le groupe des terpénoïdes (mono- et sesquiterpènes).
- Le groupe des phénylpropanoides.
- Le groupe des lipides, issus de la dégradation d'acide gras et de terpènes. **[1]**

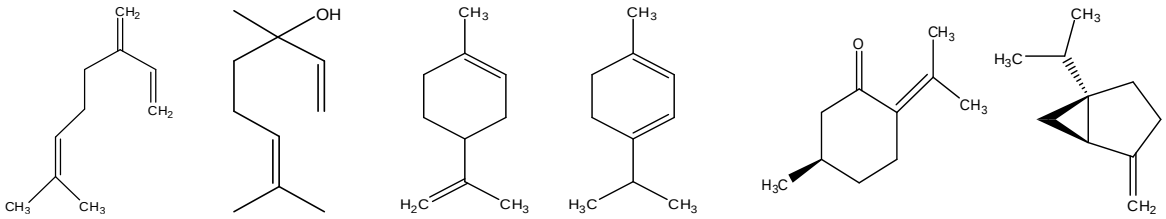
1.5.1. Terpènoïdes

Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : monoterpènes et sesquiterpènes sont les plus présents. **[4-5]**

- **Monoterpènes $C_{10}H_{16}$**: sont des hydrocarbures aliphatiques, saturés ou insaturés. Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. Ils constituent parfois plus de 90 % de l'huile essentielle. **[1]**

La réactivité des cations intermédiaires justifie l'existence de nombreuses molécules fonctionnalisées :

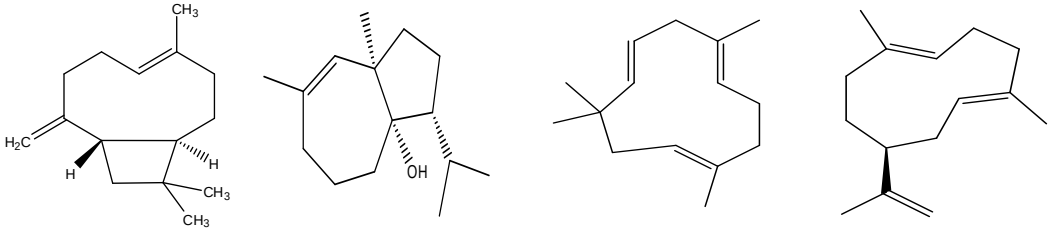
- Alcools : acycliques (linalol), monocycliques (menthol), bicycliques (bornéol).
- Aldéhydes : le plus souvent acycliques (citronellal, néral, géranial).
- Cétones (menthone, camphre)
- Esters (acétate de linalyle)
- Ethers ou oxydes (1,8-cinéol ou eucalyptol)
- Phénols (thymol, carvacrol)
- Peroxydes (ascaridole). **[6]**



Myrcène **Linalol** **Limonène** **α-Terpinène** **Pulegone** **Sabinène**

Figure 02 : Exemples de structures de monoterpènes rencontrés dans les huiles essentielles.

- **Sesquiterpènes $C_{15}H_{24}$** : sont l'objet de nombreuses cyclisations, de réarrangements, d'oxydation conduisant à un très grand nombre de structures. Celles-ci peuvent se présenter sous forme de lactones facilement allergisantes. **[7]**

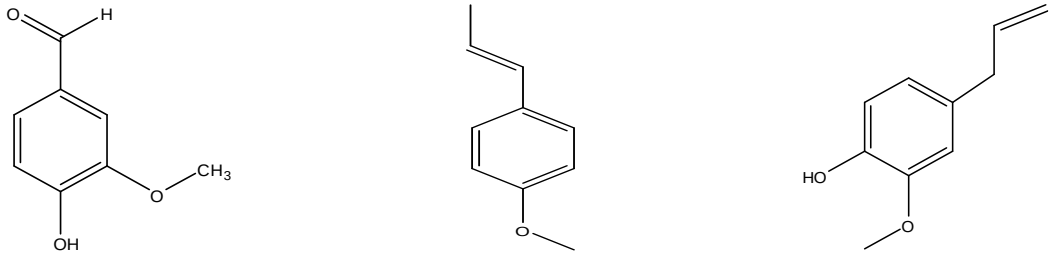


β-Caryophyllène **Carotol** **α-Humulène** **Germacrene A**

Figure 03 : Exemples de structures de sesquiterpènes rencontrés dans les huiles essentielles.

1.5.2. Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C_6-C_3) sont beaucoup moins fréquents que les précédentes. Très fréquemment, il s'agit d'allyles et de propénylphénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles, telle celle du girofle (eugénol). On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés en (C_6-C_1), plus rares, tel le safrole. **[5]**



Vanilline **Anéthol** **Eugénol**

Figure 04 : Exemples de structures de composés aromatiques rencontrés dans les huiles essentielles.

1.5.3. Autres composés des HE

Compte tenu de leur mode d'extraction, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entrainables lors de l'hydrodistillation, carbure : acide (C3 à C10), alcools, aldéhydes (octanal, décanal…), esters, lactones, produits azotés soufrés. **[5]**

1.6. Procédés d'obtention

➢ **Entrainement à la vapeur d'eau**

La plupart des huiles essentielles sont obtenues par distillation et entrainement à la vapeur d'eau (80 % des cas) trois variantes sont possibles selon la texture et la fragilité de la matière à traiter. **[5]**

- **L'hydrodistillation simple (figure 05),** consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'HE se sépare par différence de densité. **[6]**

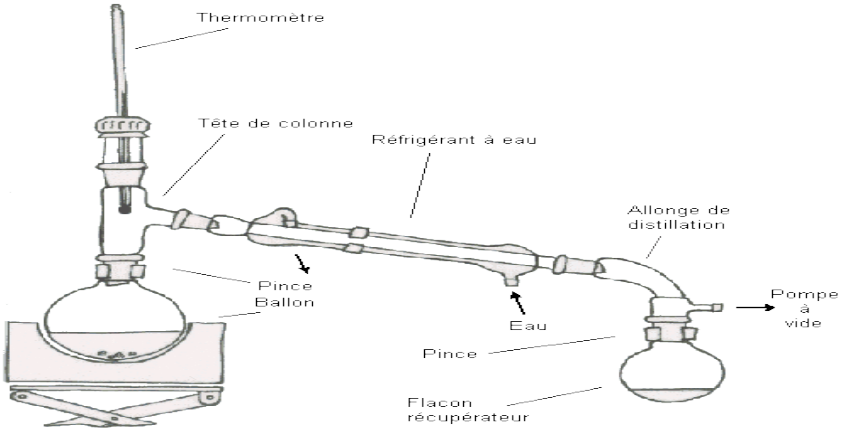


Figure 05 : Dispositif de l'hydrodistillation.

- **La distillation à vapeur saturée**, **(figure 06) :** le végétal n'est pas en contact avec l'eau : la vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. Pour raccourcir le temps de traitement, limiter l'altération des constituants de l'huile essentielle et économiser l'énergie. **[6]**

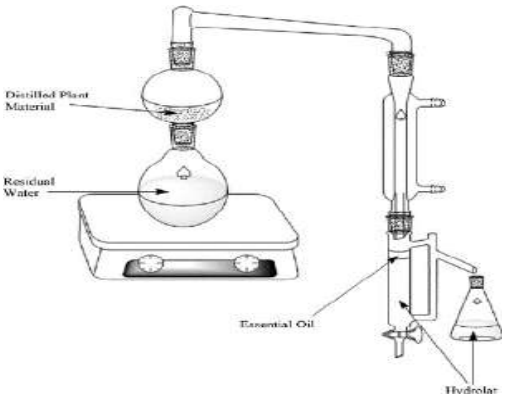


Figure 06 : Dispositif de la distillation à vapeur saturée.

- **L'hydrodiffusion** consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0,02-0.15 bar) à travers la masse végétale, du haut vers le bas. La composition des produits obtenus est qualitativement sensiblement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classiques. Le procédé permet un gain de temps et d'énergie. **[6]**

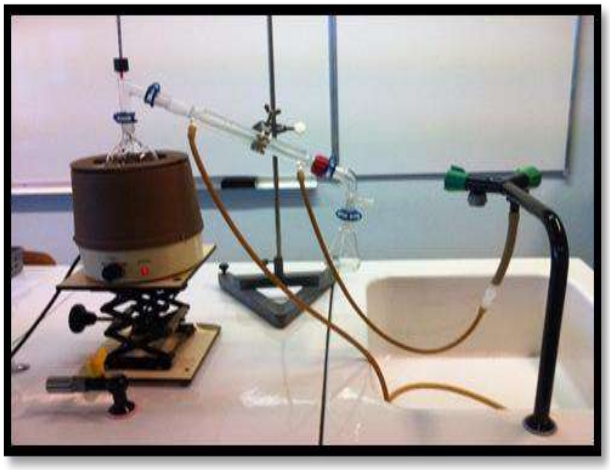


Figure 07 : Dispositif de l'hydrodistillation (à gauche) et l'entrainement à la vapeur (à droite) au laboratoire.

➢ **Par expression des épicarpes de *Citrus***

Elle est employée uniquement pour les agrumes : le zeste qui contient de petites vésicules d'essence est séparé du fruit puis soumis à l'action d'une presse. Le procède classique consiste à exercer, sous un courant d'eau, une action abrasive sur la surface du fruit. Après élimination des déchets solide, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par centrifugation. **[2]**

➢ **Extraction par solvant**

On dissout les principes aromatiques gras, les pigments, les résines de la plante fraiche dans un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré, très aromatique : la concrète. Cette concrète purifiée par l'alcool absolu, donne l'absolue, qui n'est pas stricto sensu une huile essentielle mais s'en rapproche beaucoup. On appelle rétinoïde l'homologue de la concrète obtenu à partir de plante sèche. **[2]**

D'autres procédés comme la macération à chaud ou l'enfleurage, qui consistent à extraire les principes aromatiques des plantes par des corps gras puis à les séparer des derniers par dissolution dans l'alcool, sont employés plus occasionnellement.**[2]**

- **L'hydrodistillation par micro-ondes sous vide**

Dans ce procédé, la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle : l'huile essentielle est entraînée dans le mélange azéotropique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée (sans ajout d'eau pour les produits traités en frais). Très rapide et peu consommateur d'énergie, le procédé livre un produit qui, le plus souvent, est de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation traditionnelle (temps de travail divisé par 5 à 10 et température plus basse). **[6]**

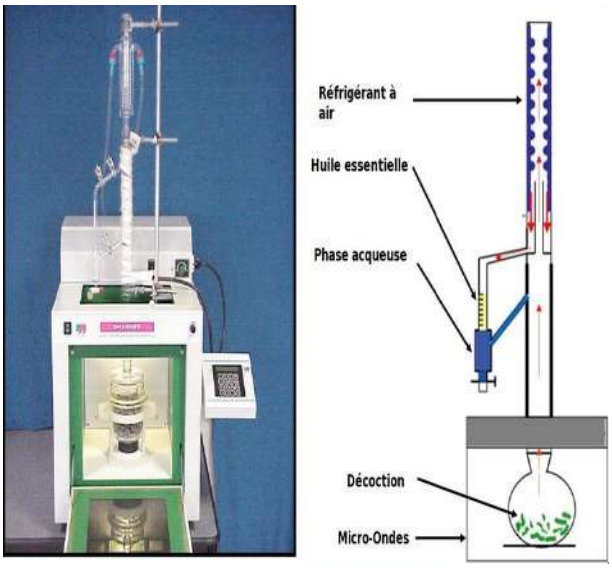


Figure 08 : Dispositif de l'hydrodistillation par micro-ondes.

- **L'hydrodistillation par CO_2 supercritique**

Cette méthode a été développée au départ dans l'industrie agroalimentaire, par exemple, pour le houblon afin d'améliorer les rendements d'extraction. Le principe est d'utiliser le gaz CO_2 mis dans un état supercritique (Tc= 31°C, Pc=74 bars).Ce type d'extraction permettra l'obtention sélective d'une molécule isolée ou d'un ensemble de molécules, douées de propriétés pharmacologiques intéressantes. Il serait également possible d'utiliser ces dernières dans des réactions chimiques d'hémi-synthèses pour l'obtention de molécules encore plus performantes. **[1], [6]**

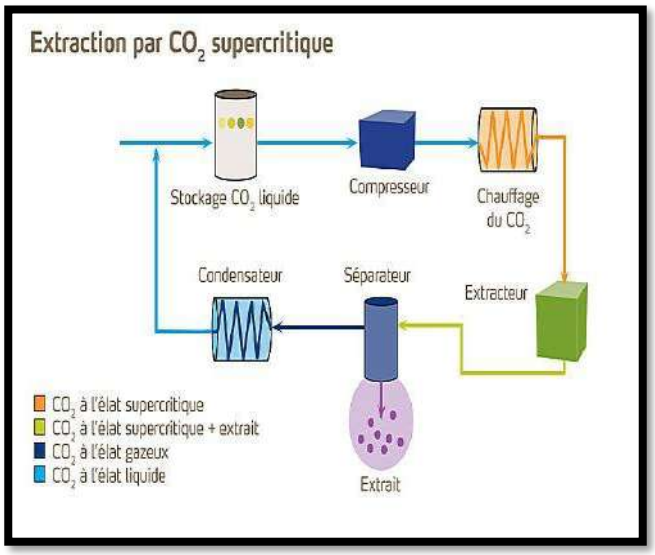


Figure 09 : Schéma de l'extraction au CO_2 supercritique.

Les huiles essentielles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal.**[4]** Pour obtenir un kilogramme d'huile essentielle pure, il faut par exemple : une tonne de fleurs de camomille, sept tonnes de feuilles de mélisse, une tonne de feuilles de verveine, quatre tonnes de pétales de rose. **[8]**

1.7.Conservation

Il va de soi que la relative instabilité des molécules constitutives des huiles essentielles rend leur conservation difficile. Les possibilités de dégradation sont nombreuses, facilement objectivées par la mesure des indices (peroxyde, réfraction), par la détermination des caractères physiques (viscosité, miscibilité à l'alcool, pouvoir rotatoire) ou par l'analyse en CPG. Les risques sont multiples : photo-isomérisation (E –> Zanéthole), photo-cyclisation (citrals), coupure oxydative de propénylphénols, peroxydation des carbures et décomposition en cétones et alcools (limonène), thermo-isomérisation (citrals), etc. **[6].** Ces dégradations pouvant modifier les propriétés ou mettre en cause l'innocuité du produit, il convient de les éviter : utilisation de flacons propres et secs en aluminium, en acier inoxydable ou en verre teinté antiactinique, presque entièrement remplis et fermés de façon étanche (l'espace libre étant rempli d'azote ou d'un autre gaz inerte), stockage à l'abri de la chaleur et de la lumière. **[6].**

1.8.Toxicité

Dans la mode actuelle des « produits naturels », il convient de ne pas utiliser ces substances de façon abusive car elles ne sont pas dénuées de toxicité dermique pour certaines d'entre elles. En raison de leur utilisation en parfumerie, les organisations professionnelles (IFRA : International Fragrance Association) ont édité un certain nombre de recommandations. Les HE sont contre-indiquées chez les enfants de moins de trois ans et chez la femme enceinte ou allaitante.

Les HE sont des mélanges complexes de substances plus ou moins actives et certaines avec une toxicité qui peut être importante. Les plus fréquemment identifiées sont : l'eugénol (carcinogène), le bergaptène (photosensibilisant et irritant), le citral (irritant cutané), le farnesol (irritant cutané). Le methyleugénol est principalement retrouvé dans l'essence de clou de girofle (92%) mais aussi le basilic (6 %) et le niaouli (97 %). L'Afssaps dans une recommandation sur les huiles essentielles dans les produits cosmétiques, a établi une liste de 26 produits susceptibles d'entraîner des réactions allergiques de contact chez des personnes sensibilisées et sur laquelle figurent : le citral, l'eugénol, l'isoeugénol, le géraniol et le citronellol. **[9]**

1.9.Identification

La chromatographie en phase gazeuse est la méthode la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles. C'est une méthode de séparation des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans subir une décomposition :

- **Chromatographie en phase gazeuse**

Cette méthode d'analyse se distingue par la facilité de mise en œuvre, un temps d'analyse assez court, la fiabilité des résultats et possibilité d'automatisation du processus ce qui justifie sa bonne adaptation aussi bien à l'analyse qualitative qu'à l'analyse quantitative. L'analyse des huiles essentielles, initialement réalisée sur des colonnes garnies, fait maintenant uniquement appel aux colonnes capillaires, plus efficaces dans un temps plus court et donnant des temps de rétention avec une plus grande précision. Pharmacopées et normes, tendent d'ailleurs à généraliser la référence à des profils chromatographiques types obtenus en CPG. **[6]**

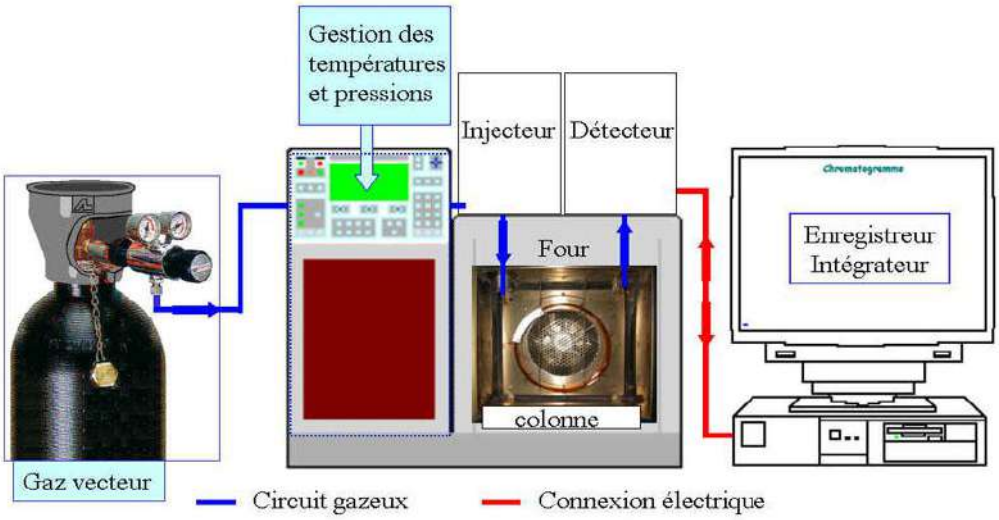


Figure 10 : Schéma de fonctionnement d'une chaîne chromatographique gazeuse.

La possibilité de coupler les chromatographes à divers spectromètres (infra-rouge à transformée de FOURIER, SM) augmente considérablement la quantité et la qualité des informations obtenues. En CPG-SM, la comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs « librairies » de référence permet son identification (à condition que le niveau de similitude des spectres, inconnu et référence, soit suffisant et que les indices de rétention soient identiques, dans des conditions opératoires comparables). L'apparente facilité

de la méthode ne doit pas faire oublier que, pour établir la structure d'un constituant inconnu, l'idéal est de l'isoler pour en faire une analyse spectrale poussée (RMN). **[6]**

1.10. Activités biologiques

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques.

Plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales, en particulier leurs pouvoirs antifongiques, antibactériens, antioxydants et insecticides.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'évaluation de deux activités : antibactérienne et antioxydante.

