

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'Aïn-Témouchent



Institut des Sciences biologiques
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Master en science biologique

Option : Biochimie

Présenté par : - Mlle CHAA Soumia
- Mlle ZIANE CHERIF Fatima Zahra

Etude de la phytochimie et des activités antibactériennes et antifongiques de l'huile de quelques plantes médicinales d'Algérie.

Soutenu le : 25/06/ 2019

Devant le jury composé de :

Présidente :	Mlle ZERRIOUH M.	MCB au CUBBAT
Examinatrice :	Mme TABTI L.	MCB au CUBBAT
Encadreur :	Mme BENTABET N.	MCB au CUBBAT

Année universitaire : 2018-2019

Remerciements

Nos vifs remerciements vont en premier lieu pour Allah pour nous avoir protégé, guidé et orienté durant toute notre vie et tout au long de notre parcours universitaire, à lui nous croyons et à son destin nous admettons.

Nous désirons exprimer notre profond remerciement et vive reconnaissance à notre encadreur Mme. Bentabet N. pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigoureuse scientifique. On vous remercie pour votre disponibilité, vos précieux conseils, la confiance que vous nous avez accordés et le suivi régulier de l'élaboration de ce travail

Nos remerciements sont également pour les membres de jury de nous avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à tous nos professeurs qui ont contribué à notre formation

Nous adressons nos remerciements aux personnes qui nous ont aidé dans la réalisation de ce mémoire et spécialement au personnel du laboratoire de biochimie en particulier MEFTAJHI Chokria , MHAMEDI Walid et RAHMANI Khaled .

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire, On tient à vous dire

Merci...



Soumia & Fatima

Dédicace

A celui qui attend mon retour à chaque coucher de soleil

*A celui qui fut le plus brave des hommes, m'ouvrant ses bras dans les
sombres moments et m'aidant à aller de l'avant vers le meilleur, et
qui m'a tant soutenu moralement et matériellement*

♥♥♥Mon père♥♥♥

*A celle qui m'a comblée d'affection, d'amour et de tendresse, et qui a
veillé à côté de mon berceau pour consoler mes cris de douleurs, et
qui n'a jamais cessé de le faire*

♥♥♥Ma mère♥♥♥

A mes très charmantes sœurs :

**♥♥♥Assia, Halima, Amina, Fatima Zohra, Khadidja, Romaiassa,
Meriem, Hafssa, et Hafida♥♥♥**

A tous ceux qui m'estiment et me portent dans leur cœur...



Soumia

Dédicace

Je dédie ce mémoire

*A ma mère **Malika** qui m'a soutenu toute ma vie, qui m'a appris à aimer le travail et le bon comportement. Pour ton amour infini et ta bien vaillance jour et nuit .Merci maman ...♥*

*A Mon père **Ismail**, pour sa patience, son amour et son soutien ...♥*

*A ma sœur : **Hadjer**, Merci pour tous ce que tu as fait pour moi.*

*A mes chers frères : **Abd-ElJalil et Abd-EL-Rahmen** ...♥*

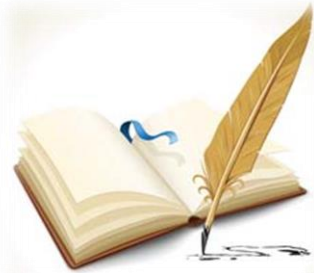
*A mon fiancé **Amine** qui m'a beaucoup encouragé tout au long de ce travail. Merci d'avoir montré beaucoup de patience envers moi durant les moments les plus stressants, merci pour ta fidélité et ta gentillesse*

...♥

*A ma belle famille **Daho**, je vous adore ...♥*

*A ma chère amie et mon binôme **Soumia** avec la quelle j'ai partagé beaucoup de joies et de difficultés au cours de notre travail.*

A tous ceux qui m'estiment et me portent dans leur cœur...



Fatima

Résumé

Lawsonia inermis, *Nigella sativa L*, *Ricinus communis L* et *Foeniculum vulgare* sont des plantes aromatiques, répandue en Algérie et très utilisées par les populations locales pour leur vertu médicinale vue leurs richesses en composés phénoliques. Ces plantes sont connues aussi pour leurs utilisations industrielles. Au cours de notre étude, les huiles fixes ont fait l'objet d'une évaluation physico-chimique et microbiologique. L'extraction de ces huiles a été effectuée par l'extracteur de Soxhlet et le rendement le plus important a été enregistré dans les graines de Ricin.

Les paramètres physico-chimiques de nos échantillons sont en accord avec ceux mentionnés dans les normes. Les effets antibactériens et antifongiques des quatre huiles étudiées ont été évalués par deux méthodes de références à savoir celle des disques diffusés sur gélose et la technique de microdilutions sur milieu liquide, vis-à-vis de quatre souches bactériennes de référence et une levure du genre *C. albicans*. Les résultats révèlent qu'il y a une différence de sensibilité parmi les souches qu'il s'agisse de Gram positives ou de Gram négatives.

Les huiles fixes de Henné et de Ricin ont révélé les activités bactéricides et fongicides les plus importantes.

Mots clés : Huile fixe, Activité antibactérienne, Activité antifongique, *Lawsonia inermis*, *Nigella sativa L*, *Ricinus communis L*, *Foeniculum vulgare*.

Abstract

The aromatic plants of *Lawsonia inermis*, *Nigella sativa L*, *Ricinus communis L* and *Foeniculum vulgare* are widespread in Algeria and widely used by local populations for their medicinal properties, that they have a phenolic compounds. These plants are also known for their industrial uses. In our study, the fixed oils were subjected to a physicochemical and microbiological evaluation. The extraction of the fixed oils was carried out by the soxhlet extractor, and the most important results were founded in the seeds's Ricin.

The physico-chemical parameters of our samples are respected by using the standards. The antibacterial and antifungal effects of the four studied oils were evaluated by two reference methods, namely "the discs broadcast on agar "and "the microdilution technique on liquid medium", those was applicated on the four reference bacterial strains and a yeast of the genus *C. albicans*.

The results reveal that there is a difference in sensitivity among the strains of the positive or the negative Gram. The important bactericidal and fungicidal activities were shown by Henne and Ricin's fixed oils.

Key words: Fixed oil, Antibacterial activity, Antifungal activity, *Lawsonia inermis*, *Nigella sativa L*, *Ricinus communis L*, *Foeniculum vulgare*.

Sommaire

Introduction générale	01
<u>Partie I : Synthèse bibliographique</u>	04
<u>Chapitre 1 : Les huiles fixes</u>	05
1.1 Généralité sur les huiles végétales fixes.....	05
1.1.1 Définition.....	05
1.1.2 Rôle.....	.05
1.2. Composition des huiles fixes.....	06
1.2.1. La fraction saponifiable.....	07
1.2.2. La fraction insaponifiable.....	08
1.3. Usages.....	08
1.4. Procédé d'extraction des huiles par Soxhlet.....	08
1.4.1. Propriétés du solvant d'extraction idéal.....	10
1.5. Conservation et stockage des huiles fixes.....	10
<u>Chapitre 2 : Généralités sur les plantes médicinales</u>	11
2.1. Généralités sur les plantes médicinales.....	11
2.1.1. Intérêt de l'étude des plantes médicinales.....	11
2.1.2. Les plantes médicinales en Algérie.....	11
2.2. <i>Lawsonia inermis</i>	12
2.2.1. Etude botanique	12
2.2.2. Étude systématique	13
2.2.3. Distribution et habitat.....	13
2.2.4. Utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle.....	14
2.2.5. Constitution chimique et données pharmacologiques.....	14
2.3. <i>Nigella sativa</i> :	15
2.3.1. Etude botanique.....	15
2.3.2. Classification botanique.....	15
2.3.3. Distribution et habitat.....	16
2.3.4. Composition chimique des graines de <i>Nigella sativa</i>	16
2.3.5. Effets thérapeutiques de la plante.....	17
2.4. <i>Ricinus communis</i> L	18
2.4.1. Etude botanique.....	18

2.4.2. Classification.....	19
2.4.3. Habitat et distribution.....	19
2.4.4. Composition chimique	19
2.4.5. Propriété pharmacologique.....	20
2.5. <i>Foeniculum vulgare</i> Miller.....	21
2.5.1. Etude botanique.....	21
2.5.2. Classification.....	22
2.5.3. Habitat et répartition géographique.....	22
2.5.4. Composition chimique du Fenouil	22
2.5.5. Utilisation thérapeutique du Fenouil.....	23

Chapitre 3 : Antibiotiques et activités biologiques

3.1. Généralités sur les antibiotiques.....	24
3.1.1. Définition.....	24
3.1.3. Classification des antibiotiques.....	25
3.1.4. Résistance aux antibiotiques.....	25
3.2. Antibiogramme et concentration minimale inhibitrice.....	26
3.3. Place des plantes dans la lutte contre la résistance.....	27
3.4. Description des bactéries étudiées.....	27
3.4.1. Bactéries à Gram positif	27
3.4.2. Bactéries à Gram négatif	28
3.5. Caractéristiques de la souche fongique <i>Candida albicans</i>.	28

Partie II: Matériel et méthodes

1 Matériel végétal :	30
1.1. <i>Lawsonia inermis</i> L.....	30
1.2. <i>Nigella sativa</i> L.....	30
1.3. <i>Ricinus communis</i> L.....	30
1.4. <i>Foeniculum vulgare</i>	30
2. Matériel biologique :.....	31
3. Méthode:.....	32
3.1 Extraction des huiles fixes par soxhlet:.....	33
3.2. Calcul du rendement :	33

3.3. Détermination des indices physico-chimiques des huiles fixes extraites.....	33
3.3.1. Propriétés physiques.....	33
3.3.2. Propriétés chimiques	34
3.4. Evaluation de l'activité antibactérienne des plantes étudiées.....	36
3.4.1. Technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques).....	36
3.4.2. La méthode de la microdilution en milieu liquide (CMI).....	36
3.4 Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des levures.....	37

Partie III : Résultats et discussion **39**

1 . Calcul du rendement.....	40
2. Détermination des indices physico-chimiques des huiles fixes.....	41
2.1 Propriétés physiques.....	41
2.1.1 Caractéristiques organoleptiques.....	42
2.1.2 Analyse physico-chimique des huiles fixes.....	42
2.1.2.1 les propriétés physiques.....	44
2.2. Les propriétés chimiques.....	45
3 .Evaluation de l'activité antibactérienne des plantes étudiées	47
3.1. Technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques).....	47
3.2. La méthode de la microdilution en milieu liquide (CMI) :.....	53
4. Evaluation de l'activité antifongique	55
4.1. Technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques).....	55
4.2. La méthode de la microdilution en milieu liquide (CMI) :.....	58

Partie IV : Conclusion générale **61**

Partie V : Références bibliographiques **64**

Annexes **77**

Liste des tableaux

Tableau N°01: Propriétés pharmacologiques du <i>R. communis</i>	20
Tableau N°02: Microorganismes utilisés pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	31
Tableau N°03: Rendements des huiles végétales fixes.....	39
Tableau N°04: Aspect des différentes huiles fixes.....	41
Tableau N°05: Caractéristiques physico-chimiques des huiles fixes des plantes étudiées.....	42
Tableau N°06: Les résultats obtenus de l'analyse chimique des huiles fixes.....	44
Tableau N°07: Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (D).....	47
Tableau N°08: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des huiles fixes des quatre plantes.....	47
Tableau N°09: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des huiles fixes des quatre plantes vis-à-vis de la souche <i>Candida albicans</i>	53
Tableau N°10: Concentration minimale inhibitrice (CMI, mg/mL) des huiles fixes testées...	56
Tableau N°11: Concentration minimale inhibitrice (CMI, mg/mL) des l'huiles étudiées contre <i>C. albicans</i>	58

Liste des figures

Figure N°01: Constituants des huiles végétales fixes.....	6
Figure N°02: Quelques constituants de la fraction glycéridique.....	7
Figure N°03: Montage de Soxhlet.....	9
Figure N°04 : Description botanique de <i>Lawsonia inermis</i>	12
Figure N°05 : Description botanique de <i>Nigella sativa</i>	15
Figure N°06 : Représentation botanique de <i>Ricinus communis</i>	18
Figure N°07: Description botanique de <i>Fenouil vulgaire</i>	21
Figure N°08 : Mode d'action des antibiotiques.....	24
Figure N°09 : Schéma de la catégorisation clinique en fonction des CMI et des diamètres d'inhibitions.....	26
Figure N°10 : Les différentes parties des plantes étudiées.....	31
Figure N°11 : Schéma d'extraction des huiles fixes des plantes étudiées.....	32
Figure N°12 : Représentation graphique des rendements des huiles fixes étudiées.....	39
Figure N°13 : Evolution de la densité des huiles fixes des plantes étudiées.....	43
Figure N°14 : Représentation graphique des indices chimiques des huiles fixes des plantes étudiées.....	44
Figure N°15: Activité antibactérienne de l'huile de Henné vis-à-vis des quatre souches bactériennes testées.....	48
Figure N° 16: Activité antibactérienne de l'huile de <i>N. sativa</i> vis-à-vis des quatre souches bactériennes testées.....	49
Figure N°17 : Activité antibactérienne de l'huile de ricin vis-à-vis des quatre souches bactériennes testées.....	51
Figure N°18 : Activité antibactérienne de l'huile de fenouil vis-à-vis des quatre souches bactériennes testées.....	52
Figure N°19 : Activité antifongique des huiles fixes étudiées vis-à-vis de <i>C.albicans</i>	53
Figure N° 20: Représentation graphique des CMI des huiles fixes étudiées vis-à-vis de la souche <i>C. albicans</i>	58
Figure N°21 : Les résultats des évaluations antibactériennes et antifongiques sur les huiles fixes de <i>Lawsonia inermis</i> , <i>Nigella sativa</i> , <i>Ricinus communis</i> et <i>Feonicolum vulgare</i>	60

Liste des abréviations

AFNOR	: Association Française de normalisation.
AG	: Acide gras.
AGMI	: Acide gras mono-insaturé.
AGPI	: Acide gras poly-insaturé.
AGS	: Acide gras saturé.
ATCC	: American Type Collection Culture.
CMI	: Concentration minimale inhibitrice.
DO	: Densité optique.
EUCAST	: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
Ia	: Indice d'acide.
Ie	: Indice d'ester.
Is	: Indice de saponification.
KOH	: Hydroxyde de potassium.
NCCLS	: National Clinical Committee Laboratory Standards
OMS	: <i>Organisation mondiale de la Santé.</i>
pH	: Potentiel d'hydrogène.
Rdt	: Rendement.
UFC	: Unité formant colonie



Introduction générale

Introduction générale

Selon l'organisation mondiale de la santé, les maladies infectieuses arrivent toujours au deuxième rang des principales causes de mortalité dans le monde (OMS, 2007). La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage d'antibiotiques et leur prescription à grande échelle et parfois inappropriée et peut entraîner la sélection des souches multi-résistantes.

En effet, l'émergence des résistances est due d'une part, au mauvais usage des antibiotiques. D'autre part, à la capacité infinie des germes à muter sous la pression des antimicrobiens, ainsi qu'à leur vitesse de réplication (Denyer *et coll.*, 2004).

Bien que les maladies bactériennes sont de mieux en mieux diagnostiquées, elles causent toujours un problème de mortalité telles que : la pneumonie, la tuberculose, la méningite, la septicémie et la typhoïde. En 2007, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé plus de 3,3 millions de cas de bactériémies dans le monde, dont près de 850 000 cas en Afrique et 8 700 cas uniquement en Algérie (OMS, 2012).

Le recours aux ressources naturelles en général et aux plantes médicinales en particulier devient alors une des plus importantes et intéressantes pistes à explorer pour la recherche de nouveaux produits antibactériens plus efficaces (Wright *et Sutherland*, 2007).

Cette utilisation des plantes supérieures a eu un regain d'intérêt avec les premières recherches sur les propriétés antimicrobiennes des plantes pour tenter de donner une base scientifique à ces pratiques empiriques (Mela, 1950) ; (Osborn, 1943). Ces plantes ont l'aptitude de synthétiser des métabolites secondaires d'une grande diversité chimique, possédant un large éventail d'activités biologiques (Jaccot *et Campillo*, 2003).

Dans ce contexte, notre travail a pour objectif d'évaluer l'activité antimicrobienne de quatre huiles fixes extraites des plantes : *Lawsonia inermis*, *Nigella sativa L*, *Ricinus communis L* et *Foeniculum vulgare* vis-à-vis de quelques souches microbienne de référence.

Cette étude comporte trois parties :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique sur les huiles fixes, sur les plantes médicinales étudiées et sur les antibiotiques et les activités biologiques.
- La seconde décrit la partie expérimentale, avec une présentation des méthodes d'extractions, des tests physico-chimiques, et les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne.

Introduction générale

- La troisième partie est consacrée à la présentation et à la discussion des résultats.
- Notre travail s'achève par une conclusion générale et des perspectives.



Synthèse bibliographique

1.1. Généralité sur les huiles végétales fixes

1.1.1. Définition :

L'huile est une matière grasse, onctueuse et épaisse, souvent liquide à température ambiante. Une huile fixe renferme en général plus de 99 % de lipides, ni glucides, ni protides et très peu ou pas de cholestérol.

Ces huiles sont des substances insolubles dans les solvants minéraux. Elles sont constituées en majeure partie d'esters de glycérol d'acides gras, appelés triglycérides. Elles sont obtenues par extraction des graines oléagineuses (ricin, soja, colza, tournesol, argan, arachide, etc...) ou de fruits oléagineux comme l'huile de coprah, d'olive ou de palme (**Benabid, 2009**).

1.1.2. Rôles :

Les huiles végétales fixes peuvent contribuer notablement, en fonction de leurs compositions en acides gras, à améliorer l'équilibre global de la part lipidique d'une alimentation. Elles remplissent, comme les corps gras en général, deux rôles principaux (**Combe et Castera, 2010**) ; Elles sont une source d'énergie, une source d'acides gras essentiels et de vitamines liposolubles. (**Legrand, 2010**).

a. Source d'énergie (nutritionnelle):

Ce rôle nutritionnel est lié à leur apport énergétique (puisque un gramme de lipides apporte environ 9 kcal) qui est principalement assuré par les acides gras saturés, mais également par les acides gras insaturés qui génèrent de l'ATP grâce à leur potentiel d'oxydation biologique (béta- oxydation).

b. Source d'acides gras essentiels et de vitamines liposolubles :

Les huiles représentent une source intéressante d'acides linoléiques (C18 : 2 n-6 ou oméga 6) qu'on retrouve dans l'huile d'argan, de tournesol et α -linoléique (C18: 3 n-3 ou oméga 3) dans l'huile de soja ou de colza par exemple.

Ces acides gras poly-insaturés (AGPI), en particulier ceux des séries oméga-3 et oméga-6, sont des composants essentiels de notre alimentation. Une fois absorbés, les AGPI sont incorporés par les cellules de tous les organes. Les AGPI sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme l'agrégation plaquettaire et l'inflammation. Ces huiles sont également la source principale de la vitamine E.

Les glycérides, sous la forme de phospholipides, constituent l'ossature des membranes cellulaires. Les AGPI apportés par les huiles végétales et leurs dérivés métaboliques contribuent à la structure des membranes cellulaires. Les principaux AGPI intervenant sont les acides linoléique (C18:2 n-6) ; arachidonique (C20:4 n-6) et docohexaénoïque (C22:6 n-3) (Lecerf et Vancassel, 2011).

1.2. Composition des huiles végétales fixes :

Les corps gras d'origine végétale sont essentiellement des glycérides (98-99 %), appelées fractions saponifiables. Une fraction quantitativement mineure, appelée fraction insaponifiable, est également présente dans ces corps gras. D'autres composés, n'appartenant pas à ces deux catégories, peuvent y être présents dans de faibles proportions tels que : les phospholipides, les cires, les chlorophylles, les caroténoïdes et les produits d'altération, issus de la dégradation des triglycérides durant le stockage (Figure N°01).

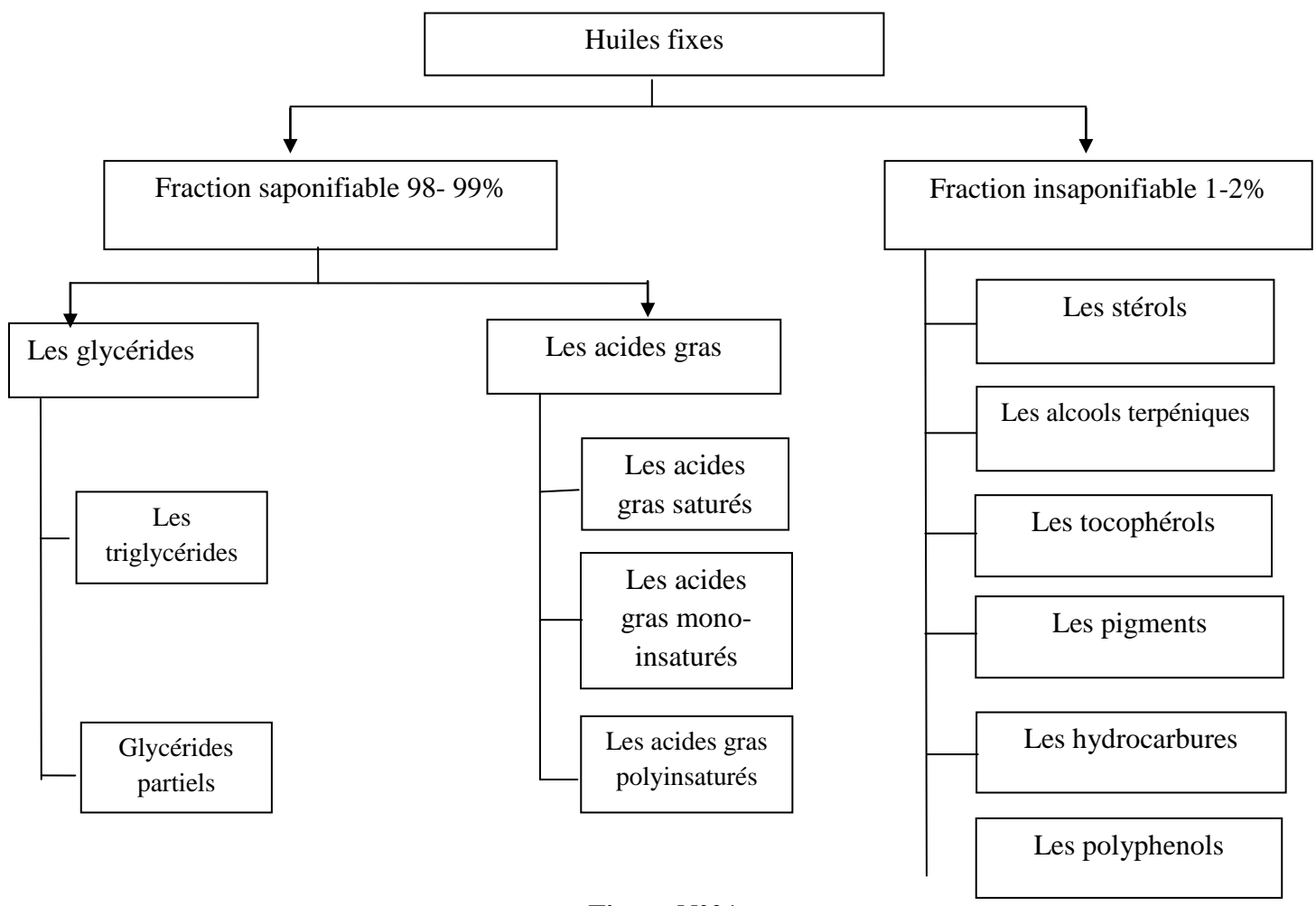


Figure N°01 :
Constituants des huiles végétales fixes (Jahouach, 2002)

1.2.1. La fraction saponifiable :

Cette fraction est formée de deux constituants, les glycérides qui renferment en majeure partie des triglycérides ainsi que des acides gras (**Figure N°02**).

