

## *ABREVIATIONS*

AAPH	2,2'-azobis(2amidinopropane)dihydrochloride
ABTS <sup>+</sup>	Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique
Ac.	Acide
ADP	Adénosine diphosphate
AFNOR	Association Française de Normalisation
AGL	Acides gras libres
ATCC	American Type Culture Collection
atm	Atmosphère
ATP	Adénosine triphosphate
BHA	Butylhydroxyanisole
BHT	Butylhydroxytoluène
BN	Bouillon Nutritif
CCLS	Coopérative de Céréales et de Légumes Secs
CG	Chromatographie en phase gazeuse
CG/SM	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CL <sub>50</sub>	Concentration létale qui provoque 50% de mortalité
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CNI	Colloïdes Naturels International
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
DCT	Détecteur de conductivité thermique
DIC	Détente instantanée contrôlée
DIF	Détecteur à ionisation de flamme
DL <sub>50</sub>	Dose létale qui provoque 50% de mortalité
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazine
DRX	Diffractogrammes des rayons X
EC <sub>50</sub>	Concentration efficace pour réduire 50% la concentration initiale de DPPH
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GHz	Giga Hertz
GN	Gélose nutritive pyrophosphate d'isopentén-3yle
HD	Hydro-distillation
HE	Huile essentielle
HEs	Huiles essentielles
HE– HD	Huile essentielle extrait par hydro-distillation
HE–SFME	Huile essentielle extraite par extraction sans solvant assistée par micro-ondes
HO	Huile d'Olive
I	Inhibition
IR	Indice de rétention
IRL	Indice de rétention linéaire
Kg	kilogramme
KHz	Kilo Hertz
KW	Kilo Watt
m/m	Masse de soluté/Masse de solution
m/z	Masse sur charge
MEB	Microscope électronique à balayage
MEP	Méthylérythritol phosphate

mg	Milligramme
MH	Mueller Hinton
MHz	Méga Hertz
min	Minute
mL	Millilitre
mm	Millimètre
MVA	Acide mévalonique
NADPH	Nicotine Adénine Dinucléotide Phosphate
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Assay
pH	Potentiel d'hydrogène
PPG	Pyrophosphate de géranyle
PPI <sub>2</sub>	Pyrophosphate de diméthylallyle
PPI <sub>3</sub>	Pyrophosphate d'isopentén-3yle
Rdt	Rendement
SD	Standard de déviation
SFME	Solvent Free Microwave Extraction (Extraction sans solvant assistée par micro-ondes)
SM	Spectrométrie de masse
Std	Standard chimique
TA	Température ambiante
TBHQ	Tert-butyl-hydroquinone
TEAC	Trolox Equivalent Antioxydant Capacity
THD	Turbo hydro-distillation
TPM	Matériaux polaires totaux
TPTZ-Fe <sup>3+</sup>	Tripyridyltriazine ferrique
TPTZ-Fe <sup>2+</sup>	Tripyridyltriazine ferreux
tr	Trace
tr/min	Tour par minute
UFC	Unité formant colonie
μ	Micro
μL	Microlitre

## *Liste des figures*

<i>Chapitre I</i>	<b>Page</b>
<b>Figure I.1 :</b> <i>Monoterpènes acycliques et cycliques rencontrés dans les huiles essentielles.</i>	11
<b>Figure I.2 :</b> <i>Sesquiterpènes rencontrés dans les huiles essentielles.</i>	12
<b>Figure I.3 :</b> <i>Phénylpropanoïdes rencontrés dans les huiles essentielles.</i>	13
<b>Figure I.4 :</b> <i>Structure de l'acétylCoenzyme A.</i>	14
<b>Figure I.5 :</b> <i>Schéma général de la biosynthèse des terpènes par la voie de l'acide mévalonique.</i>	17
<b>Figure I.6 :</b> <i>Schéma général de la biosynthèse des terpènes par la voie du méthylérythritol phosphate.</i>	18
<b>Figure I.7 :</b> <i>Exemple de la biosynthèse d'un dérivé du phénylpropane : acide cinnamique.</i>	19
<b>Figure I.8 :</b> <i>Procédés d'extraction conventionnels des produits bioactifs.</i>	20
<b>Figure I.9 :</b> <i>Schéma de montage de l'entraînement à la vapeur d'eau.</i>	21
<b>Figure I.10 :</b> <i>Schéma du dispositif de l'hydro-diffusion.</i>	22
<b>Figure I.11 :</b> <i>Schéma de montage de l'hydro-distillation.</i>	22
<b>Figure I.12 :</b> <i>Photo du dispositif de l'expression à froid.</i>	23
<b>Figure I.13 :</b> <i>Photos du dispositif de l'enfleurage à froid.</i>	24
<b>Figure I.14 :</b> <i>Procédés d'extraction récents des produits bioactifs.</i>	26
<b>Figure I.15 :</b> <i>Schéma du procédé de la Turbo Hydro-distillation.</i>	27
<b>Figure I.16 :</b> <i>Schéma du procédé de l'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique.</i>	28
<b>Figure I.17 :</b> <i>Appareillage du procédé de l'extraction par DIC.</i>	29
<b>Figure I.18 :</b> <i>Schéma démonstratif de la cavitation ultrasonore.</i>	30
<b>Figure I.19 :</b> <i>Spectre électromagnétique.</i>	31
<b>Figure I.20 :</b> <i>Mécanismes de base de transfert de chaleur et de masse dans l'extraction classique et par micro-ondes des produits naturels.</i>	32
<b>Figure I.21 :</b> <i>Schéma de montage de l'hydro-distillation assistée par micro-ondes.</i>	33