- **Activité antioxydante**

Les oxydations et en particulier celle des lipides insaturés sont l'un des troubles majeurs qui, en présence d'oxygène, peuvent intervenir soit dans la cellule elle-même soit lors de la préparation et de la conservation de produits utilisés par l'homme dans des domaines variés comme l'agroalimentaire, la pharmacologie et la cosmétologie. Elles conduisent à la formation de radicaux libres très réactifs et à des dérivés toxiques souvent carcinogènes et dont certains présentent des odeurs ou des saveurs désagréables. **[10]**

Les antioxydants sont des composés, naturels ou ajoutés, qui permettent de ralentir le phénomène d'oxydation et apparaissent ainsi comme essentiels pour maintenir la qualité des aliments riches en lipides et les protéger des oxydations. Un bon antioxydant doit présenter plusieurs propriétés : efficacité à faible concentration, compatibilité physique et chimique avec le substrat qu'il est censé protéger, absence de toxicité et de qualités sensorielles propres. **[10]**

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. **[11]**

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**.** 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 (les dérivés actifs de l'oxygène) et les éliminer**. [11]**

Quelques travaux ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que les antioxydants synthétiques**.** Les effets antioxydants des huiles essentielles et d'extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique**. [10]**

- **Activité antibactérienne**

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix. Depuis, les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et de leurs composants aient été largement étudiées par le passé. **[5]**

Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développe des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre. Elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques. **[12]**

En laboratoire, l'activité des huiles essentielles peut être montrée par l'élaboration d'un aromatogramme par une technique similaire à celle de l'antibiogramme : des pastilles imbibées d'huile essentielle sont déposées sur des blocs de géloses où sont ensemencées de bactéries. On observe, après culture, le développement des bactéries autour des timbres imbibés d'huile essentielle. Le non-développement de ces bactéries indique l'activité bactéricide de l'huile essentielle en question. **[8]**

1.11. Utilisations

Les principales utilisations des huiles essentielles sont pharmaceutiques (soit en principe actif, soit en excipient), cosmétiques, alimentaires, de loisir et industrielles. **[7]**

- ✓ **En pharmacie**

Les propriétés pharmacologiques de quelques huiles essentielles utilisées en thérapeutique sont principalement les propriétés antiseptiques et antifongiques qui sont reconnues par les autorités sanitaires. Différentes spécialités pharmaceutiques sont sur le marché. La tendance actuelle serait l'utilisation bénéfique de cette activité antiseptique, notamment, pour purifier l'air atmosphérique dans les centres de soins (hôpitaux, clinique) et aussi dans les maisons individuelles par diffusion d'huiles essentielles dans l'air. Des travaux récents soulignent

l'apport bénéfique des huiles essentielles face aux infections nosocomiales bactériennes dont les souches sont résistantes aux antibiotiques utilisés traditionnellement. Souvent, les huiles essentielles sont rajoutées dans la formulation des spécialités pharmaceutiques, pour masquer le mauvais goût des médicaments et pour donner un caractère plus agréable à leur consommation. **[1]**

- ✓ **En parfumerie**

Les huiles essentielles, à l'état dilué, sont utilisées dans les parfums. Actuellement, ce sont davantage les molécules de synthèse qui entrent dans la composition très complexe et confidentielle mise au point par les grands parfumeurs. L'avantage des matières premières de synthèse est qu'elles sont toujours disponibles, en n'importe quelle quantité et à des prix stables. En revanche, les matières premières d'origine naturelle restent onéreuses à cause, principalement, du prix élevé de la main-d'œuvre. Par ailleurs, la composition chimique des huiles essentielles dépend principalement de leurs conditions d'obtention et des variations de culture environnementales et climatiques. **[1]**

- ✓ **En cosmétologie**

Les cosmétiques sont des produits du bien-être et non des médicaments. Ils ne nécessitent pas d'autorisation de mise sur le marché. Cependant, on peut constater des allégations excessives sur les bienfaits thérapeutiques des produits cosmétiques par la présence d'huiles essentielles incorporées. L'AFSSAPS reste très vigilante sur cette pratique. **[1]**

- ✓ **En agroalimentaire**

Les huiles essentielles sont utilisées ici comme rehausseurs de goût et pour améliorer la saveur des produits alimentaires élaborés. Depuis peu, les industriels ont souhaité l'utilisation d'huiles essentielles comme conservateurs, au détriment des molécules de synthèse classiques couramment utilisées, telles que les parabènes. **[1]**

- ✓ **Dans l'industrie chimique**

L’huile essentielle est un mélange très complexe. Il est possible d'isoler des molécules d'intérêt, soit pour un usage ultérieur en tant que produit naturel présent sous une seule forme énantiomorphe, soit pour la réalisation d'hémisynthèses avec l'obtention finale de nouvelles molécules, économiquement plus rentables que la synthèse chimique classique qui présente des rendements faibles au bout de nombreuses étapes réactionnelles.**[1]**

2. GENERALITES SUR L'*OCIMUM BASILICUM* L.

2.1. Historique

Le Basilic commun ou Basilic romain, grand basilic (*Ocimum basilicum* L.) est une plante connue en Asie depuis 3000 ans, elle est originaire des Indes Orientales. Le mot « basilic » vient du grec basilikon, qui signifie « royale ».

Ocimum a été décrit par 'linnaeus' en 1753, genre de plantes de la famille des Labiées (Lamiacées, Labiacées), dont le nom vient du grec « oza » qui signifie odeur.

Labiée sont en très grande partie des plantes très aromatiques et riches en huile volatile, Elle est cultivée dans les pays méditerranéens. Aujourd'hui dans tous les jardins, à cause de l'odeur extrêmement suave de ses feuilles et de ses fleurs.

Au Moyen-âge, on cultive le basilic que l'on utilise en cuisine comme aromate. Il a longtemps été considéré comme une plante sacrée en Europe et en Inde probablement en raison de ses propriétés insecticides. **[13-17]**

Figure 11 : Le basilic commun. – Ocimum basilicum. **[14]**

2.2. Systématique

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 fleurs :

❖ **Position systématique du basilic selon Cronquist (1981)**

Règne : Plantae.
Division : Magnoliophyta.
Classe : Magnoliopsida.
Ordre : Lamiales.
Famille : Lamiaceae.
Genre : *Ocimum.*
Espèce *:* *Ocimum basilicum* L., 1753. **[18]**

2.3. Description

- Le basilic, élément obligé de tout jardin d'herbes, est une plante annuelle fragile atteignant **une hauteur** de 30 à 60 cm, selon les cultivars. On ne connaît pas avec certitude la région d'origine du basilic, mais celui-ci est sans doute indigène d'Afrique tropicale.
- **Les feuilles** ont une forme, une couleur, une saveur et un arôme qui varient selon les cultivars. De manière générale, elles sont vert foncé et luisantes, parfois pourpre violet chez certaines variétés. leurs bords sont entiers ou dentés en scie, et elles ont un arôme caractéristique à la fois chaud, épicé et parfumé qui rappelle celui du girofle, avec des notes piquantes.
- **Les fleurs** sont blanches, parfois teintées de violet pâle, formant des épis lâches au sommet de la tige, apparaissent de juin à septembre. Elles sont très petites (environ 6 mm de longueur), disposées en verticilles autour de la hampe.
- **La tige :** dressée, très-rameuse, légèrement velue, de 40 cm environ. **Les graines** fines, oblongues, elles sont de couleur noire. **Ses racines** sont pivotantes, fibreuse, blanchâtre. **[19-21]**

Figure 12 : Aspect morphologique de l'*Ocimum basilicum* L..

2.4. Culture

- Le basilic préfère les sols légers, riches, bien drainés et légèrement acides. Il peut tolérer un pH de 4,3 à 8,4. **[19]**
- La plante exige le plein soleil. Il faut bien arroser, mais éviter que le sol demeure saturé d'eau. **[19]**
- Semer à l'intérieur, environ 6 semaines avant la date de la dernière gelée de printemps, à une profondeur d'environ 6 mm. Garder le sol humide jusqu'à la germination, qui survient au bout de 8 à 14 jours, mais éviter de trop arroser. Pincer le sommet des semis dès qu'ils atteignent une hauteur d'environ 15 cm, afin de stimuler la croissance et la production de branches latérales. Ensuite, repiquer à l'extérieur lorsque tout risque de gel est écarté.
- Espacer les semis de 30 à 45 cm. **[19]**
- Le basilic tolère mal les températures inférieures à 5 °C (41°F). Il faut donc couvrir les plants avec des cloches ou un tunnel de plastique, si la température baisse trop. **[19]**
- Pincer les hampes florales dès qu'elles apparaissent, afin que la plante continue de produire de nouvelles feuilles. **[19]**
- Le basilic est sensible à la tâche foliaire pendant les périodes très humides, ou si le sol est mal drainé. La plante est aussi sujette aux infestations de pucerons et de thrips. **[17]**
- Pour cultiver à l'intérieur, semer à faible profondeur, dans de petits pots bien drainés. Placer les pots dans un endroit chaud et bien éclairé de la cuisine. Lorsque les premières feuilles véritables apparaissent, repiquer par touffes de 3 à 5 plants dans des pots de 10 cm, et placer les pots en plein soleil. Le basilic requiert au moins 5 heures de soleil par jour, ou 12 heures d'éclairage artificiel. Cueillir les jeunes extrémités pour maintenir le port buissonnant de la plante. **[19]**

2.5. Récolte et conservation

- Les feuilles peuvent être cueillies séparément pendant toute la saison de végétation, mais les jeunes plantes produisent les feuilles les plus savoureuses. **[19]**
- Si on veut cueillir seulement quelques feuilles, utiliser des ciseaux ou un couteau bien aiguisé, pour endommager la plante le moins possible. **[19]**

- On peut aussi cueillir toute la partie supérieure de la plante, avec tige et feuilles, mais il faut laisser au moins 4 étages de feuilles, soit environ 13 cm (5 po) de tige, sinon la plante risque de mourir. Pour conserver la fraîcheur de la récolte, faire une coupe nette à la base des tiges, puis placer dans un pot d'eau, dans un endroit frais. Éviter cependant de mouiller les feuilles, pour ne pas en altérer la couleur. **[19]**
- On peut blanchir les feuilles, puis les congeler dans des cubes de glace. C'est la meilleure façon de conserver la saveur du basilic, une fois récolté. **[19]**
- Pour sécher le basilic, séparer les feuilles de la tige et faire sécher dans un endroit sombre et aéré. Entreposer les feuilles sèches entières, dans un contenant hermétique. **[19]**

2.6. Utilisation

➢ **Usage culinaire**

- Le basilic frais, congelé ou séché peut être employé dans les soupes, les plats de poisson, les omelettes, les vinaigrettes, les farces et les plats de pâtes, ou sur la pizza. Il peut aussi accompagner de nombreux légumes, dont les artichauts, le brocoli, les carottes, les aubergines, le chou, les courges et les courgettes. Le basilic est sans doute l'herbe qui accompagne le mieux les tomates, et c'est un ingrédient quasi essentiel des pâtes et sauces de tomates. Le pesto des Italiens, analogue au pistou du sud de la France, est une délicieuse sauce à base de feuilles de basilic écrasées, d'ail, d'huile d'olive, de fromage parmesan et de pignons. **[19]**
- On peut ajouter aux salades des feuilles fraîches de basilic. **[19]**
- Les petites feuilles devraient être utilisées entières. Les feuilles plus grandes doivent être déchirées, plutôt que coupées, car cela conserve mieux leur saveur. **[19]**
- Pour utiliser le basilic frais en cuisine, ajouter les feuilles vers la fin de la cuisson, afin de conserver le plus possible de leur arôme et de leur saveur. **[19]**
- Pour faire une vinaigrette au basilic, ajouter des feuilles fraîches à un mélange de vinaigre et d'huile d'olive vierge. **[19]**

➢ **Usage artisanal**

- Les rameaux de basilic complètent bien le parfum des bouquets de fleurs fraîches. **[19]**

- **Usage médicinal**
  - Le basilic a été très utilisé dans le passé contre de nombreux maux, et la plante est encore employée à des fins médicinales dans bien des pays. Cependant, c'est avant tout une plante alimentaire. **[19]**
  - Le basilic est riche en vitamine C, en potassium, en bêta-carotène et en calcium. **[19]**
  - le basilic excite l'organisme, augmente la chaleur générale après avoir stimulé l'estomac. On l'a employé contre les maux de tête nerveux, la migraine, les névroses avec atonie, certaines paralysies. surtout celles qui sont liées à l'affection hystérique, dans les amauroses, dans quelques affections rhumatismales, etc. Certains auteurs l'ont considéré comme sédatif et antigonorrhéique. **[22]**
  - L'huile essentielle est très-énergique. Frédéric Hofmann (un médecin et chimiste allemand, 1660-1742) la considérait comme céphalique et nervine. Quelques gouttes instillées sur du sucre qu'on fait fondre dans deux cuillerées d'eau, agissent efficacement contre l'espèce de céphalalgie dont la cause se trouve liée à un état d'atonie et de langueur des organes digestifs. Cette huile, dit Gilibert (un physicien et chimiste américain, 1875-1946), est utile dans les névroses atoniques, telles que la paralysie et la goutte sereine. **[22], [23]**
  - Dioscoride (médecin, pharmacologue et botaniste grec, vers 25-90 apr. J-C) accorde au basilic la vertu diurétique, mais il lui reproche, sans raison plausible, d'affaiblir la vue lorsqu'on en fait un usage trop abondant, « Proposé par Bodard (un médecin, et botaniste français, 1785-1826) comme succédané du camphre, le basilic est banni par d'autres de la matière médicale, et borné aux usages culinaires. Ces deux opinions s'éloignent également de la vérité. Le camphre est un remède héroïque dont l'art de guérir pourrait difficilement se passer, et que jusqu'à présent on a vainement essayé de remplacer. » **[22], [23]**
  - La poudre des feuilles est un agréable sternutatoire employé avec succès dans la perte de l'odorat causée par l'épaississement de la muqueuse pituitaire ou la concrétion du mucus nasal, dans le coryza chronique, l'amaurose, etc. **[22]**

2.7.Variétés

Il existe des dizaines de variétés de basilic, de couleurs, de goût et de forme différente. En Algérie deux variétés sont cultivées : le basilic grand vert et le basilic nain compact. **[21]**

Les principales variétés du basilic sont les suivantes :

a) Basilic à petites feuilles (*Ocimum basilicum* L. *minimum*) **:** au goût citronné, courant sur les marchés européens, son parfum intense est parfait pour la cuisine (soupe au pistou, sauces). **[21]**

- **Basilic fin vert ou nain compact : (figure 13)** petites feuilles minces, lisses de couleur verte vive, à odeur intense. **[21]**
- **Basilic marseillais** *(Ocimum basilicum* L. *marseillais*) **: (figure 14)** variété traditionnelle Provençale. Très parfumé et typé. Lent à monter en graines. **[21]**

Figure 13 : Basilic nain compact. **[21]**

Figure 14 : Basilic mareseillias. **[21]**

b) Basilic à grandes feuilles : les feuilles peuvent atteindre jusqu'à 10 cm de longueur, à l'odeur de jasmin, de réglisse et de citron. **[21]**

- **Grand vert** (*Ocimum basilicum* L. *genovese)* **:(figure 15)** de port buissonnant, ses feuilles vertes, ovales, et ses jeunes pousses très aromatiques.
- **Basilic à feuilles de laitue :** hauteur de 50 cm, compact aux très grandes feuilles vert tendre, larges et cloquées, très parfumées. **[21]**

c) Basilic pourpre (*Ocimum basilicum purpurescens*) **:(figure 16)** à feuilles pourpres et fleur rose pâle, aux feuilles souples et décoratives. **[21]**

Figure 15 : Basilic grand vert. **[21]**

Figure 16 : Basilic pourpre. **[21]**

d) Basilic thaï, ses feuilles évoquent à la fois la menthe et le clou de girofle. **[21]**

e) Basilic sacré (*Ocimum sanctum)* : est une espèce cultivée près des temples bouddhistes, notamment en Thaïlande. **[21]**

f) Basilic cannelle (*Ocimum basilicum* L. *cinnamon) :* **(figure 17)** Le feuillage est d'un vert olive avec des sommités fleuries brunes à pourpres. **[21]**

g) Basilic citron (*Ocimum basilicum* L. *citriodora (citriodorum)) :***(figure 18)** 25 à 50 cm. Petites feuilles vertes pointues, fleurs blanches. La plante a un léger goût et l'odeur de la mélisse citronnelle. **[21]**

Figure 17 : basilic cannelle. **[21]**

Figure 18 : basilic citron. **[21]**

2.8.Travaux sur le basilic

Vu les nombreuses applications du basilic en aromathérapie, médecine, parfumerie…etc, plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude de cette plante. Nous citons quelques travaux qui ont un lien avec notre sujet d'étude :

- **Les compositions chimiques, en fonction des parties de la plante**

Yasmin A. A. Aburigal et *al* ont étudiés la variabilité du rendement de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* L. obtenue à partir des feuilles, fleurs et tiges. Ils ont révélé que la teneur en huiles essentielles était plus élevée dans les feuilles que dans les fleurs, et aucune huile dans les tiges. L'huile essentielle contient le méthyl eugénol et le germacrène et le linalol comme des composés majoritaires. **[24]**

J.C. Chalchat et M.M. Özcanont fait une comparaison sur les compositions des huiles essentielles de fleurs, feuilles et tiges d'*Ocimum basilicum* L.. Ils ont trouvé quelle teneur, en huiles essentielles, était plus élevée dans les feuilles que dans les fleurs et les tiges. Elles contiennent l'estragole et le limonène comme des composés majoritaires dans les feuilles et le p-cymène comme un composé majoritaire dans les tiges. **[25]**

En revanche, Denys J. Charles et James E. Simon, ont trouvé que la teneur en HE était plus élevée dans les fleurs que dans les feuilles. L'HE contient le linalol come composé majoritaire (73.9 % pour les fleurs et 48.2 % pour les feuilles). **[26]**

- **L'effet des saisons sur les compositions chimiques**

AI Hussain et *al* ont effectué une comparaison de la composition des huiles essentielles d'*Ocimum basilicum* L. suivant les saisons de cultures. Le rendement de l'HE variait de 0,5 % à 0,8 %, les quantités maximales ont été observées en hiver et au minimum en été. Les composés identifiés dans cette étude sont les suivants : linalol, suivi de l'epi-α-cadinol, de l'α-bergamotène et du γ-cadinène. Les échantillons recueillis en hiver se sont révélés plus riches en monoterpènes oxygénés, par contre celle de l'été sont plus riches en hydrocarbures sesquiterpéniques. **[27]**

Al-Maskri AY a trouvé que les rendements en huile essentielle d'*Ocimum basilicum* L. sont : 0,1 %, 0,3 % et 0,1 % pendant les saisons d'hiver, de printemps et d'été, respectivement. L'huile essentielle contient le linalol, le geraniol, le 1,8-cinéol, le p-allylanisole et le DL-limonène comme des composés majoritaires. **[28]**

S. Raseetha Vani, S.F. Cheng et C.H. Chuah ont trouvé que la quantité de méthylchavicol, qui était élevée en avril, a sensiblement diminué en juin, puis augmente progressivement, jusqu'en novembre. Parallèlement, le linalol n'était présent que lorsque le méthylchavicol était relativement élevé. **[29]**

Slougui, et *al* ont effectué une comparaison de la composition des huiles essentielles de six variétés d'*O. basilicum* L. d'origine européenne cultivées pour la première fois en Algérie. Le chémotype identifié pour la variété *O. basilicum* L. *genovese* dans la région d'Ouargla est un chémotype hybride (linalol/eugénol). **[21]**

Plusieures travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* L., Bassole *et al,* ont trouvé que les bacteries Gram positif sont plus sensibles aux huiles essensielles que les bactéries Gram négatif. **[30]**

Partie expérimentale

Chapitre I :

Matériel végétal & Extraction

OBJECTIFS

Dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles des zones arides, nous avons choisi d'étudier l'effet des saisons de culture sur les diverses caractéristiques de l'huile essentielle des différentes parties d'*Ocimum basilicum* L., dans un climat saharien (cas d'Oum-Erraneb, Ouargla).

La partie expérimentale est consacrée tout d'abord à la présentation de la région d'étude, puis le matériel végétal utilisé, et enfin la méthode d'extraction et les propriétés des huiles essentielles obtenues.

1. PRESENTATION DE LA ZONE DE CULTURE

1.1. Localisation géographique

Le matériel végétal utilisé a été récolté dans la wilaya d'Ouargla (village d'Oum-Erraneb) au sud de l'Algérie **(figure 19).**

Oum-Erraneb (zone agricole) est un village de la commune de *Sidi Khouiled* situé à 18 km au Nord-Est de la wilaya d'Ouargla, à une latitude de 32°03'53.24 Nord et à une longitude de 5°22'33,34 Est, élevé à 129 m par rapport au niveau de la mer.