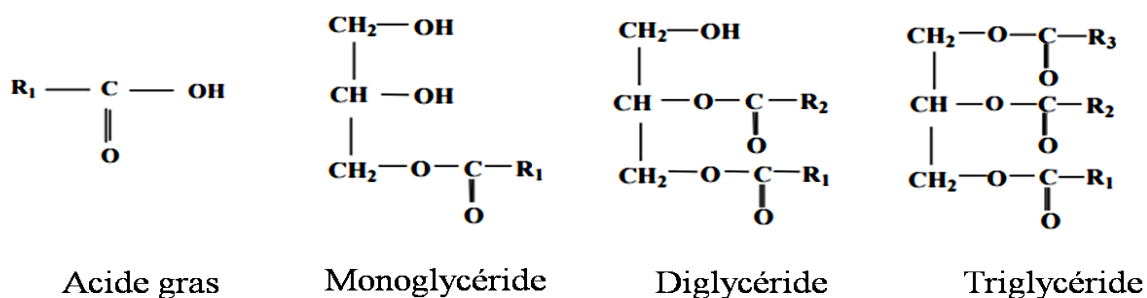
a. Les triglycérides :

Les triglycérides ou acylglycérols sont des esters d'acides gras et de glycérol. Ils sont composés d'une molécule de glycérol dont les trois fonctions alcool sont estérifiées par trois acides gras semblables ou différents. Ce sont les principaux constituants des corps gras (97 à 99 %) (**Ollé, 2002**).

b. Les acides gras :

Les acides gras sont classés en trois groupes :

- Les acides gras saturés (**AGS**), chaînes hydrocarbonées sans insaturation (double liaison), avec principalement des longueurs de chaîne comprises entre 16 (acide palmitique) et 18 atomes de carbone (acide stéarique).
- Les acides gras monoinsaturés (**AGMI**) à chaînes hydrocarbonées comportant une double liaison et dont le principal représentant est l'acide oléique (C18:1, n-9 ou ω9) ;
- Les acides gras polyinsaturés (**AGPI**) à chaînes hydrocarbonées comportant plusieurs doubles liaisons, dont on connaît les deux principaux qui sont les acides linoléique (C18 :2 n - 6 ou ω6) et α-linolénique (C18:3 n-3 ou ω3).



R : chaîne hydrocarbonée

Figure N°02 :

Quelques constituants de la fraction glycéridique.

Les huiles végétales sont principalement des esters d'acides gras et de glycérol, et sont ainsi insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques. Les huiles végétales comestibles contiennent rarement des acides gras à chaînes ramifiées, avec un nombre impair de carbones, ou des acides gras insaturés dont le nombre de carbone est inférieur à seize ou supérieur à vingt atomes de carbone (**Kiritsakis et Christie, 2000**).

1.2.2. La fraction insaponifiable :

Les huiles fixes contiennent aussi des constituants non glycéridiques et des lipides complexes appelés « constituants mineurs ». Généralement, la fraction insaponifiable des huiles contient des molécules de haut poids moléculaire, non volatils, possédant une solubilité faible dans les solvants aqueux.

Les principaux sont des hydrocarbures divers, des composés terpéniques (alcools triterpéniques, 4-méthylstérois, stérois...), des alcools gras, des vitamines liposolubles (vitamines A, D, E), des polyphénols, des pigments et des constituants extrêmement divers (**Wolf, 1968**).

1.3. Usages :

Seul un tiers de la production mondiale des corps gras est destiné à un usage industriel. Les deux tiers de la production sont en effet destinés à l'alimentation. Parmi les multiples usages industriels des corps gras, on peut citer la fabrication des savons et cosmétiques, des acides gras etc.....

Les triglycérides sont également à l'origine de nombreux produits chimiques qui peuvent entrer dans la composition d'une multitude de produits : lubrifiants, produits cosmétiques, produits pharmaceutiques, peintures, etc. (**Ornella et al., 2009**).

1.4. Procédé d'extraction des huiles par Soxhlet :

L'extraction est une opération ancienne utilisée pour retirer des plantes et de certains organes d'animaux, des produits alimentaires, pharmaceutiques ou odoriférants sous formes de breuvages, drogues ou parfums.

L'extraction par l'appareil de Soxhlet est une méthode simple et convenable, nous permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à épuisement complet du soluté dans la matière première, d'où vient son efficacité élevée. L'extracteur de Soxhlet est une pièce de verrerie, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais dans un

tube siphon. Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction et il est porté à ébullition. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant (**Figure N°03**). Au fil des cycles, le solvant s'enrichit en substances extraites jusqu'à épuisement de l'échantillon en substances d'intérêt (**Grigonis, 2007**).

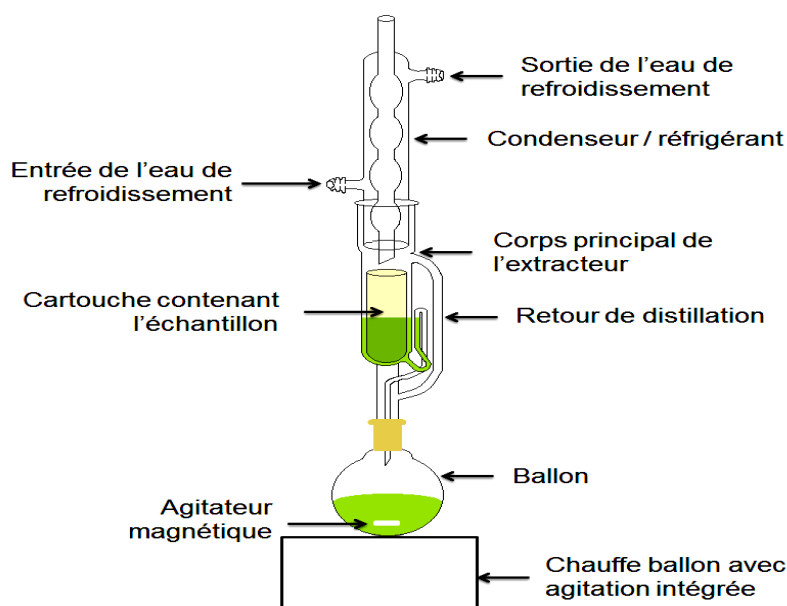


Figure N°03:
Montage de Soxhlet (Grigonis., 2007).

Le Soxhlet est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide. Parmi les avantages du Soxhlet est que l'échantillon entre rapidement en contact avec une portion fraîche de solvant, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. Cette méthode ne nécessite pas de filtration après extraction. Le Soxhlet est indépendant de la matrice végétale. Les inconvénients les plus significatifs de cette méthode, par comparaison avec les autres techniques conventionnelles sont : la durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommée, ce qui conduit non seulement à des pertes économiques mais pose aussi des problèmes sur le plan environnemental. Les échantillons étant portés à haute température pendant une période relativement longue, le risque de thermodestruction de certains composés n'est pas à négliger si la matière végétale contient des composés thermolabiles. Des échauffements locaux sont également possibles (**Grigonis et al., 2005**).

Cette méthode exige un pro traitement pour le mélange obtenu par Soxhlet. En pratique, on utilise un évaporateur rotatif pour séparer les huiles et les solvants.

1.4.1. Propriétés du solvant d'extraction idéal :

Un solvant est, par définition, une substance qui a le pouvoir de former avec d'autres substances une solution homogène (**Gerin 2002**). Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone.

Un solvant d'extraction est choisi en fonction de :

- Ses propriétés physiques tels que: la densité, la viscosité, le point d'ébullition, l'oxygène, sa température d'ébullition qui de préférence sera basse afin de faciliter son élimination et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait, vitesse d'écoulement et de filtration, conditions de distillation et de concentration, pertes par volatilisation, etc... (**Vignerou, 1954**).
- La nature des principes à dissoudre.
- Ses caractéristiques économiques et son prix de revient.

1.5. Conservation et stockage des huiles fixes:

La bonne conservation des huiles fixes nécessite la mise en valeur d'un bon conditionnement de stockage, en raison de leur faible acidité et de leur patrimoine antioxydant et ses qualités organoleptiques. Il est important donc de respecter les règles suivantes :

- a. La température de stockage doit être relativement basse. Il faudra, donc, utiliser des systèmes tendant à éviter les sources de chaleur, mais sans recourir aux systèmes de refroidissement. La température optimale se situe entre 15 et 25°C.
- b. L'absence de radiations, et en particulier de radiations ultraviolettes, qui sont à l'origine de la formation des radicaux qui déclenchent les réactions d'auto-oxydation.
- c. Le matériel des récipients doit être inattaquable ; à cet effet, les meilleurs matériaux sont l'acier inoxydable et le fer iso vitrifié. Les revêtements en matières plastiques sont à déconseiller.
- d. La mise sous emballage des huiles pour assurer leur conservation et leur transfert depuis l'usine de fabrication jusqu'aux consommateurs (**Linden, 1994**). Avec tous ses conditionnements le stockage des huiles végétales restent un poste exigeant de qualité et de propreté pour cela il est préférable de stocker les graines plutôt que l'huile.

2.1. Généralités sur les plantes médicinales :

Une plante est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et qu'elle présente des propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (Moreau, 2003). Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Leur action provient de leur composition chimique (métabolites primaires ou secondaires) ou des synergies entre les différents composés présents dans la plante (Sanago, 2006).

Une plante médicinale est utilisée si elle obéit à plusieurs critères tels que la présence ou pas de phénomène de toxicité, son utilisation pour une indication donnée dans plusieurs pays et la posologie précise (Colette, 2014).

2.1.1. Intérêt de l'étude des plantes médicinales :

La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir, à un niveau ou un autre, sur l'organisme humain et animal. Elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (Iserin, 2001). La raison fondamentale est que les principes actifs des végétaux proviennent de processus biotiques répandus dans tout le monde vivant, alors que les médicaments de synthèse sont des xénobiotiques aux effets secondaires très mal maîtrisés (Bruneton, 2009). Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, agissant directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme modèle pour les composés pharmaceutiquement actifs (Decaux, 2002).

2.1.2. Les plantes médicinales en Algérie :

Avec une superficie de 2 381 741 km², l'Algérie est le plus grand pays riverain de la Méditerranée. Il est reconnu par sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques.

La richesse de la flore algérienne est donc incontestable. Elle recèle un grand nombre d'espèces classées en fonction de leur degré de rareté : 289 espèces assez rares, 647 espèces rares, 640 espèces très rares, 35 espèces rarissimes et 168 espèces endémiques (FAO, 2012). A cet effet, et dans le cadre de la valorisation de la flore Algérienne en général, on s'est intéressé à l'étude des espèces suivantes : *Lawsonia inermis*, *Nigella sativa*, *Ricinus communis* et *Foeniculum vulgare*, qui ont été choisies en fonction de leur emploi très fréquent en Algérie.

2.2. *Lawsonia inermis* :

2.2.1. Etude botanique :

Le Henné (*Lawsonia inermis* L.) est un arbuste herbacé dicotylédone très ramifié (de 2 à 6 m de hauteur). (Figure N°04).

- **Les feuilles** sont petites, opposées en branches, d'environ 1,5 à 5 cm de long et 0,5 à 2cm de large, de couleur brun verdâtre à vert terne. L'écorce est brun-grisâtre. L'inflorescence est une grande pyramide en forme de cyme.
- **Les fleurs** sont petites, d'environ 1cm de diamètre, nombreuses, parfumées, de couleur blanches ou roses avec quatre pétales effilochés.
- **Le fruit** est une petite capsule ronde de couleur brune. Il s'ouvre irrégulièrement et se divise en quatre sections à maturité et comporte beaucoup de semences.
- **Les graines** mesurent environ 3mm de diamètre. Elles sont nombreuses, lisses, pyramidales, dures et épaisses avec une coloration brunâtre [(Vasudevan et Laddha, 2003) ;(Abdelbasset, 2004) ; (Chauhan et Pillai, 2007)].

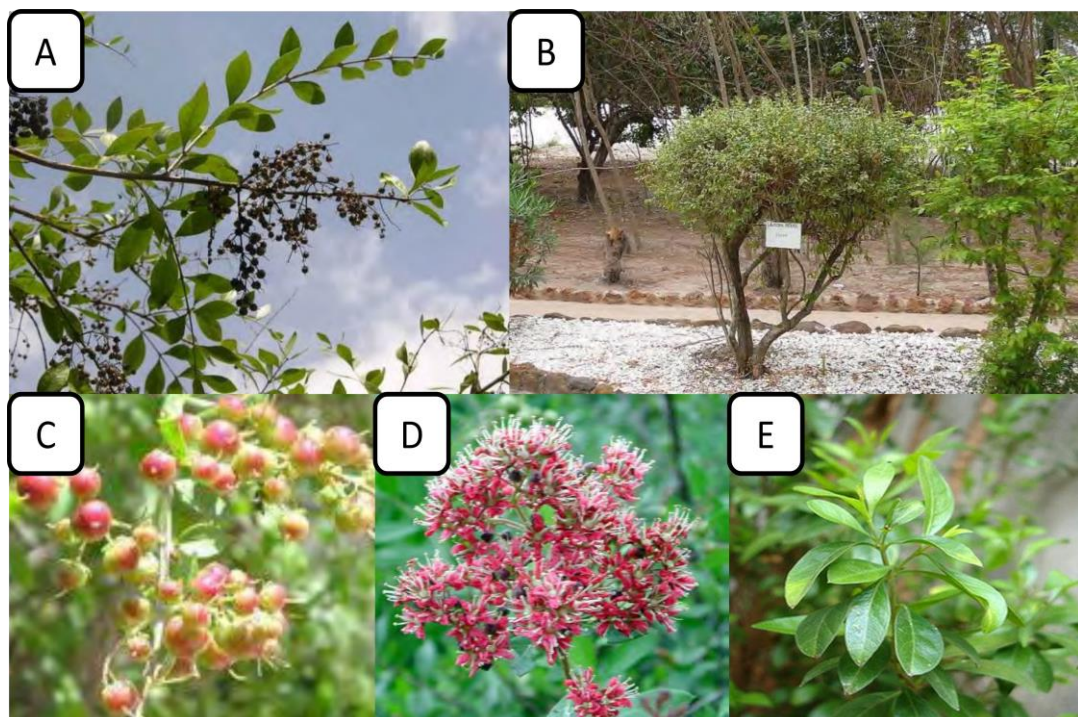


Figure N°04 :

Description botanique de *Lawsonia inermis*.

(A : Partie aérienne avec fruit, B : Arbuste, C : Fruits, D : Fleurs, E : Feuilles).

2.2.2. Étude systématique :

L. inermis est la plante la plus connue de la famille des Lythracées. Cette famille est connue pour sa possession d'un potentiel colorant important. En botanique, la plante *L. inermis* est classée comme suit (d'après Wong et Theng 1995):

Embranchement	: Spermaphytes
Classe	: Magnoliopsida
Sous-classe	: Magnoliidae
Ordre	: Myrtales
Famille	: Lythraceae: qui se compose d'environ 500 espèces
Genre	: <i>Lawsonia</i>
Espèce	: <i>inermis</i> L
Nom commun	: Henna : dans tout le maghreb : Henné : France

2.2.3. Distribution et habitat :

2.2.3.1. Distribution :

Le Henné est distribué dans toutes les régions tropicales et subtropicales [(Orwa et al., 2009) ; (Prota, 2017)]. Au cours de l'apparition de précipitations hivernales, la plante se développe rapidement, émet de nouvelles pousses, puis la croissance ralentit (Musa et Gasmelseed 2012). La poudre de ses feuilles, dite également Henné, a été largement diffusée en Europe depuis 1890 (El Babili et al., 2013). Actuellement, elle est fait l'objet d'un commerce intense entre l'Afrique du nord, le sous-continent indien et l'Europe (Botineau 2010). Le Henné est cultivé comme plante ornementale et colorante. Il est utilisé pour colorer les mains, les doigts, les ongles et les cheveux et joue un rôle naturel thérapeutique.

2.2.3.2. Habitat :

L. inermis est bien adapté à un large éventail de conditions environnementales. Il pousse dans les habitats secs et semi-arides, [(Orwa et al., 2009) ; (Prota, 2017)].

En Afrique, il s'est souvent naturalisé, en particulier sur les sols alluviaux situés le long des rivières et dans les zones proches des villages (Prota, 2017).

2.2.4. Utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle:

Les différents extraits issus des feuilles, des tiges et des racines de cette plante sont connus pour leurs nombreuses applications en médecine traditionnelle (**Aluka, 2008**). Ses feuilles sont depuis longtemps utilisées pour traiter les cicatrices jaunes, de l'amibiase. La feuille réduite en poudre a des effets antimicrobiens, antifongiques, bactériostatique (**Khorrami 1979**). La poudre de ses feuilles humectées d'eau forme une pâte réputée astringente pour la peau et cicatrisante pour les blessures. Elle est aussi utilisée, sur les cheveux, contre les infestations de poux et en infusion contre les ulcères et certaines diarrhées.

2.2.5. Constitution chimique et données pharmacologiques :**2.2.5.1. Constitution chimique :**

Les composants responsables des propriétés colorantes dans la plante *L.inermis* appartiennent à la famille des quinones (**Nayak et al., 2007**). Les principaux composants sont de type 1 ,4-naphtoquinone, appelé couramment la Lawsone (**Wichtl, 1999**).

a- Les feuilles contiennent :

- 7 à 8 % de tanins, refermant des flavonoïdes.
- 6 % de lipides.
- 2 % de résines et de pigments flavoniques et 1 % de pigment Naphtoquinonique.

b- Les graines contiennent :

5.8% d'une huile fixe composée d'acide arachidonique, d'acides, stéarique, palmitique, oléique et linoléique en plus d'une huile essentielle composée d'ionone principalement (**Sarita 1991**).

c- Les fleurs:

La fleur de la plante s'est avérée contenir certains métabolites secondaires tels que le (Z)-2-hexenol, linalol et la 13- ionone et ses dérivés [(**Wong et Teng, 1995**) ; (**Oyedeji et al., 2005**)].

2.2.5.2. Données Pharmacologiques :

En médecine populaire, on attribue au Henné de nombreuses propriétés : diurétique, astringent dans les ulcères gastro-intestinaux et dans le traitement de la diarrhée amibienne (**Vanhellement 1986**). En Algérie des travaux publiés par **Hamdi Pacha et Benazzouz M. (1998)** ont mis en évidence un effet probable de *Lawsonia inermis* comme cicatrisant sur les brûlures du 3ème degré chez le lapin.

2.3. *Nigella sativa* :

2.3.1. Etude botanique :

N. sativa est une plante annuelle herbacée, à tige dressée, anguleuse et rameuse atteignant 30 à 60 cm de haut. Les feuilles sont divisées en lobes étroits, allongées, souvent un peu élargies à leur sommet. Elles sont multifides. Les feuilles inférieures sont pétiolées et les supérieures sessiles (Orsi – Ilinares, 2005). Les fleurs sont petites, solitaires, terminales et très riches en nectar, à pétales blanchâtres et sépales pétaloïdes. Ses fruits sont des capsules formées de follicules soudés, s'ouvrant au sommet par une fente interne (Bonnier, 1990). Tandis que les graines sont de couleur noirâtre, avec un tégument assez dure ornémenté de stries. La graine faisant en moyenne 2 à 3 mm dans le sens de la longueur, a une base large puis se rétrécit en forme triangulaire anguleuse. En l'écrasant entre les doigts, elle dégage une odeur de camphre (Figure N°05) (Orsi – Ilinares, 2005).

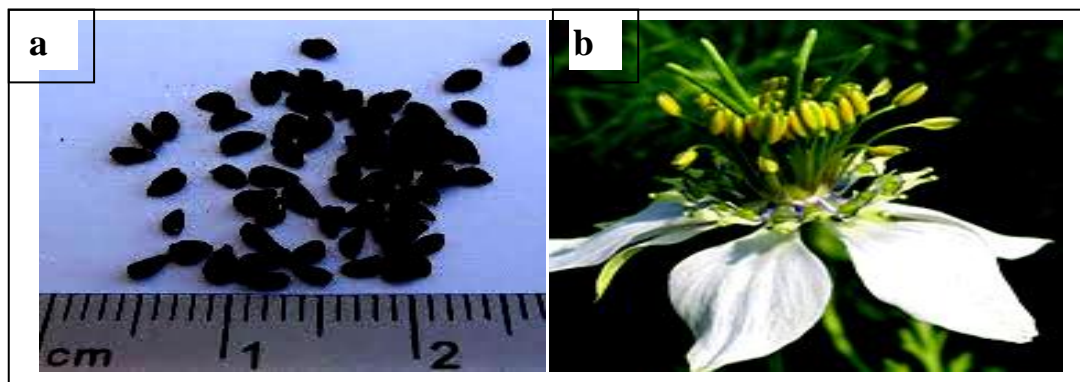


Figure N°05 :

Description botanique de *Nigella sativa* (a : les graines ; b : la fleur)

2.3.2. Classification botanique :

Nigella sativa est appelée aussi *N. cretica* ou *N. indica* (Kokoska, 2011). Elle possède plusieurs appellations vernaculaires, dont celles indiquées dans le tableau ci-dessous :

Règne	: Végétal
Classe	: Dicotylédones
Sous-classe	: Magnoliidae
Ordre	: Ranunculales
Famille	: Ranunculaceae
Genre	: <i>Nigella</i>
Espèce	: <i>Nigella sativa</i>
Noms communs :	Arabe: Habbet-el baraka, habba-tu sawda, Kamun-aswad, Français : Cumin noir, nigelle cultivée, toute-épice

2.3.3. Distribution et habitat :

Nigella sativa est retrouvée dans la Méditerranée est au nord de l'Inde. Elle est couramment cultivée en Égypte, au Moyen-Orient (Arabie saoudite, en particulier), en Turquie, en Sri Lanka, au Kenya, au Soudan, en Afghanistan, en Europe et dans beaucoup plus d'endroits.