<b>Figure I.22 :</b> <i>Extraction par solvant assistée par micro-ondes.</i>	34
<b>Figure I.23 :</b> <i>Schéma de montage de l'hydro-diffusion assistée par micro-ondes et gravité.</i>	35
<b>Figure I.24 :</b> <i>Schéma de montage de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME).</i>	36
<b>Figure I.25 :</b> <i>Avantages et inconvénients des différents procédés d'extraction conventionnels et innovants.</i>	39

<b>Chapitre II</b>	<b>Page</b>
--------------------	-------------

<b>Figure II.1 :</b> <i>Répartition géographique du basilic.</i>	51
<b>Figure II.2 :</b> <i>Schéma de montage de l'hydro-distillation.</i>	55
<b>Figure II.3 :</b> <i>Schéma de montage de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes.</i>	56
<b>Figure II.4 :</b> <i>Cinétique d'évolution de la température au cours de l'extraction de l'HE de basilic par HD et SFME.</i>	57
<b>Figure II.5 :</b> <i>Cinétique d'évolution du rendement en HE de basilic au cours de l'extraction par HD et SFME.</i>	58

<b>Chapitre III</b>	<b>Page</b>
---------------------	-------------

<b>Figure III.1 :</b> <i>Schéma d'identification et de quantification des constituants de l'HE de basilic.</i>	70
<b>Figure III.2 :</b> <i>Répartition en % des principales familles de composés de l'HE de basilic extraite par HD et SFME.</i>	73
<b>Figure III.3 :</b> <i>Répartition en % des principaux composés de l'HE de basilic extraite par HD et SFME.</i>	74

<b>Chapitre I'</b>	<b>Page</b>
--------------------	-------------

<b>Figure I'.1 :</b> <i>Principales localisations des sites d'action des constituants des HEs d'après Nazzaro et al.</i>	86
<b>Figure I'.2 :</b> <i>Principe de la méthode de diffusion sur disques.</i>	90
<b>Figure I'.3 :</b> <i>Schéma du protocole de détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode des disques.</i>	92
<b>Figure I'.4 :</b> <i>Schéma du protocole de détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode des dilutions (CMI).</i>	94
<b>Figure I'.5 :</b> <i>Effet de l'HE de basilic extraite par HD et SFME sur la croissance d'Escherichia coli (ATCC 25922).</i>	97

<b>Figure I'.6 :</b> Effet de l'HE de basilic extraite par HD et SFME sur la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 14028).	97
<b>Figure I'.7 :</b> Effet de l'HE de basilic extraite par HD et SFME sur la croissance de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633).	99
<b>Figure I'.8 :</b> Effet de l'HE de basilic extraite par HD et SFME sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538).	99
<b>Figure I'.9 :</b> Effet de l'HE de basilic extraite par HD et SFME sur la croissance de <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231).	100
<b>Figure I'.10 :</b> Diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes testées vis-à-vis de l'HE de basilic extraite par HD et SFME.	104
<b>Figure I'.11 :</b> Concentration minimale inhibitrice (CMI) des souches microbiennes testées vis-à-vis de l'HE de basilic extraite par HD et SFME.	105

<b>Chapitre II'</b>	<b>Page</b>
---------------------	-------------

<b>Figure II'.1 :</b> Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante par piégeage de différents radicaux.	112
<b>Figure II'.2 :</b> Forme libre et réduite du DPPH.	114
<b>Figure II'.3 :</b> Protocole de détermination de l'activité antioxydante par le test au DPPH.	118
<b>Figure II'.4 :</b> Photo et représentation schématique du testeur d'huile de friture « testo 270 ».	119
<b>Figure II'.5 :</b> Schéma du protocole de test de friture de l'HE de basilic.	120
<b>Figure II'.6 :</b> Evaluation de l'activité antioxydante de l'HE de basilic extraite par HD et SFME.	121
<b>Figure II'.7 :</b> Evaluation de la couleur d'huile d'olive imprégnée d'HE de basilic (HD et SFME) au cours du chauffage à 180°C.	123
<b>Figure II'.8 :</b> Evaluation des valeurs des TPM au cours du chauffage à 180°C d'HO et de l'HO avec l'HE de basilic extraite par HD et SFME.	124