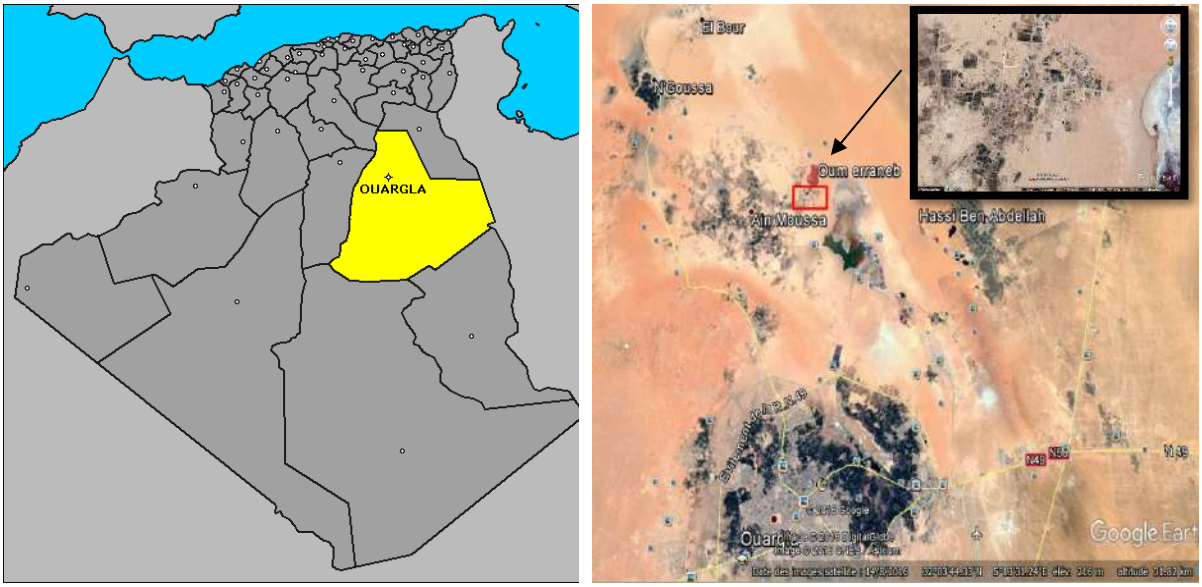


Figure 19 : Localisation géographique du site de prélèvement. (Google earth, 20/01/2017)

1.2. Caractéristiques climatiques de la wilaya d'Ouargla

Pour étudier l'influence des saisons, il faut connaitre le climat de la région d'étude. Selon ZATOUT M, Ouargla appartient à l'étage bioclimatique saharien à hiver doux. Elle est caractérisée par une sécheresse presque permanente et une très forte aridité. La température annuelle moyenne est de 23.82 °C, le minima moyen est au mois de janvier avec 4.47 °C et le maxima moyen est au mois de juillet avec 44.09 °C. L'amplitude thermique annuelle est donc de 39.60 °C. **[31]**

1.3. Conditions de culture

L'ensemencement a été fait directement au sol de la région. La plante a été en contact direct avec le climat dans des zones aérées et ensoleillées **(figure 20)**. La micro-irrigation, pour cette zone aride a été bien développée. L'eau s'égoutte lentement vers les racines des plantes en coulant à la surface du sol par l'utilisation d'eau locale de la région.

Figure 20 : La zone agricole d'Oum-Erraneb.

1.4. Date de récolte

La plante a été récoltée durant la période juin 2016- avril 2017 **(tableau 01)**. Des coupes régulières ont été effectuées selon un calendrier précis dans chaque saison.

Tableau 01 : planning de récolte dans les quatre saisons.

Dates	Temps	Climat
20-06-2016	18 :00	~ 34° Ensoleillé
19-10-2016	18 :00	~ 24° plutôt ensoleillé
14-01-2017	10 :00	~ 7° Fortes éclaircies
24-04-2017	Basilic non arrivé au stade de semi floraison	

2. PRESENTATION DU MATERIEL VEGETAL D'ETUDE

Le matériel végétal utilisé pour cette étude est représenté par les différentes parties (feuilles, fleurs, tiges, graines) d'*Ocimum basilicum* L. *Genovese*, (basilic grand vert) (**figure 21**).

Le basilic grand vert est la variété, la plus connue et cultivée en Algérie. **[21].** Cette plante est très riche en huile essentielle.

Figure 21 : L'*Ocimum basilicum* L. *Genovese* : Le basilic grand vert (hiver).

Nous avons procédé à la séparation des différents organes : feuilles, fleurs, tiges et graines, et cela dans les quatre différentes saisons (**figure 22**).

Feuilles **Fleurs** **Tiges** **Graines**

Figure 22 : Les différentes parties d'*Ocimum basilicum* L. *Genovese*.

3. CONSERVATION DE LA PLANTE

Avant le stockage de la plante, nous avons pris 200 g du matériel frais et nous l'avons séché pour le calcul du taux d'humidité. Le matériel végétal a été séché à une température ambiante et à l'ombre pendant 7 jours, afin de préserver au maximum l'intégrité des constituants. Chaque partie séchée a été conservée dans des sacs en papier et placée dans des boîtes.

4. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Ce travail a été réalisé selon le protocole expérimental suivant *:*

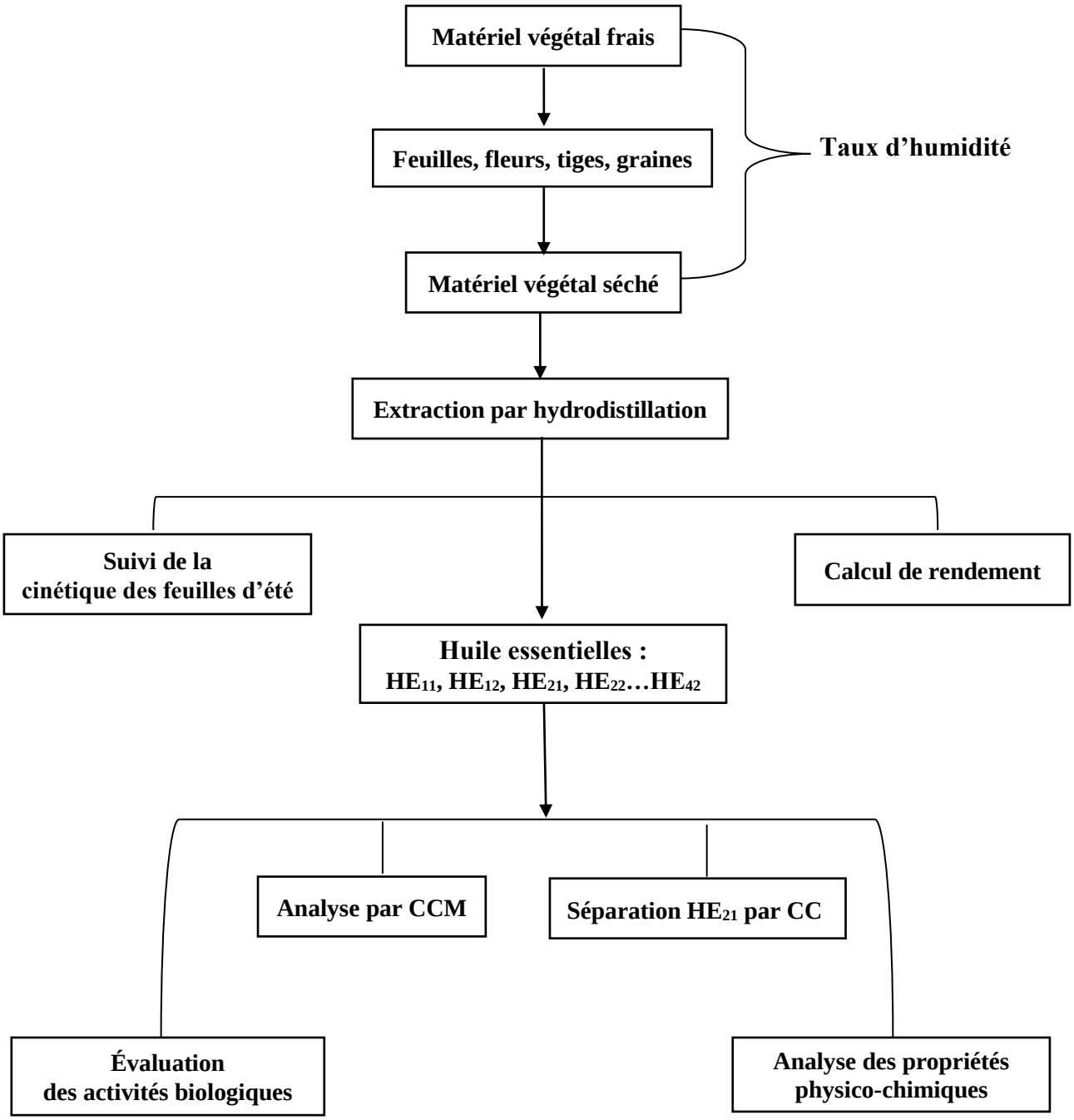


Schéma 01 : Organigramme de la méthodologie de l'étude.

HE_{sp} :

- **s** : indiqués les saisons, (1 = été, 2 = automnes, 3 = hiver, 4 = printemps).
- **p** : indiqué les parties, (1 = feuilles, 2 = fleurs, 3 = tiges, 4 = graines).

5. EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES

La technique adaptée pour obtenir les huiles essentielles est l'hydrodistillation. C'est une méthode de mise en œuvre facile, ne nécessitant pas beaucoup de matériel et utilisant uniquement l'eau distillée. Elle peut donner des rendements très élevés et assurer une meilleure qualité des huiles.

L'appareil utilisé pour l'hydrodistillation est de type Clevenger (**figure 23)**, composé de quatre parties principales : un ballon dans lequel on introduit la matière végétale et l'eau, une colonne en verre placé au-dessus du réacteur pour recueillir la phase vapeur, un réfrigérant dans lequel se condensent les vapeurs et enfin un récepteur gradué où va se séparer la phase organique (huile essentielle) et la phase aqueuse (eau florale) et permet la mesure du volume de l'huile extraite pure.

Cet appareil est équipé d'un système de recyclage ou cohabage, Un simple robinet au bas du vase permet de recueillir l'huile essentielle à la fin de la réaction.

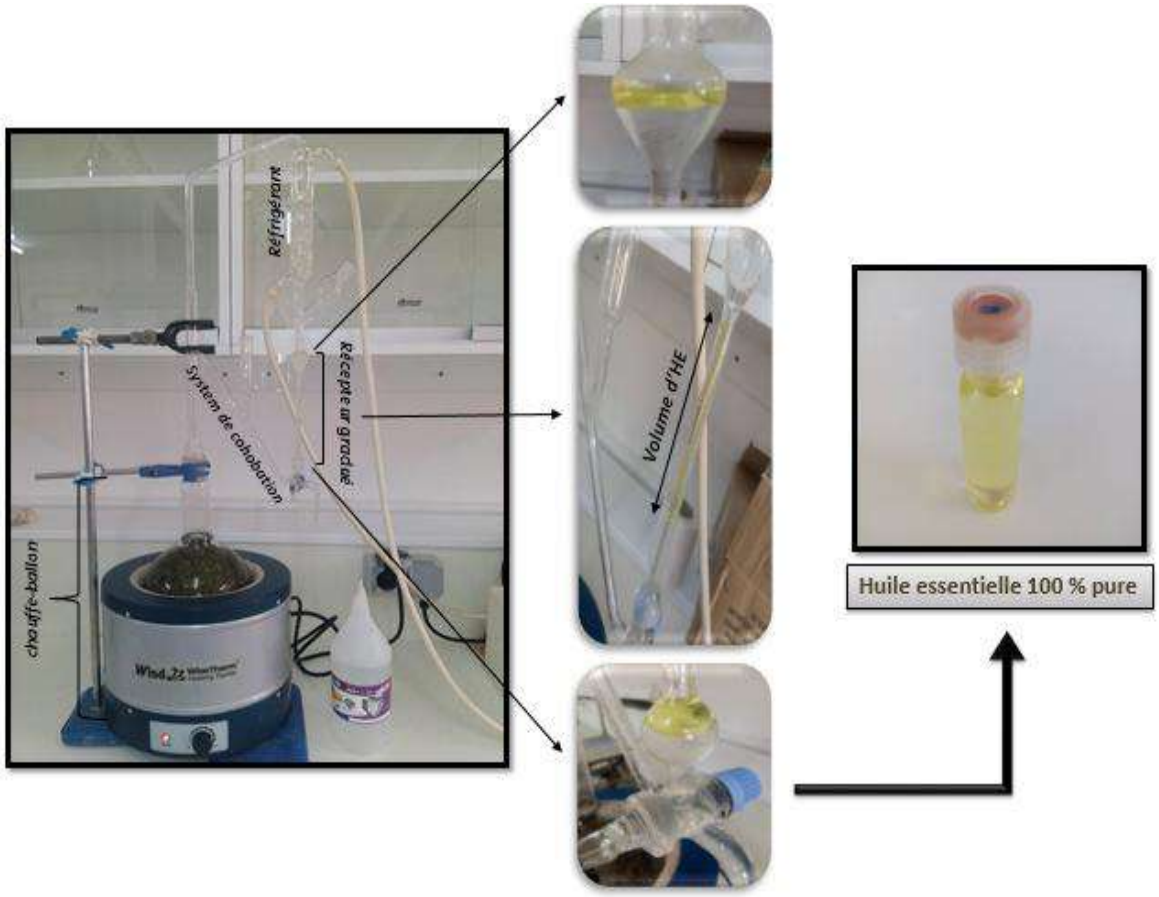


Figure 23 : Le montage d'hydrodistillation (type Clevenger) employé pour l'extraction des HE.

5.1. Les conditions opératoires de l'extraction

Les conditions opératoires sont données dans le tableau suivant :

Tableau 02 : Conditions opératoires pour l'hydrodistillation

Matière végétale	**Feuilles**	**Fleurs**	**Tiges**	**Graines**
Quantité de la matière végétale séchée	1 kg (5x200 g)	1 kg (5x200 g)	340 g (2x170 g)	103 g
Quantité d'eau (litres)	1			
Température (°C)	80			
Durée d'hydrodistillation (h)	2,5			

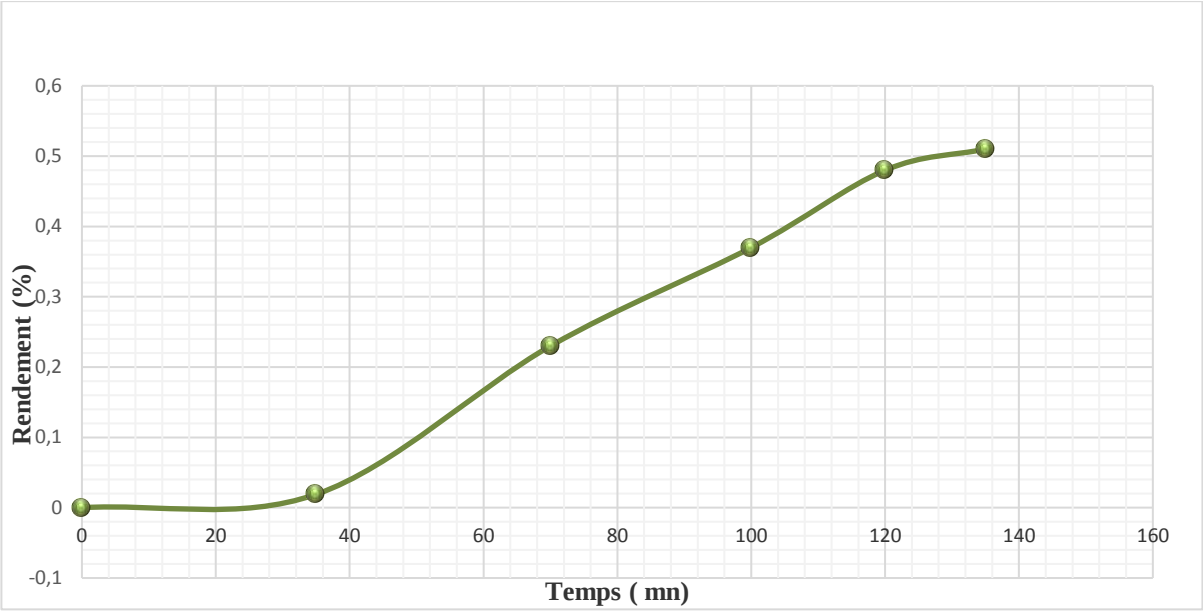
Pour suivre la cinétique d'extraction, la quantité d'essence obtenue est pesée pour le calcul du rendement.

5.2. Etude cinétique du rendement

Selon Bachelot, la cinétique d'extraction a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et pour éviter les pertes de temps et d'énergie. Cette cinétique consiste à déterminer le rendement en fonction du temps d'extraction. **[32]**

Dans notre étude, le rendement pour les feuilles *d'Ocimum basilicum* L. *Genovese* a été déterminé chaque 30 minute, en tenant compte du temps d'extraction dès la formation de la première goutte du distillat. Cette étape correspond à la montée de la température d'ébullition de l'eau.

Notons au passage que 4 essais ont été effectués pour l'essence considérée et ce sont les moyennes des essais qui ont été prises en compte pour tracer la courbe de cinétique suivante :



Courbe 01 : Cinétique d'extraction de l'huile essentielle **(HE_{11})** lors de l'hydrodistillation des feuilles *d'O basilicum* L. *Genovese.*

Les résultats du suivi de la cinétique d'extraction montrent que cette dernière passe par deux phases importantes **(courbe 01)**. La première phase correspond à l'augmentation du rendement d'extraction en huile essentielle, de 0,2324 à 0,5197 %. Cette augmentation s'observe dans l'intervalle de temps de 35 à 120 minutes. La deuxième phase s'observe au-delà de 120 minutes et se caractérise par un palier où le rendement d'extraction a atteint un taux constant de 0,5667 %. Cette stagnation pourrait s'expliquer par l'épuisement des cellules de l'écorce en huile essentielle. Ce résultat est cohérent avec celui obtenu par TALEB où la durée d'extraction observée a été de 120-180 min. A l'issue de ce suivi, la durée d'extraction de cette huile a été fixée à 150 mn. **[33]**

5.3. Rendement des huiles essentielles

Le rendement est calculé par la relation suivante :

$$\mathbf{R\ \%} = \frac{m(HE)}{m(MS)} \times 100$$

R : Rendement exprimé en pourcentage (%)

m(HE) : masse d'huile essentielle obtenue en gramme (g)

m(MS) : masse de matériel végétal sec utilisé en gramme (g)

Le tableau suivant représente le moyen de rendement après cinq répétitions :

Tableau 03 : Rendement des HE des différentes parties d'*O. basilicum* L., chaque saison.

Organes	Feuilles	Fleurs	Tiges	Graines
L'été	0.5667±0.0332%	0.4048±0.0445%	Des traces	Des traces
L'automne	1.2035±0.0106 %	0.7782±0.0485 %	Des traces	Des traces
L'hiver	0.3120±0.0084 %	0.7352±0.0091 %	Des traces	/
Le printemps	le basilic n'a pas encore fleuri après deux mois d'ensemencement (**fig. 24**)			

Figure 24 : Le basilic avant la floraison (mois d'avril).

Ces résultats sont conformes dans l'ensemble aux données de la littérature mais supérieurs à ceux signalés dans d'autres pays pour la même espèce.

- ✓ En août 2001, de Dakar-Hann au Sénégal : d'après S. Ngom et *al*, Les rendements d'extraction ont montré que pour *Ocimum basilic*um L. les feuilles sont plus riches en huiles essentielles (1,26 %) que les fleurs (0,49 %). **[34]**

- ✓ En automne 2008, de Turquie : d'après J.C. Chalchat et M.M. Özcan, le rendement des huiles essentielles par l'hydrodistillation de : feuilles, fleurs et tiges d'*Ocimum basilicum* L. sont 1.0 %, 0.5 % et 0.05 respectivement. **[25]**
- ✓ Au printemps 2014, de Khartoum au Soudan : d'après Y. A. A. Aburigal et *al*, le rendement des feuilles varie entre 0.32 et 0.48 % et dans les fleurs entre 0.29 et 0.33 %, et aucune huile dans les tiges. **[24]**

Les huiles obtenues sont 100 % pures ,100 % naturelles et la quantité est toujours faible par rapport à la masse végétale utilisée.

Les résultats d'extraction ont montré une variation de la teneur en essence dans les différents organes :

- ✓ Les feuilles d'été et d'automne fournissent un rendement supérieur en huile essentielle par rapport à celui des autres organes de la plante. Cette stagnation pourrait s'expliquer par la présence des poils sécréteurs épidermiques rencontrés chez les Lamiacées, communes aux feuilles par rapport aux autres parties qui associent la synthèse et l'accumulation d'une huile essentielles.
- ✓ Les fleurs d'hiver fournissent un rendement supérieur en huile essentielle et cela pourrait s'expliquer par le flétrissement des feuilles dans le climat froid, qui n'est pas propice à la croissance du basilic (Le basilic, sensible au froid, n'a pas résisté aux températures trop basses du mois de janvier et février).
- ✓ Les changements climatiques influent directement sur la teneur du rendement en huile essentielle : l'automne fournit une teneur de R % supérieur à celle des autres saisons.

Cette variation pourrait s'expliquer aussi par le taux d'humidité du matériel végétal dans chaque saison.

5.4. Taux d'humidité

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans la matière végétale, calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{H\ \%} = \frac{mf - ms}{mf} \times 100$$

mf : masse du matériel végétal frais en gramme (g)

ms : masse du matériel végétal séché en gramme (g)

Tableau 04 : Taux d'humidité d'*Ocimum basilicum* L. *Genovese,* pour chaque saison.