2.3.4. Composition chimique des graines de *Nigella sativa* :

En raison de leur large domaine d'usage médicinal, les graines de *Nigella sativa* ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques intensives dans le but d'identifier ses principes actifs. Ces études ont révélé que ces graines sont très riches en plusieurs constituants tant de métabolites secondaires que primaires, dont la teneur varie selon les conditions géographiques et climatiques, ainsi que les méthodes d'études (extraction et détection).

- **L'huile fixe** : Les graines sont très riches en huiles fixes qui représentent 37,9 à 39,2% du poids de la graine. Elle est constituée principalement de lipides neutres (96,1%-97,2%), de lipides polaires (3%) et de phospholipides (0,32-1,05%) (**Ramadan et Mörsel, 2002a**).
- **L'huile essentielle** : qui représente entre 1,4 à 1,9% du poids de l'huile fixe et 0,18 à 0,50% du poids des graines (**Benkaci-Ali et al., 2006**).
- **Les saponines triterpènes**: Dans une étude réalisée par **Kumara et Huat (2001)**, il a été possible d'isoler et de caractériser à partir des graines de *Nigella sativa* une saponoside triterpénique douée de propriétés antitumorales appelée l' α -hederine.
- **Les flavonoïdes** : Trois flavonoïdes triglycosylés ont été isolés à partir des graines de *Nigella sativa* (**Merfort et al., 1997**) :
 - La quercétine 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside.
 - La Kæmpférol 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside.
 - La quercétine 3- (6-feruloglucosyl) (1→2) galactosyl (1→2) glucoside.
- **Les vitamines et les sels minéraux** : La composition en vitamines a été déterminée et a révélée la présence des vitamines B₁, B₂, B₆, PP et de l'acide folique (**Nergiz et Ötles, 1993**). **Ramadan et Mörsel en 2002**, ont analysé les vitamines liposolubles de *Nigella sativa* et ont pu identifier toutes les classes des tocophérols dans l'huile. Les tocophérols totaux constituent 0,05% de l'huile, et sont constitués majoritairement de l' α - tocophérol (48%) et du γ -tocophérol (28%).

2.3.5. Effets thérapeutiques de la plante :

Les applications thérapeutiques traditionnelles très vastes de la Nigelle ont poussé de nombreux chercheurs à étudier les activités pharmacologiques des différents extraits de la graine de Nigelle sur divers systèmes *in vitro* et *in vivo*, afin de confirmer ses propriétés thérapeutiques.

a- Effets sur le système immunitaire :

Les graines de *N. sativa* présentent *in vitro* des propriétés immunes potentialisatrices des lymphocytes T humains, qui activent la sécrétion d'IL-3 et augmente la production d'IL-1 α par les lymphocytes T, ce qui indique un effet stimulateur sur les macrophages [(Haqet *al.*, 1995) ; (Meziti, 2009)]. D'autre part, la Nigelle est traditionnellement utilisée dans le traitement des maladies allergiques, comme l'inhibition de la libération d'histamine des mastocytes et l'inhibition de la protéine kinase C (Meziti, 2009).

b- Effets anticancéreux et antimutagène :

L'activité anti-tumorale des extraits ou de composés isolés de *Nigella sativa* a été testée par plusieurs auteurs. Cette plante présente une importante action cytotoxique sur le carcinome ascitique d'Ehrlich et sur le lymphome ascitique de Dalton tout en exerçant une cytotoxicité minimale vis-à-vis des lymphocytes normaux [(Musa *et al.*, 2004) ; (Ghedira, 2006)].

L'extrait décocté des graines de Nigelle exerce une forte activité cytotoxique sur les cellules hépatiques cancéreuses, notamment sur la synthèse d'ADN (Thabrew *et al.*, 2005).

c- Effets anti-inflammatoire et analgésique :

Plusieurs auteurs ont étudié l'éventuelle activité analgésique et anti-inflammatoire d'extraits ou de composés purs issus de *Nigella sativa*. Khanna *et ses collaborateurs en 1993*, ont montré que l'huile fixe de *Nigella sativa* possède une importante action anti-nociceptive qui est due à la présence d'un principe opioïde. Cette action est antagonisée par la naloxone [(Abdel-Fattahet *al.*, 2000) ; (Ali et Blunden, 2003)].

2.4. *Ricinus communis* L :

2.4.1. Etude botanique :

Le Ricin est un arbuste à rameaux ultime herbacés ou arbre, pouvant atteindre 7 m et plus. Son feuillage est d'une beauté remarquable, parfois cultivé comme plante annuelle très vigoureuse, mais naturellement vivace (Mario et Espirito, 2007). L'arbuste possède les parties suivantes :

- **Les feuilles** sont alternes et portées par de longs pétioles cylindriques et creux de 10 à 30cm. Le pétiole est fixé à la partie principale de la feuille. Elles sont palmées, composées de six à onze lobes ovales aigus à marge dentée, vert des deux côtés et divisées par des nervures rouge laque. Ecrasées, les feuilles dégagent une odeur nauséabonde.
- **Les fleurs** unisexuées sont réunies sur le même pied. Elles forment des grappes pyramidales. Les fleurs femelles occupant le sommet et les mâles formant des houpes jaunâtres à la base.
- **Les fruits** sont des capsules pendantes à trois côtés saillants arrondis et chargés d'épines de 1.5 à 2.5cm de diamètre.
- **La graine** est luisante, marbrée de rouge ou de brun, de 8 à 15 mm de long de 5 à 7mm de large. Elle présente une ligne saillante sur la face ventrale. Elle contient entre 40 et 60 % d'huile riche en triglycérides, principalement la ricinoléin (**Figure N°06**).

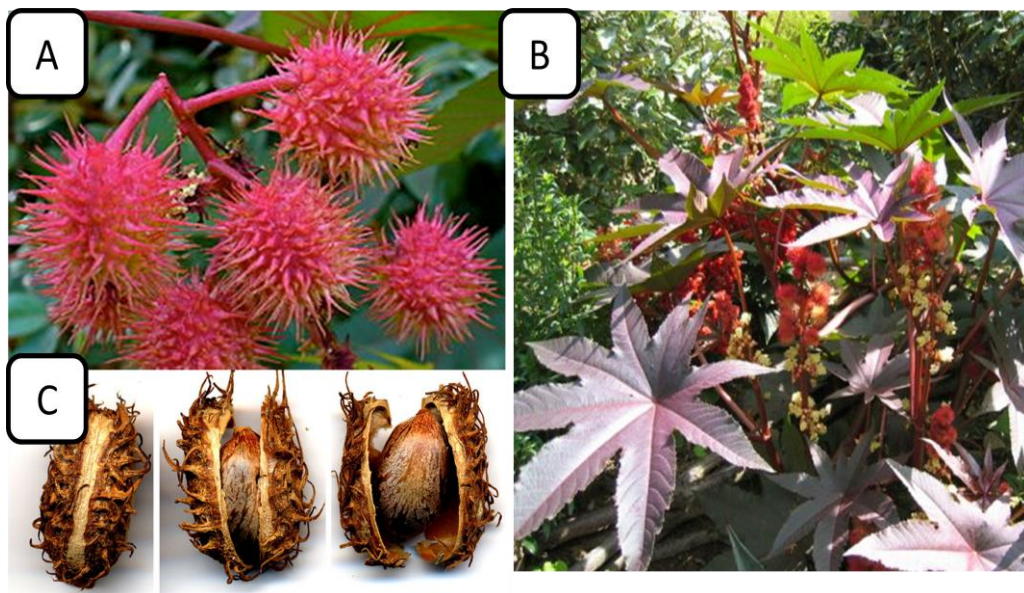


Figure N°06 :

Représentation botanique de *Ricinus communis*.

(A : Les fruits épineux rouges de la plante à ricin, B : les feuilles, C : les graines).

2.4.2. Classification :

Selon Linné (1753), *Ricinus communis* L, appelé également kharouâa en arabe, Ricin en français et Castor Bean en anglais appartient au :

Ordre	:Malpighiales
Famille	:Euphorbiaceae - Euphorbiacées
Sous-famille	:Acalyphoideae.
Tribu	:Acalypheae
Sous-tribu	:Ricininae
Genre	: <i>Ricinus</i>
Espèce	: <i>Ricinus communis</i> .
Noms communs	<u>Arabe</u> : <i>Kharouaa</i> <u>Français</u> : <i>Ricin</i>

2.4.3. Habitat et distribution :

Le Ricin est originaire du nord-est africain et du moyen-orient. Il est cultivé en tant que plante ornementale dans diverses régions de l'Asie, de l'Amérique du Nord, de l'Afrique et de l'Europe (Aslania et al., 2007). Cette plante est présente dans tout le continent africain, de la cote atlantique à la mer rouge et de la Tunisie à l'Afrique du Sud ainsi que dans les îles de l'océan Indien (Maroyi, 2007). Plus de 95% de la culture de *Ricinus* dans le monde est concentrée en Inde, en Chine et en Brésil (Sailaja et al., 2008). Il se naturalise facilement et pousse dans de nombreux endroits comme plante rudérale adaptée aux contraintes des milieux parfois hostiles aux autres végétaux (Polvèche, 1996)

2.4.4. Composition chimique :

Plusieurs études phytochimiques ont été réalisées pour identifier les différents composés chimiques chez le ricin. Ces analyses ont montré que :

- **Les graines** : contiennent 50% d'huile (Anoskie et Chibogwuk., 1981). Cette huile est sous forme d'un liquide visqueux et pale.
- **Les protéines** : dans les graines de ricin mures, constituent 90-95% de toutes les protéines trouvées dans les graines. Les fractions solubles résiduelles de protéine sont des pectines et des albumines (Harley et Beevers, 1986).

- **Les glycoprotéines** : du Ricin sont sous forme de poudre blanche à l'état pure et hydrosoluble. Ils sont inactifs à la température de 80°C dans un temps de 10 min (**Garland et Bailey, 2006**). La totalité de la plante semble toxique en raison de la présence d'une lectine glycoprotéique (**Garland et Bailey, 2006**).

2.4.5. Propriété pharmacologique :

Le Ricin est une plante médicinale qui est traditionnellement utilisée dans le traitement de nombreuses maladies (**Tableau N°01**).

Tableau N°01: Propriétés pharmacologiques du *R. communis*

Parties utilisées	Effet thérapeutique
Feuilles	Recommandées contre l'inflammation et les affections du foie (effet hépatoprotecteur) (Omeh et Ejiofor, 2014), laxatifs et diurétiques (Preeti et Verma, 2014).
Racines	Pour les maladies nerveuses et les affections rhumatismales. Les racines sont utiles dans le traitement du diabète "effet hypoglycémiant" [(Poonam et al, 2008) ; (Rao et al., 2010)] et présentent un effet antibactérien (Sharma et al., 2013).
Graines	Elle ont un effet cathartique et sont utilisées pour le traitement de la lèpre et de la syphilis. Certaines femmes en Inde et en Corée utilisent les graines de ricin, comme moyens contraceptifs (Preeti et Verma, 2014).
Huile de ricin	L'huile extrait des graines est utilisée contre la constipation et comme fongicide en usage externe. Elle est utilisée dans l'industrie cosmétique et constitue un excellent produit pour les cheveux, les ongles, les cilles et les taches de rousseur [(Jalal, 2000) ; (Etchiké et al., 2011)].

2.5. *Foeniculum vulgare* Miller

2.5.1. Etude botanique :

Foeniculum vulgare, généralement connu sous le nom de Fenouil, est un petit genre des herbes annuelles, bisannuelles ou éternelles (**Figure N°07**) (**Gulfrazet al. 2008**).

- **La tige** : est robuste et lisse, pouvant atteindre 2m de haut cylindrique et rameuse. Elle porte des feuilles alternes pétiolées à la base (**Wichtl& Anton, 2003**)(**Teuscheret al., 2005**).
- **Les feuilles** : sont supérieures et sessiles, découpées en lanières filiformes et très allongées, d'où un aspect aérien et plumeux (**Teuscheret al., 2005**).
- **Les fleurs** : sont régulières, radiales, à 5 sépales formant un bourrelet, 5 pétales jaune verdâtre tronquées et roulées vers l'intérieur, 5 étamines, 2 styles courts, un ovaire divisé en 2 loges (**Teuscheret al., 2005**).
- **Le fruit** : est une graine sèche de 4-10 mm. Le fruit vert jaunâtre, est fermé de cinq cotes [(**Debuigne&Couplan., 2009**) ; (**Ratheret al., 2012**)].

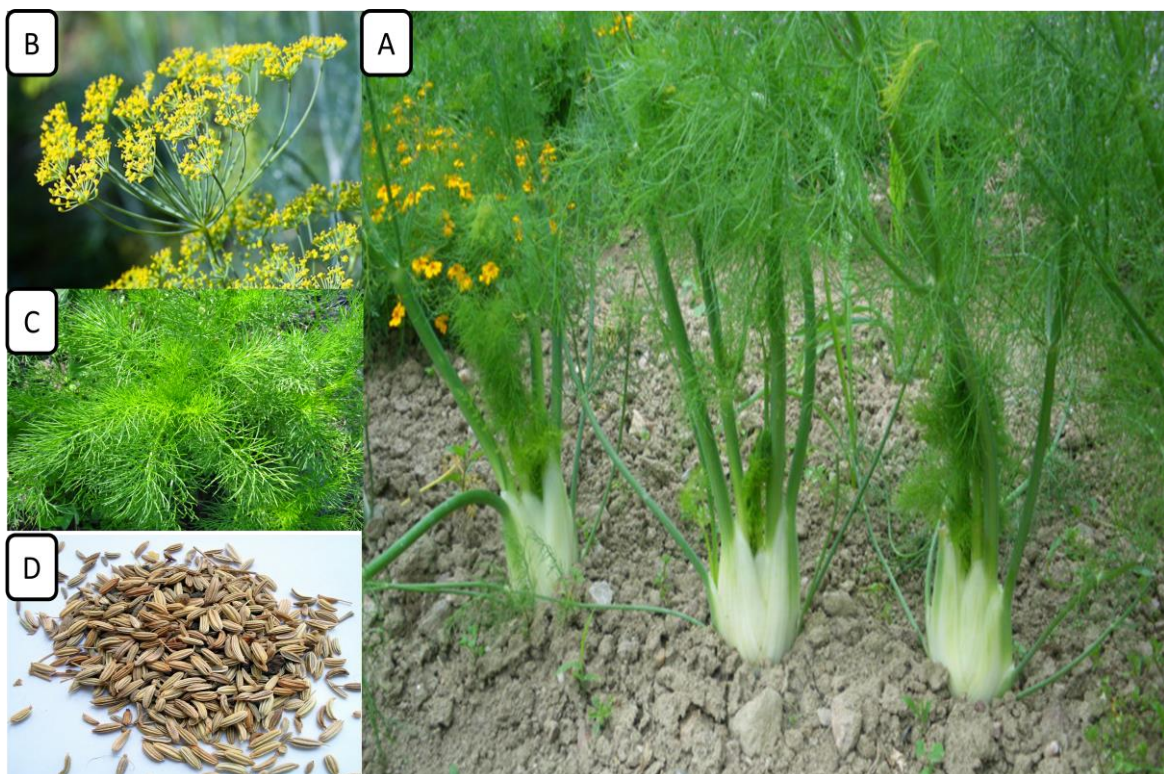


Figure N°07: Description botanique de *Fenouil vulgaire*

(A : Partie aérienne avec fruit B : Les fleurs, C : Les feuilles, D : Les graines).

2.5.2. Classification :

Selon Muckensturm et al., (1997), *Foeniculum vulgare miller*, populairement connu comme plante de Fenouil ou appelée également Besbes par la population locale appartient au :

Règne :	Plantae
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Apiales
Famille :	Apiaceae
Genre :	<i>Foeniculum</i>
Espèce :	<i>vulgare</i>

2.5.3. Habitat et répartition géographique :

Le Fenouil est originaire de la région méditerranéenne. Il est généralement considéré comme indigène sur les rives de la mer méditerranée mais est devenu largement naturalisée dans de nombreuses parties du monde, en particulier sur les sols secs, près de la côte de la mer et sur les berges de la rivière. Il est cultivé dans la Russie, l'Inde, la Chine et le Japon (Zoubiri et al., 2014).

2.5.4. Composition chimique du fenouil :

F. vulgare contient 6,3% d'humidité, 9,5% de protéines, 10% de matières grasses, 13,4% de minéraux et de fibres et 18,5% à 42,3% de glucides. Les minéraux et les vitamines présentes dans cette plante sont le calcium, le potassium, le sodium, le fer, le phosphore, la thiamine, la riboflavine, la niacine et la vitamine C. Le fruit de cette plante renferme des huiles essentielles dont les principaux composants sont transanethole, estragol, fenchone, et α phellandrène (Senatore et al., 2013). Il renferme également de l'alcool anisique, de l'anisaldéhyde ainsi que des monoterpènes (1 à 5%): (R)-limonène , α -pinène camphre , p-cymène ,myrcène , α - et β -phellandrènes , sabinène , γ -terpinène, cis- β -ocymène et terpinolène (Paloma, 2012).

2.5.5. Utilisation thérapeutique du Fenouil :

Foeniculum vulgare est une importante et bien connue plante médicinale et aromatique avec effet carminative, digestive, galactogène et diurétique, indiquée dans le traitement des troubles respiratoires et gastro-intestinale (**Rather et al., 1997**).

- **Usage traditionnelle :**

Foeniculum vulgare a été largement utilisé dans la médecine traditionnelle pour le traitement d'un certain nombre de maladies comme les douleurs abdominales, l'arthrite, le cancer, la fièvre, la flatulence, les gastralgies, la gastrite, les douleurs du foie, et les maux d'estomac (**Shamkant et al., 2014**).

- **Utilisation en pharmacologie**

Foeniculum vulgare présente différentes activités pharmacologiques mentionnées dans la médecine traditionnelle iranienne et dans la phytothérapie moderne tels qu'un antioxydant, cytotoxiques, anti-inflammatoire, antimicrobien, bronchodilatateur, ostrogénique, diurétique, galactagogue, hypotenseur, gastro protecteur, hépato protecteur, améliorant la mémoire, et les activités antimutagènes (**Rahimi et al., 2013**).

3.1. Généralités sur les antibiotiques :

3.1.1. Définition :

Un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle ou synthétique d'origine microbienne ou synthétisée chimiquement, capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres micro-organismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe [(Gogny *et al.*, 2001) ; (Morin *et al.*, 2005)]. Pour qu'il soit actif, un antibiotique doit pénétrer dans la bactérie, sans être détruit ni être modifié, et de se fixer sur une cible en perturbant la physiologie bactérienne (Ogawara, 1981).

3.1.2. Mode d'action des antibiotiques :

A la différence des antiseptiques et des désinfectants, les antibiotiques agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne (**Figure N°08**). Cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à très faible concentration. Cette action s'exerce selon les molécules sur des sites variés [(Mevius *et al.*, 1999) ; (Oxoby, 2002)].

Certain antibiotiques attaquent le peptidoglycane de la paroi bactérienne ce qui cause une déstabilisation de la bactérie et entraîne sa mort. Il s'agit de l'action bactéricide autrement dit une lyse bactérienne (Zeba, 2005). D'autres agissent sur le système protéique de la bactérie : en se fixant sur la sous unité 50s du ribosome bactérien entraînant une inhibition de la synthèse protéique. La bactérie ne meurt pas mais ne peut plus se développer ni se multiplier, on parle de bactériostatisme (Hermann, 2005). L'antibiotique est capable aussi d'inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), de la membrane cellulaire en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur (Flandrois *et al.*, 1997).

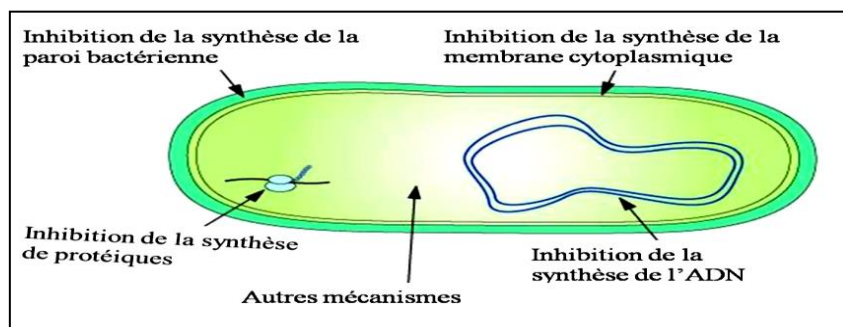


Figure N°08 :

Mode d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006).

3.1.3. Classification des antibiotiques:

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique [(Newman et al., 2003) ; (Singh et Barrett, 2006)]. Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de microorganismes. Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification *in vitro* de substances produites par des micro-organismes.

Il existe trois classes d'antibiotiques synthétiques :

- **Les sulfamides**, qui sont aussi les premiers antibiotiques à avoir été utilisés cliniquement (Laub, 1986).
- **Les quinolones (ou fluoroquinolones)**: dont la découverte a été lors de la synthèse de la chloroquine, un antipaludéen en 1962 (Singh et Barrett, 2006).
- **Les oxazolidinones** : découverts en 1979, ceux-ci a conduit au développement et à la commercialisation du linézolide en 1999. Avec les lipopeptides cycliques (daptomycine), les oxazolidinones constituent l'une des rares classes d'antibiotiques mise sur le marché au cours de ces dix dernières années.

3.1.4. Résistance aux antibiotiques:

La résistance aux antibiotiques s'est principalement développée durant les 50 dernières années par l'utilisation répandue et fréquente des antibiotiques favorisant une pression de sélection (Matyara et al., 2008). Plusieurs mécanismes de résistance ont été mis en évidence chez les bacilles Gram négatif qui sont, par ailleurs, responsables de la majorité des infections hospitalières (60 %) et sont de plus en plus multirésistantes (Bolla et al., 2011).

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique donné, quand elle est capable de se développer en présence d'une concentration en antibiotique significativement plus élevée que celle habituellement active sur les souches de cette espèce (Leclerc et al., 1995).