<b>Chapitre III'</b>	<b>Page</b>
----------------------	-------------

<b>Figure III'.1 :</b> Trois principales espèces ravageuses des denrées stockées appartenant aux Coléoptères.	133
<b>Figure III'.2 :</b> Morphologie des Coléoptères.	134
<b>Figure III'.3 :</b> Cycle de vie de <i>Tribolium castaneum</i> (Hbst).	136
<b>Figure III'.4 :</b> Cycle de vie de <i>Sitophilus oryzae</i> L.	138
<b>Figure III'.5 :</b> Cycle de vie de <i>Rhyzopertha dominica</i> (Fab.).	140

<b>Figure III'.6 :</b> <i>Echantillons de l'HE d'O. basilicum extraite par HD et SFME en poudre après lyophilisation.</i>	141
<b>Figure III'.7 :</b> <i>Étude de l'activité insecticide par la technique de toxicité par effet de contact direct.</i>	142
<b>Figure III'.8 :</b> <i>Étude de l'activité insecticide par la technique de toxicité par effet d'ingestion.</i>	142
<b>Figure III'.9 :</b> <i>Traitement des insectes par la technique de toxicité par contact direct avec l'HE encapsulée.</i>	144
<b>Figure III'.10 :</b> <i>Traitement des insectes par la technique de toxicité par ingestion des graines imbibées par l'HE encapsulée.</i>	144
<b>Figure III'.11 :</b> <i>Caractérisation par diffraction des rayons X de l'HE de basilic encapsulée (HE–HD et HE–SFME).</i>	145
<b>Figure III'.12 :</b> <i>Evaluation de l'activité insecticide de l'HE de basilic encapsulée (HE–HD et HE–SFME) par effet de contact direct.</i>	147
<b>Figure III'.13 :</b> <i>Evaluation de l'activité insecticide de l'HE de basilic encapsulée (HE–HD et HE–SFME) par effet d'ingestion.</i>	147
<b>Figure III'.14 :</b> <i>Effet de toxicité de l'HE de basilic encapsulée (HE–HD et HE–SFME) par contact direct.</i>	148
<b>Figure III'.15 :</b> <i>Effet de toxicité de l'HE de basilic encapsulée (HE–HD et HE–SFME) par ingestion.</i>	148

## *Liste des tableaux*

<i>Chapitre I</i>	<b>Page</b>
<b>Tableau I.1</b> : Comparaison entre les méthodes d'extraction conventionnelles et celles assistées par micro-ondes.	37
<b>Tableau I.2</b> : Données de la littérature de quelques HEs extraite par HD et SFME.	40
<i>Chapitre II</i>	<b>Page</b>
<b>Tableau II.1</b> : Classification et systématique d' <i>Ocimum basilicum</i> L.	50
<b>Tableau II.2</b> : Propriétés physico-chimiques et organoleptiques des HEs de basilic obtenues par HD et SFME.	59
<b>Tableau II.3</b> : Constantes physico-chimiques et propriétés organoleptiques de l'HE de basilic Européen.	60
<i>Chapitre III</i>	<b>Page</b>
<b>Tableau III.1</b> : Quatre chémotypes d' <i>O. basilicum</i> L. selon Simon et al.	65
<b>Tableau III.2</b> : Chémotypes d' <i>O. basilicum</i> L. selon Baritiaux et al.	66
<b>Tableau III.3</b> : Chémotypes d' <i>O. basilicum</i> L. selon Telci et al.	67
<b>Tableau III.4</b> : Conditions opératoires de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG).	68
<b>Tableau III.5</b> : Conditions opératoires de l'analyse en CG/SM.	69
<b>Tableau III.6</b> : Composition chimique de l'HE des feuilles du basilic extraite par HD et SFME.	71
<b>Tableau III.7</b> : Composés majoritaires présents dans l'HE d' <i>O. basilicum</i> L. de différents pays.	76
<i>Chapitre I'</i>	<b>Page</b>
<b>Tableau I'.1</b> : Diamètres des zones d'inhibition des micro-organismes testés vis-à-vis de l'HE de basilic extraite par HD et SFME.	101
<b>Tableau I'.2</b> : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'HE de basilic extraite par HD et SFME.	102

<i>Chapitre III'</i>	<b>Page</b>
<b>Tableau III'.1</b> : <i>Différents procédés d'encapsulation des composés aromatiques.</i>	130
<b>Tableau III'.2</b> : <i>Toxicité par effet contact direct de l'HE de basilic encapsulée (HE-HD et HE-SFME).</i>	146
<b>Tableau III'.3</b> : <i>Toxicité par effet ingestion de l'HE de basilic encapsulée (HE-HD et HE-SFME).</i>	146
<b>Tableau III'.4</b> : <i>Activité insecticide des composés actifs de l'HE d'<i>O. basilicum</i>.</i>	149
<b>Tableau III'.5</b> : <i>Activité insecticide des HEs des plantes aromatiques encapsulées.</i>	150
<b>Tableau III'.6</b> : <i>Activité insecticide des HEs des plantes appartenant au genre <i>Ocimum</i>.</i>	151



## Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	2
Références .....	5

### **PREMIERE PARTIE : Etude Chimique de l'Huile Essentielle de Basilic**

#### **CHAPITRE I : Procédés d'extraction des produits bioactifs**

I.1. Introduction.....	8
I.2. Généralités sur les huiles essentielles .....	8
I.3. Composition chimique des huiles essentielles .....	10
I.3.1. Terpènes .....	10
I.3.2. Composés aromatiques.....	12
I.3.3. Composés d'origine variée.....	13
I.3.4. Chémotypes .....	13
I.4. Biosynthèse des constituants des huiles essentielles .....	14
I.4.1. Biosynthèse des terpènes.....	14
I.4.2. Biosynthèse des phénylpropanoïdes.....	18
I.5. Procédés d'extraction des produits bioactifs.....	19
I.5.1. Techniques d'extraction conventionnelles .....	19
I.5.1.1. Entraînement à la vapeur d'eau .....	21
I.5.1.2. Hydro-diffusion .....	21
I.5.1.3. Hydro-distillation "HD".....	22
I.5.1.4. Extraction par les solvants organiques .....	23
I.5.1.5. Expression à froid.....	23
I.5.1.6. Enfleurage.....	24
I.5.2. Techniques d'extraction innovantes.....	25
I.5.2.1. Turbo hydro-distillation "THD" .....	27
I.5.2.2. Extraction par fluide supercritique .....	27
I.5.2.3. Extraction par détente instantanée contrôlée "DIC" .....	27
I.5.2.4. Extraction par Ultrasons .....	29
I.5.2.5. Extraction assistée par micro-ondes .....	30
I.5.2.5.1. Hydro-distillation assistée par micro-ondes.....	32
I.5.2.5.2. Extraction par solvant assistée par micro-ondes.....	33



I.5.2.5.3. Hydro-diffusion assistée par micro-ondes et gravité .....	34
I.5.2.5.4. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes "SFME" .....	35
I.5.3. Etude comparative entre les extractions classiques et celles par micro-ondes .....	36
I.6. Conclusion .....	42
Références .....	43

## CHAPITRE II : Extraction et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de basilic "*Ocimum basilicum* L."

II.1. Introduction .....	48
II.2. Etude botanique de la plante étudiée : " <i>Ocimum basilicum</i> L." .....	48
II.2.1. Présentation de la famille des Lamiaceae .....	48
II.2.1.1. Généralités sur les Lamiaceae .....	48
II.2.1.2. Description botanique de la famille des Lamiaceae .....	48
II.2.2. Etude botanique du basilic .....	49
II.2.2.1. Classification .....	49
II.2.2.2. Noms et synonymes du basilic .....	50
II.2.2.3. Origine et répartition géographique du basilic .....	51
II.2.2.4. Description botanique du basilic .....	52
II.2.2.5. Usage et propriétés thérapeutiques .....	53
II.3. Extraction de l'HE de basilic .....	54
II.3.1. Matériel et méthodes .....	54
II.3.1.1. Matériel végétal .....	54
II.3.1.2. Méthodes d'extraction : description expérimentale de HD et SFME .....	54
II.3.1.2.1. Conduite de l'hydro-distillation "HD" .....	54
II.3.1.2.2. Conduite de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes "SFME" .....	55
II.3.1.3. Détermination des propriétés physico-chimiques et organoleptiques .....	56
II.4. Résultats et discussion .....	57
II.4.1. Facteurs influençant l'extraction .....	57
II.4.1.1. Influence de la température sur l'extraction par HD et SFME .....	57
II.4.1.2. Influence du temps sur l'extraction par HD et SFME .....	58
II.4.2. Propriétés physico-chimiques et organoleptiques .....	59
II.5. Conclusion .....	60
Références .....	61

## **CHAPITRE III : Composition chimique de l'HE de basilic** *"Ocimum basilicum L."*

III.1. Introduction .....	63
III.2. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles' .....	63
III.2.1. Chromatographie en phase gazeuse (CG) .....	63
III.2.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) ..	64
III.3. Chémotypes de l'huile essentielle d' <i>Ocimum basilicum</i> L. ....	65
III.4. Matériel et méthodes .....	67
III.4.1. Matériel végétal .....	67
III.4.2. Description des méthodes d'analyse chromatographique des HEs de basilic .....	68
III.4.2.1. Analyse par chromatographie en phase Gazeuse (CG) par détecteur à ionisation de flamme (DIF) .....	68
III.4.2.2. Analyse par chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM) .....	68
III.4.3. Identification des composés.....	69
III.5. Résultats et Discussion.....	71
III.5.1. Composition chimique de l'HE d' <i>Ocimum basilicum</i> L. ....	71
III.5.2. Comparaison de la composition chimique de l'HE de basilic extraite avec les essences étrangères .....	75
III.6. Conclusion.....	79
Références .....	80