Saison	L'été	L'automne	L'hiver	Le printemps
Taux d'humidité	88,55	77,56	48,80	

Les résultats obtenus ont révélé un taux d'humidité compris entre 48.80 % en hiver et 88.55 % en été. La comparaison des taux d'humidité des différents échantillons à chaque saison, nous fait constater que l'évolution de ce paramètre n'est pas proportionnelle à l'évolution du rendement d'extraction, le taux d'humidité le plus faible correspond au rendement le plus élevé, à l'exception de l'hiver ou la plante présente déjà un état de stress très important.

Cette stagnation pourrait s'expliquer par : ***La transpiration***, qui est le processus par lequel les plantes absorbent de l'eau par les racines et émettent de la vapeur d'eau par les pores de leurs feuilles. Plus l'air est sec (cas d'été et d'automne) et plus la température de l'air est élevée, plus le taux de transpiration de la plante est rapide. **[35]**

D'un autre côté, si l'air est très humide (cas d'hiver), la plante n'absorbe pas beaucoup d'eau du substrat, ce qui signifie aussi que l'absorption de nutriments est faible.

Lorsque la température est élevée et que l'humidité est normale, un plus grand nombre de stomates vont s'ouvrir, laissant pénétrer du dioxyde de carbone pour ***la photosynthèse*** active. Si l'air est excessivement sec et que la plante flétrit, les stomates se referment, réduisant ainsi l'activité photosynthétique et la croissance. La qualité de la culture dépend des conditions qui favorisent la photosynthèse optimale, et le taux d'humidité joue un rôle important dans ce processus. **[35]**

5.5. La densité

La densité est le seul caractère physique, qui a été calculé (pour éviter la perte de nos huiles), par la relation suivante :

$$\boldsymbol{d} = \frac{p\ HE}{p\ eau}$$

$$p\ eau = 1\ \text{g/cm}^3 \quad ; \quad d = p\ HE = \frac{m\ (g)}{\text{V(cm}^3)}$$

p : la masse volumique en (g/cm^3) ;
V : volume (HE) en centimètre cube ;
m : la masse (HE) en gramme.

Tableau 05 : La densité des différentes parties d'*O. basilicum* L. *Genovese*, de chaque saison

	HE_{11}	HE_{12}	HE_{21}	HE_{22}	HE_{31}	HE_{32}
Densité (20 °C)	0.8661	0.9201	0.8888	0.8453	0.8172	0.7352

La densité obtenue varie entre 0.7352 et 0.9201, elle est inférieure à celle obtenue par Slougui. N qui était de 0.950. **[21]**

5.6. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles

Quelques caractéristiques organoleptiques de l'essence *d'Ocimum basilicum* L. *Genovese* ont été relevées. Parmi les caractéristiques des huiles, nous citons la couleur et l'odeur, qui sont déterminées par une analyse visuelle à l'œil nu et l'odorat.

Tableau 06 : Couleurs des huiles essentielles obtenues des différentes parties.

	Organes			
	Feuilles	Fleurs	tiges	graines
Eté	Jaune foncé	Jaune pâle	Traces incolores	Traces incolores
Automne	Jaune claire	Jaune très claire	Traces incolores	Traces incolores
Hiver	Jaune miel	Jaune verdâtre	Traces incolores	Quantité insuffisante
	Forte +++	Très forte ++++	moyenne ++	Faible +
	Odeur			

Les résultats montrent que les différentes parties d'*Ocimum basilicum* L. contiennent des HE distinctes avec des caractéristiques organoleptiques différentes. L'HE des fleurs est plus clair que l'HE des feuilles.

Ces différences peuvent être attribuées à la composition chimique de l'HE qui peut varier dans une même plante selon les organes, et dans l'année selon la saison. Pour expliquer cette différence, nous avons analysé nos échantillons par Chromatographie sur couche mince (CCM) et Chromatographie sur colonne (CC).

Chapitre II :

Les méthodes de séparation :

CCM & CC

LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES DE SEPARATION

La chromatographie a été très utilisée pour séparer, identifier et quantifier les composants présents dans les mélanges. Les composés chimiques d'un mélange sont élués par une phase mobile à travers une phase stationnaire. Le matériel est transporté à travers la phase stationnaire par la phase mobile et la séparation à lieu par les différentes vitesses de migration dues aux différents rapports entre les deux phases des différentes molécules. La séparation d'un extrait est basée sur l'interaction sélective comme par exemple la surface d'adsorption et la solubilité des composés avec les deux phases.

1. LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode analytique couramment utilisée dans les laboratoires de phytochimie pour la séparation et l'identification rapides des constituants d'un extrait donné. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. **[36], [37]**

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant migre à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse au-dessous de front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince en mode normale, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires. **[36], [37]**

Les substances peuvent être identifiées en calculant la valeur R_f qui peut être comparée à celle de la littérature ou à celles des étalons. Cette valeur correspond à :

R_f = (distance parcourue par l'échantillon) / (distance parcourue par le front du solvant).

Figure 25 : Analyse des chromatogrammes sous UV.

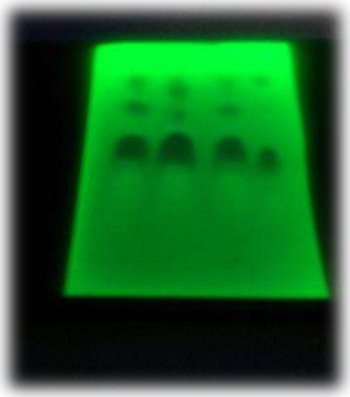
Les bandes de séparations sur la couche mince ont été révélées par absorption de la lumière UV à 250 et 366 nm.

1.1. En phase normale

Nous avons utilisé dans nos expériences une plaque avec du gel de silice F_{254} 20 x 20 cm (épaisseur de la couche 0.2 mm, E. Merck, Darmstadt, Allemagne) et plusieurs phases mobiles.

Les tableaux et les figures suivants représentent les différents R_f en fonction des phases mobiles choisies :

- *Toluène / DCM (90 / 10)*

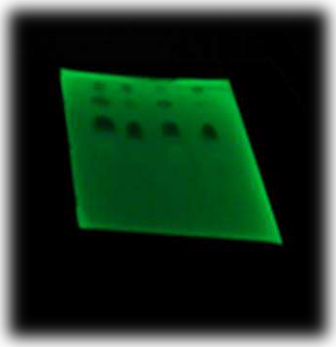


Toluène/dichlorométhane (90 /10)

HE_{11}	**HE_{12}**	**HE_{21}**	**HE_{22}**
0,60	0,61	0,60	0,56
0,81	0,76	0,78	0,80
0,97	0,94	0,96	0,96

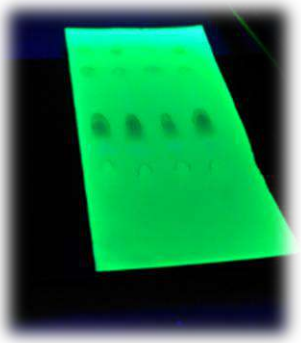
Les mêmes taches sont présentes dans les quatre huiles essentielles,les R_f des différentes taches montrent que les composés sont peu polaire. Ce système donne 3 taches, leurs R_f varient de 0,60 à 0,97 pour l'HE des feuilles et un R_f qui varie de 0,61 à 0,96 pour l'HE des fleurs.

- *Toluène / acétate d'éthyle (95 / 5) et (98 /2)*



Toluène/acétate d'éthyle (95 : 5)

HE11	HE12
0,43	0,39
0,66	0,62
0,84	0,84
0,98	0,98



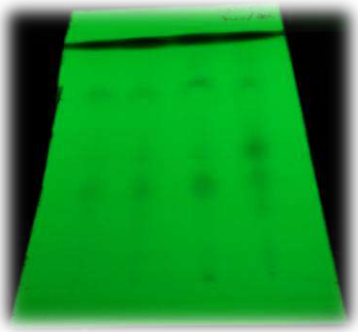
Toluène/acétate d'éthyle (98 :2)

HE11	HE12
0,34	0,24
0,43	0,31
0,55	0,60
0,83	0,83
0,99	0,99

Les même taches sont présentes dans les deux huiles essentielles pour les deux saisons,les R_f des différentes taches montrent que le caractèreest peu polaire. 5 taches ont été observés dans ce système,leur R_f varie de 0,24 à 0,99 pour les deux essences.

Pour faire diminuer les valeurs des R_f, nous avons diminué la polarité de la phase mobile en augmentant le rapport du solvant le moins polaire (toluène).

- *n-Hexane /acétate d'éthyle (95 / 5), (90 /10).*



hexane/ EtOAc (95 / 5)

HE11	HE12
0,25	0,26
0,34	0,33
0,44	0,44
0,66	0,69
0,92	0,91

hexane/ EtOAc (90 / 10) (meme taches)

HE21	HE22
0,25	0,26
0,31	0,31
0,41	0,39
0,66	0,57
0,92	0,66
	0,91

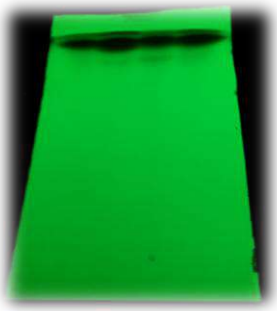
Les mêmes taches sont présentes dans les deux huiles essentielles avec des concentrations différentes (couleur et volume des taches). Les R_f des différentes taches montrent que les constituants ont une polarité différente (taches occupent toute la longuer de la plaque). Dans ce système 5 taches ont été observées, leurs R_f varient de 0,25 à 0,92 pour les feuilles et varient de 0,26 à 0,91 pour les fleurs.

Pour faire diminuer les R_f des taches qui sont en haut, on fait diminuer la polarité de la phase mobile en augmentant le rapport de l'hexane

1.2. En phase inverse

- Nous avons utilisé la plaque RP-18 F_{254} (épaisseur de la couche 0.2 mm, E. Merck, Darmstadt, Allemagne) deux systèmes de phase mobile ont été utilisés :
  - Eau : méthanol / acétate d'éthyle (10 /10 / 80), (80 / 8 / 12)
  - Méthanol / acétate d'éthyle (5 / 95), (1 / 99)

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures suivantes :



Eau/MeOH/ EtOAc (10 /10/ 80)	**Eau/ MeOH/EtOAc (80 /8/ 12)**	**MeOH / EtOAc (5/ 95)**	**MeOH / EtOAc (1/ 99)**
Plusieurs taches accumulées au front de solvant	**HE_{11}** : 0,08 **HE_{12}** :0,08 ;0,05 **HE_{21}** :0,05 **HE_{22}** :0,08 ;0,05	**HE :**0,89 ×4	Plusieurs taches accumulées au front de solvant

Dans le système : *Eau/ MeOH /EtOAc (10 /10/ 80),* cette phase mobile est innappropriée pour la separation des constituents des HE. Des R_f trop élevés, taches non séparés.

Dans le système : *MeOH /EtOAc (5/ 95),*les R_f des différentes taches montrent que les taches ont un caractère polaire. L'analyse sur RP18, nous a donné une tache a été observé, avec

R_f égal 0,89 pour l'HE des 4 extrait. Cette phase mobile est inadéquate également pour la séparation des huiles essentielles.

Selon Slougui N, qui a étudié la variation du facteur de rétention de chaque monoterpène pur par rapport à la composition de la phase mobile choisie, le R_f du linalol, dans le même système que nous avons utilisé (toluène / acétate d'éthyle, 95/5) en phase normale valait 0.43 et celui de l'eugénol valait 0.68 **[38]**. Sur ces résultats nous pensons avoir identifié ces deux composés majoritaires.

Conclusion

Nous avons constaté que la technique de CCM est une technique fiable et rapide pour donner une idée préliminaire sur la composition d'un extrait naturel, en jouant sur la polarité des deux phases mobile et stationnaire.

L'analyse de l'HE des feuilles et celle des fleurs par CCM nous a montré que les composants de l'HE des feuilles et ceux des fleurs sont les mêmes pour les deux saisons. La majorité des constituants de l'HE sont apolaire ou peu polaire.

La chromatographie sur couche mince de l'huile essentielle de la plante se fait dans différents systèmes en utilisant les deux modes normal et inverse. Ce dernier nous a donné des résultats non exploitables alors que le mode normal a donné une bonne séparation des molécules dans les systèmes : (toluène/acétate d'éthyle : 98/2) ; (hexane/ acétate d'éthyle : 95/5) ; (Toluène/dichlorométhane : 9/1/V/V). Nous pensons avoir identifié avec cette phase les deux composants majoritaires : le linalol et l'eugénol mais cette méthode reste insuffisante pour connaître l'ensemble des composants de l'huile ou pour confirmer l'identification d'un composé. Des techniques plus adaptées à l'analyse des huiles essentielles s'avèrent indispensables comme la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

1. SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

L'objectif de cette partie est la séparation des composés majoritaires de l'huile essentielle d'*O. basilicum* L.

2.1. La chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne est basée sur le même principe que la chromatographie sur couche mince, sauf que la silice ne se trouve par sur une plaque mais dans une colonne. Cette technique est très utilisée dans la purification en chimie organique (séparation des produits organiques d'un mélange). **[39]**

❖ **Principe**

La séparation des composés est basée sur la différence d'affinité existante entre ces composés, la phase stationnaire, le plus souvent la silice (SiO_2) comme adsorbant et la phase mobile (se fait avec plusieurs solvants allant du moins polaire au plus polaire : mode gradient d'élution). En effet, selon la plus ou moins grande affinité entre les solutés et la phase stationnaire ou mobile, les constituants du mélange migrent à des vitesses différentes et sont ainsi séparés. **[40]**

La chromatographie sur colonne permet la séparation d'une plus grande quantité de produits. Cependant, cette technique présente quelques inconvénients :

- De grandes quantités d'éluant sont nécessaires ;
- La durée de l'élution peut être longue, allant de quelques heures à quelques jours ;
- La détection des composés demande une attention constante.

Toutefois, lorsque les conditions expérimentales gagnantes sont réunies, cette technique permet de purifier efficacement de grandes quantités de produit.

2.2. Identification spectrale par la spectroscopie infrarouge (IR)

L'identification de composés organiques à partir d'un spectre infrarouge consiste d'abord à déterminer la nature des groupements fonctionnels susceptibles d'être présents. Pour ce faire, on considère le domaine de nombres d'onde des groupements fonctionnels qui s'étend essentiellement entre 1200 et 3600 cm^{-1}. Il convient ensuite d'examiner le domaine des empreintes digitales compris approximativement entre 600 et 1200 cm^{-1}, un domaine sensible

à la structure et à la composition des molécules. L'examen des pics d'absorption dans cette région fournit des informations précieuses sur la nature du composé étudié. **[41]**

- **Principe de la spectroscopie infrarouge IR :**

Les photons d'un rayonnement infrarouge sont porteurs d'une énergie correspondante aux vibrations des liaisons. Lorsque la molécule est soumise au rayonnement, certaines fréquences infrarouges sont absorbées et la liaison entre en résonnance. L'absorbance infrarouge fournit une information sur les liaisons qui constituent la molécule.

Un spectre IR représente la transmittance en fonction du nombre d'onde. Les bandes d'absorption IR sont caractéristiques des fonctions chimiques présentes sur la molécule. Pour chaque bande, on précise : son nombre d'ondes, son intensité (F : forte, m : moyenne, f : faible) et sa largeur (fine ou large). Par exemple, la bande vibration d'élongation de la liaison C=O est caractérisée par : 1720 cm^{-1}, F, fine.

De manière pratique, on ne cherchera pas à interpréter tous les signaux observés, mais seulement ceux caractérisant les vibrations d'élongation des fonctions chimiques présentes sur la molécule étudiée. **[42]**

2.3. Chromatographie sur colonne de l'huile HE_{21}

Nous avons choisi de séparer l'huile qui nous a fourni le rendement le plus élevé (la plus grande quantité).

Figure 26 : Huile essentielle (**HE_{21}**) utilisée pour la séparation.

2.4. Préparation de la colonne

Une colonne de 50 cm de long et de 3 cm de diamètre est choisie (Le choix de la taille de la colonne est fait par rapport à la masse de notre huile essentielle (3ml)). Le gel de silice est mélangé avec le solvant le moins polaire du système choisi, puis versé dans la colonne jusqu'à stabilisation au niveau désiré. L'échantillon est déposé dans la colonne, lentement absorbé dans la phase stationnaire, l'éluant est préparé selon un gradient de polarité : Hexane 100 % puis, Toluène / Dichlorométhane (90 :0 à 0 :100), puis suivi d'un lavage de la colonne avec le méthanol (MeOH). L'élution des composés par les différents mélanges de solvants successifs est alors réalisée en veillant à ne jamais laisser la colonne s'assécher. Les fractions sont alors récoltées dans des tubes à essai. 418 fractions ont été obtenues et sont toutes testées. Le suivi de l'élution des composés se fait par chromatographie sur couche mince.

Figure 27 : La colonne utilisée.

2.5. Récupération des fractions

Des fractions de ~ 7 ml sont recueillies dans des tubes numérotés. Le suivi de la composition des fractions est effectué par CCM avec le gel de silice sur support en aluminium comme phase stationnaire et le système de solvant : Toluène /Dichloro-méthane (9 : 1) comme phase mobile. Les plaques sont visualisées sous lumière UV/ visible (254 et 365 nm), puis regroupées suivant leurs similitudes de profil (la couleur, et le nombre de spots, les R_f).

Figure 28 : Les fractions obtenues.

Le fractionnement de cette colonne est rassemblé dans le tableau suivant :

Tableau 07 : Regroupement des fractions.

Systèmes de solvant	Fractions	Analyse par CCM	regroupement des fractions
Hexane	01 - 41	Aucuns spots	**A**
Toluène/DCM (9/1)	42 - 108	Aucuns spots	**B**
Toluène/DCM (6/1)	109 -164	157 - 164 1 seul spot, Incolore, R_f = 0.4-0.42	**C**
Toluène/DCM (5/1)	165 -202	1 seul spot, Incolore, R_f = 0.4-0.42	157 ---- > 294 **D_1** et **D_2**
Toluène/DCM (2/1)	203 - 273	1 seul spot, Incolore, R_f = 0.4-0.42	
Toluène/DCM (1/1)	274 - 356	274 - 294 1 seul spot, Incolore, R_f = 0.4-0.42	
DCM	357 -397	Aucuns spots	**E**
Méthanol	398 - 418	Spots dans 411(1,2), 412(1,2) Composé : Brun, R_f =0.23-0.66	411 (**F_1**, **F_2**), 412 (**F_3**, **F_4**)

2.6. Etude des fractions regroupées

- *Les fractions A, B et C :*

CCM : Les premières fractions (f_{1-156}) qui ont été regroupées en 3 grandes fractions (**A**, **B** et **C**), ne donnent aucune tâche, probablement, de très faibles concentrations des composés apolaires ont empêché leur détection.

- *Les fractions D_1 et D_2 :*

CCM : Les fractions $f_{157-294}$, ont été regroupées en 2 grandes fractions (**D_1**et **D_2**), montrent l'existence d'une grande quantité de composé majoritaire (**figure 29**) incolore avec R_f entre 0.4 et 0.42.

Selon N. SLOUGUI, le chémotype identifié pour la variété : *O. basilicum* L. (grand vert) est un chémotype hybride : linalol-eugénol. La même étude a trouvé que l'huile essentielle des feuilles du mois d'octobre (Ouargla, 2001) a donné un composé majoritaire identifié comme linalol, son R_f varie de 0.44 – 0.58 dans le système de solvant toluène/ acétate d'éthyle. **[21], [38]**

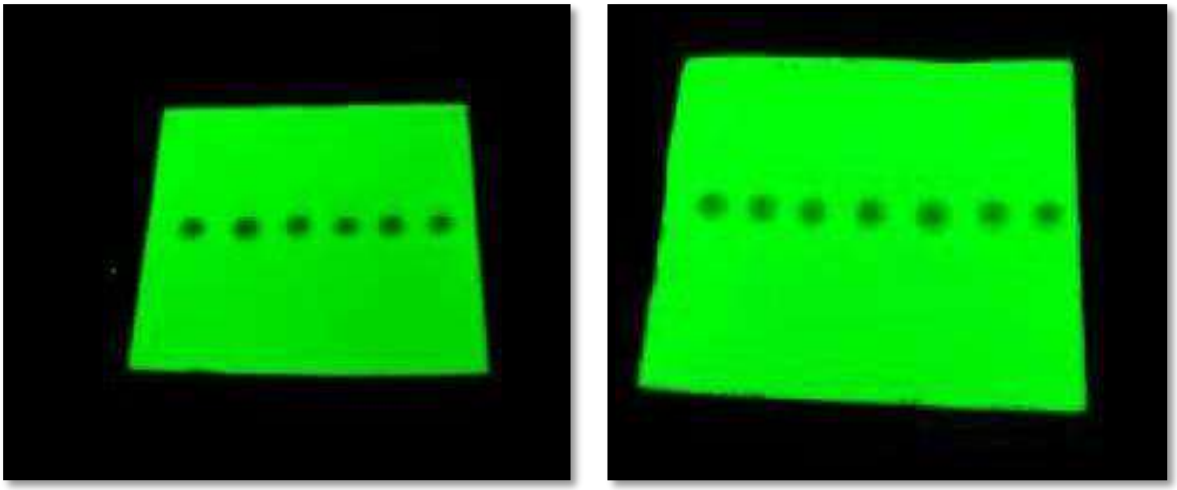


Figure 29 : Plaques CCM récapitulative des sous-fractions **D_1** et **D_2**.