3.2. Antibiogramme et concentration minimale inhibitrice:

L'antibiogramme regroupe différentes techniques permettant de déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Son principe repose sur la mise en contact *in vitro* de la bactérie à tester avec

l'antibiotique et sur l'observation des conséquences sur la croissance et la survie bactérienne (Poumarat et Martel, 1989).

En fonction de la méthode utilisée, deux types de valeur sont recherchés:

➤ **la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI):** qui correspond à la plus petite concentration d'antibiotique inhibant toute croissance visible de la bactérie à 24H pour les bactéries à multiplication rapide (absence de l'augmentation du nombre de bactéries).

➤ **le diamètre de la zone d'inhibition :** Afin de catégoriser cliniquement la sensibilité de la souche à un antibiotique, c'est-à-dire de prédire le succès ou l'échec clinique du traitement antibiotique, les CMI ou les diamètres d'inhibition sont comparés à des valeurs critiques (concentrations critiques ou diamètres critiques) définis par les comités d'experts nationaux ou internationaux tels que le NCCLS ou l'EUCAST (**Figure N°09**). La souche est catégorisée:

- **sensible** si sa CMI est inférieur ou égale à la concentration critique inférieure (c), ce qui équivaut à un diamètre supérieur ou égal au diamètre critique supérieur (D).
- **résistante** si sa CMI est supérieur à la concentration critique supérieure (C), ce qui équivaut à un diamètre inférieur ou égal au diamètre critique inférieur (d).
- **intermédiaire** si sa CMI est comprise entre c et C, ce qui équivaut à un diamètre compris entre d et D.



Figure N°09 :

Schéma de la catégorisation clinique en fonction des CMI et des diamètres d'inhibitions.

c : concentration critique inférieure, **C** : concentration critique supérieure,
d : diamètre critique inférieur, **D** : diamètre critique supérieur

3.3. Place des plantes dans la lutte contre la résistance :

Ces dernières années, il y a eu un grand intérêt pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, due à une augmentation alarmante du taux des infections due aux microorganismes résistant aux antibiotiques. Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives est le criblage systématique des micro-organismes ou des plantes, qui sont des sources de beaucoup d'agents thérapeutiques utiles. En particulier, l'activité antimicrobienne des huiles et des extraits de plantes ont formé la base de beaucoup d'applications, y compris, pharmaceutiques, médicales et agro-alimentaires.

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Un grand nombre de plantes, aromatiques, des plantes épices et autres, possèdent des propriétés biologiques très importantes, qui trouvent des applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture (Bahorun, 1997).

A partir des oses et des métabolites primaires, la plante synthétise une grande variété de métabolites dits secondaires, plus complexes. Aujourd'hui, plusieurs de ces phytomolécules ont déjà été décrites mais un grand nombre reste encore mal connu et non caractérisé. Ces composés constituent les principes actifs des plantes médicinales exploités dans la médecine traditionnelle.

3.4. Description des bactéries étudiées:

3.4.1. Bactéries à Gram positif :

Les bactéries qui retiennent le cristal violet dans le procédé de coloration de Gram sont appelées bactéries Gram positives. En taxinomie bactériologique, se sont des bactéries enveloppées d'une membrane plasmique, doublée d'une épaisse paroi de peptidoglycane et dépourvues d'une membrane externe. On peut citer :

- ***Staphylococcus aureus***: Cette bactérie est une cocci à Gram positif ubiquitaire qui est commensal de l'homme et se révèle être pathogène opportuniste dans certains cas. *S.aureus* est aussi responsable d'infections nosocomiales, d'intoxications alimentaires et sa résistance aux antibiotiques cause parfois un grand problème pour le traitement des patients.

- ***Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline « mrsa »:** C'est une bactérie multirésistante aux antibiotiques, fréquemment en cause dans les infections nosocomiales (IN). Elle est également responsable de graves infections systémiques telles que des septicémies (empoisonnement du sang), des pneumonies (infection des poumons)... (Wagenvoort *et al*;1997).

3.4.2. Bactéries à Gram négatif :

Ce type de bactéries ne retient pas le violet de gentiane dans le procédé de coloration de Gram. Elles sont enveloppées d'une membrane plasmique, d'une mince paroi de peptidoglycane, et d'une membrane externe. On retrouve :

- ***Escherichia coli*:** qui est une Bacille aérobie et Gram négatif que l'on trouve couramment dans le tube digestif de l'être humain et des animaux à sang chaud. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien des méningites néo-natales (Patrick *et al*, 1988).
- ***Pseudomonas aeruginosa*:** est une bactérie bacille aérobie, Gram négatif et très mobile grâce à un flagelle polaire. Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le premier rang dans les infections pulmonaires et le troisième rang dans les infections urinaires (Richard et Kiredjian, 1995).

3.5. Caractéristiques de la souche fongique *Candida albicans*:

Les champignons ou « mycètes » ou « fungi » sont des organismes eucaryotes qui n'ont pas d'organisation tissulaire et dont la masse cytoplasmique est enfermée dans une structure pariétale rigide qui constitue le thalle ou mycélium.

Le genre *Candida* compte les levures pathogènes les plus fréquentes. Elles provoquent des affections cosmopolites atteignant la peau, les ongles, les cavités naturelles et les divers viscères par hémato-dissémination (Bouchet *et al.*, 2005).

Ce sont des champignons, le plus souvent arrondies, globuleux et à bourgeonnement multiple. Ils ont une surface cireuse avec une couleur blanc-cassée à crème. *Candida albicans* se trouve dans les cavités naturelles de certains animaux et de l'homme. En pathologie cette levure est la cause, de 70 à 80 % des cas de candidoses humaines (Bouchet *et al.* 2005).



Matériel et méthodes

1. Matériel végétal :

1.1. *Lawsonia inermis L:*

Le matériel végétal est constitué par les feuilles de *Lawsonia inermis*, récolté dans la Wilaya d'Adrar, située dans le sud-ouest d'Algérie. Les feuilles sont débarrassées du sable collé. Après, le matériel végétal est séché à l'ombre et à température ambiante (**Figure 10A**). Après séchage, les feuilles sont conservées dans des bocaux hermétiques, à sec et à l'abri de l'humidité.

1.2. *Nigella sativa L :*

L'étude a porté sur les huiles fixes des graines de *Nigella sativa L*. Ces graines récoltées de la région de Tlemcen, sont de couleur noire très brillante de $5\pm 0,2$ mm de taille. Elle possède une forme ovoïde aplanie et lisse (**Figure 10B**). Les graines ont été soigneusement nettoyées, concassées et conservées à l'abri de la lumière.

1.3. *Ricinus communis L:*

Le matériel végétal est constitué par des graines. Ces graines de *Ricinus communis L* sont récoltées au mois de Juillet- Août, période de maturation des graines, dans de la région de Béni Aziz située au Nord Est à 70 Km de la Wilaya de Sétif (**Figure 10C**). Ces graines sont conservée à l'abri de l'humidité dans des boites hermétiquement fermées.

1.4. *Foeniculum vulgare :*

Le matériel végétal choisi dans la présente étude est représenté par les graines de Fenouil bulbeux. Ces graines ont été récoltées de la région d'Ain Ouelman, wilaya de Sétif (**Figure 10D**). Elles ont été récupérées, concassées et conservées pour servir ultérieurement à l'extraction.

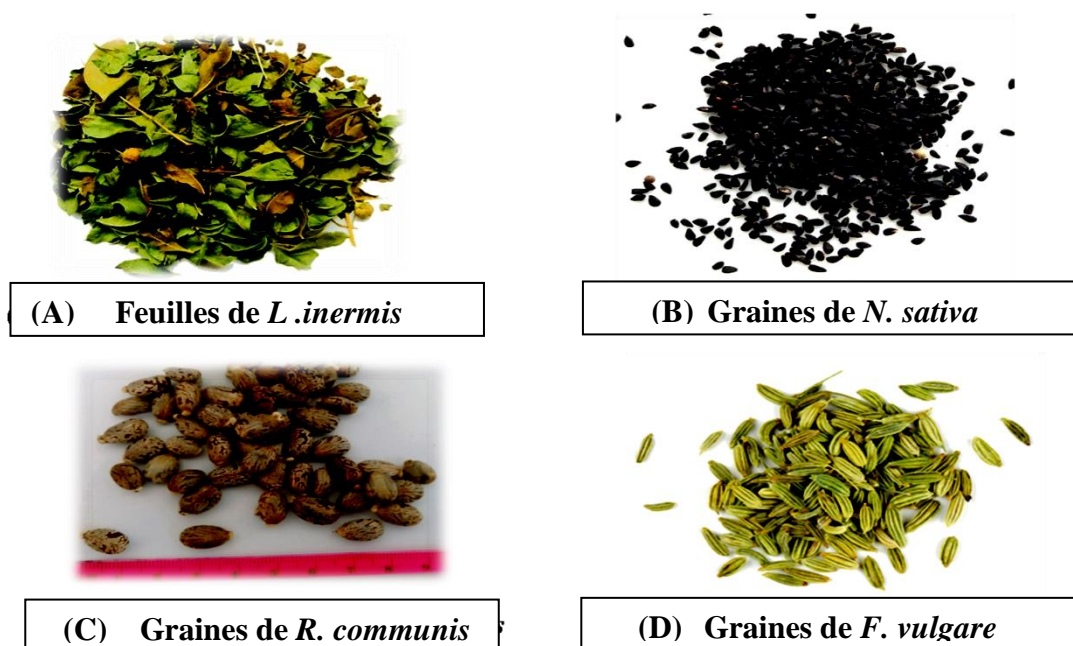


Figure N°10 : Les différentes parties des plantes étudiées

2. Matériel biologique :

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles végétales fixes des plantes médicinales étudiées (*Lawsonia inermis L*, *Nigella sativa L*, *Ricinus communis L*, *Foeniculum vulgare*), nous avons choisi quatre souches bactériennes et une souche fongique de références. Ces dernières sont disponibles au laboratoire du centre universitaire d'Ain Témouchent (**Tableau N°02**).

Elles sont entretenues par des repiquages successifs et réguliers sur gélose nutritive pour les bactéries et sur gélose sabouraud pour les levures puis conservées à +4°C.

Tableau N°02: Microorganismes utilisés pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

	Bactéries	Code	Pathogénicité
Gram négatif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Infection nosocomiales
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25933	Gastro-entérite et infection urinaire
Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Intoxication alimentaires
	<i>Staphylococcus aureus mrsa</i>	ATCC 43300	Infection de la peau ou infection de plaie
Levure	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Infections fongique (candidose)

3. Méthode :

3.1 Extraction des huiles fixes par soxhlet:

L'extraction des huiles fixes est réalisée à l'aide d'un soxhlet en utilisant de l'hexane comme solvant et selon la procédure décrite par **Abitogun *et al.* (2009)**. Ainsi 100g de chaque échantillon ont été placés dans une cartouche qui sera ensuite insérée au centre de chaque extracteur. Lorsque le solvant atteint le degré d'ébullition, la vapeur monte à travers un circuit d'évaporation, se condense au niveau du condensateur et après son contact direct avec le réfrigérant, il retombe sur l'extracteur faisant macérer l'échantillon dans le solvant. Ce dernier s'enrichit progressivement de composés solubles. Enfin, les mélanges obtenus sont placés dans un évaporateur rotatif afin de récupérer l'huile résiduelle qui va être conservée dans de petits flacons en verre et utilisée pour le reste du travail analytique (**Figure N°11**).

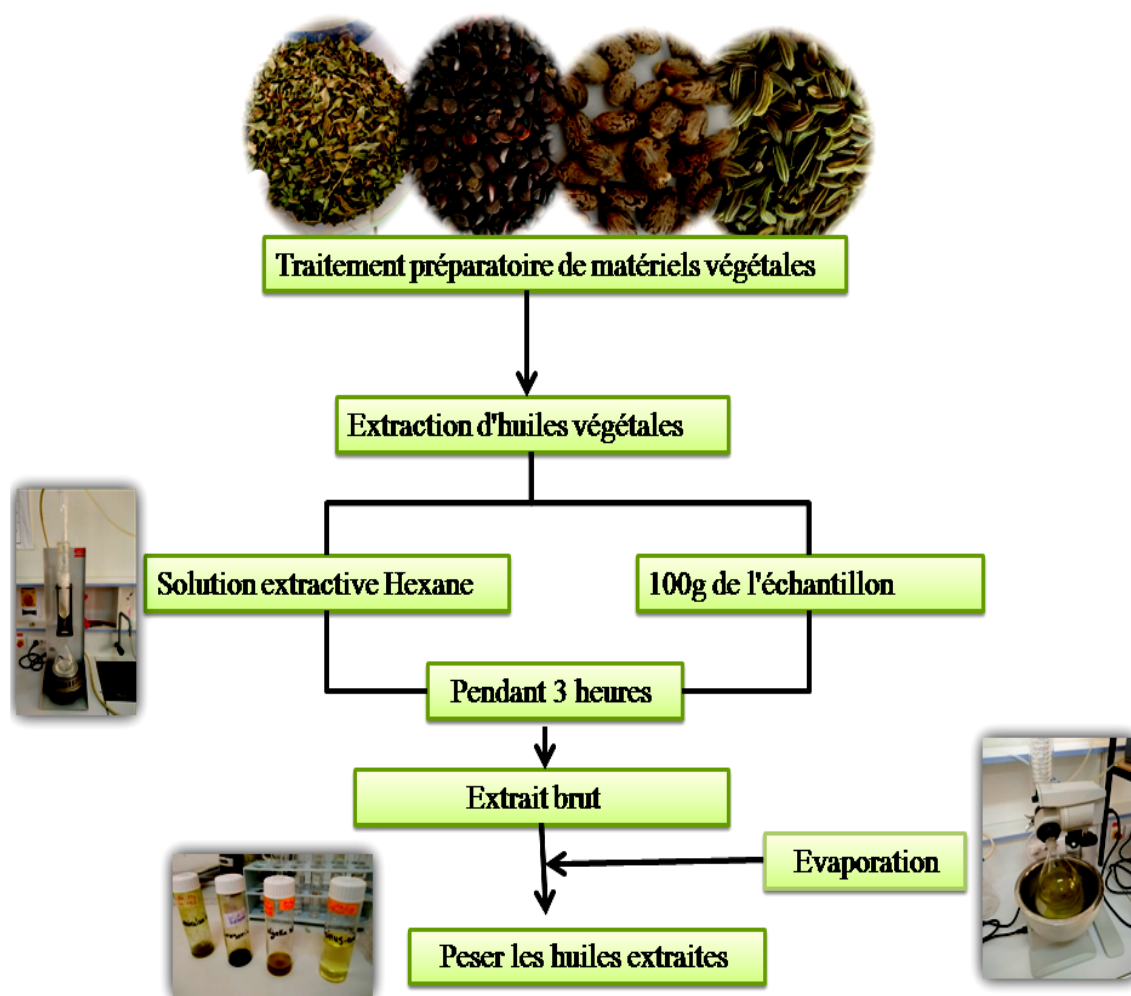


Figure N°11 : Schéma d'extraction des huiles fixes des plantes étudiées (Akpan *et al.*, 2006)

3.2. Calcul du rendement :

Le calcul du rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile fixe obtenue et la masse de matière végétale à traiter (Belyagoubi, 2014) :

$$R_{HF} = \frac{MH}{M_{VS}} \cdot 100$$

R : Rendement en huile fixe.

MH : Masse d'huile récupérée en g.

M_{vs} : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction exprimée en g.

3.3. Détermination des indices physico-chimiques des huiles fixes extraites :

Les huiles végétales fixes sont caractérisées par leurs propriétés physiques (densité, pouvoir rotatoire, indice de réfraction, miscibilité dans l'alcool,...) ainsi que par leurs propriétés chimiques (indice d'acide, d'ester, d'iode et de carbonyle) permettant d'évaluer la nature des composés organiques (acide, ester, alcène, carbonyle) présents dans l'essence.

Nous avons évalué les propriétés physico-chimiques de nos huiles fixes des quatre espèces sélectionnées suivant **la pharmacopée Européenne (1997) et la commission française de normalisation (Dedier, 2000)**.

3.3.1. Propriétés physiques :

a- Caractéristiques organoleptiques :

Les propriétés organoleptiques (consistance, la couleur et l'odeur) des huiles de nos plantes étudiées sont regroupées dans **le Tableau N°04**.

b- Détermination de pH :

Le pH « potentiel hydrogène » permet de mesurer l'activité chimique des ions hydrogènes H⁺ en solution. Le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. Cette méthode décrit l'acidité ionique du produit à analyser, son principe consiste à introduire l'électrode du pH-mètre dans le produit après le réglage de la température d'étalonnage. La lecture se fait directement sur le pH-mètre.

Ainsi, les huiles végétales fixes extraites ont été caractérisées par leur pH.

c- Densité relative :

La densité de nos huiles est déterminée par le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile et la masse du même volume d'eau distillée pris à la même température.

La détermination de la densité des huiles des plantes étudiées est réalisée à l'aide d'une seringue d'une capacité de 1mL au lieu du pycnomètre. Le volume prélevé est de 0,20 mL pour chaque huile, ainsi que pour l'eau. La densité de chaque essence a été calculée à partir de la relation suivante :

$$d_{20} = (m_1 - m_0) / (m - m_0)$$

Dans laquelle :

m_1 : Masse en g de la seringue contenant 0,20 mL d'huile.

m_0 : Masse en g de la seringue vide.

m : Masse en g de la seringue contenant 0,20 mL d'eau.

d- Miscibilité à l'éthanol :

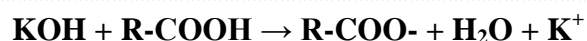
La miscibilité à l'éthanol est déterminée par le volume (V) d'alcool nécessaire pour former avec 0,5mL d'huile végétale un mélange homogène.

Donc un volume d'éthanol par fractions de 0,5 mL a été ajouté, à l'aide d'une burette, à 0,5mL d'huile fixe. Après chaque ajout, le mélange est agité. Quand la solution devient limpide, on note le volume d'éthanol additionné. Nous avons employé de l'éthanol absolu pour tous nos échantillons.

3.3.2. Propriétés chimiques :

a- Indice d'acide (I_a) :

L'indice d'acide exprime le nombre de mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1g d'huile. L'hydroxyde de potassium réagit avec l'acide selon la réaction suivante :



Pour cela à 1g de nos huiles testées, 5mL d'éthanol à 96% et environ 5 gouttes d'indicateur coloré (phénolphaléine) sont mis dans un erlenmeyer. Ensuite, on titre par une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium (KOH) à 0,1N jusqu'à ce que la solution vire au rose.

L'indice d'acide I_a est déterminé par la formule suivante :

$$I_a = V.C. \frac{56,11}{m}$$

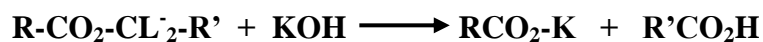
V : Volume en mL de la solution de KOH utilisé pour le titrage.

c : Concentration en mol /L de la solution de KOH.

m : Masse en g de la prise d'essai.

b- Indice d'ester (I_e) :

L'indice d'ester est le nombre de mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libérés par hydrolyse en milieu basique des esters contenus dans 1g d'huile fixe:



Pour cela, on introduit dans un ballon de 100 mL, 1g d'huile obtenue et 25mL d'une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium à 0,5 M à l'aide d'une burette, ainsi que quelques pierres ponce.

L'ensemble est porté à reflux pendant 1h. Après refroidissement de la solution, on ajoute 20 mL d'eau distillée et 5 gouttes de phénolphthaléine. L'excès de KOH est titré avec une solution d'acide chlorhydrique à 0,1N jusqu'à la disparition de la couleur rose. Une opération à blanc est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. L'indice d'ester (I_e) est calculé à l'aide de la relation suivante :

$$I_e = 28,05/m \cdot (V_0 - V_1) - I_a$$

V₀: Volume en mL de la solution d'HCl (0,1N) mesuré pour l'essai à blanc.

V₁: Volume en mL de la solution d'HCl (0,1N) mesuré pour le calcul de I_e .

m : Masse en g de la prise d'essai.

I_a : Valeur d'indice d'acide.

c-L'indice de saponification (I_s)

Il est déterminé à partir de I_e et I_a selon la formule suivante :

$$I_s = I_e + I_a$$

3.4. Evaluation de l'activité antibactérienne des plantes étudiées :

L'activité antibactérienne des huiles fixes des plantes étudiées a été évaluée par deux méthodes de référence:

- La technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques).
- La méthode de microdilution en milieu liquide pour déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).

Il faut noter que le DMSO à la concentration finale utilisée, n'exerce aucune activité vis-à-vis des souches testées.

3.4.1. Technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques) :

Pour la préparation de l'inoculum, chaque culture bactérienne est ensemencée en stries sur une gélose nutritive pour obtenir des colonies bien isolées. Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, quelques colonies sont transférées à l'aide d'une anse de platine dans un tube à essai contenant de l'eau physiologique. Les densités optiques sont ajustées à l'aide d'un spectrophotomètre «SPECORD 200 plus» à une longueur d'onde de 625 nm. La densité optique doit être comprise entre 0,08 et 0,1 l'équivalent de 10^8 UFC/mL (CLSI, 2006).

L'inoculum ainsi préparé est dilué au 1/100ème dans de l'eau physiologique. La densité optique finale obtenue de l'inoculum doit être équivalente à 10^6 UFC/mL. Les boîtes de Pétri contenant le milieu Muller Hinton gélosé sont ensemencées par écouvillonnage [(EUCAST, 2003) ; (Joffin et Leyral, 2006)]. Des disques de 6 mm de diamètre sont préparés en extemporané à partir de papier filtre stérile, puis imprégnés avec l'huile fixe (10µL pour chaque disque) à différentes concentrations. Les disques sont placés aseptiquement sur la gélose inoculée préalablement. Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 1h pour que l'huile puisse diffuser puis incubées à 37°C pendant 24 heures. L'activité antibactérienne est déterminée par mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques. L'activité antibactérienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et est exprimé en millimètre (Joffin et Leyral, 2006).