## **DEUXIEME PARTIE : Etude Biologique de l'Huile Essentielle de Basilic**

### **CHAPITRE I' : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de basilic** *"Ocimum basilicum L."*

I'.1. Introduction .....	85
I'.2. Mécanisme d'action des huiles essentielles sur les bactéries .....	85
I'.3. Matériel et méthodes .....	87
I'.3.1. Matériel.....	87
I'.3.1.1. Principales caractéristiques des souches testées .....	87
I'.3.1.1.1. Souches bactériennes .....	87
I'.3.1.1.2. Souche fongique : levure .....	88
I'.3.1.2. Milieux de culture.....	89
I'.3.2. Méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne des HEs .....	90

I'.3.2.1. Méthodes par diffusion sur milieu solide : Méthode des disques.....	90
I'.3.2.2. Méthodes sur milieu liquide : Méthode des dilutions.....	90
I'.3.3. Tests de l'activité antimicrobienne de l'HE de basilic .....	91
I'.3.3.1. Tests de l'activité antimicrobienne par la méthode des disques.....	91
I'.3.3.2. Tests de l'activité antimicrobienne par la méthode des dilutions : concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	93
I'.4. Résultats et discussion .....	95
I'.5. Conclusion .....	106
Références .....	107

## **CHAPITRE II' : Activité antioxydante de l'huile essentielle de basilic** **"*Ocimum basilicum* L."**

II'.1. Introduction .....	110
II'.2. Tests d'évaluation de l'activité antioxydante .....	110
II'.3. Matériaux polaires totaux (TPM) .....	115
II'.4. Matériel et méthodes .....	116
II'.4.1. Matériel .....	116
II'.4.2. Méthodes .....	116
II'.4.2.1. Détermination de l'activité antioxydante de l'HE de basilic par le test au DPPH .....	116
II'.4.2.2. Détermination de l'activité antioxydante de l'HE de basilic par le test de l'huile de friture.....	119
II'.5. Résultats et discussion.....	121
II'.5.1. Activité antioxydante de l'HE de basilic.....	121
II'.5.2. Effet de chauffage et d'enrichissement de l'huile d'olive par l'HE de basilic .....	123
II'.6. Conclusion.....	124
Références .....	125

## **CHAPITRE III' : Activité insecticide de l'huile essentielle de basilic encapsulée**

III'.1. Introduction.....	128
III'.2. Techniques d'encapsulation.....	129
III'.2.1. Procédés chimiques .....	129
III'.2.1.1. Coacervation .....	129
III'.2.1.2. Co-crystallisation.....	130
III'.2.1.3. Inclusion moléculaire .....	130

III'.2.1.4. Polymérisation interfaciale .....	130
III'.2.2. Procédés mécaniques.....	131
III'.2.2.1. Atomisation "Spray-drying" .....	131
III'.2.2.2. Séchage en lit fluidisé.....	131
III'.2.2.3. Atomisation à froid .....	131
III'.2.2.4. Extrusion.....	131
III'.2.2.5. Lyophilisation "Freeze-drying" .....	131
III'.3. Huiles essentielles comme bio-insecticides .....	132
III'.4. Matériel et méthodes.....	133
III'.4.1. Matériel .....	133
III'.4.1.1. Provenance.....	133
III'.4.1.2. Description des trois principaux insectes ciblés .....	133
III'.4.2. Méthodes .....	140
III'.4.2.1. Description expérimentale de la lyophilisation de l'HE de basilic .....	140
III'.4.2.2. Description de la méthode d'analyse "Diffraction des Rayons X".....	141
III'.4.2.3. Méthodes d'évaluation de l'activité insecticide des HEs .....	141
II'.4.2.3.1. Toxicité par contact direct.....	142
II'.4.2.3.2. Toxicité par ingestion.....	142
III'.4.3. Calcul de la mortalité .....	143
III'.4.4. Efficacité d'un produit toxique .....	143
III'.4.5. Tests d'activité insecticide de l'HE de basilic .....	143
III'.4.5.1. Toxicité par contact direct .....	143
III'.4.5.2. Toxicité par ingestion .....	144
III'.6. Résultats et discussion .....	145
III'.6.1. Analyse par DRX des capsules de l'HE d' <i>O. basilicum</i> .....	145
III'.6.2. Résultats de l'activité insecticide de l'HE de basilic .....	145
III'.6.3. Discussion des résultats de l'activité insecticide de l'HE de basilic.....	149
III'.7. Conclusion .....	153
Références .....	154
 CONCLUSION GENERALE .....	 157
ANNEXES.....	160

# *Introduction générale*

## Introduction générale

Les plantes aromatiques et médicinales représentent une source inépuisable de remèdes traditionnels et efficaces grâce aux principes actifs qu'elles contiennent : alcaloïdes, flavonoïdes, hétérosides, saponosides, quinones, vitamines,...et huiles essentielles<sup>1</sup>.