IR : Les spectres IR du produit isolé **D_1** et **D_2 (figure 30 et 31)**, nous donne une première série d'informations concernant sa structure :

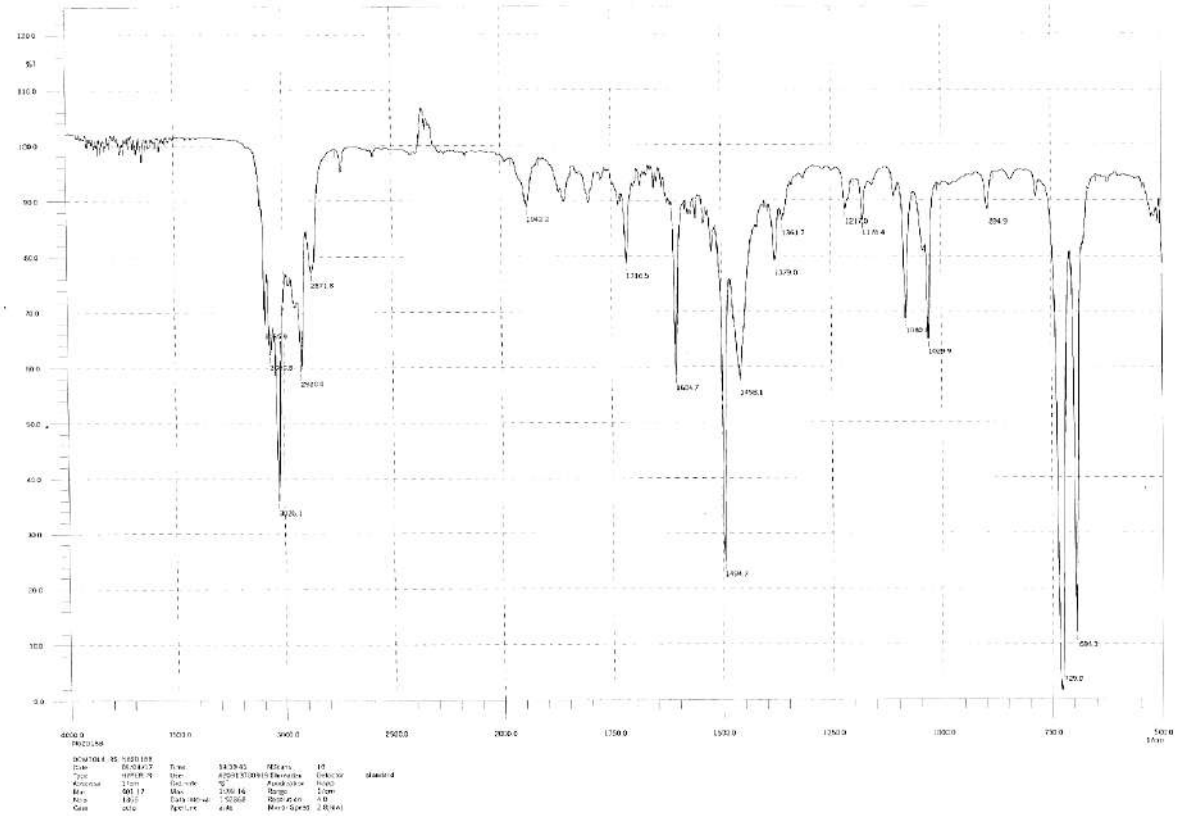


Figure 30 : Spectre IR de la fraction **D_1**.

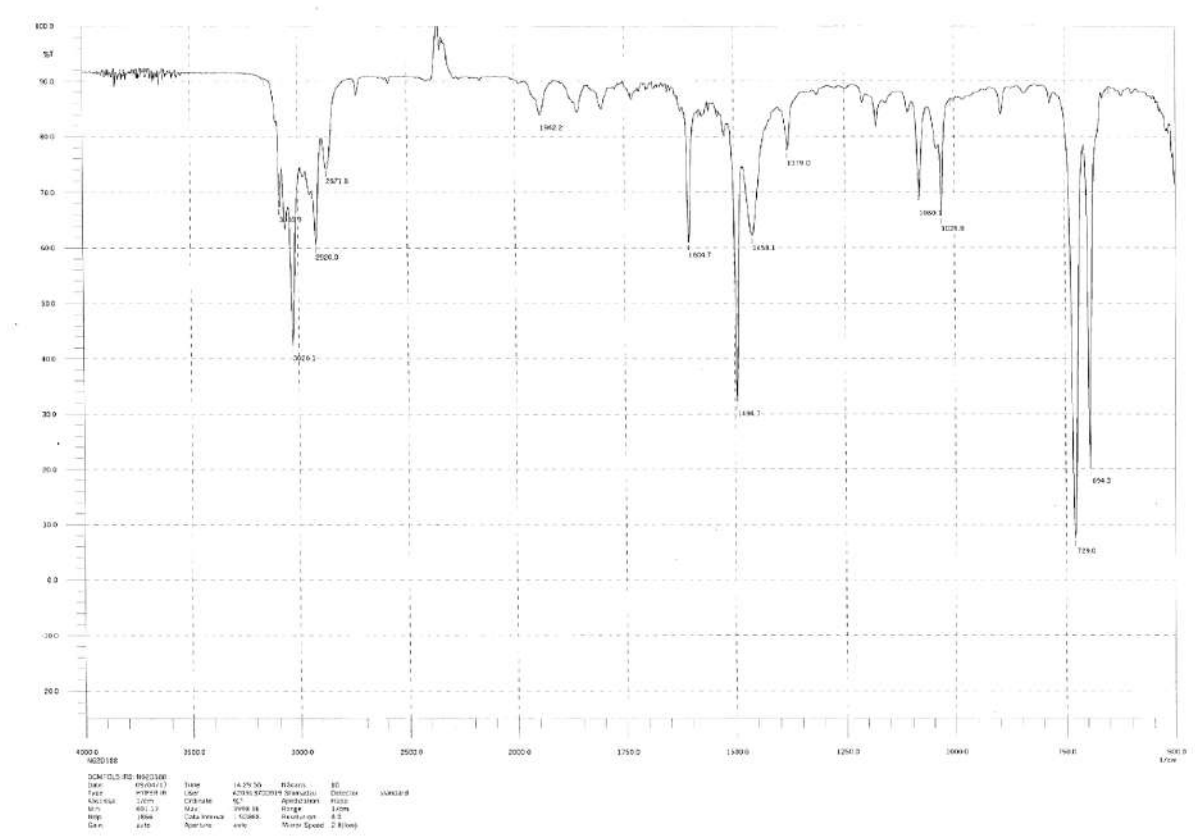
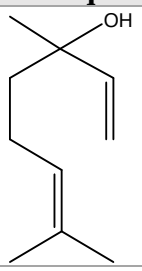


Figure 31 : Spectre IR de la fraction **D_2**.

Les deux spectres IR, donnent les mêmes bandes d'absorptions, l'examen du ces spectres montrent la présence de fonction ou de groupements spécifiques tels que :

L'élongation de (O-H) à 3630 cm^{-1}, l'élongation de (C=CH) à 3085.9 cm^{-1} et l'élongation des groupes portant des liaisons (CH2, CH3) : 2920.0 et 2871.8 cm^{-1}, ainsi que la présence d'une fonction ($C=CH_2$) à 1604.7 cm^{-1}et l'élongation de (C-C), isopropyle à 1178.4 cm^{-1}, de liaison (C-O) à 1029.9 cm^{-1}et la rotation du méthyle à 729 et 694.3 cm^{-1}.

Tableau 08 : Fréquences de groupe actives dans de linalol (tables IR).

Structure chimique du Linalol	Limite d'absorption (cm^{-1})	
	***v* (O-H, alcool libre)**	3650 - 3500
	***v* (C=C-H)**	3095 - 3050
	***v* (CH_2, CH_3)**	2970 - 2915
	***v* ($CH=CH_2$)**	1650 - 1640
	***v* (C-C)**	1175 - 1165
	***v* (C-O, alcool)**	1200 - 1000
	δ ($CH=CH_2$)	1000 - 900

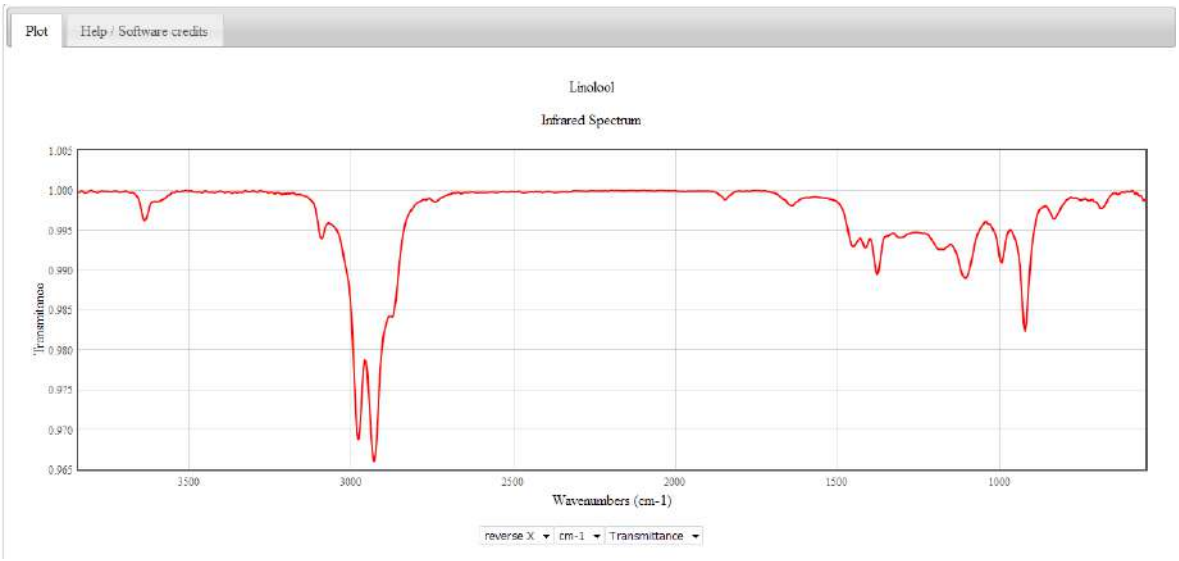


Figure 32 : Spectre IR du linalol pure. **[43]**

D'après l'analyse spectrale par IR de la fraction **D_1** et **D_2** et comparé à celle obtenue par NIST (*National Institue of Standars and Technology*) **[43],** on met en évidence que le groupe **D (D_1** et **D_2)** contient du linalol.

- *La fraction E :*

CCM de la fraction **E**, ne donne aucune tache, mais l'analyse **IR** donne un spectre difficile à analyser (**Figure 33**). Ce qui signifie que cela représente un mélange de produit.

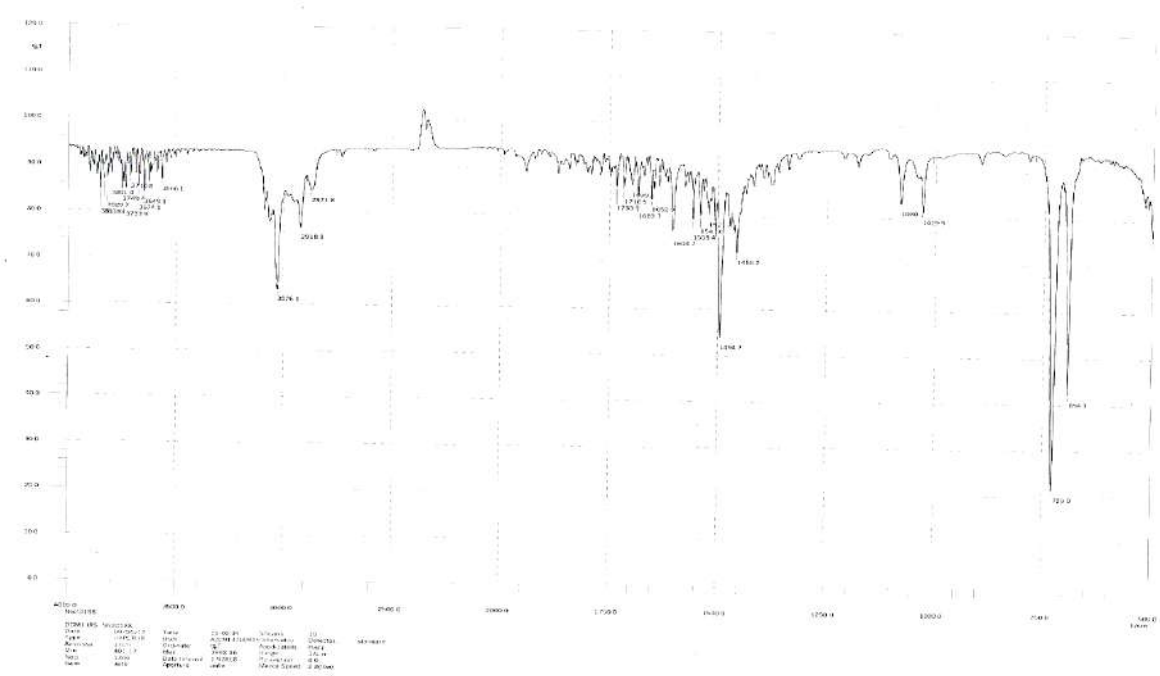


Figure 33 : Spectre IR du groupe **E**.

- *Les fractions F_1, F_2, F_3, F_4 :*

CCM : Les quatre fractions isolées (**figure 34**) par les différentes couleurs après lavage de colonne au méthanol, montrent l'existence d'autres composantes.

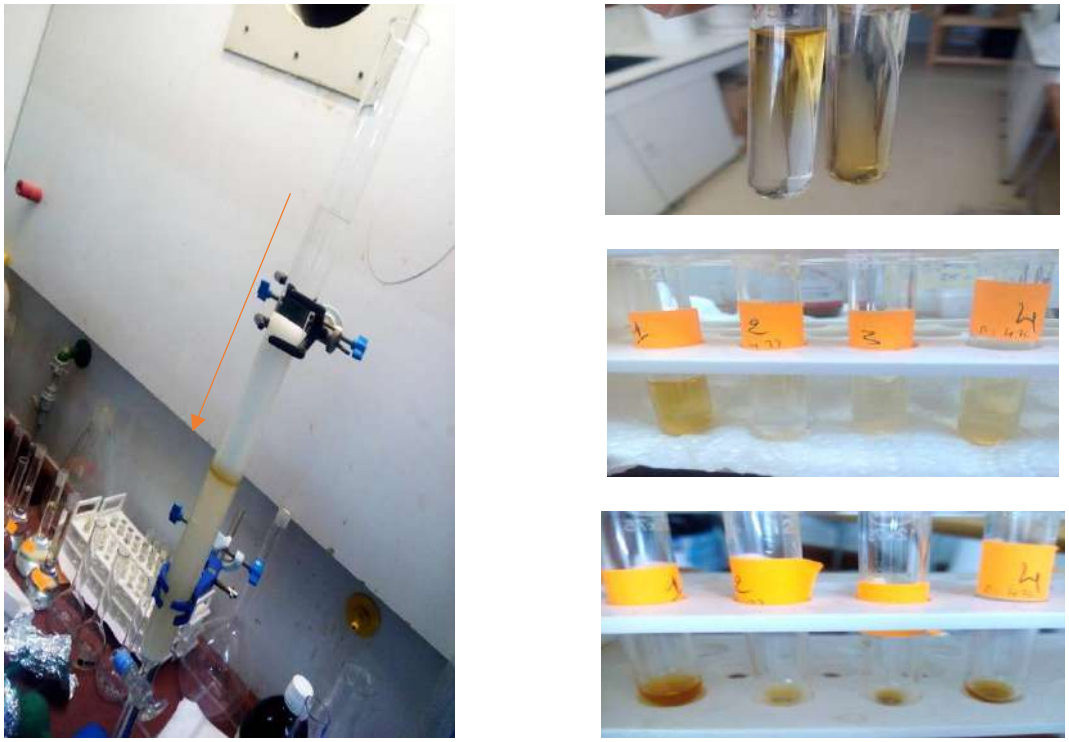


Figure 34 : Les fractions isolées : 411, 412 (**F_1, F_2, F_3, F_4**)

Les résultats de CCM pour ces fractions sont les suivants :

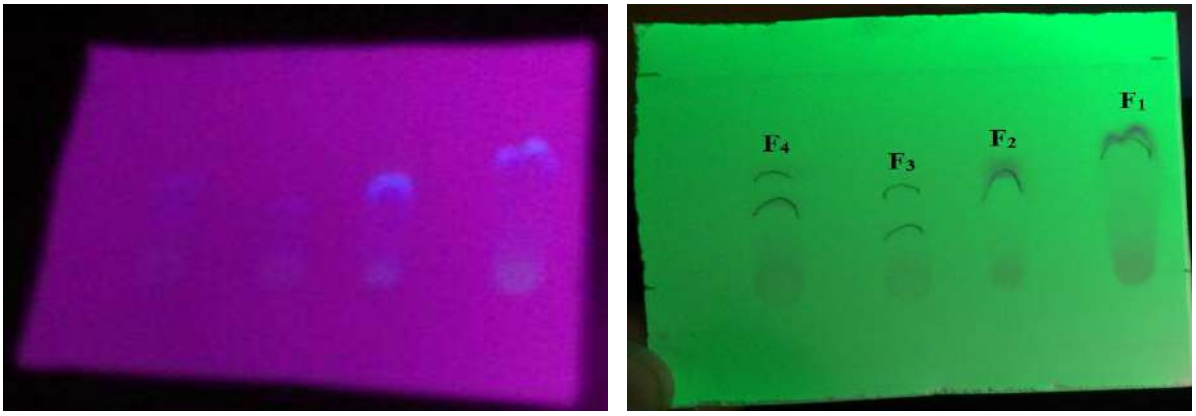


Figure 35 : Plaque CCM récapitulative des sous-fractions (**F_1, F_2, F_3, F_4**)

Tableau 09 : Les R_f des sous-fractions de méthanol.

Sous-fractions	**F_1**	**F_2**	**F_3**	**F_4**
R_f	0.66 Jaune très claire	0.50 Spot incolore	0.23 – 0.43 2 spots incolores	0.33 – 0.53 2 spots incolores

Le **tableau 09** montre la présence d'un produit dans les fractions **F_1** et **F_2** mais pour les fractions **F_3** et **F_4**, on remarque l'apparition de deux composés.