3.4.2. La méthode de la microdilution en milieu liquide (CMI) :

Le bouillon Muller Hinton (MHB) est largement utilisé comme milieu standard pour la microdilution en plaque. Il permet une meilleure croissance de la plupart des bactéries pathogènes non exigeantes, en plus de son faible effet antagoniste vis-à-vis des antibiotiques (EUCAST, 2003). La microplaque à 96 puits permet de déterminer les CMI des différents huiles fixes. Dans les puits des colonnes 1 à 8, nous avons introduit à l'aide d'une micropipette 100µL de bouillon Muller Hinton (MHB). Ensuite, 100µL de l'huile fixe est ajouté dans le 2ème puits (qui servira de témoin négatif) et 100µL dans le 3ème puits. A partir de ce dernier, nous avons procédé à des dilutions de 100µL de puits à puits à l'aide d'une micropipette. Le facteur de ½ est pris en considération dans le calcul des concentrations des produits à tester. Chaque puits contient 100µL de bouillon et le produit testé en dilution. Ensuite, nous avons additionné 100µL de l'inoculum (10^6 UFC/mL) dans les 96 puits sauf ceux de la colonne 2 (témoin négatif). Le puits 1 sert de témoin positif (100µL du bouillon et 100µL de l'inoculum). La microplaque est couverte et incubée à 37°C de 18 à 20 heures. La lecture se fait à l'œil nue sachant que la CMI est la plus faible concentration de la substance testée, à laquelle aucun trouble visuel n'est observé. Nous avons utilisé comme antibiotique de référence la gentamycine à une concentration finale de 5 mg/mL.

3.4. Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des levures :

L'évaluation de l'activité de nos huiles vis-à-vis des levures est réalisée par la méthode de diffusion sur milieu solide recommandée par CLSI (Espinel-Ingroff, 2007).

Nous avons utilisé le milieu Mueller Hinton additionné de 2% de glucose et de 0,5 µg/mL de bleu de méthylène. L'inoculum équivalent au 0,5 McFarland est préparé selon les mêmes étapes que celles décrites pour les bactéries sauf que l'absorbance est de l'ordre de 0,12 à 0,15 à une longueur d'onde de 530 nm équivalent à $1-5 \cdot 10^6$ UFC/mL. L'ensemencement est effectué par écouvillonnage. Les disques immergés par les produits à tester sont déposés après séchage de la boîte. Ces dernières sont maintenues à 4°C durant 1 heure puis incubées à 35°C pendant 24h. La lecture est réalisée de la même façon que celle décrite pour les bactéries.

L'étude de la CMI des levures est réalisée de la même manière que celles des bactéries, sauf que le milieu de culture utilisé est le milieu sabouraud liquide. L'inoculum est ajusté à une absorbance de l'ordre de 0,12 à 0,15 lue à 530 nm.



Résultats et discussion

1. Calcul du rendement :

Dans cette étude, le rendement a été déterminé par rapport à 100g de la matière végétale. Le poids de l'huile fixe est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation).

Les rendements en huiles fixes des quatre espèces sont représentés en pourcentage dans le **tableau N°03**.

Tableau N°03 : Rendements des huiles végétales fixes.

Espèce	Rendement
<i>Lawsonia inermis</i>	1,16%
<i>Nigella sativa L</i>	9,18%
<i>Ricinus communis L</i>	26,3%
<i>Foeniculum vulgare</i>	8,26%

D'après les résultats représentés dans le **tableau N°03**, nous pouvons déduire que les plantes étudiées contiennent effectivement des huiles fixes et les rendements en huile de Ricin sont les plus élevés dont le taux est estimé à 26,3%, suivi par l'huile de Nigelle (9,18%), en suite l'huile de Fenouil (8,26%). En ce qui concerne *L. inermis*, ses feuilles possèdent un faible rendement en huile fixe (1,16 %).

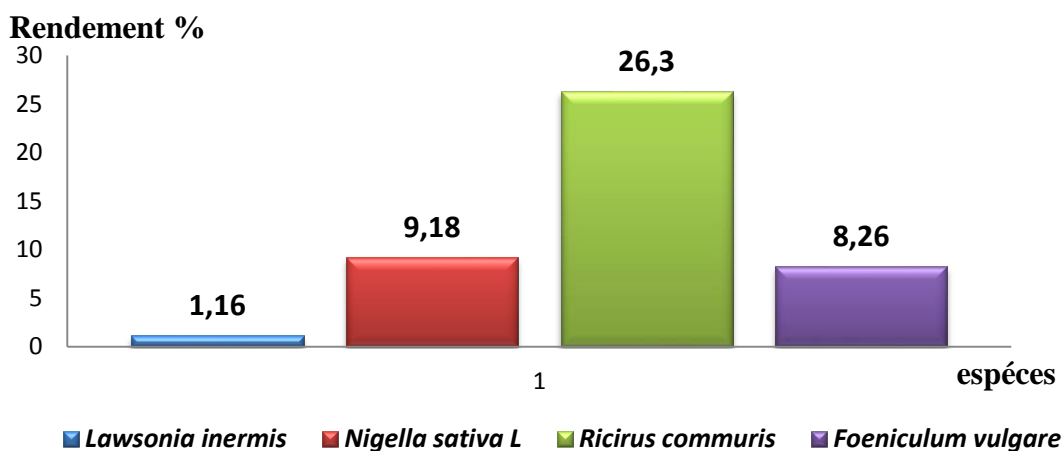


Figure N°12 :

Représentation graphique des rendements des huiles fixes étudiées.

Selon la **figure N°12**, les résultats des rendements enregistrés sont comparables à ceux obtenus dans d'autres études. En effet, le rendement en huile fixe des feuilles de *L.inermis* est inférieur à celui obtenu par **Fagbohoun et ses collaborateurs (2014)** qui ont travaillé sur la même espèce mais le solvant utilisé était différent. Le taux obtenu était égale à 6,66%.

Le rendement en huile fixe de *N. sativa* est nettement inférieur à celui obtenu par **AchourTani (2013)** qui est égale à 24%. Le rendement en huile végétale de *Ricin* obtenu est inférieur à celui relevé par **Alloune et ses collaborateurs (2012)**, qui est égale à 45%.

Tandis que le rendement de l'huile de Fenouil est supérieur à celle qui est enregistré par **Anwar et ses collaborateurs (2009)**, et qui ont travaillé sur les graines mais avec la méthode d'hydrodistillation. Leur rendement était estimé à 2,81%.

Ces variations pourraient être expliquées par la provenance géographique des échantillons notamment le facteur climatique, la date de récolte des graines, la durée et les conditions de conservation (**Belabid, 2014**). Le rendement diffère aussi entre les plantes de la même espèce, d'un stade de développement à un autre et d'une saison à une autre (**Perry et al., 1999**).

La méthode d'extraction est une opération importante qu'il faut mener avec soin. La récolte, le séchage, et le stockage influencent largement sur le rendement ainsi que la qualité organoleptique des huiles (**Benjilali., 2005**).

Le rendement d'extraction est le rapport de la quantité de substances naturelles extraites par l'action extractive d'un solvant. Il dépend de plusieurs paramètres tels que: le solvant, le pH, la température, le temps d'extraction et la composition de l'échantillon (**Quy Diem Do et al., 2014**).

2. Détermination des indices physico-chimiques des huiles fixes :

2.1. Propriétés physiques :

2.1.1. Caractéristiques organoleptiques :

Les résultats illustrés dans le **tableau N°04** montrent que les critères organoleptiques varient d'une huile à une autre. En effet chaque huile à ces propres caractéristiques qui lui corresponde.

Tableau N°04: Aspect des différentes huiles fixes obtenues

Huile	Consistance	Couleur	Odeur
<i>Lawsonia inermis</i>	Peu visqueux	Marron	Très aromatique
<i>Nigella sativa</i>	Liquide	Orangé-brun	Très aromatique, épicée, piquante.
<i>Ricinus comunis</i>	Liquide	jaune très claire	Peu prononcée
<i>Foeniculum vulgar</i>	Liquide limpide	Jaune pale	Aromatique anisée

Selon l'expérimentation, les huiles fixes étudiées sont liquides à une température ordinaire, avec une légère viscosité pour huile de Henné avec une nuance de couleur qui varie entre le jaune-claire, l'orangé-brunet et le marron. En effet, la couleur d'une huile fixe est un indice très important pour la détermination de sa qualité. Elle nous indique la présence des pigments colorés (caroténoïdes, xanthophylles...).

Concernant l'odorat des huiles fixes, les huiles de Ricin et de Fenouil présentent une odeur peu prononcée contrairement à l'huile de Henné et de Nigelle qui sont très aromatique. On peut expliquer cette différence d'odeur des huiles obtenues par la différence des parties des plantes utilisées. Des notes olfactives proches des arômes originales des espèces fraîches utilisées sont enregistrées pour les quatre huiles fixes, avec un caractère aromatique qui caractérise les huiles obtenues par la méthode d'extraction au Soxhlet.

On note que nos huiles ont des caractéristiques organoleptiques du même ordre et avec les propriétés que ceux donnés par la littérature et par la direction de normalisation (nouvelle direction aromatique) (AFNOR, 2000).

2.1.2. Analyse physico-chimique des huiles fixes :

La détermination des propriétés physique des graines est indispensable pour maîtriser leur traitement au cours des procédés de fabrication (Juliano et al., 1990). Les valeurs de la densité, du pH et de la miscibilité à l'éthanol des essences végétales obtenues sont regroupées dans le tableau N°05.

Tableau N°05: Caractéristiques physico-chimiques des huiles fixes des plantes étudiées.

Propriétés physique	pH	²⁰ d ₂₀	Miscibilité à l'éthanol
<i>Lawsonia inermis L</i>	4.5	0.66	1V/13 V d'EtOH
<i>Nigella sativa L</i>	6.43	0.66	1V/12.2 V d'EtOH
<i>Ricinuscommunis L</i>	6.33	0.96	1V/12.1 V d'EtOH
<i>Foeniculum vulgar</i>	3.33	0.89	1V/16 V d'EtOH

a- Le pH :

A la lumière des résultats obtenus dans le tableau N°05, nous remarquons que nos échantillons ont un caractère acide (pH<7). Ce dernier est dû à plusieurs facteurs tels que : les facteurs climatiques, le pH du sol et les facteurs génétiques. Les huiles de Ricin et de Nigelle enregistrent un pH presque identique avec une valeur supérieur à celle de l'huile de Henné et de Fenouil. Ces valeurs répondent aux normes données par la pharmacopée européenne.

Les résultats obtenus dans nos études sont proche des résultats obtenus dans d'autres études. En effet, l'huile des quatre plantes sélectionnées ont enregistré des valeurs similaires à ceux de Mussa, (2012), Fararh, (2004) , Akpan et al, (2006) , Fernández, (2006).

Le pH est un facteur clé, influençant l'assimilation des éléments par la plante et de ce fait, la composition chimique des huiles. Il a été établi que l'efficacité de l'huile augmente avec la diminution du pH de la plante (Stéphane et al, 2004).

Il convient de souligner que le pH joue un rôle déterminant au cours des réactions chimiques et biochimiques et peut influencer les propriétés stabilisatrices d'une huile. Par conséquent,

ces résultats peuvent amener à un bon caractère stabilisateur contre les microorganismes. Ceci permettra à ces huiles fixes de jouer le rôle de conservateurs dans les produits alimentaires.

b- Densité :

La détermination de la densité d'une huile nous renseigne sur sa pureté. Elle est en fonction de la composition chimique des huiles et de la température (**Karleskind, 1992**). Dans notre étude, nous avons déterminé ce critère de pureté à une température de 20°C. Les valeurs de densité des quatre huiles sont comprises dans la norme établie par le **Codex Alimentarius (1983)**.

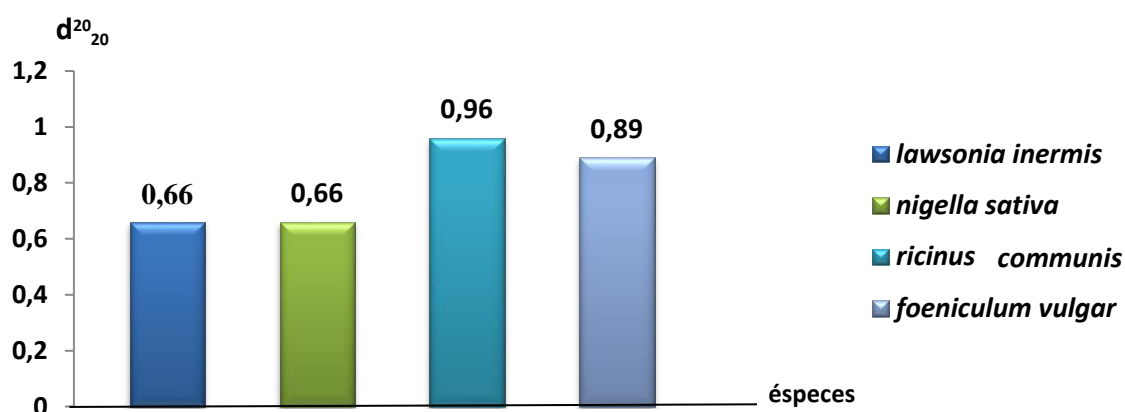


Figure N°13 :

Evolution de la densité des huiles fixes des plantes étudiées.

Selon la **figure N° 13**, on constate que la densité en huile fixe du Ricin et de Fenouil respectivement est supérieure à celui de Henné et de Nigelle. En effet, pour l'huile de Nigelle, nos résultats sont inférieurs à la norme indiquée dans la littérature. Les bienfaits et l'utilisation des huiles en cosmétique et en santé naturelles, doivent présenter un intervalle de norme entre 0.90 à 0.92.

D'après **Akpan et ses collaborateurs (2006)**, la densité de l'huile de Ricin est presque identique à celle de nos résultats (0,9587). En fin, la densité de l'huile de Fenouil est égale à celle de **Garnero (1991)**, qui a enregistré une valeur de 0.889 à 0.921.

La densité est une caractéristique physique d'une grande importance lors de l'évaluation de la qualité d'une huile. D'après nos résultats, nous remarquons que quelque soit les différences obtenues avec d'autres études, nos valeurs de densité restent conformes à la norme d'**AFNOR (NFT 75, 111,2000)**.

c- Miscibilité à l'éthanol :

La miscibilité indique si deux liquides peuvent se mélanger pour former une solution homogène. D'après les résultats illustrés dans le **tableau N°06**, on peut déduire que les huiles fixes de Ricin et de Nigelle sont les plus solubles comparées à celles de Henné et de Fenouil.

La miscibilité à l'éthanol de l'huile de Fenouil est similaire à celle rapporté par **Seddik, en 2010**. Ce dernier a enregistré une valeur de 1V/16.8V d'EtOH, et qui reste supérieur à celle apporté par **Ouis (2015)** qui a enregistré un taux de miscibilité égale à 1V/5V d'EtOH.

2.2. Les propriétés chimiques :

Les résultats obtenus de l'analyse chimique des huiles fixes sont regroupé dans le **Tableau N°06** qui représente l'indice d'ester l'indice d'acide et l'indice de saponification.

Huile	Indice I _e	I _a (mg de KOH/g MG)	I _s (mg KOH/g d'huile)
<i>Lawsonia inermis L</i>	23.01	5,04	28.05
<i>Nigella sativa L</i>	10,665	3,36	14,026
<i>Ricinus communis L</i>	110.34	1,86	112.2
<i>Foeniculum vulgar</i>	25.25	2,8	28.05

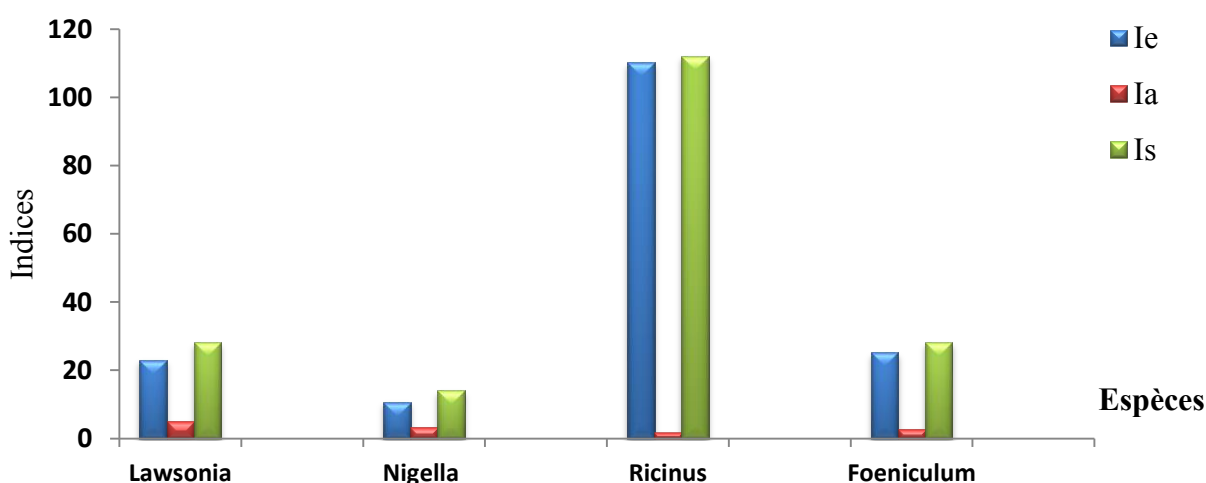


Figure N°14 :
Représentation graphique des indices chimiques des huiles fixes des plantes étudiées.

2.2.1. Indice d'acide :

L'indice d'acide (Ia) est la masse de potasse (en %) nécessaire pour neutraliser les acides gras libres du corps gras. Il indique le degré d'altération des esters (essentiellement des triglycérides) présents dans le corps gras, et le comportement et la quantité des acides libres présents dans nos huiles. D'après les résultats obtenus dans **le tableau N°06** et **la figure N°14**, l'huile de Henné présente un indice d'acide plus élevé (5,04) par rapport à celui de l'huile de Nigelle et l'huile de Fenouil. Par contre, l'huile de Ricin présente l'indice d'acide le plus faible (1,86).

La valeur élevée de l'indice d'acide de Henné serait liée à la nature intrinsèque des feuilles où certaines huiles fixes sont caractérisées par une acidité élevée (**Patterson, 1989**), qui est due à la présence des acides gras libérés par l'action des lipases favorisées par le broyage qui mettait en contact la lipase avec les lipides (**Alibert, 2001**).

D'après les résultats obtenus, on constate qu'il y a une concordance entre l'augmentation de l'indice d'acide et la diminution des pH. L'exemple de Henné qui présente des indices d'acide élevé concorde avec la faible valeur du pH de ces essences.

Concernant l'huile de Ricin, nos résultats sont proches de ceux de **Akpan et ses collaborateurs (2006)**, qui ont enregistré un indice d'acide égale à 1,148. Concernant l'huile fixe de Fenouil, le taux d'indice obtenu est plus grand que celui de **Seddik (2010)** qui ont enregistré une valeur de 0.90. Tandis que l'huile de Nigelle présente des valeurs qui sont en accord avec les normes citée par **Achour Tani (2013)**.

L'indice d'acide qui mesure la quantité d'acides gras libres résultant des réactions hydrolytiques des triglycérides est un critère de qualité permettant de rendre compte de l'état de conservation d'une huile. Une huile de bonne qualité doit présenter une acidité nulle. Dans notre cas, aucun échantillon analysé ne présente une acidité nulle, mais nos résultats obtenus montrent une acidité faible pour les 4 huiles entre (2.8–3,36 mg KOH/g MG) et une légère acidité (5.04 mg KOH/g MG) pour l'huile d'henné. Ceci peut être expliqué par une mauvaise conservation de celle-ci.

L'indice d'acide élevé d'une huile peut être bénéfique si ces essences sont ajoutées à un produit alimentaire possédant des matières grasses et des acides gras libres oxydables. Cet effet stabilisateur protège ou limite l'oxydation des acides gras libres insaturés des

produits alimentaires ce qui améliore à la fois la qualité nutritionnelle et organoleptique de ces produits.

2.2.2. Indice d'ester :

Le taux d'indice d'ester de l'huile de Ricin est le plus significatif (110,34) par rapport à celui de Henné et de Fenouil (plus ou moins 25). Tandis que l'huile fixe de Nigelle possède l'indice le plus faible. Les résultats obtenus par **Seddik (2010)**, concernant l'huile de Fenouil sont égale à 23,57, ce qui est en accord avec nos résultats.

Toutes nos huiles fixes sont dans les normes. Plus l'indice d'ester est élevé plus les huiles sont riche en esters. Cependant, l'indice d'ester peut aussi être influencé par d'autres facteurs, tels que les conditions dans lesquelles s'effectuent l'hydrolyse (c'est-à-dire dans quel type d'alambic, les constituants de l'eau utilisée pour le chauffage,...). De manière générale, les huiles de très bonnes qualités ont un indice ester très élevé.

2.2.3. Indice de saponification :

L'indice de saponification rend compte de la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras. C'est la quantité de potasse, exprimée en milligrammes, nécessaire pour saponifier 1 g de corps gras.

L'indice de saponification des huiles fixes des graines de Nigelle est de l'ordre de 14,026. Celui de Henné et de Fenouil sont identiques et sont estimés à 28,05. En fin, l'indice d'acide de Ricin présente le taux le plus élevé et qui est estimé à 112,2. Ce résultat est comparable à celui obtenu par **Akpan et ses collaborateurs en 2006**, qui ont enregistré un taux de 185,83.

Une étude ultérieure faite par **Azag et Makhlouf (2014)**, sur l'huile de Nigelle rapporte une valeur d'IS égale à 207,33. Cette valeur est plus élevée que celle trouvée dans notre étude. Les résultats obtenus par **Seddik (2010)**, sont inférieurs aux notre (19,09).

Les indices de saponification nous renseignent sur la richesse et la nature des acides gras contenus dans les huiles. Cela implique que ces huiles contiennent une forte quantité d'acides gras avec un important poids moléculaire. L'indice de saponification rend compte de la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras. Plus le poids moléculaire est élevé plus l'indice de saponification est faible (**Bruni et al., 1994**). Dans ce cas, nous pouvons déduire que notre huile fixe de ricin est plus riche en acide gras insaturés que les autres huiles testées.

3. Evaluation de l'activité antibactérienne des plantes étudiées :

3.1. Technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques) :

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence un éventuel effet antibactérien des drogues obtenues. Le principe comme il a été déjà décrit consiste à ensemencer une boîte de milieu gélosé par un germe-test et l'amener au contact de la substance à tester au niveau d'une petite zone déterminée. Après la mise à l'étuve pendant 24 heures, l'action de l'huile est déterminée par le diamètre du halo d'inhibition qui apparaît clair autour de la zone de contact (**Tableau N°07**) (**Vanden-Berghe, 1991**). L'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par **Mutai et al., (2009)** ; ils ont classé les zones d'inhibitions de la croissance en 4 classes (**Tableau N°17**).

Tableau N°07 : Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (D)

Inhibition	Sensibilité
D<8mm	Résistante
9mm≥D≤14	Sensible
15mm≥D≤19mm	Assez sensible
D>20mm	Très sensible

Pour l'évaluation du potentiel antimicrobien de nos huiles fixes, nous avons préféré les tester contre cinq souches microbiennes de références, car chacune d'elles possèdent des structures cellulaires et un métabolisme particulier [(**Athamina, 2010**) ; (**Djahra, 2014**)].