En effet, les huiles essentielles (HEs), principes actifs issus du métabolisme secondaire des plantes médicinales, ont été utilisées depuis l'antiquité et sont largement employées de nos jours, pour leurs propriétés biologiques (antimicrobienne, antioxydante, analgésique, anti-inflammatoire, anti-cancérigène, antiparasitaire, insecticide...) <sup>2,3</sup> et leurs applications dans de multiples et diverses industries : alimentaire, cosmétique, parfumerie et pharmacie <sup>4,5</sup>.

L'importance économique que représentent ces essences du fait de leurs propriétés biologiques, thérapeutiques, odoriférantes..., de leur impact au niveau de l'environnement et de leur utilisation dans le traitement de certaines maladies infectieuses pour lesquelles les antibiotiques de synthèse sont de moins en moins actifs ou dans la conservation des aliments contre l'oxydation comme alternatives aux produits chimiques de synthèse suscite de plus en plus l'intérêt des biologistes, des médecins, ...et des chimistes<sup>6</sup>.

Par ailleurs, l'utilisation de nouvelles techniques faisant appel aux critères de chimie verte et de développement durable pour l'extraction de substances bioactives, est devenue fort intéressante car elle répond aux enjeux scientifiques et aux problèmes économiques et environnementaux actuels<sup>7</sup>.

---

<sup>1</sup> a) Lafon, J.P.; Tharaud-Prayer, C. et Lévy, G. « *Biologie des plantes cultivées. Tome 1 : organisation, physiologie de la nutrition* », Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris **1988**, p. 240; b) Sallé, J.L. « *Le Totum en Phytothérapie : Approche de phyto-biothérapie* », Ed. Frison-Roche, Paris **1991**, p. 239.

<sup>2</sup> Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. and Idaomar, M. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46, 446–475.

<sup>3</sup> Teles Andrade, B.F.M.; Barbosa, L.N.; da Silva Probst, I. and Fernandes, Júnior A. J. *Essent. Oil Res.* **2014**, 26, 34–40.

<sup>4</sup> a) El Abed, D. et Kambouche, N. « Les huiles essentielles », Edition Dar El Gharb, **2003**; b) Burt, S. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, 94, 223–253.

<sup>5</sup> Da Cruz-Cabral L.; Fernandez-Pinto, V.; Patriarca, A. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, 166, 1–14.

<sup>6</sup> a) Farnsworth, N. R.; Akerele, O.; Bingel, A.S.; Soejarto, D.D.; Guo, Z. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé* **1986**, 64(2), 159–175; b) Roux, D.; Catier, O. « *Botanique, pharmacognosie, phytothérapie* », 3<sup>ème</sup> Ed. Porphyre **2007**, 13.

<sup>7</sup> a) Li, Y.; Fabiano-Tixier, A.S.; Abert-Vian, M. and Chemat, F. *Trends Anal. Chem.* **2013**, 47, 1–11; b) Filly, A.; Fernandez, X.; Minuti, M.; Visinoni, F.; Cravotto, G. and Chemat, F. *Food Chem.* **2014**, 150, 193–198.

En effet, l'activation des milieux réactionnels par les micro-ondes est l'une des méthodes les plus appliquées non seulement dans les stratégies de synthèse chimique modernes mais aussi dans l'extraction des principes actifs des végétaux que sont les HEs.

Elle conduit à des produits propres avec de bons rendements en des temps plus réduits par rapport au chauffage thermique qui lui nécessite un temps de réaction et/ou d'extraction plus long.

Dans ce contexte d'une chimie plus respectueuse de l'environnement et dans le cadre de l'un des axes de recherche relatif à la valorisation des plantes aromatiques et médicinales développé par notre laboratoire<sup>8</sup> et en collaboration avec le Laboratoire GREEN (Groupe de Recherche en Eco-Extraction de produits Naturels) de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, innovateur de la conception et de la mise au point d'une nouvelle technique d'extraction des HEs par micro-ondes sans ajout de solvant<sup>9,10</sup>, procédé qui contribue fortement au développement d'une chimie verte et durable, nous nous sommes intéressés à l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes « Solvent Free Microwave Extraction (SFME) » de l'HE des feuilles du basilic « *Ocimum basilicum* L. ».

L'objectif poursuivi est de réaliser une étude comparative de l'HE des feuilles brisées du basilic d'Egypte extraite par HD (hydro-distillation) et par SFME, en termes de cinétique d'extraction, de rendement, de propriétés physico-chimiques, de composition chimique,... et d'activités antimicrobienne, antioxydante et insecticide.