IR : Les spectres IR de ces fractions sont représentés ci-dessous :

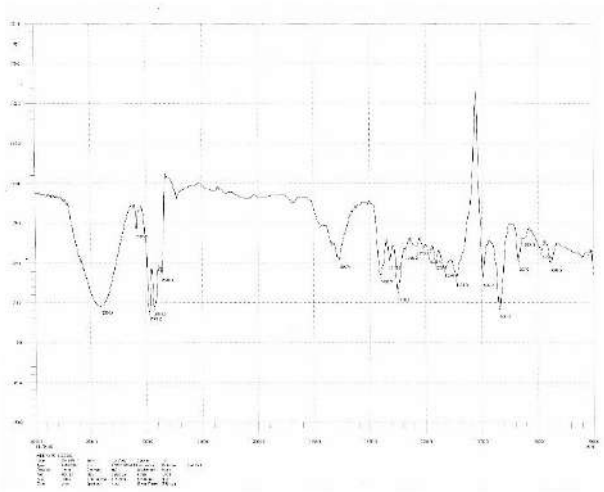


Figure 36 : Spectre IR de la fraction **F_1**

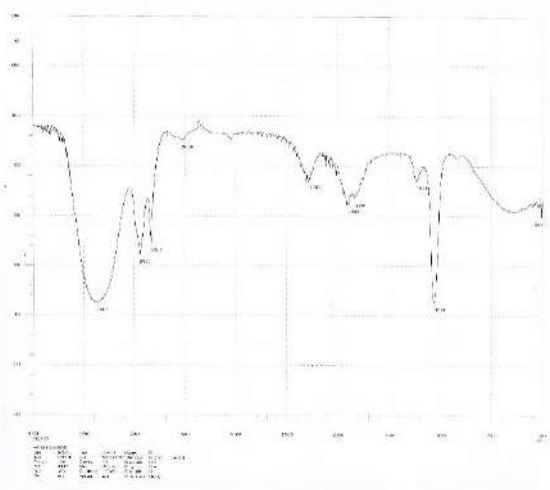


Figure 37 : Spectre IR de la fraction **F_2**

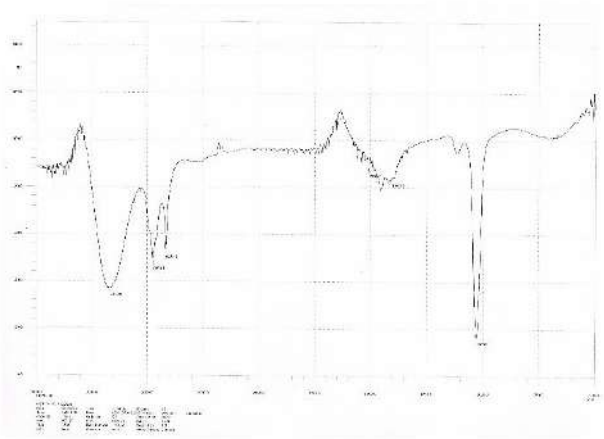


Figure 38 : Spectre IR de la fraction **F_3**

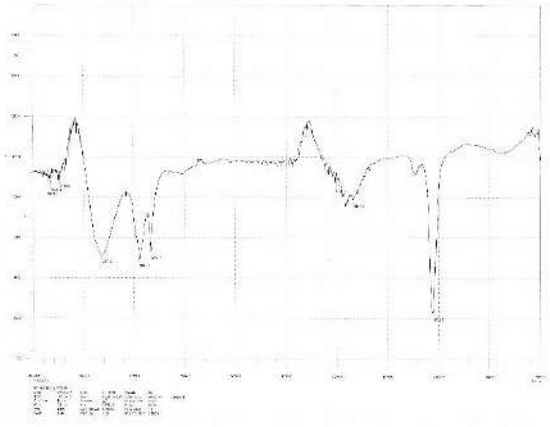


Figure 39 : Spectre IR de la fraction **F_4**

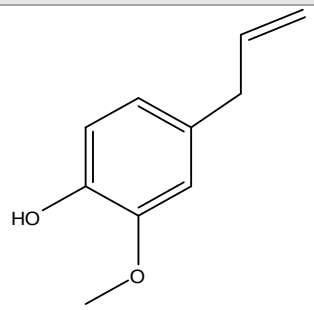
<u>Lecture des spectres :</u>

Tableau 10 : les principaux vibrateurs (cm^{-1}) présents sur les quatre fractions.

Fonctions	**F_1**	**F_2**	**F_3**	**F_4**
***v* (OH, alcool associé)**	3396.4	3361.7	3330.8	3321.2
***v* (CH, aromatiques)**	3085.9	3028	3075	3080
***v* (CH, sp^2, sp^3)**	2970.2-2925.4	2945.1-2845.1	2945.1-2833.2	2945.1-2831.3
***v* (C=C, alcène)**	1637.5	1635.5	1508.2	1506.3
***v* (C=C, aromatiques)**	1452.3-1375.2	1448.4-1419.5	1404.1	1419.5
***v* (CO, éther)**	1164.9-1114.8	1114.8 cm^{-1}	1110	1105
***v* (CO, alcool)**	concentré	1029.9 cm^{-1}	1028.0	1028.0

Le spectre d'infrarouge met en évidence la présence de l'eugénol dans les 4 fractions.

Tableau 11 : Fréquences de groupes fonctionnels dans l'eugénol (tables IR).

Structure chimique d'eugénol	**Limite d'absorption (cm^{-1})**	
	***v* (OH, alcool associé)**	3550 - 3450
	***v* (CH, aromatiques)**	3075 - 3030
	***v* (CH_2, CH_3)**	2970 - 2845
	***v* ($O-CH_3$)**	2835 - 2825
	***v* ($CH=CH_2$)**	1650 - 1640
	***v* (C=C, aromatiques)**	1620 - 1565
	***v* (C-C)**	1175 - 1165
	***v* (CO, ether)**	1150 - 1070
	***v* (C-O, alcool)**	1200 - 1000
	δ ($CH=CH_2$)	1000 - 900

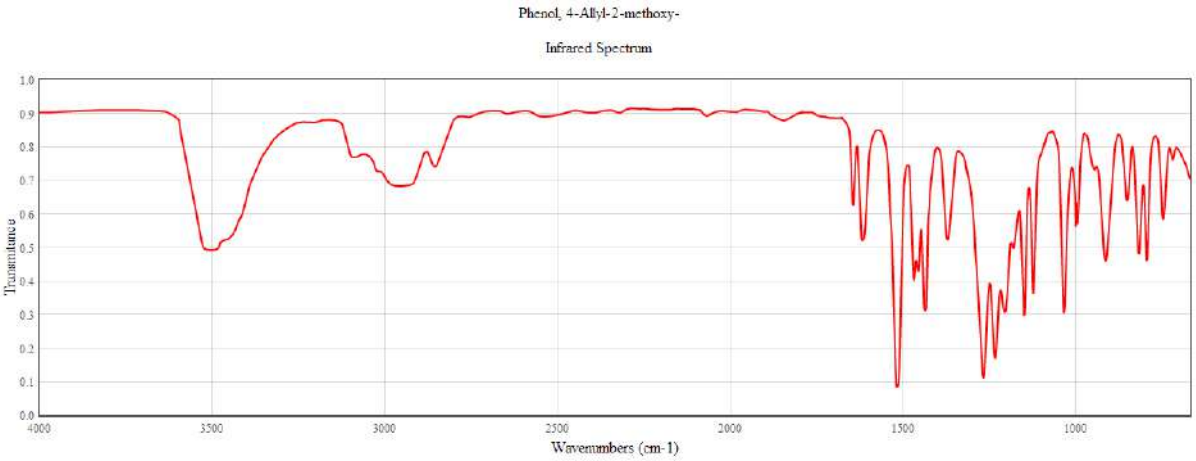


Figure 40 : Spectre IR d'eugénol pur. **[43]**

Conclusion

La séparation chromatographique sur colonne de gel de silice de l'huile essentielle (**HE_{21}**), puis l'analyse par CCM, nous a permis de séparer deux fractions D et F contenant les deux composés majoritaires . La spectroscopie infrarouge nous confirme la présence de ces composés que nous avons pu identifier comme le linalol et l'eugénol dans les fractions étudiées. Ces mêmes spectres nous montrent que nos fractions contiennent d'autres composés qui nécessitent un suivi de fractionnement pour la purification, ainsi que d'autres techniques spectroscopiques telles que la RMN et la masse qui sont indispensables pour confirmer l'identification.

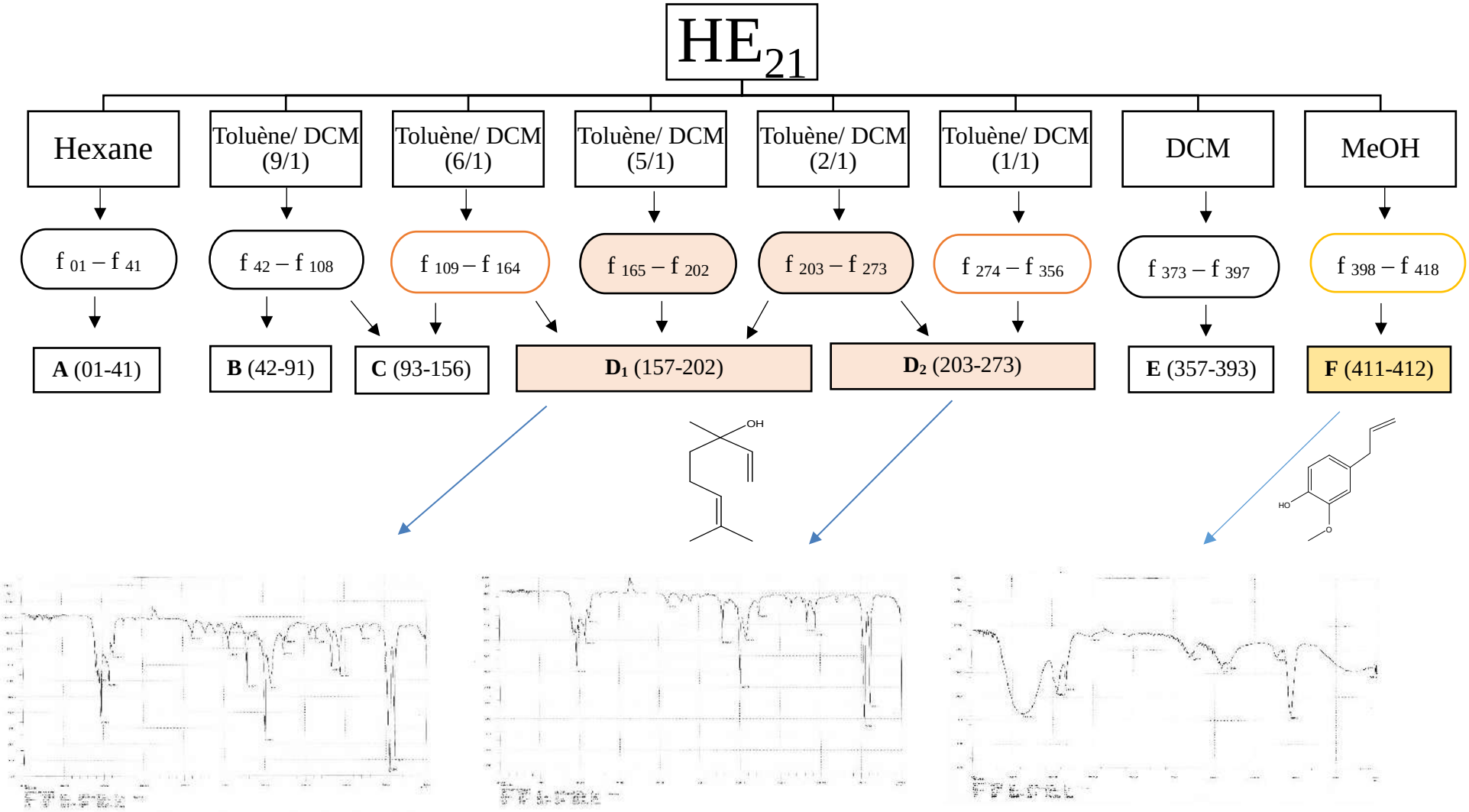


Figure 41 : Résumé les résultats de la colonne.

…

Chapitre III :

Activités biologiques *:*

Antioxydante & Antibactérienne

INTRODUCTION

Les substances naturelles sont des composés que l'on retrouve dans les organismes végétaux, l'étude de ces composés et leur isolement a permis des progrès dans plusieurs domaines, particulièrement dans le domaine de la santé humaine et animale. En effet les plantes renferment des composés qui ont la propriété d'agir sur l'organisme humain. A travers ce chapitre, nous allons présenter deux activités biologiques importantes qui sont :

1. ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET LES ANTIOXYDANTS

L'utilisation des antioxydants de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées. En effet, les composés phénoliques sont des molécules naturelles très répondues dans le règne végétal. Ces derniers regagnent une importance croissante grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. Leur rôle d'antioxydants naturels suscite un très grand intérêt, notamment pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires ; ils sont également utilisés en tant qu'additifs en industrie agroalimentaire, en pharmacie et en cosmétologie. **[44]**

Ces dernières années, l'intérêt porte aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires.

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β-carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxy- phénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH•) et superoxydes (O2•). **[45]**

Notre étude vise à évaluer in vitro l'activité antioxydante de l'HE de différentes parties d'*Ocimum basilicum* L. selon la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

1.1. Principe de la méthode

Le composé chimique 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (α, α-diphenyl-β picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violet, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie UV- Visible à 515-518 nm.

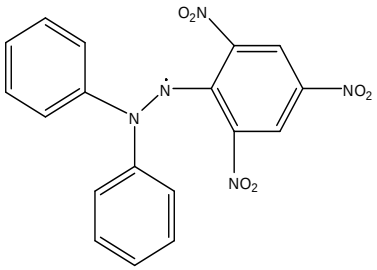


Figure 42 : Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle) **[45]**

Figure 43 : Spectrophotomètre UV pour l'évaluation de l'effet antioxydant

1.2. Protocole

La solution de DPPH a été préparée par la solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml d'éthanol (elle ne se conserve pas plus de 3 jours à -5 °C et à l'obscurité). Un volume de 2000 µl d'huile essentielle (à différentes concentrations ; différentes parties, chaque saison) a été ajouté à 2ml de la solution de DPPH dans des tubes à essai secs, la couleur change de violet

intense à jaune clair, quand le DPPH est réduit. Le mélange réactionnel a été agité vigoureusement et incubé 30 min à l'obscurité.

Les absorbances ont été mesurées à 517 nm contre le blanc (solution DPPH/éthanol). L'acide ascorbique a été utilisé comme antioxydant synthétique de référence, sont absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que celle de l'huile essentielle. **[46]**

1.3. Calcul du pourcentage d'inhibition (I %) et de la concentration inhibitrice minimale (IC_{50})

I est calculé suivant la formule suivante :

$$I\ [\%] = \frac{(ABS - ABS_0)\times 100}{ABS}$$

Où :

- ABS : Absorbance de la solution DPPH sans l'échantillon (contrôle négatif).
- ABS_0 : Absorbance de la solution DPPH en présence de l'échantillon.

La concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) qui est une mesure de l'efficacité d'un composé donné pour inhiber une fonction biologique ou biochimique spécifique est estimée par extrapolation à I= 50 % en traçant la courbe % I = f ([concentration]), (voir les **figures 51,52**).

Plus la valeur de CI_{50} est basse, plus l'activité antioxydante est élevée. Pour toute l'expérimentation, chaque test est répété 3 fois. La moyenne des trois essais a été calculée.

1.4. Résultats du test DPPH

On remarque expérimentalement, le changement de couleur de la solution du DPPH de la coloration violet intense à une coloration jeune pâle, cela montre déjà la présence d'une activité anti-oxydante. Notre série de dilution est analysé par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 517 nm, les résultats de l'HE d'*Ocimum basilicum* L. (différentes parties, chaque saison) sont présentés dans le **Tableau 12** et **13**.

Tableau 12 : L'activité antioxydante de l'HE du basilic (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD).

C [µg/ml]	%DPPH d'HE_{11}	%DPPH d'HE_{12}	%DPPH d'HE_{21}	%DPPH d'HE_{22}	%DPPH d'HE_{31}	%DPPH d'HE_{32}
32	61,33±0,011	60,17±0,01	64,30±0,12	66 ,14±0,05	60,76±0,00	55,63±0,00
24	53,83±0,008	49,39±0,01	55,84±0,01	57,38±0,00	51,43±0,01	46,00±0,00
16	44,87±0,002	39,90±0,14	44,60±0,00	45,01±0,03	39,37±0,10	36,40±0,01
8	36,33±0,012	29,28±0,02	32,39±0,00	33,26±0,11	28,54±0,05	27,15±0,01

Tableau 13 : L'activité antioxydante de l'acide ascorbique (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD).

Concentration [µg/ml]	L'absorbance en 517nm	% Piégeage du radical DPPH
100	0,043± 0,006	92,53
80	0,155± 0,007	79,09
60	0,177± 0,007	69,27
40	0,232± 0,001	59,72
10	0,327± 0,004	43,22

Les extraits d'*Ocimum basilicum* L. (différentes parties des 3 saisons) ont manifestés un pouvoir antioxydant en piégeant les molécules du radical libre DPPH, l'extrait des HE a présenté une capacité faible en comparaison avec le contrôle positif.

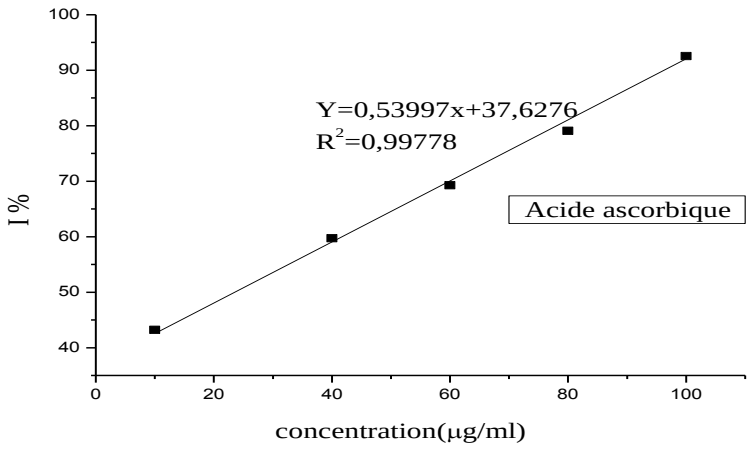


Figure 44 : Activité antioxydante de l'acide ascorbique.