Les résultats des tests qualitatifs de l'activité antibactérienne des huiles fixes obtenues sont regroupés dans le **tableau N°08**.

Tableau 08: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des huiles fixes des quatre plantes vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

Bactéries		Huiles			
		<i>R. communis L</i>	<i>N. sativa</i>	<i>I. inermis</i>	<i>F. vulgare</i>
Gram positif	<i>Staphylococcus aureus mrsa ATCC 43300</i>	18mm	25 mm	30mm	32mm
	<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>	13mm	0mm	22mm	0mm
Gram négatif	<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	12mm	0mm	30mm	25mm
	<i>Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</i>	0mm	14 mm	13mm	21mm

a. L'huile de *L. inermis* :

D'après la **figure N°15**, on constate que les zones d'inhibition de *L. inermis* sont importantes ce qui montre leur pouvoir antibactérien. L'huile fixe de Henné a montré une très forte activité vis à vis des trois souches de: *S. aureus mrsa*, *S. aureus* et *E. coli* avec des diamètres d'inhibitions égale à 30mm, 22mm et 30mm respectivement. *P.aeruginosa* a présenté une zone d'inhibition de 13mm donc elle est considérée comme sensible. On pourra dire que tous les souches testées sont très sensibles à l'huile de Henné.

Ces résultats sont en accord avec l'étude de **Benabedallah (2012)**, qui a montré que les feuilles de *L. inermis* présente une activité antimicrobienne vis -à- vis des trois souches de nos bactéries testées. En effet, une activité moyenne a été observée sur des souches d'*E.coli* et de *S.aures*. Tandis qu'une faible activité a été enregistrée vis-à-vis de la souche *P. aeruginosa*. Ceci concorde avec nos résultats obtenus.

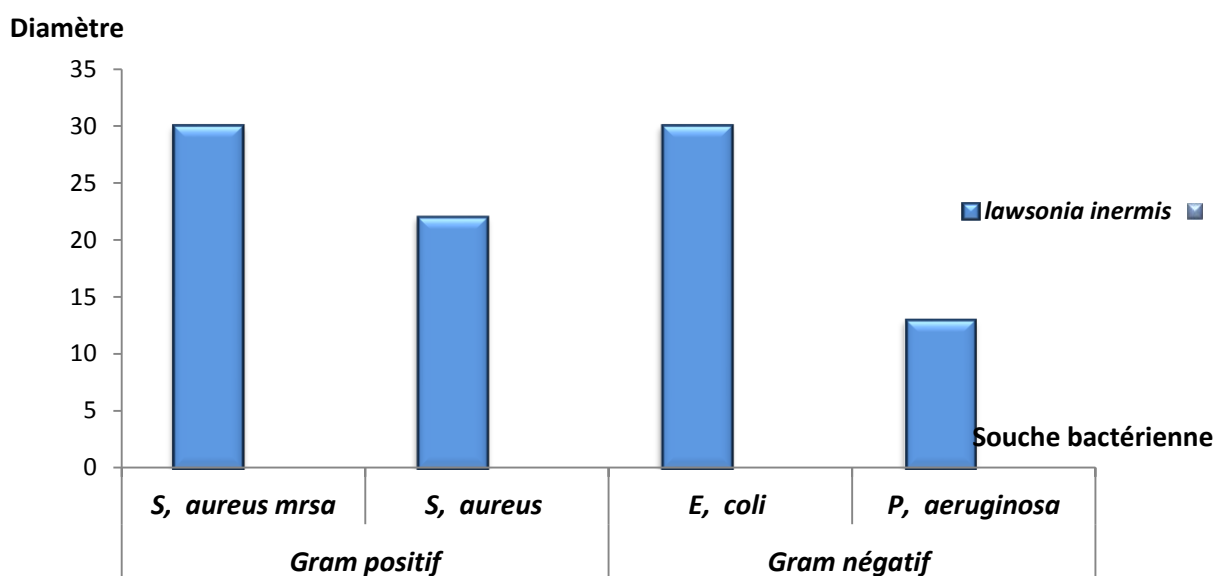


Figure N°15: Activité antibactérienne de l'huile de Henné vis-à-vis des quatre souches bactériennes testées.

On peut conclure que l'huile de Henné agit sur les bactéries à Gram négatives et sur les bactéries à Gram positives. Les feuilles de Henné possèdent des propriétés antibactériennes d'une nature étendue. Il est plus au moins actif selon les espèces. Cette activité antibactérienne est due à des composés phénoliques et principalement à la lawsonie, à l'acide gallique et au 1,4 naphthoquinone (**Munshi et al., 1977**).

L'activité antibactérienne des produits naturels dérivés de cette plante tels que : naphthoquinone alkannin et shikonin et leurs dérivés ont été étudiée (Riffel et al., 2002). En général, ils sont actifs contre les bactéries Gram-positif telles que *Staphylococcus aureus* (Papageorgiou et al., 1999). Emori et ses collaborateurs en 1993, démontrent que le Henné a une action inhibitrice contre les deux germes Gram négatif et Gram positif.

b. L'huile de Nigelle :

L'huile de Nigelle a une activité variable sur les souches à Gram positif comme *S. aureus mrsa*, qui présente une sensibilité forte, traduite par une zone d'inhibition importante estimée à 25 mm (Figure N°16). Ce résultat va dans le même sens que celui de Harzallah et ses collaborateurs (2012), qui ont trouvé que la souche de référence *Staphylococcus aureus mrsa* ATCC 43300 était la plus sensible des souches bactériennes testées.

Nos résultats montrent que parmi les bactéries à Gram négatif testées, l'espèce *P. aeruginosa* était sensible à l'huile de graines de Nigelle avec un diamètre de 14 mm. Ce résultats concorde avec ceux de Harzallah et al., (2012), qui ont démontré que le diamètre d'inhibition de cette souche ne dépassant pas les 12.33 mm par la méthode de diffusion des disques.

Dans le cas des bactéries *S. aureus* et *E. coli*, l'huile de *N. sativa* n'a exercé aucune activité antimicrobienne. Ce résultat est identique à celui obtenu dans les travaux de Kökdil et al., (2005) et Mariam et Abu-Al-basal (2009).

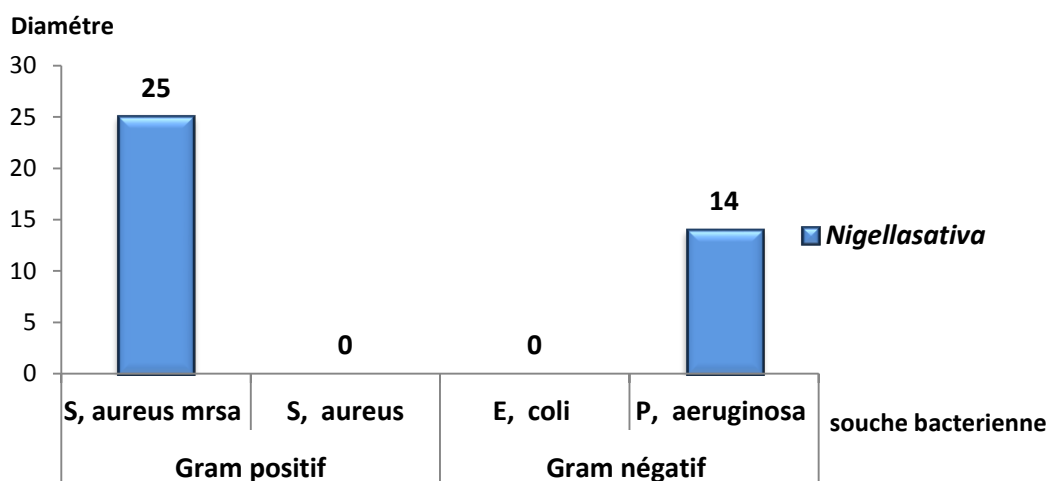


Figure N° 16: Activité antibactérienne de l'huile de *N. sativa* vis-à-vis des quatre souches bactériennes testées.

Les constituants des graines de *Nigella sativa* tels que la thymoquinone et le thymol, sont caractérisés par plusieurs activités pharmacologiques telles qu'anti-inflammatoire (**Mutabagani et El-Mahdy, 1997**), et antibactérienne (**Hosseinzadeh et al., 2007**).

Le Thymol et carvacrol, isolées dans des herbes telles que le thym, sont des membres de la famille de menthane. Les huiles contenant ces terpènes phénoliques se sont avérées particulièrement efficaces en tant qu'agents antibactériens (**Crozieret al., 2006**). Ces données confirment que la thymoquinone et le thymol d'huile de graines de *Nigella sativa* ont des effets antibactériens.

Cependant, les équipes de **Mccutcheon (1995)** et de **Harzallah et al., (2012)** soulignent fortement que l'origine de l'activité antimicrobienne de cette huile pourrait être attribuée à la présence de certains acides gras tels que l'acide linoléique (58.73% des AGT) et l'acide oléique (21.67% des AGT) qui demeurent des composés majoritaires.

D'autres études ont montré que les acides gras insaturés à long chaîne sont des substances bactéricides des microorganismes pathogènes incluant la *S. aureus* résistant à la Methicillin (SARM) responsable de la surinfection post opératoire (**Nadkarni, 1976**).

c. L'huile de Ricin :

Les résultats illustrés dans la **figure N°17** montrant que l'huile fixe de Ricin a une très forte activité inhibitrice vis-à-vis des souches *S.aureus mrsa*, *S.aureus*, *E.coli* testées avec des diamètres égales à 18mm, 13mm, 12mm respectivement.

P. aeruginosa a présenté un diamètre d'inhibition nulle, ce qui est explicable par la résistance totale contre huile de Ricin. En revanche, les bactéries à Gram positif ont des zones d'inhibition plus grandes que celles des bactéries à Gram négatif donc ils sont assez sensibles.

Nos résultats sont en accord a celle de **Bedreddine et ses collaborateurs (2018)**, qui ont trouvé que l'huile de Ricin présente l'activité la plus élevée contre *S.aureus* et la plus faible contre *P.aeruginosa* avec des valeurs des zones d'inhibitions qui sont presque similaires a nos valeurs. Grâce à cette activité notre plante peut être utilisée dans les industries agroalimentaires afin d'éviter les intoxications et la dégradation des aliments.

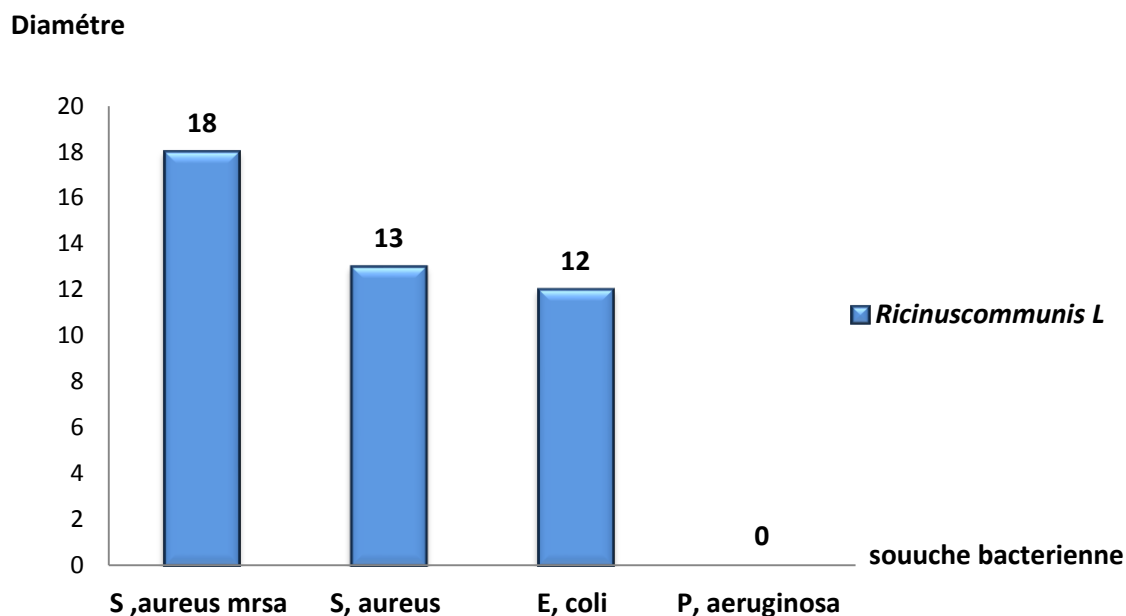


Figure N°17 : Activité antibactérienne de l’huile de Ricin vis-à-vis des quatre souches bactériennes testées.

Des études plus récentes ont montré que les polyphénols présentent une activité antibactérienne importante (**Ferrazzano et al., 2011**). Ces composés agissent par deux mécanismes d’actions qui en premier consiste à l’inhibition de la synthèse d’acide nucléique des bactéries (**Wu et al., 2013**) et en deuxième provoquent l’endommagement des membranes cellulaires des bactéries (**Tsuchiya et Linuma, 2000**).

d. L’huile de Fenouil :

D’après la **figure N°18**, l’huile fixe de Fenouil a montré une très forte activité envers les trois souches de : *S.aureus mrsa* , *E.coli* et *p.aeuginosa* dans les diamètres sont estimés à 30mm, 25mm et 21mm respectivement. Comparativement avec les résultats de **Bouguerra (2012)**, les trois bactéries sont sensible avec des zones d’inhibitions plus on moins faible que ceux obtenues dan notre étude.

Concernant la souche *S.aureus*, elle a présenté une forte résistante contre l’huile de Fenouil. Ce résultat en accord avec celui enregistré par **Piochon, (2008)**.

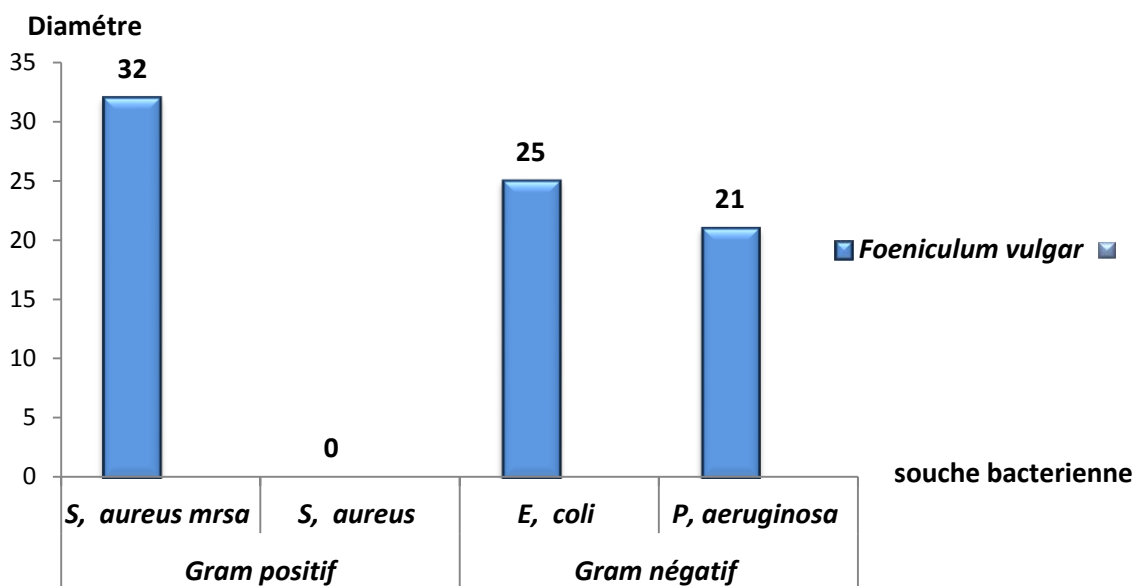


Figure N°18 :

Activité antibactérienne de l'huile de Fenouil vis-à-vis des quatre souches bactériennes testées.

Les principaux constituants de l'huile fixe des gaines de Fenouil sont : le Trans-anéthol, le fenchone, l'estragole et le limonène (hydrocarbures monoterpéniques). Le fenchone est le constituant responsable des propriétés biologiques, par conséquent seulement les variétés de Fenouil contenant une bonne proportion de fenchone conviennent qu'on exploite leurs activités biologiques (**Vienna et al., 2005**).

Récemment, certains chercheurs ont rapporté que ces hydrocarbures monoterpéniques ou ses quiterpéniques et leurs dérivés oxygénés, sont les principaux composants des huiles, qui présentent une activité antimicrobienne (**Cakir et al., 2004**). Ces résultats soutiennent fortement cette étude, puisque l'huile de fenouil contient ces composés, ce qui confirme son efficacité comme agent antimicrobien naturel.

3.2. La méthode de la microdilution en milieu liquide (CMI) :

La détermination de la concentration minimale inhibitrice des huiles de *Lawsonia inermis*, *Nigella sativa*, *Ricinus communis* et *Foeniculum vulgare* est effectuée par la méthode de microdilution sur microplaque à 96 puits. Cette technique quantitative permet de déterminer l'intervalle de concentrations qui inhibent effectivement la croissance bactérienne.

Sur la base des résultats obtenus, nous pouvons dire que les valeurs des CMI varient d'une bactérie à une autre en fonction des différentes huiles fixes étudiées. Ces derniers sont beaucoup plus actifs sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Les CMI varient de 0,04 à 12,5 mg/mL chez les bactéries à Gram positif et de 0,04 à 50 mg/mL chez les bactéries à Gram négatif.

Les résultats obtenus sont représentés dans le **Tableau N°10**:

Tableau N° 10 : Concentration minimale inhibitrice (CMI, mg/mL) des huiles fixes testées.

	Bactérie	Huile	<i>Lawsonia inermis</i>	<i>Nigella sativa</i>	<i>Ricinus communis</i>	<i>Foeniculum vulgare</i>	Antibiotique Gentamicine Ampinax (5mg/mL)
Gram +	<i>Staphylococcus aureus mrsa ATCC 43300</i>		0,04	6,25	0,39	6,25	0,62
	<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>		0,39	12,5	0,19	6,25	2,5
Gram-	<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>		0,04	1,56	0,04	3,12	0,15
	<i>Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</i>		0,04	50	0,19	3,12	0,62

Les résultats obtenus dans le **tableau N°10** des différents huiles fixes testées sur les quatre souches bactériennes, montrent que :

a. L'huile de *L.inermis* est douée d'une bonne activité antibactérienne avec une CMI égale à 0,04 mg/mL et ceci vis-à-vis de *S. aureus mrsa*, *E. coli* et de *P. aeruginosa*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Rahmoun et al., (2008)** et **Sharma et al., (1995)**. On peut suggérer que l'activité antimicrobienne des feuilles de Henné est largement influencée par l'action de la Lawsone.

L'huile de Henné possède des propriétés antibactériennes d'une nature étendue. Cette activité antibactérienne est due à des composés phénoliques et principalement à la lawsone, l'acide gallique et la 1,4 naphthoquinone (**Munshi et al., 1977**).

b. L'huile de Ricin est lui aussi très actif vis-à-vis de *S.aureus*, *E.coli* et *P.aeruginosa* avec des CMI égale à 0.19, 0.04 et 0.19 mg/mL respectivement. Nos résultats sont semblables aux résultats de la recherche expérimentale biologique d' **Etchike et ses collaborateurs en 2011**. Des décoctions d'huiles de *Ricinus communis*, ont été étudiées *in vitro* pour évaluer leur activité antibactérienne. Ils présentent une inhibition de la croissance bactérienne. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) varient entre 0,05mg/mL et 2,64 mg/mL. Ces résultats montrent que les graines de *R.communis* sont plus riches en composés phénoliques, et sont plus riches en flavonoïdes. Ceci nous permis de conclure que l'huile de ricin possède une bonne activité antimicrobienne (**Bedreddine, 2018**).

c. Par contre l'huile de Nigelle s'est montré la moins active par rapport aux autres huiles avec une CMI qui varie entre 1,56 et 50 mg/mL. D'après l'étude de **Beddou (2016)**, les valeurs de CMI de l'huile de Nigelle varient entre $6,4 < \text{CMI} \leq 12,8$ mg/mL. Ces résultats sont en accord avec les notre. Ces mêmes valeurs de CMI ont été trouvées par **Kamni et Senouci Bereksi en 2015**.

d. L'huile de Fenouil présente des CMI intéressantes vis-à-vis d'*E. Coli* et de *P. aeruginosa* et qui sont égales à 3,12 mg/mL. Plusieurs études sur l'activité antibactérienne et antifongique de *F. vulgare* ont été rapportées dans la littérature ; **Taie et al., (2013)** et **Sigh et al., (2006)** montrent que l'extrait de la tige de fenouil a montré une forte inhibition des souches bactériennes. L'huile de Fenouil est considérée comme une riche source en composés

phénoliques tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines et les tannins....etc.

En comparant ces valeurs avec celles obtenues avec l'antibiotique de référence, nous remarquons que l'effet inhibiteur de l'antibiotique de gentamicine est plus important. Concernant les espèces bactériennes testées, nous remarquons qu'il ya une différence de sensibilité parmi les souches qu'il s'agisse de Gram positives ou de Gram négatives (les plus résistantes).

Ainsi, l'espèce *S. aureus* s'est révélée la plus résistante à toutes les huiles fixes testées, contrairement à *E.coli* qui est a la plus sensible à toutes les huiles testées par des CMI les plus faibles, ce qui confirme la similitude des résultats obtenus par les deux techniques utilisées.

4. Activité antifongique :

4.1. Technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques)

Les résultats de l'activité antifongique des huiles fixes de *Lawsonia inermis*, *Nigella Sativa*, *Ricinus communis* et de *Foeniculum vulgare* vis-à-vis de la levure du genre *Candida albicans* sont représentés dans le **tableau N°09**.

Tableau N°09 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des huiles fixes des quatre plantes vis-à-vis de la souche *Candida albicans*.

Levures	<i>L. inermis</i>	<i>N. sativa</i>	<i>R. communis L</i>	<i>F. vulgare</i>
<i>Candida Albicans</i> <i>ATCC 10231</i>	13mm	0	20mm	0

Selon la **figure N°19** illustré ci-dessous, nos résultats confirment l'inactivité des deux huiles de Nigelle et de Fenouil vis-à-vis de cette levure. Tandis que l'huile de Ricin et de Henné possèdent des activités antifongiques avec des diamètres d'inhibitions de 20mm et 13 mm respectivement.