Les résultats de nos travaux présentés dans ce manuscrit sont répartis, par conséquent, en deux parties :

**La première partie** a trait à l'étude phytochimique de la plante « *Ocimum basilicum* L. », appelée populairement basilic commun et comprend trois chapitres :

*Le premier chapitre* est réservé à la description des différents procédés d'extraction des produits bioactifs et particulièrement les HEs par les techniques classiques d'une part, et innovantes d'autre part.

Dans *le deuxième chapitre*, il sera question de l'extraction des HEs des feuilles du basilic par HD et SFME ainsi que de la détermination des propriétés physico-chimiques des deux essences.

L'identification par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse des principales substances bioactives contenues dans des essences recueillies par les deux techniques est exposée dans *le troisième chapitre*.

<sup>8</sup> a) Kambouche, N.; El Abed, D. *J. Essent. Oil Res.* Janvier/Février **2003**, *15*, 39–4; b) Ouis, N. Thèse de Doctorat, Université d'Oran 1 Ahmed BenBella **2015**.

<sup>9</sup> a) Chemat, F.; Smadja, J.; Lucchesi, M.E. *Brevet Européen*, EP 1 439 218 B1, **2004**; b) Chemat, F.; Lucchesi, M.E.; Smadja, J. *Brevet Américain*, US 2004/0187340 A1, **2004**.

<sup>10</sup> Chemat, F.; Lucchesi, M.E.; Smadja, J. *Int. Microw. Power Inst.* **2004**, *39*, 135–139; b) Lucchesi, M.E.; Chemat, F.; Smadja, J. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1043*, 323–327.



**La deuxième partie** relative à la valorisation des HEs isolées par les deux techniques est subdivisée également en trois chapitres :

*Le premier chapitre* est consacré à la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des deux huiles. L'évaluation du pouvoir antioxydant des essences isolées par HD et SFME est présentée dans *le second chapitre* de cette deuxième partie.

L'activité insecticide de l'HE de basilic, encapsulée en poudre par la technique de lyophilisation « freeze-drying », fera l'objet *d'un troisième* et dernier *chapitre*.

A cela s'ajoute une conclusion générale dans laquelle sont résumés les principaux résultats obtenus ainsi que les perspectives envisagées.

Enfin, les notions fondamentales de l'extraction des substances bioactives par micro-ondes, ainsi que les structures des constituants majoritaires identifiés dans l'essence étudiée sont présentées en annexe.

## Références

- <sup>1</sup> a) Lafon, J.P.; Tharaud-Prayer, C. et Lévy, G. « *Biologie des plantes cultivées. Tome 1 : organisation, physiologie de la nutrition* », Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris **1988**, p. 240; b) Sallé, J.L. « *Le Totum en Phytothérapie : Approche de phyto-biothérapie* », Ed. Frison-Roche, Paris **1991**, p. 239.
- <sup>2</sup> Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. and Idaomar, M. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446–475.
- <sup>3</sup> Teles Andrade, B.F.M.; Barbosa, L.N.; da Silva Probst, I. and Fernandes, Júnior A. *J. Essent. Oil Res.* **2014**, *26*, 34–40.
- <sup>4</sup> a) El Abed D. et Kambouche, N. « Les huiles essentielles », Edition Dar El Gharb **2003**; b) Burt, S. *Int. J. Food. Microbiol.* **2004**, *94*, 223–253.
- <sup>5</sup> Da Cruz-Cabral L.; Fernandez-Pinto V.; Patriarca, A. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *166*, 1–14.
- <sup>6</sup> a) Farnsworth, N. R.; Akerele, O.; Bingel, A.S.; Soejarto, D.D.; Guo, Z. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé* **1986**, *64*(2), 159–175; b) Roux, D.; Catier, O. « *Botanique, pharmacognosie, phytothérapie* », 3<sup>ème</sup> Ed. Porphyre **2007**, 13.
- <sup>7</sup> a) Li, Y.; Fabiano-Tixier, A.S.; Abert-Vian, M. and Chemat, F. *Trends Anal. Chem.* **2013**, *47*, 1–11; b) Filly, A.; Fernandez, X.; Minuti, M.; Visinoni, F.; Cravotto, G. and Chemat, F. *Food Chem.* **2014**, *150*, 193–198.
- <sup>8</sup> a) Kambouche, N.; El Abed, D. *J. Essent. Oil Res.* Janvier/Février **2003**, *15*, 39–4; b) Ouis, N. Thèse de Doctorat, Université d'Oran 1 Ahmed BenBella **2015**.
- <sup>9</sup> a) Chemat, F.; Smadja, J.; Lucchesi, M.E. *Brevet Européen*, EP 1 439 218 B1, **2004**; b) Chemat, F.; Lucchesi, M.E.; Smadja, J. *Brevet Américain*, US 2004/0187340 A1, **2004**.
- <sup>10</sup> Chemat, F.; Lucchesie, M.E.; Smadja, J. *Int. Microw. Power Inst.* **2004**, *39*, 135–139; b) Lucchesie, M.E.; Chemat, F.; Smadja, J. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1043*, 323–327.