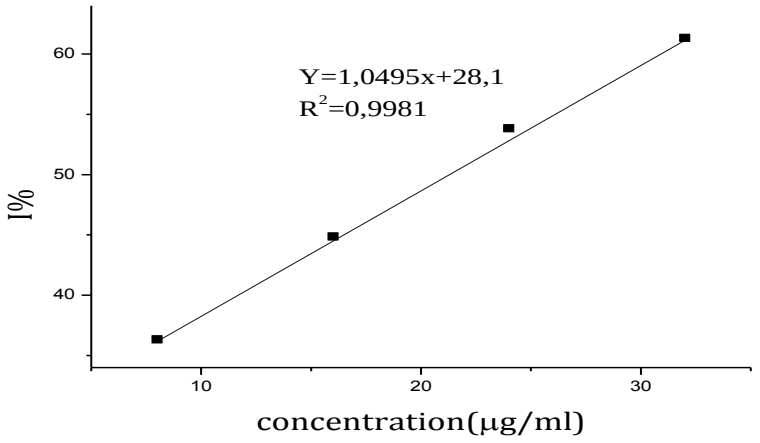


Figure 45 : Activité antioxydante d'**HE11.**

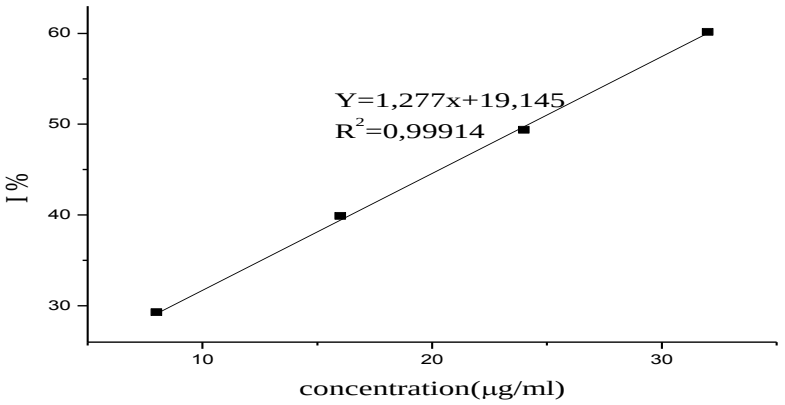


Figure 46 : Activité antioxydante d'**HE12.**

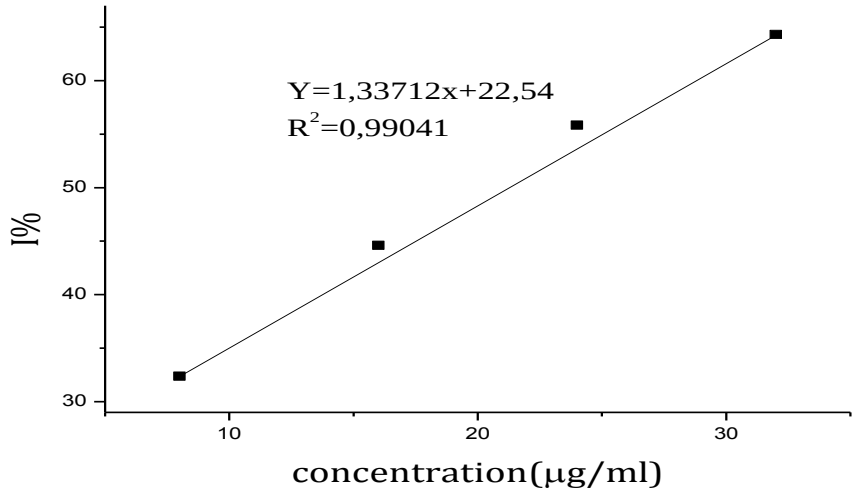


Figure 47 : Activité antioxydante d' **HE21.**

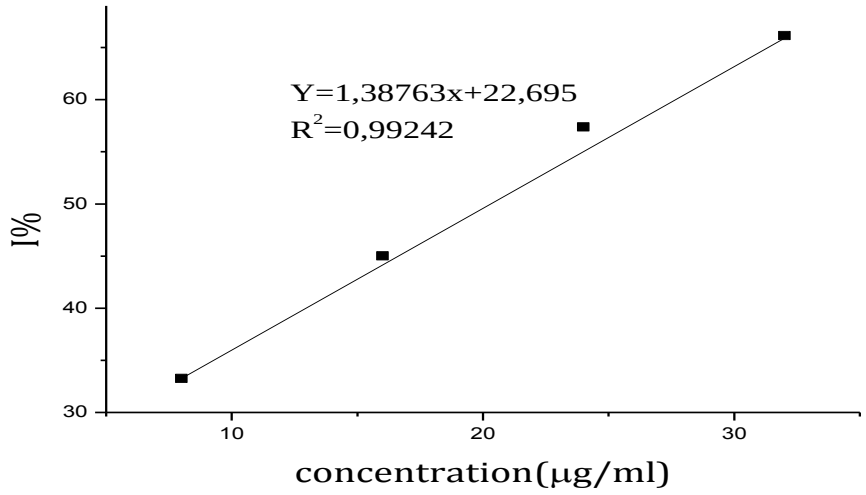


Figure 48 : Activité antioxydante d' **HE22.**

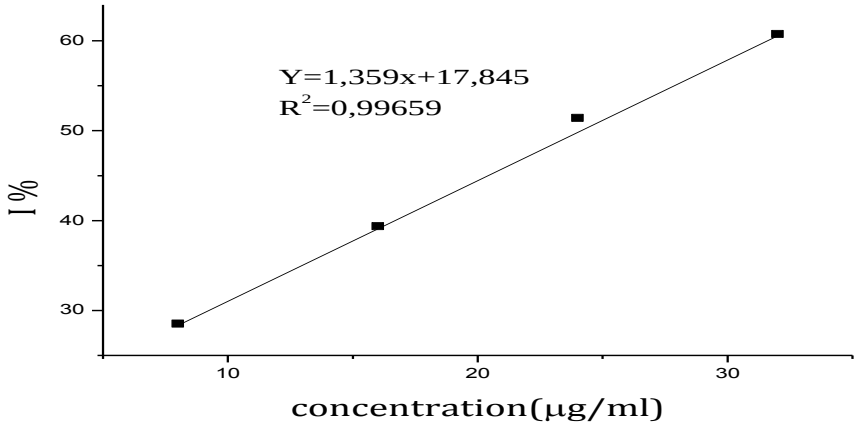


Figure 49 : Activité antioxydant d' **HE31.**

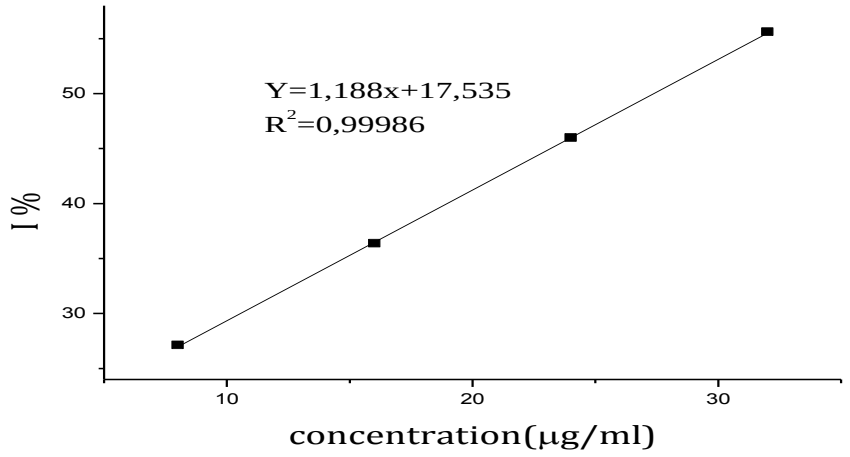


Figure 50 : Activité antioxydante d' **HE32.**

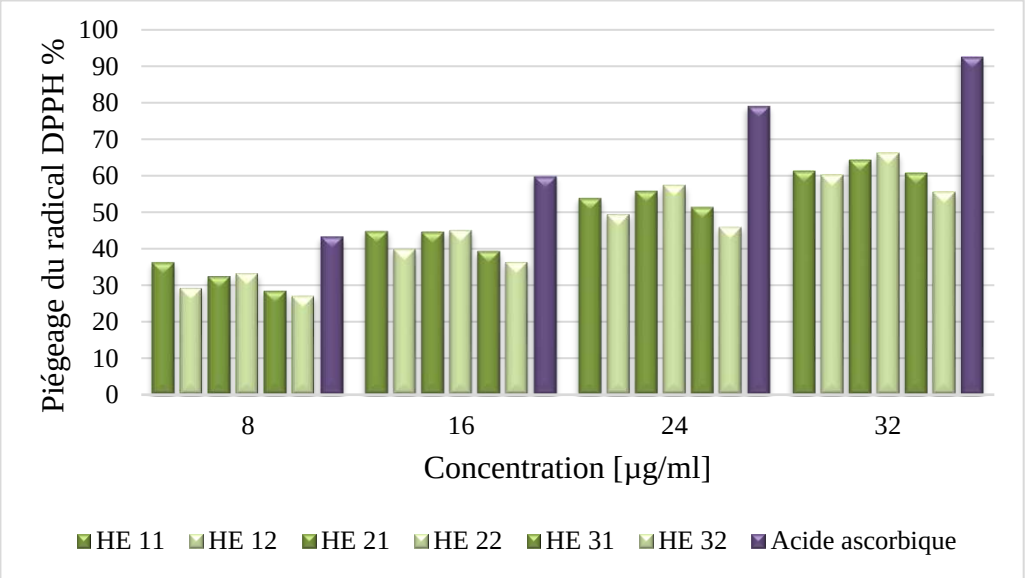


Figure 51 : Activité antioxydante de l'huile essentielle d'*O. Basilicum* L. comparée à celle de l'acide ascorbique à des concentrations allant de 8 à 32 µg/ml.

Les résultats obtenus (**tableau 12 et 13)** ci-dessus, montrent que le pourcentage de piégeage du radical DPPH s'accentue avec l'augmentation de la concentration soit pour l'antioxydant de comparaison l'acide ascorbique, ou pour l'huile essentielle.

D'ailleurs, l'activité antioxydante des extraits de feuilles et fleurs d'*O. Basilicum* L. est inférieure à celle du témoin pour toutes les concentrations utilisées. Pour les concentrations de

32 µg/ml et 8 µg/ml en huile essentielle le % de piégeage du radical DPPH dépasse 66,14%.Pour toutes les concentrations utilisées, l'acide ascorbique s'impose avec un pouvoir antioxydant élevé comparé à celui de l'HE, ce pouvoir est de 92,53 % à une concentration de 100µg/ml.

En comparant les résultats obtenus avec les extraits de la plante et le standard, les valeurs CI_{50} déterminées en µg/ml expriment la concentration efficace de l'extrait antioxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50 % de molécules de DPPH mises en solution dans l'éthanol (**Tableau 14**).

Tableau 14 : CI_{50} des huiles essentielles et de l'acide ascorbique (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD).

	HE_{11}	**HE_{12}**	**HE_{21}**	**HE_{22}**	**HE_{31}**	**HE_{32}**	**Acide ascorbique**
CI_{50} [µg/ml]	20,86±0,03	24,16±0,06	20,53±0,03	19,69±0,01	23,66±0,08	27,32±0,04	22,91±0,09

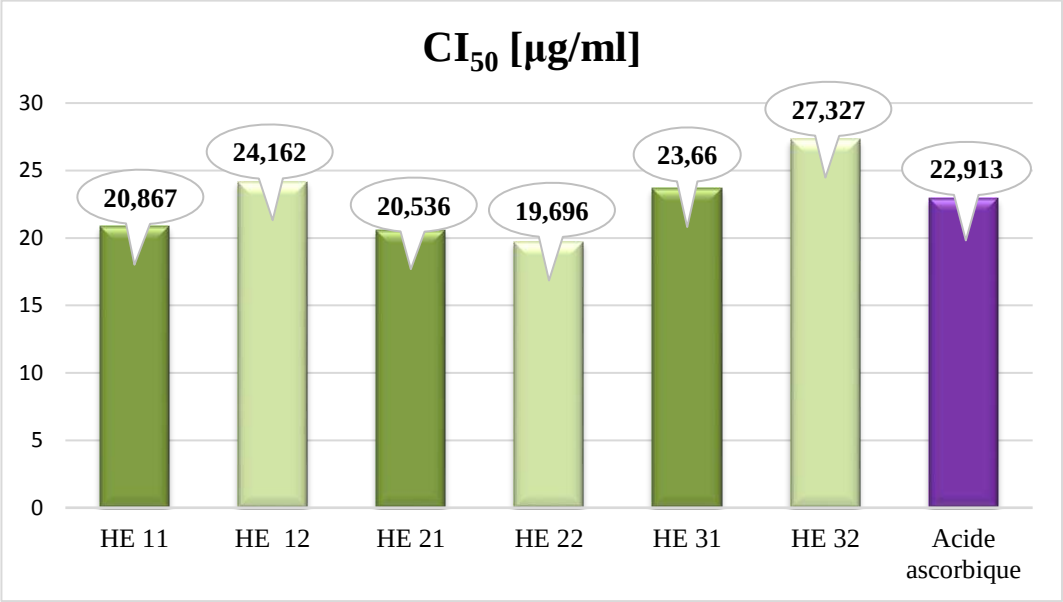


Figure 52 : CI_{50} des huiles essentielles et de l'acide ascorbique.

Selon les résultats enregistrés, nous remarquons que l'extrait des fleurs de l'automne obtenu est doté d'un bon pouvoir antioxydant (CI_{50}= 19,696±0,01µg/ml), mais les huiles essentielles des fleurs de l'hiver ont présenté un pouvoir antioxydant très faible avec un CI_{50}= 27,32±0,04 µg/ml, ce qui nous donne le pouvoir antioxydant le plus faible par rapport

aux huiles essentielles de l'autre organe d'O. *Basilicum* L ; 20,536±0,03 ; 20,867±0,03 ; 23,660±0,08 et 24,162±0,06 µg/ ml pour les feuilles de l'automne ; les feuilles de l'été ; les feuilles de l'hiver ; les fleurs de l'été respectivement. Alors que le CI_{50} de l'acide ascorbique est de 22,913±0,09 µg/ml.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus préalablement dans le cadre d'un projet de recherche dans le laboratoire biogéochimie des milieux désertiques **[47]**. L'huile essentielle d'*O.basilicum* L. *genovese* s'est révélée avoir une activité anti-radicalaire avec une valeur de CI_{50}= 320.96±0.0969 µg/ml pour la région d'Ouargla.

En comparant nos résultats avec ceux obtenus par L. Hadj Khelifa qui a signalé que l'huile essentielle de *O. basilicum* de Khemis Miliana, située dans le nord de l'Algérie, présente une activité antioxydante très importante ; Les résultats ont montré que la concentration de l'huile essentielle nécessaire pour inhiber 50 % de DPPH, était de 83,54 mg / ml supérieur à celle de la vitamine E (22,0 mg / ml) et agit donc comme un agent antioxydant naturel. **[48]**

La même constatation a été rapportée par Ouibrahim, le potentiel antiradicalaire global des huiles essentielles testées a été inférieur à celui du BHT dont l'CI_{50} était de 0,17±0,02 mg/ml alors que celui de l'HE l'*Ocimum basilicum* avait une valeur de 2,0 ± 0,04 mg/ml. **[49]**

L'HE d'*Ocimum basilicum* a fait l'objet de nombreux travaux dont les résultats sont variables. Les travaux d'Ijaz Hussain sur l'HE d'*Ocimum basilicum* en fonction des différentes périodes de récolte dans l'année, démontrent que les HE de la période d'hiver et de printemps jouissent d'une plus grande activité antiradicalaire comparée à celle de l'automne et de l'été, présentant des valeurs respectives d'CI_{50} : 4.8, 5.3, 6.0 et 6.7 µg/ml. Cette variabilité est due aux impacts des facteurs environnementaux sur la composition chimique des HE ainsi que sur leurs activités biologiques. **[27]**

CONCLUSION

L'évaluation des propriétés antioxydantes des extraits naturels est d'une importance croissante, en particulier pour trouver de nouvelles sources d'agents antioxydants et antimicrobiens naturels. Dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*O. Basilicum* L cultivée à Ouargla.

Les 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 HE testées jouissent d'un potentiel antiradicalaire appréciable surtout pour l'HE des fleurs et des feuilles de l'automne avec un CI_{50} de 19,696±0,01 et 20,536±0,03 µg/ml respectivement, suivie des feuilles de l'été et l'hiver avec un CI_{50} de 20,867±0,03 et 23,660±0,08 µg/ml respectivement. Les fleurs de l'été ont fourni un CI_{50} de 24,162±0,06 µg/ml et finalement les fleurs de l'hiver ont donné un CI_{50} de 27,327±0,04 µg/ml.

Généralement, nous remarquons une activité antioxydante élevée pour les extraits des fleurs comparativement à celle des extraits des feuilles pour l'été et l'hiver, alors que dans l'automne cet ordre est inversé.

2. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES HE

Objectif

Cette partie vise le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle des différentes parties d'*Ocimum basilicm* L. Il s'inscrit dans la perspective de la valorisation des HE en vue de leur utilisation en agroalimentaire, en médicine et en cosmétique.

Les tests sont réalisés au niveau du laboratoire de bactériologie de l'hôpital Mohammed BOUDIAF, Ouargla.

2.1. Souches bactériennes testées et conditions de culture

L'activité antibactérienne a été évaluée sur trois souches (**tableau 15**) : deux de Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 25923 (pour les infections digestifs), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (pour les infections nosocomiales) et une de Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 (la flore commensale de la peau chez l'homme). Elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive (**figure 53**) favorable à leur croissance pendant 24 h, à l'obscurité et à 37 °C. **[50], [51]**

Les microorganismes utilisés sont des bactéries de l'ATCC (American Type Culture Collection), impliquées fréquemment dans la contamination et l'altération des denrées alimentaire et souvent responsables d'infections contractées dans les hôpitaux. **[50-57]**

Tableau 15 : Les noms botaniques et les références des souches bactériennes utilisées.

Bactéries	souches	Références
Gram positif	*Staphylococus aureus*	ATCC 25923
Gram négatif	*Escherichia coli*	ATCC 25922
	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853

Figure 53 : Les souches bactériennes utilisées.

2.2. Les milieux de culture utilisés

- La Gélose Nutritive (GN) pour l'entretien des souches bactériennes (favorable à leur croissance à l'obscurité pendant 24h à 37°C).
- La gélose Mueller Hinton (MH) pour l'étude de la sensibilité des bactéries à l'**HE**.

Figure 54 : La gélose Muller-Hinton

2.3. Méthode de l'aromatogramme

La méthode de diffusion en milieu gélosé (aromatogramme) est utilisée pour l'étude de l'activité antibactérienne qui permet de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes *vis à vis* de l'huile essentielle donnée. Des boites de pétri (90 mm) contenant la gélose de Muller-Hinton sont inoculées, des disques (papier filtre de 6mm de diamètre) stériles imprégnés de différentes huiles essentielles (5µl par disque) sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince. L'ensemble est incubé à 37°C à l'étuve pendant 24 heures. **[30], [50-57]**

Après 24 heures d'incubation une zone ou un halo clair est présent autour du disque. Ce diamètre d'inhibition traduit l'activité antibactérienne de l'huile essentielle. Le résultat est exprimé par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition où les bactéries n'ont pas pu se développer. Ces dernières seront qualifiées :

- ✓ **Non sensible** (-) ou **résistante** : diamètre < 8mm.
- ✓ **Sensible** (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- ✓ **Très sensible** (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- ✓ **Extrêmement sensible** (+++) : diamètre > 20 mm. [**57]**

2.4. Résultats de l'aromatogramme

On a utilisé des antibiotiques comme témoin positif.

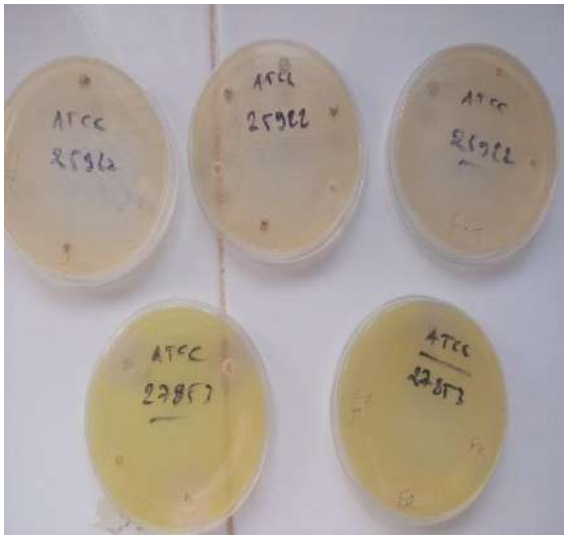


Figure 55 : Les zones d'inhibition, incluant le disque (L'essai antibiotique à droite et les huiles à gauche)

Tableau 16 : Liste des antibiotiques testés pour les souches bactériennes utilisée.

Escherichia coli	**Antibiotique**	Amoxicilline (AMC) (Aminopencilline)	Colistine (CL) (Polypeptide)	Pipéracilline (PIP) (Carboxypencilline)	Tobranycine (TM) (Aminosides)
	D	**26 mm**	**20 mm**	**25 mm**	**22 mm**
Staphylococus aureus	**Antibiotique**	Ofloxacine (OF)	Fucidine (FC)	Gentamicine (GEN)	
	D	**26 mm**	**30 mm**	**29 mm**	
Pseudomonas aeruginosa	**Antibiotique**	TCC (Ticarcilline + acide clavulanique)		Tic (Ticarcilline) Carboxypencilline	
	D	**20 mm**		**19 mm**	

Les résultats des tests antibactériens avec des huiles essentielles (différentes parties, chaque saison) résumés dans le tableau suivant :

Tableau 17 : Diamètres des zones d'inhibition (incluant le disque 6 mm) des HE d'*O.basilicum* L..

Les souches	**HE_{11}**	**HE_{12}**	**HE_{21}**	**HE_{22}**	**HE_{31}**	**HE_{32}**
Escherichia coli (G-) ATCC 25922	8 mm –	12 mm +	16 mm ++	21.5 mm +++	6 -	13 mm +
Staphylococcus aureus (G+) ATCC 25923	10 mm +	14 mm +	18 mm ++	**25** mm +++	6 -	20 mm +++
Pseudomonas aeruginosa (G-) ATCC 27853	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -

Discussion

Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle des différentes parties de l'*Ocimum basilicum* L. n'avait aucune activité antibactérienne marquée contre la souche de *Pseudomonas aeruginosa (*ATCC 27853), la souche la moins sensible aux antibiotiques testés. Les micro-organismes les plus sensibles à ces huiles essentielles étaient *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Escherichia coli (*ATCC 25922).

Selon Bassolet, les bactéries Gram positif sont plus sensibles que les bactéries Gram négatif aux huiles essentielles. **[30]**

Les zones d'inhibition des antibiotiques testés sont aux alentours de 19 et 30 mm, cette sensibilité varie d'un antibiotique à l'autre. Cette activité est très forte comparée à celle des huiles étudiées.

En effet, l'**HE** d'Octobre d'*Ocimum basilicum* L. a montré un important effet inhibiteur contre les micro-organismes étudiés. Selon nos résultats, on conclue que l'automne favorise cette forte activité par rapport aux autres saisons.