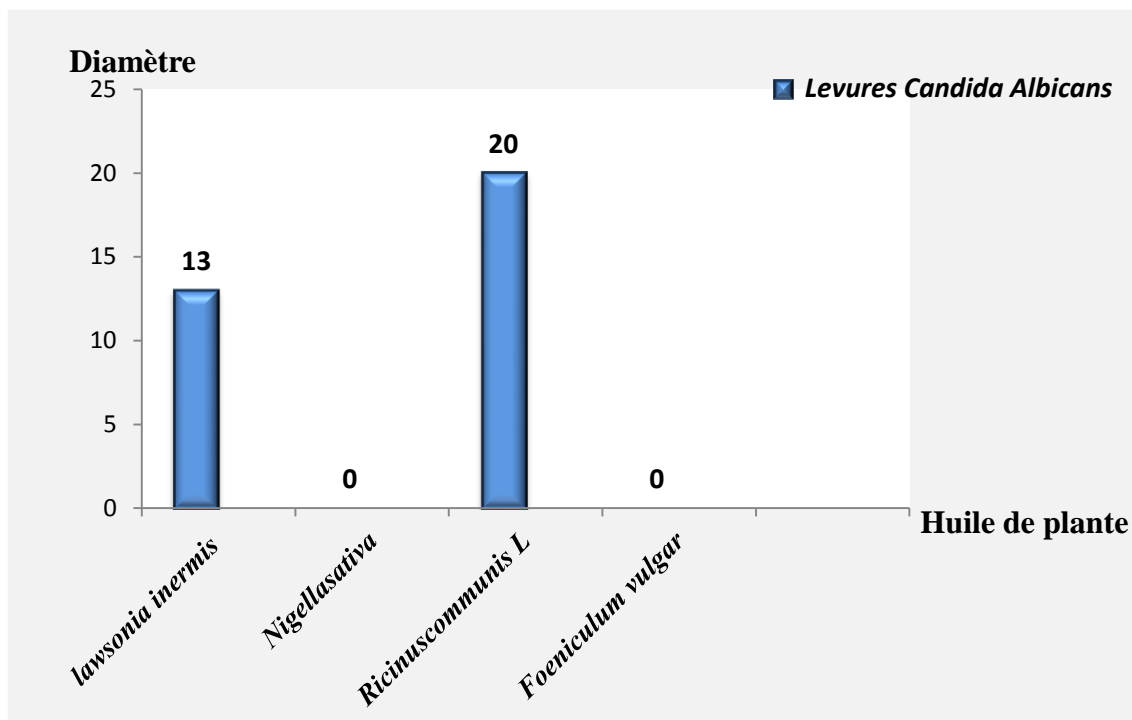


Figure N°19 :

Activité antifongique des huiles fixes étudiées vis-à-vis de *C. albicans*.

a. L'huile de *L. inermis* :

Les résultats des tests quantitatifs de l'activité antifongique de l'huile de *L.inermis* sont mentionnés dans le **tableau N°09**. Nous pourrions dire que cette huile fixe possède une bonne activité vis-à-vis de la souche de *Candida albicans*.

Des études portées par **Brigham et al., (1999)** et **Riffel et al., (2002)**, ont démontré que les molécules qui inhibent la croissance de souches fongiques sont la juglone, la lawson, et la plumbagone.

L'équipe de Rahmoun (2010) affirment que les différents extraits du henné sont des fractions les plus actives contre la levure *C. albicans*. Ces données suggèrent que cette activité est fortement liée à la présence de la *lawsone* dans des feuilles de henné. L'inhibition de la croissance de micro-organismes témoigne que le Henné Algérien peut être largement exploité dans la recherche de nouveaux médicaments antimicrobiens.

b. L'huile de Nigelle :

Les résultats de l'activité antifongique ont révélé aussi l'inefficacité des huiles fixes des graines de Nigelle contre la levure testée. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Benzine (2014)**, qui ont révélé l'absence d'activité antifongique de l'huile de *Nigella*

sativa contre *Candida albicans*. Cette inefficacité pourrait être corrélée à la différence morphologique et à la diversité des mécanismes biochimique de la levure.

c. L'huile de Ricin :

D'après la **figure N°23**, on remarque que l'activité antifongique de l'huile de Ricin est importante vis-à-vis de *candida albicans*. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Maruf O Yekeen et al, (2014)**.

Par ailleurs **Rabia et Asghari (2012)** ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *R. communis* présentait une activité antifongique estimée à 59,5% et 56,3% d'inhibition fongique contre *A. fumigatus* et *A. flavus*, respectivement. D'autres études menées par **Maruf O. Yekeen et al., (2014)** soulignent que l'huile de graines de *R. communis* possédait en effet une activité antifongique. Ces résultats permettent de conclure que les graines de *Ricinus communis* L possèdent une activité antifongique et ceci concorde avec nos résultats obtenus.

d. L'huile de Fenouil :

Notre huile fixe de Fenouil semble être inactive sur *C. albicans*. En revanche, beaucoup de chercheurs ont confirmé la présence de l'activité antifongique de l'huile des graines de Fenouil (**Bouguerra, 2012**).

Cette inactivité trouvée dans les deux huiles de Nigelle et de Fenouil, est due probablement à plusieurs facteurs, tels que (**Beddou,, 2016**). :

- Le procédé et les conditions d'extraction
- La nature du matériel d'extraction (risque d'oxydation).
- Les conditions de conservation, de stockage.
- La concentration en huiles utilisée.
- La diffusion des huiles à travers la gélose.
- L'état physiologique de la levure..etc.

4.2. La méthode de la microdilution en milieu liquide (CMI)

Tableau N°11 : Concentration minimale inhibitrice (CMI, mg/mL) des l'huiles étudiées.

Huile Levures	<i>Lawsonia inermis</i>	<i>Nigella sativa</i>	<i>Ricinus communis</i>	<i>Foeniculu m vulgare</i>	Antifongique Fungizone (0,1 mg/ml)
<i>Candida Albicans</i> ATCC 10231	0,39	1,56	0,39	3,12	0,015

Selon les résultats des tests quantitatifs de l'activité antifongique des huiles fixes mentionnés dans le **tableau N°11**, nous pourrions dire que l'huile de Henné et de Ricin ont montré une activité antifongique importante (0,39 mg/mL) vis-à-vis de la souche *C.albicans*. Cependant, cette activité reste nettement inférieure à celle de l'antifongique de référence : la fungizone.

On note que la l'amphotéricine B (fungizone®) est un antifongique qui rend la membrane fongique perméable et aboutit alors a la lyse cellulaire.

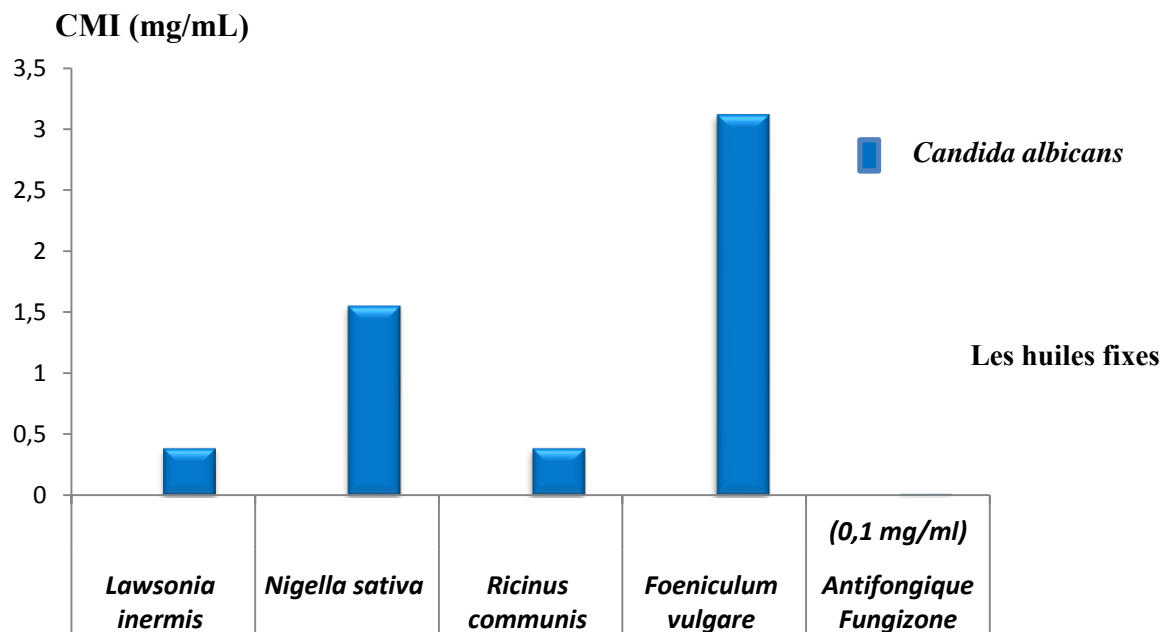


Figure N° 20:
Représentation graphique des CMI des huiles fixes étudiées vis-à-vis de la souche *C. albicans*

Selon la figure N°20 :

- Nos résultats obtenus avec *L. inermis* sont en accord avec des études antérieures réalisées par **Brigham et al., (1999)** et **Riffel et al., (2002)** qui portent sur les naphthoquinones naturelles et de synthèse et qui ont démontré que ces molécules inhibent la croissance de souches fongiques.
- D'après **Bedreddine, (2018)** l'huile de *Ricinus communis* possède une activité antifongique. Cela confirme l'intérêt de son utilisation dans l'industrie pharmaceutique.
- Nos résultats de l'activité antifongique des graines de *N.sativa* sont similaires à ceux de **Mahmoudvand (2014)**. Les résultats de ces études suggèrent une première étape dans la recherche de nouveaux médicaments antidermatophytes et facilitent l'utilisation des graines de *N. sativa* dans le traitement traditionnel des infections dermatophytiques.
- L'huile fixe de Fenouil a montré un effet antifongique. Des recherches faites sur les divers extraits de l'écorce de cette plante ont également rapporté une activité antifongique contre les *C. albicans* (**Bang et al., 2000**). Cet huile réduit également la croissance et la germination mycélienne du sclerotiorum de sclérotinie (**Rather et al., 2012**).
- L'activité antifongique pourrait également être liée à l'interférence des composants de l'huile dans des réactions enzymatiques de la synthèse de la paroi cellulaire, qui affecte la croissance fongique (**Carmo et al., 2008**).
- Concernant l'essai de microdilution en microplaques de 96 puits, les résultats obtenus pour la CMI sont pour la majorité en concordance avec les diamètres des zones d'inhibitions observées dans la méthode de diffusion par disque. D'autre part, toutes les huiles fixes testées ont montré une activité microbienne.
- Selon d'autres données de la littérature, la nature de la membrane cellulaire bactérienne et l'étendue des dommages membranaires produits par les huiles fixes sont aussi à prendre en compte pour expliquer les résultats obtenus. Certain huiles fixes, agissent comme tout agent antimicrobien et cible la paroi et la membrane de la cellule microbienne. Etant de nature lipophile, ces huiles passent à travers ces structures, perturbant les différents composants (polysaccharides, acides gras and phospholipides) et rendant ainsi la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique plus perméables. La fuite des macromolécules et ions provoquerait alors la lyse et la mort cellulaire.

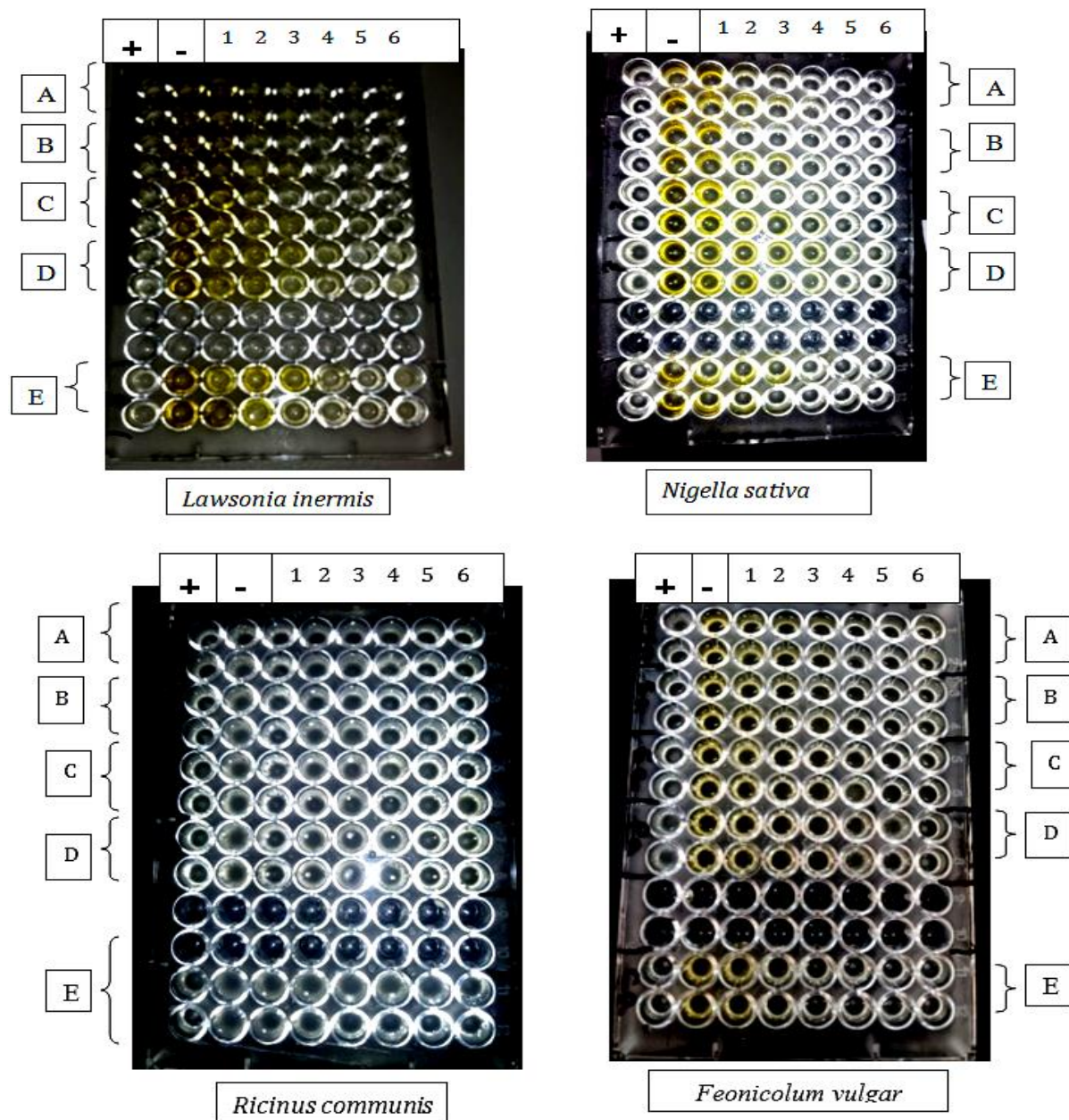


Figure N°21 : Les résultats des évaluations antibactériennes et antifongiques sur les huiles fixes de *Lawsonia inermis*, *Nigella sativa*, *Ricinus communis* et *Feoniculum vulgare*.

+ : témoin positive.

- : témoin négative.

A : *Staphylococcus aureus mrsa ATCC 43300*.

B : *Staphylococcus aureus ATCC 25923*.

C : *Escherichia coli ATCC 25922*.

D : *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853*.

E : *Candida Albicans ATCC 10231*.



Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de notre travail réside sur l'étude de la phytochimie et la détermination des propriétés physico-chimiques des huiles fixes. Nous nous sommes aussi intéressées d'évaluer leurs activités antimicrobiennes vis-à-vis des souches de références. Les quatre espèces végétales ayant fait l'objet de notre études, à savoir *Lawsonia inermis*, *Nigella sativa L*, *Ricinus communis L*, *Foeniculum vulgare* sont fréquemment utilisées dans la pharmacopée traditionnelle Algérienne et mondiale.

L'extraction des huiles fixes par soxhlet de ces plantes présente des rendements différents avec un taux élevé enregistré dans les graines de Ricin.

Les huiles fixes obtenues possèdent des propriétés organoleptiques (odeur, couleur et aspect) très appréciées en parfumerie et sont très convoitées en aromathérapie. On observe que la couleur des différentes huiles est nuancée entre le jaune-claire, le jaune et le marron. Les huiles de Ricin et de Fenouil présentent une odeur peu prononcée contrairement à l'huile de Henné et de Nigelle.

La détermination des caractéristique physiques des huiles fixes (densité relative, détermination de pH, et la miscibilité à l'éthanol) révèle qu'elles sont conformes aux normes établies par les différentes pharmacopées et proches de certains travaux antérieurs.

La détermination des indices chimique (indice d'acide, d'ester et de saponification) a montré certains renseignements sur la pureté de nos huiles fixes et sur la quantité des acides libres présents dans nos huiles.

Dans notre étude, l'activité antimicrobienne des huiles testées a été évaluée par deux méthodes de référence à savoir la méthode des disques diffusés sur gélose et la technique de microdilutions sur milieu liquide. Une bonne activité de ces huiles a été obtenue vis-à-vis des quatre souches bactériennes de référence et d'une seule souche de levure (*C. albicans* ATCC 10231). Nous remarquons qu'il ya une différence de sensibilité parmi les souches qu'il s'agisse de Gram positives ou Gram négatives.

Les huiles végétales fixes de Henné et de Ricin ont révélé les plus importantes activités bactéricides.

A la suite de ces résultats, il serait intéressant d'étendre l'éventail des tests antimicrobiens sur d'autres agents microbiens afin de confirmer leur efficacité. Comme il est indispensable de chercher de nouvelles substances antibactériennes efficaces et à large spectre d'action. L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active.













Conclusion générale












Partant de ces résultats, il est nécessaire d'approfondir l'étude phytochimique des huiles en utilisant des CPG/SM ;













- Faire un fractionnement de ces huiles pour savoir les molécules responsables de cette activité;
- Elargir la gamme des souches microbiennes ;
- Etablir des tests antibactériens, antioxydants et autres plus détaillés et plus avancés.
- Appliquer les techniques biotechnologiques dans le domaine des huiles et des métabolites secondaires à fin de tirer le maximum de ces molécules, et les utilisées pour l'intérêt de la santé humaine.





























Références bibliographiques













-  **Abdel-Fattah, A.M., Matsumoto, K., Watanabe, H., (2000)** Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone, in mice. *European journal of pharmacology*. 400: 89-97.
-  **Abu-Al-Basal. M., (2009).** *In vitro and in vivo* anti-microbial effects of *nigella sativa* linn. seed extracts against clinical isolates from skin wound infection . *American Journal of Applied Sciences* 6(8): 1440-1447.
-  **Abulyazid, I. Elsayed M.E. Mahdy b, Ragaa M. A, (2010).** Biochemical study for the effect of henna (*Lawsonia inermis*) on *Escherichia coli*. *Arabian Journal of Chemistry*, doi:10.1016/j.arabjc.2010.10.005(In press).
-  **Achour Tani, Y., (2013).** *Analyse de la politique économique algérienne* (Doctoral dissertation, Paris 1).
-  **AFNOR, (2000).** Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthode d’analyse 471 P. Tome 2 – Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles 323 P.
-  **Ağaoğlu S., Dostbil N., et Alemdar S., (2007).** Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. *Bull Vet Inst Pulawy* 51, pp.53-57.
-  **Ahmad A.M., Khokhar I., Ahmad I., Kashmiri M.A., Adnan A. et Ahmad M., (2006b).** Study of antimicrobial activity and composition by GC/MS spectroscopic analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum*. *Internet Journal of Food Safety*, Vol. 5, pp.56-60.
-  **Ahmed, H., et Nawel O., (2015).** Phytochemical studies and antioxidant activities of *adiantum capilus-veneris*, *lavandula stoechas* and *ajuga iva*.
-  **Akpan, U. G., Jimoh, A., & Mohammed, A. D. (2006).** Extraction, characterization and modification of castor seed oil. *Leonardo Journal of Sciences*, 8, 43-52.
-  **Ali, B.H., Blunden, G., (2003)** Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytotherapy research*. 17 : 299-305.
-  **Alloune R., Liazid A. et Tazerout M., (2012).** Etudes comparatives de deux plantes oléagineuses locales pour la production du biodiesel en Algérie.
-  **Alloune, R., Liazid, A., et Tazerout, M., (2012).** Etudes comparatives de deux plantes oléagineuses locales pour la production du biodiesel en Algérie. *Revue des Energies Renouvelables SIENR*, 12, 19-22.













-  **Anosike, E. O. et Chibogwu K. E., (1981).** Biochemical changes during the fermentation of castor oil (*Ricinus communis*) seeds for use as a seasoning agent. *Plant Fd. Hum. Nutr.* 30: 181-185.
-  **Anwar F., Ali M., Hussain A.I., et Shahid M., (2009).** Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare Mill.*) seeds from Pakistan. *Flavour Fragr. J.* 24: 170–176.
-  **Aslania M.R., Malekib M., Mohria M., Sharifia K., Najjar V.N., Afshari E., (2007).** Castor bean (*Ricinus communis*) toxicosis in a sheep flock. *Toxicon.* 49: 400–406.
-  **Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., et Khebri, S., (2010).** Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum L.* *Lebanese science journal*, 11(1), 69-81.
-  **Azag, R., Makhlouf, L., & Smail, L. E., (2014).** Essai de fabrication d'un savon a base de l'huile d'olive et de nigelle.
-  **Badoc A., Amimar Z., Lamarti A. et Deffieux G., (1998).** Action de la colchicine lors de la micropropagation du fenouil (*Foeniculum vulgare Mill.*) sur l'huile essentielle des fruits. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 137, pp. 25-36.
-  **Bagamboula C.F., Uyttendaele M. and Debevere J., (2004).** Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology* 21: pp. 33-42.
-  **Bahorun T., (1997).** Substances Naturelles Actives: La Flore Mauricienne, Une Source D'approvisionnement Potentielle. AMAS. Food and Agricultural Research Council. Réduit. Mauritius.
-  **Beddou, F., Bekhechi, C., Ksouri, R., Chabane Sari, D., Atik Bekkara, F., (2016).** Potential assessment of *Rumex vesicarius L.* as a source of natural antioxidants and bioactive compounds. *J. Food Sci. Technol.*,
-  **Bedreddine, S., Benhamla, O., & Belhamel, K., (2018).** Evaluation des activités anti oxydantes et antimicrobiennes des extraits d'une plante médicinale (*Ricinus communis L.*) (Doctoral dissertation, Université Abderrahmane Mira-Bejaia).
-  **Belabid, H., (2014).** *Contribution à l'étude physiochimique de l'huile de: nijella sativa (nigelle) et de son pouvoir antimicrobien* (Doctoral dissertation).