Les diamètres d'inhibition varient de 8 à 18 mm pour les feuilles et de 12 à 25 pour les fleurs *d'Ocimum basilicum* L. Selon nos résultats l'huile essentielle des fleurs *d'Ocimum basilicum* L. inhibe plus la croissance bactérienne que celle des feuilles. Les résultats trouvés par d'Ijaz Hussain sur l'HE *d'Ocimum basilicum* en fonction des différentes périodes de récolte dans l'année, démontrent que les HE de la période de l'automne et de l'hiver sont plus actifs que celles du printemps et de l'été : *Staphylococcus aureus* (24.4 ± 1.1 ; 24.0 ± 1.0 ; 23.2 ± 1.4 ; 22.2 ± 1.3 mm), *Escherichia coli* (13.2 ± 0.8 ; 16.2 ± 1.0 ; 13.5 ± 0.8 ; 11.4 ± 0.6 mm). **[27]**

L'activité des huiles essentielles testées pourrait être liée à leurs compositions chimiques. Selon N. Slougui, L'analyse des huiles essentielles, des fleurs et des feuilles d'*O.basilicum* L., a montré une variation dans la composition chimique d'un organe à l'autre. **[38]**

En effet, l'étude de l'activité antibactérienne de certains constituants des huiles essentielles a permis de distinguer que :

- les composés phénoliques ont forte activité antimicrobienne tels que le thymol, le carvacrol et l'eugénol.

- les constituants qui ont une faible activité antibactérienne sont : pulegone, menthone, 1,8-cinéole, p-cymène, isomenthone, myrcène, -pinène, pipéritone, limonène, linalol, terpinène, les sesquiterpènes et les composés non terpéniques. **[30]**

D'après ces données de la littérature, la variation dans l'activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles et des fleurs d'*Ocimum basilicum* L. est due à leur différence de teneur en composés actifs, qui doit être déterminée par la chromatographie gazeuse (CPG) qui a été faite préalablement dans le laboratoire BioGéoChimie des milieux désertiques (**tableau 18**).

Tableau 18 : Teneur en chémotype hybride linalol-eugénol des huiles essentielles d'*Ocimum basilicum* L. analysées par CPG sur 3 colonnes de polarité différentes. **[38]**

Type de colonne	**Colonne OV1701**		**Colonne SE30**		**Colonne CW20M**	
Partie de plante	*feuilles*	*fleurs*	*Feuilles*	*fleurs*	*feuilles*	*fleurs*
linalol	44.50 %	50.23 %	25.23 %	43.37 %	9.41 %	49.88 %
eugénol	38.42 %	36.35 %	24 %	22.89 %	17.64 %	28.17 %

Conclusion générale

Dans notre travail, nous avons voulu contribuer aux études qui ont été menées sur l'exploitation des propriétés naturelles des huiles essentielles. A cet effet, on s'est intéressé à la valorisation des huiles essentielles d'*Ocimum basilicum* L. *genovese*, récolté dans la région d'Oum-Erraneb de la wilaya de Ouargla, durant la période juin 2016 - avril 2017. Notre contribution réside sur l'étude comparative et analytique des huiles essentielles obtenues à partir des différents organes (feuilles, fleurs, tiges et graines) et une évaluation de leur potentiel antioxydant et antibactérien. L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation au moyen d'un dispositif de type Clevenger. Un certain nombre de résultats intéressants peuvent être résumés dans ce qui suit :

- L'étude quantitative a montré une variation remarquable de la teneur des huiles essentielles ; Les feuilles fournissent un rendement supérieur à celui des autres organes de la plante. Cependant en hiver, le taux d'humidité est trop élevé, les feuilles flétrissent, la croissance ralentit, et l'aspect général de la plante se dégrade. Le rendement en huile essentielle est de 0.3120 à 0.5667 % pour les feuilles ; de 0.4048 à 0.7352 % pour les fleurs ; des traces pour les tiges et les graines dans chaque saison. Ces huiles présentent des densités, des couleurs et des odeurs différentes. Ces résultats ont pu mettre en évidence la variabilité de la composition chimique des huiles essentielles des différentes parties de la plante.

- Les analyses qualitatives, par CCM nous ont montré que les composants de l'huile essentielle des feuilles et ceux des fleurs sont presque les mêmes.

- La séparation par CC a montré, que l'huile essentielle du basilic grand vert se constitue essentiellement de linalol et d'eugénol.

- L'étude de l'activité antioxydante a révélé que l'extrait de l'huile essentielle des différentes parties d'*O. basilicum* L. est actif comme piégeur du radical DPPH. Les feuilles d'été et d'hiver ont fourni le pouvoir antioxydant le plus important au détriment des huiles essentielles des fleurs. Ce résultat est inversé pour l'automne.

- L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*O. basilicum* L. sur les trois souches de bactéries (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), a montré une importante activité antibactérienne contre deux souches bactériennes, à l'exception de *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC 27853 qui est connue d'après la littérature par sa large résistance aux antibiotiques.

- L'huile essentielle des fleurs d'*O. basilicum* L. inhibe la croissance bactérienne plus que celle des feuilles. L'automne favorise cette activité alors qu'en été elle est moins performante. Cette variabilité est due aux impacts des facteurs environnementaux sur la composition chimique des HE ainsi que sur leurs activités biologiques.

En termes de perspectives et à la suite des résultats obtenus, il serait intéressant de mener une investigation plus détaillée de l'enquête dans les autres villes de la région du sud d'Algérie, en vue de bien évaluer l'état des plantes aromatiques et médicales originaire du sud. Les résultats de ce travail peuvent être complétés aussi par :

- L'Evaluation de l'activité antioxydante par les diverses méthodes disponibles.
- L'étude de l'effet insecticide des huiles essentielles d'*O. basilicum* L.
- La réalisation des tests antibactériens sur une large gamme de microorganismes.
- Cibler les fractions les plus actives afin de caractériser les molécules responsables de ces activités (principes actifs).

Référence bibliographique

[1] K. Francis, H-M. Dordrecht., 2012, La connaissance des huiles essentielles : Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Spinger Verlag, France. 2-23

[2] C. Duraffourd., 2002, Traité de phytothérapie clinique : endobiogénie et médecine. Masson, Paris

[3] F. Bardeau., 2009, Les Huilles Essentielles : découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Lanore : François-Xavier Sorlot, Editeur, Paris

[4] C. Bekhechi, D. Abdelouahid., 2010, Les huiles essentielles, Office des publications universitaires. Alger

[5] F. Boukhobza, P. Goetz., 2014, Phytothérapie en odontologie. Editions CdP Initiatives Santé, France

[6] J. Bruneton., 2009, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4 éme Éd. Tec & doc ; Cachan : Éd. médicales internationales, Paris

[7] Bordeaux., 2009, Progrès en dermato-allergologie, Montrouge : J. Libbey Eurotext.DL,France

[8] M. Ragot., 2011, Produire du lait biologique : conversion et témoignages. Government publication : France : Nouvelle éd., revue et actualisée.

[9] G. Duvallet, L. de Gentile., 2012, Protection personnelle antivectorielle. Government publication : France

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

[11] C. Vergely, L. Rochette., 2003, Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. Facultés de Médecine et de Pharmacie, 7 Bd Jeanne d'Arc.

[12] A. Zhiri., 2006, les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. La fondation pour le libre choix.

[13] P. Martinetti., 2013, Mon guide des Huiles essentielles. Paris : Lanore : François-Xavier Sorlot, Editeur, cop.

[14] Alcane., 1858, Revue de thérapeutique medico-chirurgicale.

[15] A. Jacques de Lens, FV. Mérat., 1833, Dictionnaire universel de matière médicale et de thérapeutique générale. J.-B. Baillière,

[16] A. Richard., 1823, Botanique medicale, ou histoire naturelle et medicale des médicaments. Bechet, France

[17] Y. Holm, R. Hiltunen., 2003, Basil: The Genus Ocimum. CRC Press,Finland

[18] A. Cronquist., 1981, An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Illustrée, réimprimée, rééditée. Columbia University Press. New York

[19] E. Small, G. Deutsch., 2001, Herbes culinaires pour nos jardins de pays froid. National Research Council Canada. Canada

[20] M. Pierre, M. Lys., 2007, Secrets des plantes. Editions Artemis., impr,Paris

[21] N. Slougui., 2017, Etude analytique comparative des huiles essentielles de quelques variétés de basilic cultivées pour la première fois dans diverses régions d'Algérie. Thèse de Doctorat de l'Université Ouargla, option : chimie. 23,65p.

[22] F. J. Cazin., 1868, Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes : avec un atlas de 200 planches lithographiées. 3 édition, Bibliothèque cant et univ. Lausanne, P. Asselin

[23] F.P. Chaumeton, Chamberet et Poiret., 1814, Flore medicale., peinte par M.me E. Panckoucke et par P.J.F. Turpin ... Tome premier -septieme: Université La Sapienza de Rome (Biblioteca di Biologia Ambientale

[24] Y A. A. Aburigal et *al*., 2016, Variability in Content and Chemical Constituents of Essential Oil of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) Obtained from Aerial Plant Parts. Sudan, Advances in Bioscience and Biotechnology, Scientific Research, 2016, 7, PP. 183-187

[25] J.C. Chalchat et M. Özcan., 2008, Comparative essential oil composition of flowers, leavesand stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb.in Turkey. Food Chem.15; 110(2):501-3

[26] D J. Charles, J E. Simon., 1990, Comparison of Extraction Methods for the Rapid Determination of Essential Oil Content and Composition of Basil. Journal of the American Society for Horticultural Science, 115. 3 458-462

[27] AI Hussain *et al*., 2008, Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (Ocimum basilicum) essential oils depends on seasonal variations. *Pakistan*, Food Chem.108(3) :986-95

[28] Al-Maskri AY et al., 2011, Essential oil from Ocimum basilicum (Omani Basil): a desert crop. Pubmed.gov. US National Library of Medicine National Institutes of Health, Nat Prod Commun. 6(10):1487-90

[29] S. Raseetha Vani, S.F. Cheng and C.H. Chuah., 2009, Comparative Study of Volatile Compounds from Genus Ocimum. American Journal of Applied Sciences 6 (3) : 523-528

[30] I. Bassole et al., 2011, Composition chimique et activités antibactériennes des huiles essentielles des feuilles et des fleurs de cymbopogon proximus (stapf.) et d'ocimum canum (SIMS). Pharm. Méd.Trad. 11 : 37-51

[31] M. Zatout., 2012, Etude géochimique et minéralogique du chott de Ain El Beida et de la sebkha d'Oum Erraneb Cuvette de Ouargla - Bas Sahara. Mémoire de magister Univ de Ouargla, Spécialité : Géologie, Option : Géochimie de surface.

[32] C.Bachelot., 2006, Les huiles essentielles : extraction et comparaison. U.C.O Bretagne, pp.1-18

[33] K. Taleb-toudert , 2015, Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de kabylie (nort algérien) et evaluation de leurs effets sur le bruche du niébé callosobruchus maculatus (coleoptera : bruchidae). Thèse de doctorat, université Mouloud Mammeri de Mizi-Ouzou, option : sciences biologiques.

[34] S. Ngom et *al*., 2012, Composition chimique et propriétés physico-chimiques des huiles essentielles d'*Ocimum basilicum* et d'*Hyptis suaveolens* (L.). Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 81 : 166 – 175

[35] Site 01 : http://www.pthorticulture.com/fr/zone-du-savoir/comment-lhumidite_influence-t-elle-la-qualite-des-cultures/ consulté le : 09/05/2017

[36] F. Rouessac et al., 2004, Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes. 6e édition. Dunod, Paris, 100-106.

[37] M. Frederick.,2009, La chromatographie, Publié dans biotechnologies.

[38] N. Slougui., 2002, Etude de la rètention de quelques terpènes par chromatographie Application à leur analyse dans le basilic de la région d'Ouargla, Mémoire de Magister de l'Université Ouargla, option : chimie organique appliquée.

[39]C.W. Kahn, M. Mitra., 1987, Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. A. J. Org. Chem, 43 : 2923-2925

[40] S. de Monredon – Senani., 2004, Interaction Organosilanes /Silice de précipitation Du milieu hydro-alcoolique au milieu aqueux Spécialité : Physique et Chimie des Matériaux, These de Doctorat de l'universite pierre et marie curie, Paris

[41] É. Biémont., 2008, Spectroscopie moléculaire: Structures moléculaires et analyse spectrale. De Boeck Supérieur

[42] M-A. Schott et J. Valentin et G. Magadur., 2014, Chimie : option PC et PSI, MPSI, 1ère année : un accompagnement au quotidien : tout-en-un : cours, exercices corrigés, Louvain-la-Neuve : De Boeck, France

[43] Site 02 : http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID consulté le : 09/05/2017

[44] M. Touaibia., 2014, Evaluation de l'effet anti-oxydant des extraits de l'espèce Saharo-Endemique (*Myrtus nivellei* Batt & Trab.) obtenus in situ et in vitro. Algerian Journal of Natural Products. 2 (2) : 56-63

[45] C. Popovici., 2010, Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de génie industriel. 4 : 25-39

[46] O.K. Laghouiter., 2015, Etude de l'activité antioxydante des huiles essentielles de certaines menthes cultivées dans la région de Ghardaïa. El Wahat pour les Recherches et les Etudes.8 (1) : 84 - 93

[47] A. Benzid, N. Litim., 2016, Etude comparative de l'activité antioxydante de deux variétés d'*Ocimum basilicum L.* cultivées dans plusieurs régions d'Algérie. Mémoire de Master, université Kasdi Merbah-Ouargla, option: Chimie appliquée

[48] L. Hadj Khelifa et al., 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

[49] A. Ouibrahim., 2015, Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis* L., *Ocimum basilicum* L. et *Rosmarinus officinalis* L.) de l'Est Algérien. Diplôme de Doctorat, université Badji Mokhtar – Annaba, Spécialité : Toxicologie

[50] L. Boutabia et *al.*, 2016, Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie), Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège. 85: 174 – 189

[51] J**.** Branger et al, 2004, Role of Toll-like receptor 4 in gram-positive and gram negative pneumonia in mice. Infect Immun. 72:788–794

[52] T. Fritsche et *al*., 2005, Antimicrobial Activity and Spectrum of PPI-0903M (T-91825), a Novel Cephalosporin, Tested against a Worldwide Collection of Clinical Strains. Antimicrob Agents Chemother. ; 49(8): 3501–3512

[53] S. O. S. Hassane et *al*., 2011, Activité antimicrobienne et composition chimique de l'huile essentielle de Plectranthus aromaticus Roxb. de l'ile de la Grande Comore. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 15(2) : 251-258

[54] A. M. D. Moghaddam et *al*., 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

[55] N. Zayyad et al., 2011, Analyse chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des trois espèces de Thymus : *Thymus zygis*, *T. algeriensis* et *T. bleicherianus*. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège. 1783-5720

[56] M. Nabrdalik, K. Grata., 2016, Antibacterial activity of *Ocimum basilicum* L. essential oil against Gram-negative bacteria, Post Fitoter.17 (2): 80-86

[57] A. Bougurra, L. Himed, M. Barakat., 2014, étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des écoreces de Citrus reticulate. SAN 03(1), 32-39

Résumé

Résume :

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet des saisons de culture et les parties de la plante *Ocimum basilicum* L.*Genovese (basilic*), sur le rendement d'extraction, la qualité et la constitution de ses huiles essentielles ainsi que quelques activités biologiques. Cette plante, connue pour ses effets thérapeutiques est cultivée pour ce travail, dans une zone agricole à Oum-Erraneb (Ouargla).

Le rendement d'extraction des huiles essentielles du basilic obtenu, s'avère acceptable pour les divers organes. Il varie de 0.3120 à 1.2035 % pour les feuilles ; de 0.4048 à 0,7782 % pour les fleurs et à l'état de traces pour les tiges et les graines. Les valeurs maximales ont été observées en automne, et minimales en hiver pour les feuilles, et en été pour les fleurs.

L'analyse des huiles essentielles, par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) et Chromatographie sur Colonne ouverte de gel de silice (CC), nous a permis d'identifier les deux composés majoritaires : le linalol et l'eugénol (confrontation avec les R_f et les spectres IR des étalons purs).

L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode de réduction du DPPH•. Les valeurs de la CI_{50} sont 20,867±0,03 ; 20,536±0,03 et 23,660±0,08 µg/ml pour les feuilles et 24,162±0,06 ; 19,696±0,01 et 27,327±0,04 µg/ml pour les fleurs dans les trois saisons : été, automne et hiver respectivement.

L'activité antimicrobienne a été testée par la méthode de l'aromatogramme sur trois souches bactérienne (*Escherichia coli* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25922).Les résultats montrent que les huiles essentielles sont actives contre : *Escherichia coli* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, les diamètres d'inhibition varient de 8 à 18 mm pour les feuilles et de 12 à 25 mm pour les fleurs. Notons enfin, que les huiles essentielles des plantes récoltées en automne sont plus actives que celles des autres saisons.

Mots- clés : *Ocimum basilicum* L. *Genovese*, huiles essentielles, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

الملخص:

في عملنا كنا مهتمين بدراسة تأثير موسم الحصاد واختلاف أجزاء نبتة: الريحان (*Ocimum basilicum* L. *Genovese*) على مردود الاستخلاص، نوعية ومكونات الزيوت الطيارة وبعض نشاطيتها البيولوجية. هذه نبتة معروفة بخصائصها العلاجية زرعت لهذا العمل في منطقة زراعية ب: ام الرانب (ورقلة).

مردود الزيوت الطيارة للريحان كان مقبولا لمختلف أجزاء النبتة حيث يتراوح بين 0.3120 الى 1.2035٪ بالنسبة للأوراق ومن 0.4048 إلى 0,7782٪ بالنسبة للزهور، وقطرات بالنسبة للجذوع والبذور. القيم العظمى لوحظت في فصل الخريف بينما القيم الدنيا كانت في فصل الشتاء بالنسبة للاوراق وفي فصل الصيف بالنسبة للزهور.

تحليل الزيوت الطيارة بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة والفصل بواسطة كروماتوغرافيا العمود سمح لنا بتحديد مركبين أعظمين: اللينانول والايجينول.

النشاطية المضاد للأكسدة أجريت بطريقة الارجاع لل DPPH•. قيم ال CE_{50} هي:20,536±0,03 20,867±0,03 ; و23,660± 0,08 ميكروغرام /مل بالنسبة للأوراق و24,162±0,06 ; 19,696 ±0,01 و27,327±0,04 ميكروغرام /مل بالنسبة للزهور في الصيف، والخريف والشتاء، على التوالي.

النشاطية المضادة للبكتيريا تم اختبارها بطريقة (aromatogramme) على ثلاث سلالات بكتيرية (*Escherichia coli* ATCC 25923 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و*Staphylococcus aureus* ATCC 25922). أظهرت النتائج ان الزيوت الأساسية فعالة ضد: *Escherichia coli* ATCC 25923 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 *بأقطار* تثبيط تتراوح بين 8 الى 18 ملم بالنسبة للأوراق وبين 12 الى 25 ملم بالنسبة للزهور. لاحظنا انا الزيوت الأساسية لفصل الخريف أكثر فعالية مقارنة بالفصول الاخرى.

الكلمات الدالة: *Ocimum basilicum* L. Genovese، زيوت طيارة، النشاط المضادة للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا.

Résumé

Abstract:

In our study, we were interested in studying the effect of seasons of culture and parts of the plant: *Ocimum basilicum* L. Genovese (basil) on extraction yield, quality and constitution of essential oils and some of biological activities. This plant, known for its therapeutic effects, grown for this work in an agricultural zone at Oum-Erraneb (Ouargla).

The yield of the essential oils of the basil gave an acceptable yield for the various organs, which varies from 0.3120 to 1.2035% for the leaves; from 0.4048 to 0.7782% for the flowers and in trace amounts in stems and seeds. Maximum values observed in autumn, and minimal, in winter for leaves and in summer for flowers.

Analysis of the essential oils by Thin Layer Chromatography (TLC) and Open Column Chromatography on silica gel (CC) allowed us to identify the two major compounds: linalool and eugenol (Comparison with R_f and IR spectra of pure standards).

Antioxidant activity was evaluated by the DPPH reduction method. The EC50 values are 20.867 ± 0.03; 20.536 ± 0.03 and 23.660 ± 0.08µg / ml for leaves and 24.162 ± 0.06; 19,696 ± 0,01 and 27,327 ± 0,04 µg / ml for flowers in all three seasons: summer, autumn and winter respectively.

The antimicrobial activity tested by aromatogram method on three-bacterial (Escherichia coli ATCC 25923, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 and Staphylococcus aureus ATCC 25922). The results show that the essential oils are active against: Escherichia coli ATCC 25923 and Staphylococcus aureus ATCC 25922, the inhibition diameters vary from 8 to 18 mm for the leaves and from 12 to 25 mm for the flowers. It noted that the essential oils of autumn are more active than those of other seasons.

Keywords: *Ocimum basilicum* L. Genovese, essential oils, antioxidant activity, antimicrobial activity.