-  **Belbache, H., (2003).** Investigation phytochimiques de l'extrait chloroforme de *Centaurea Parviflora Desf*, mémoire de magister en chimie organique, université Mentouri Constantine. p 16-20.
-  **Beloued A., (1998).** Plantes médicinales d'Algérie. Ed Office des publications universitaires, Alger, 274 p.
-  **Belyagoubi-Benhamou N., Belyagoubi, L., Bekkara, F. (2014).** Phenolic contents and antioxidant activities *in vitro* of some selected Algerian plants. *Journal of medical plant research*, 8(40), 1198-1207.
-  **Benabdallah, F. Z., (2012).** *Etude morphologique des feuilles et des fruits du pistachier de l'atlas (Pistacia atlantica Desf.) et valorisation des huiles essentielles des feuilles et de l'oléorésine* (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider-Biskra).
-  **Benabid H., (2009)** Caractérisation de l'huile d'olive algérienne Apports des méthodes chimiométriques. *Thèse de doctorat (Sciences Alimentaires) Université Mentouri de Constantine, Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires.*
-  **Benkaci-Ali, F., Baaliouamer, A., Meklati, B.Y., (2006)** Kinetic study of microwave extraction of essential oil of *Nigella sativa L.* seeds. *Chromatographia*. **64**: 227-231.
-  **Bolla JM, Alibert-Franco S., Handzlik J, Chevalier J., Mahamoud A., Boyer G., Kiec- Kononowicz K., et Pages JM ., (2011).** Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. **585**, 1682-1690.
-  **Bonnier, G., (1990).** La grande flore en couleur. Ed Belin, Paris. Tome 1. p 17.
-  **Botte J., (2001).** Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, Hong Kong, 335P.
-  **Bouaita, S., (2017).** *Extraction et caractérisation des huiles essentielles du myrte vert sauvage* (Doctoral dissertation, Université Abderrahmane Mira).
-  **Bouchet P.H., Guignard J.L. Pou chus Y.F., Villard J., (2005)** Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. Abrégés de Pharmacie, Paris : Masson.
-  **Bouguerra, A., (2012).** Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *foeniculum vulgare* Mill.













-  **Boutine, D., (2011)** ; évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne d'une plante endémique algérienne *Ampelodesma mauritanica*. Mémoire l'obtention du diplôme de magister.p9.
-  **Brigham, L.A., Michaels, P.J et Flores, H.E., (1999)**. Cell-Specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Physiol.* 119, 417–428.
-  **Bruneton J., (1999)**. Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales, 3ème édition, Paris : Editions médicales internationales, Tec et Doc, Lavoisier, 1120p.
-  **Bruneton, J., (2009)**. *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales*. 4e Ed : Lavoisier ; Paris. P.1269.
-  **Carmo E.S., Lima E.D.O. and De Souza E.L., (2008)**. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: pp.362-367 .
-  **Chakravarty, N., (1993)** Inhibition of histamine release from mast cells by nigellone. *Annals of allergy.* **70** : 237-242.
-  **Chauhan MG. and Pillai APG., (2007)**. Microscopic Profile of Powdered Drugs Used in Indian Systems of Medicine. Vol.-II- Leaf drugs. Gujarat Ayurveda University, Jamnagar, Gujarat.
-  **Colette K., (2004)**. Les plantes médicinales. ALS (séance du 25 Avril 2004). P58.
-  **Combe N, Rossignol-Castera A., (2010)**. Vegetable oils and frying composition, antibacterial and antifungal properties of Tunisian *Nigella sativa* fixed oil. *Cahiers de nutrition et diététique.* (45) : 44-51.
-  **Coopman, V., Marc, D. L., Cordonnier, J., Werner, J., (2009)**. Suicidal death after injection of a castor bean extract (*Ricinus communis* L.). *Forensic Sci. Internatl.*189:e13–e20.
-  **Couplan, F., Styner, E. , (1994)**. Guides des plantes sauvages : comestibles et toxiques (1994), Paris, pp : 36.
-  **Cowan M.M., (1999)**. Plant product as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews.* 12 (4), 564-582.
-  **Debuigne G. et Couplan F., (2009)**. Petit Larousse des Plante Médicinales. Ed. Paris : de Bamako.neutrophils under flow conditions. *J. Immunol*, 158, 4879-4885.
-  **Decaux, I., (2002)**. *Phytothérapie : Mode d'emploi*. Ed : Le bien public. Pp 6.













-  **Diaaz-Maroto M.C., Pearez-Coello M.S., Esteban J. et Sanz J., (2006).** Comparison of the volatile composition of wild fennel samples (*Foeniculum vulgare* Mill.) from Central Spain. *J. 48 Agric. Food Chem.* 54, 6814-6818.
-  **Djahra A, B., (2014).** Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydants, antihépatotoxique du marrube blanc ou *Mrrubium vulgare* L. Thèse de doctorat de biologie végétale. Université Badji mokhtar-ANNABA.Algérie, 15p.
-  **Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014).** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), 296-302.
-  **Etchike, C. A., Sassa A. M., (2011).** "Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne de cinq plantes de la pharmacopée traditionnelle de l'Adamaoua (Cameroun)." *Cameroon Journal of Experimental Biology* 7(1): 22-27.
-  **Fagbohoun, L., (2014).** Etude chimique de colorants naturels et matériaux résineux traditionnels au Bénin dans le domaine artisanal. Avignon.
-  **Fararh, K. M., Atoji, Y., Shimizu, Y., Shiina, T., Nikami, H., & Takewaki, T., (2004).** Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters. *Research in veterinary science*, 77(2), 123-129.
-  **Flandrois, J.C, Courco, L, Lemeland , J.F., Ramuc, M,Sirot, J.et Souny, C.J., (1997).** Bactériologie médicale. Presses Universitaire de Lyon . ISBN 2 7297 0567 8.
-  **Garland, T., Bailey, E. M., (2006):** Toxins of concern to animals and people. *Rev. sci. tech.Off. int. Epiz.* 25(31):341-351.
-  **Garnero, J., (1991).** Les huiles essentielles, leurs obtentions, leurs compositions, leurs analyses et leurs normalisations. *Ed. Techniques, Encycl. Med-Nat.(Paris, France)*.
-  **Gogny . M, Puyt .J.D, Pellerin .J.L., (2001)** Classification des principes actifs. L'arsenal thérapeutique vétérinaire, Editions le point vétérinaire. P165-168.
-  **Guignard, J.L., (2001).** Botanique systématique moléculaire. 12 ème édition Masson (Paris), 304p.
-  **Gulfraz M., Mehmood S., Minhas N., Jabeen N., Kausar R., Jabeen K. and Arshad G., (2008).** Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (24), pp.4364-4368.












-  **Hamdi Pacha. Y, Benazzouz. M, Belkhiri. H., (1998).** Effet cicatrisant de *Lawsonia inermis* dans les brûlures du 3ème degré. *Revue Med. Pharm. Afr.* Vol 11-12 pp151-157.
-  **Hammer K. A., Carson C. F., & Riley T. V., (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* Vol. 86, Issue 6: pp.985-990.
-  **Haq, A., Abdullatif, M., Lobo, P.I., Khabar, K.S.A., Sheth, K.V., Al-Sedairy, S.T., (1995)** *Nigella sativa* : effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte phagocytic activity. *Immunopharmacology.* **30**: 147-155.
-  **Harley, S., Beever, H. (1986).** Lectins in Castor Bean Seedlings. *Plant Phys.* 80: 1-6.
-  **Harwoode J., et Aparicio R., (2000).** Handbook of olive oil- Analysis and properties, An Aspen publication, Ed. Aspen Publishers Inc. Gaithersburg, Maryland, USA, 620p.
-  **Harzallah H.J., Noumi E., Bekir K., Bakhrouf A., Mahjoub T. (2012).** Chemical composition, antibacterial and antifungal properties of Tunisian *Nigella sativa* fixed oil. *African Journal of Microbiology Research*, 6 (22) : 4675-4679.
-  **Hathaway, S. C., (1993).** Risk assessment procedures used by the Codex Alimentarius Commission and its subsidiary and advisory bodies. *Food Control*, 4(4), 189-201.
-  **Hermann, T., (2005).** Drugs targeting the ribosome .*Current opinion in Microbiology.*15,355-366.
-  **Inouye, S., Tsuruoka, T., Uchida, K., Yamaguchi, H., (2001).** *Microbiol. Immunol.*, 43, pp.201– 208. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. *Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs.* Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.
-  **Inouye, S., Tsuruoka, T., Uchida, K., Yamaguchi, H., (2001).** *Microbiol. Immunol.*, 43, pp.201– 208. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. *Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs.* Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.
-  **Iserin, P. (2001).** *Encyclopedie des plantes medicinales.* Ed : Larousse Bourdasse Paris, p.335.
-  **Kadambi K.,Dabral S.N. (1955).** The silviculture of *Ricinus communis* L. *Ind. Forester.*8(1):53-58.








-  **Kamni A., Senouci Berekxi M., (2015).** Effet inhibiteur de certains extraits hydrométhanoliques et huiles essentielles de plantes médicinales sur des espèces bactériennes résistantes aux antibiotiques. Mémoire de Master en biologie (Sciences des aliments). Université de Tlemcen.
-  **Karleskind, A., (1992).** Détermination des caractéristiques physiques des corps gras. *Mauel des corps gras*, 2, 1290.
-  **Khanna, T., Zaidi, F.A., Dandiya, P.C. (1993)** CNS and analgesic studies on *Nigella sativa*. *Fitoterapia*. **64**: 407-410.
-  **Kiritsakis A.K., Christie W.W., (2000).** Analysis of Edible Oils. In: Handbook of Olive Oil - Analysis and Properties - An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland,USA, pp 129-158.
-  **Kökdil, G., & Yılmaz, H., (2005).** Analysis of the fixed oils of the genus *Nigella* L.(Ranunculaceae) in Turkey. *Biochemical systematics and ecology*, 33(12), 1203-1209.
-  **Kumara, S.S., Huat, B.T., (2001)** Extraction, isolation and characterization of antitumor principle, alpha-hederin, from the seeds of *Nigella sativa*. *Planta medica*. **67**: 29-32.
-  **Lecerf, J.-M., (2011)** Les huiles végétales particularités et utilités. Médecine des maladies Métaboliques (5) 3, 257-262.
-  **Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M., (1995).** La bactérie et le monde bactérien, DOIN, Microbiologie générale, Paris, 517p.
-  **Linnée C., (1753).** Systema naturae per regna tria naturae. Edition 10. Vol.1.Holmiae: 824 p.
-  **Little, E.L. et Wadsworth, F.H., (1974).** Trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. Agriculture Handbook. 449. U.S. Depart. Agricul. Forest. Serv. Washington,DC. 2.
-  **Lozniewski A, Rabaud C et Nancy., (2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Infections associées aux soins .CCLIN Sud-Est.
-  **Mahmoudvand, H., Sepahvand, A., Jahanbakhsh, S., Ezatpour, B., & Mousavi, S. A. (2014).** Evaluation of antifungal activities of the essential oil and various extracts of *Nigella sativa* and its main component, thymoquinone against pathogenic dermatophyte strains. *Journal de mycologie medicale*, 24(4), e155-e161.

- 📖 **Mario M., Esp.rito S., (2007).** Secondary seed dispersal of *Ricinus communis* Linnaeus (Euphorbiaceae) by ants in secondary growth vegetation minas gerais. R. Árvore Viçosa- MG.31 (6):1013-1018.
- 📖 **Maroyi A. (2007).** *Ricinus communis* L. In: van der Vossen, H.A.M. & Mkamilo, G.S.(Editeurs). PROTA 14: Vegetable oils/Oleagineux. PROTA, Wageningen, Pays Bas.
- 📖 **Martin A. (2001)** Apports Nutritionnels Conseillés (ANC) pour la population française. 3ème édition. *Editions Tec & Doc.(LECERF and VANCASSEL 2011)*.
- 📖 **Matyara F, Kayab A et Dinçerb Sk. (2008).** Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Science of the Total Environment.* **407**, 279-285.
- 📖 **Merfort, I., Wray, V., Barakat, H., Hussein, S.A.M., Nawwar, M.A.M., Willuhn, G., (1997)** Flavonol triglycosides from seeds of *Nigella sativa*. *Phytochemistry.* **46**: 359-363.
- 📖 **Mevius, D.J, Rutter J.M, Hart C.A, Imberenchts H, Kempf-Laafont G, (1999).**Antibiotic resistance in the European Union associates with therapeutic use of veterinary medicines .Report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary medicinal products, Editions Le point vétérinaire.p1-57.
- 📖 **Mezni, F., Maaroufi, A., Msallem, M., Boussaid, M., Khouja, M. L., et Khaldi, A. (2012).** Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial activities of Pistacia lentiscus L. fruit oils. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(39), 5266-5271.
- 📖 **Mogode D, (2005).** « Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchd » .Université
- 📖 **Mohsenzadeh, M., (2007).** Evaluation of antibacterial activity of selected Iranian essential oils against Staphylococcus aureus and Escherichia coli in nutrient broth medium. *Pak. J.Biol. Sci.* 10, 3693–3697.
- 📖 **Munshi, S. R., Shetye, T. A., & Nair, R. K., (1977).** Antifertility activity of three indigenous plant preparations. *Planta medica*, 31(01), 73-75.
- 📖 **Musa, A. E., & Gasmelseed, G. A., (2012).** Characterization of Lawsonia inermis (Henna) as vegetable tanning material. *Journal of forest products & industries*, 1(2), 35-40.

-  **Musa, D., Dilsiz, N., Gumushan, H., Ulakoglu, G. And Bitiren, M., (2004).** Antitumor activity of an ethanol extract of *Nigella sativa* seeds. *Biologia, Bratislava*. **59**: 735-740.
-  **Nergiz, C., Otles, S., (2003).** Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry*. **83**: 63-68.
-  **Odile P, (2008).** Le masque dans la société béninoise. *Revue Teheran* N°33.
-  **Ogawara ,H., (1981).** Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to betalactam antibiotics. *Microbial. Rev.* 45 (4), 591-619.
-  **Orsi – Llinares, F, (2005).** La nigelle, une épice d'intérêt médicamenteux. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Joseph Fourier. Faculté de Pharmacie De Grenoble.
-  **Ouattara B., Simard R.E., Holley R.A., Piette G.J.P. and Begin A., (1997).** Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol*, 37, pp.155-162.
-  **Oxoby, M, (2002.)** Etudes sur la synthèse totale des antibiotiques naturels de la famille des angucyclinones , Thèse de docteyre en chimie organique de l'université Bordeaux I, école doctorale des sciences chimique p3-12.
-  **Pérez-Fernández, M. A., Calvo-Magro, E., Montanero-Fernández, J., & Oyola-elasco, J. A. (2006).** Seed germination in response to chemicals: Effect of nitrogen and pH in the media. *Journal of environmental biology*, 27(1), 13.
-  **Perry J, W. G., (1999).** *Forms of Intellectual and Ethical Development in the College Years: A Scheme.* Jossey-Bass Higher and Adult Education Series. Jossey-Bass Publishers, 350 Sansome St., San Francisco, CA 94104.
-  **Piochon, M., (2008).** *Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse.* Université du Québec à Chicoutimi.
-  **Poonam, S., Prachi, A., Krishna Murali, Y., Vibha, T., (2008).** Antidiabetic activity of 50% ethanolic extract of *Ricinus communis* and its purified fractions. *Fd Chem. Toxicol.* 46: 3458–3466.
-  **Poumarat, F., & Martel, J. L., (1989).** Antibio-sensibilité in vitro des souches françaises de *Mycoplasma bovis*. In *Annales de Recherches Vétérinaires* (Vol. 20, No. 2, pp. 145-152).

-  **Rahimi R., Ardekani M.R., (2013).** Medicinal properties of *Foeniculum vulgare* Mill.in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy. *Chin J Integr Med.* 2013;19(1):73-9.
-  **Rahmoun, M. N., (2008).** Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de produits dérivés de la lawsone.
-  **Ramadan, M. F., Mörsel, J.T., (2002b).** Direct isocratic normal-phase HPLC assay for fat soluble vitamins and β -carotene in oil seeds. *European food research and technology.* **214:** 521-527.
-  **Ramadan, M.F., Mörsel, J.T., (2002a)** Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil. *Nahrung Food.* **46:** 240-244.
-  **Rather M (2012).** *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phyto-chemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry.* .page3_4.
-  **Rather M.A., Dar B.A., Sofi S.N., Bhat B.A. Qurishi M.A. (2012).** *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry.*..
-  **Riffel, A., L.F. Medina, V. Stefani, R.C. Santos, D. Bizani and Brandelli A., (2002).** *In vitro* antimicrobial activity of a new series of 1, 4-naphthoquinones. *Braz. J. Med Biol Res.*, 35: 811-18.
-  **Sailaja M., Tarakeswari M., Sujatha M., (2008).** Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis* L.) via particle gun-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. *Plant Cell. Rep.* 27: 1509–1519.
-  **Sanago R., (2006).** Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako(Mali): 53.
-  **Sarita. G. Mohd .A. Sarwar. A. (1991).** Etycholest 4 en 3 *b* ol from the roots of *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry*, vol 31 n° 7 PP 2558-2560.
-  **Seddik. M., (2010).** *Analyse physico-chimique, chromatographique et spectroscopique de l'huile essentielle d'Ammodendron verticillata de la région d'Adrar: Etude de son activité biologique et anti-oxydante* (Doctoral dissertation, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella).
-  **Shamkant B, Badgujar B., (2014).** *Foeniculum vulgare* Mill : A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and

- Toxicology. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*; Article ID 842674, 32.
-  **Sharma, M., Langrana, N. A., & Rodriguez, J., (1995).** Role of ligaments and facets in lumbar spinal stability. *Spine*, 20(8), 887-900.
-  **Sharma., Tanu Khan., Absar, M., (2013).** Toxic effect of neem (*Azadirachta indica*) extracts against the eggs and adults of *Dysderus koenigii* (*Fabricius*).
-  **Shivananda N. B., Isitor.G., Davis. E. M. et Pillai. G. K., (2007).** The Evidence based Wound Healing Activity of *Lawsonia inermis* Linn. *Phytotherapy Research*; 21, 827— 831.
-  **Singh B. & Kale R.K. (2008).** Chemomodulatory action of *Foeniculum vulgare* (Fennel) on skin and forestomach papilloma genesis, enzymes associated with xenobiotic metabolism and antioxidant status in murine model system. *Food and Chemical Toxicology* 46 : 3842–3850.
-  **Singh, K.V, Malathum, K, Murray, B.E, (2001).** Disruption of an *Enterococcus faecium* species specific gene, a homologue of acquired macrolide resistance genes of *staphylococci* , is associated with an increase in macrolide susceptibility, antimicrob. Agents chemother.45,263-266.
-  **Souza E.L., Stamford T.L.M. and Lima E.O., (2006a).** Sensitivity of spoiling and pathogen foodrelated bacteria to *Origanum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: pp.527-532.
-  **Teucher E., Anton R. & Lobstein A. (2005).** Plantes aromatiques (Epices, aromates, condiments et huiles essentielles). Ed : Tec et Doc. Lavoisier.
-  **Thabrew, M.I., Mitry, R.R., Morsy, M.A., Hughes, R.D. (2005)** Cytotoxic effects of a decoction of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax glabra* on human hepatoma HepG2 cells. *Life Sciences*. 77: 1319-1330.
-  **Upadhyay R.K., Dwivedi P. and Ahmad S., (2010).** Screening of antibacterial activity of six plant essential oils against pathogenic bacterial strains. *Asian Journal of Medical Sciences* 2 (3) : pp.152-158.
-  **Van Hellemont.J. (1986).** Compendium de phytothérapie. Adaptation française. Marc DELFOSSE. pp 227-228.
-  **Vanden Berghe .D.A et Vlietinck. A.J., (1991).** Serening Methods for antibacterial and antirival agent from higher plants. *Methods in plants Biochgmistry* vol 6 pp 47-54.

-  **Vasudevan T.N et Laddha K.S., (2003).** Herbal drug microscopy. Ed. n 1, Yucca publishing house, Dombivli., pp : 68-69.
-  **Wichtl M. & Anton R. (2003).** Plantes thérapeutiques. Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Ed : Tec et Doc. Lavoisier. Paris.
-  **Wichtl M., (1999).** Plantes thérapeutiques: Tradition, pratique officinale. Science et thérapeutique 3ème édition. Edition française par Robert Anton. *Technique et documentation.* p: 262-264.
-  **Wolff M., (1968).** Manuel d'analyse des corps gras. Ed. Azoulay, Paris.
-  **Wong K. C. et Teng Y. E., (1995).** Volatile components of *Lawsonia inermis L.* flowers. *Journal of Essential Oil Research;* 7: 425-8.
-  **Zebz, B, (2005).** Overview of B-lactamase incidence on bacterial drug resistance *.African journal of biotechnology,*4 (13),1559-1562.
-  **Zoubiri S., (2014).** Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *Foeniculum vulgare* seed essential oil. *Arabian Journal Of Chemistry;* 7:480-485.



Annexes

Les milieux de culture

- **Bouillon Mueller Hinton (Fluka, BioChemika):**

Composition	Quantité
Peptone de caséine	17,5 g
Extrait de viande	4,0 g
Amidon	1,5 g
Eau distillée	1L

pH= 7,4 ($\pm 0,2$) à 37°C.

Suspendre 23 g de la poudre dans un litre d'eau distillée, ensuite stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

- **Gélose Mueller Hinton (Fluka, BioChemika):**

Compositions	Quantité
Mueller Hinton	38 g
Eau distillée	1 L

pH= 7,4 ($\pm 0,2$) à 37°C.

Suspendre 38g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

- **Préparation de la Gélose Nutritive (GN) : (Fluka, BioChemika)**

Composition	Quantité
Extrait de viande de boeuf	1,0 g
Extrait de levure	2,0 g
Peptone	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	15,0 g
Eau Distillée	1L

pH = 7,2 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre 28 g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

- **Gélose Sabouraud (Fluka, BioChemika)**

Composition	Quantité
Peptone pepsique	10 g
Glucose	20 g
Agar	15 g
Eau distillée	1 L

pH=5,8 ($\pm 0,2$) à 37°C.

Suspendre 45 g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

- **Bouillon Sabouraud (Fluka, BioChemika):**

Composition	Quantité
Tryptone	5,0 g
Peptone pepsique de viande	5.0 g
Glucose	20.0 g
Eau distillée	1 L

pH= 5,8 ($\pm 0,2$) à 37°C.

Suspendre 30 g de la poudre dans un litre d'eau distillée, chauffer si c'est nécessaire pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.