# ***PREMIERE PARTIE***

## *Etude Chimique de l'Huile Essentielle de Basilic*

*Chapitre I*

*Procédés d'extraction des produits  
bioactifs*

## I.1. Introduction

De tout temps et à travers les diverses civilisations : grecque, romaine, égyptienne, chinoise,...et arabe, l'homme a eu recours aux plantes non seulement pour se nourrir, se vêtir, se chauffer, se loger, se parfumer...mais aussi pour entretenir son équilibre, soulager ses maux, prévenir et guérir les maladies qui nuisent à sa santé<sup>1</sup>.

En effet, les plantes représentent la principale source de principes actifs dont le rôle et l'utilisation sont très variés. Ainsi, les huiles essentielles (HEs) constituent l'un des principes actifs les plus remarquables par leurs nombreuses propriétés : organoleptiques, odorantes, curatives,...et par leurs multiples et diverses applications dans le secteur industriel<sup>2</sup>.

Avant de décrire les principaux procédés d'obtention des principes actifs et plus particulièrement des HEs, il nous a paru utile et intéressant de présenter, dans ce premier chapitre, une esquisse générale des traits les plus caractéristiques de ces huiles végétales.

## I.2. Généralités sur les huiles essentielles

Les HEs, constituants du métabolisme secondaire des plantes, ne sont pas toujours présentes chez tous les végétaux. Néanmoins, elles existent en grande partie dans le règne végétal et se rencontrent uniquement chez les plantes supérieures. Elles se trouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces réparties en 60 familles botaniques<sup>3</sup>.

Nous citerons entre autres : les Composeae (armoise, camomille, pissenlit,...), les Myrtaceae (eucalyptus, girofle,...), les Rutaceae ou Hespéridés (citron, orange,...), les Apiaceae (anis, angélique, carotte, carvi, cerfeuil, persil, coriandre,...), les Lamiaceae (thym, lavande, menthe, patchouli, romarin, basilic,...), et les Conifères (cèdre, cyprès, pin, épicéa, sapin,...)<sup>4</sup>.

Elles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante, aussi bien dans les fleurs, les feuilles, les fruits, les tiges que dans les écorces, les graines, les racines, les rhizomes ou le bois.

Elles se forment dans des cellules spécialisées, le plus souvent, regroupées en poches ou en canaux sécréteurs et elles sont ensuite transportées lors de la croissance de la plante dans d'autres parties<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Beloued, A. « *Plantes médicinales d'Algérie* », OPU, Alger **1998**, p.277.

<sup>2</sup> Lafon, J.P.; Tharaud-Prayer, C. et Lévy, G. « *Biologie des plantes cultivées. Tome 1 : organisation, physiologie de la nutrition* », Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris **1988**, p. 240.

<sup>3</sup> El Abed, D. et Kambouche, N. « *Les Huiles essentielles* », Editions Dar El Gharb, **2003**.

<sup>4</sup> Richter, G. « *Métabolisme des végétaux : Physiologie et Biochimie* », Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, **1993**, p. 526.

<sup>5</sup> Bernard, T.; Perineau, F.; Bravo, P.; Delmas, M. et Gaset, A. « *Informations chimie* », n° 298, Oct, **1988**, pp. 179–184.

Quant à leur stockage, il se fait dans des cavités qui résultent de la fusion de plusieurs cellules qui sont de structures très variées :

- Poils sécréteurs des Labiaceae situés sur les épidermes inférieurs des feuilles;
- Poches sécrétrices des Rutaceae;
- Canaux sécréteurs des Conifères et d'un grand nombre d'Apiaceae formés par des cellules qui se sont transformées;
- Sacs et tubes huileux obtenus par modification de cellules sécrétrices.

Dans la plupart des cas, ces cellules sécrétrices se situent sur ou à proximité de la surface de la plante ce qui facilite l'émission des essences lorsque la température est élevée.

Les HEs ou essences végétales sont des substances odorantes volatiles de composition assez complexe et plus ou moins modifiées au cours de la préparation. Elles sont généralement liquides d'odeur et de saveur généralement forte, très rarement colorées. Leur densité est le plus souvent inférieure à l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé, et le plus souvent sont douées de pouvoir rotatoire. Elles sont très peu solubles dans l'eau, en revanche, elles sont généralement assez solubles dans les solvants organiques. Elles se différencient des huiles grasses, par leurs propriétés physiques et leur composition, du fait qu'elles se volatilisent à la chaleur et que leurs taches sur le papier sont passagères<sup>6</sup>.

Les HEs émises par les plantes sous forme de vapeur ont un impact écologique évident. Elles protègent les cultures en inhibant la multiplication des bactéries et des champignons. Elles empêchent la dessiccation de la plante par évaporation excessive et protègent la plante contre la lumière soit par diminution ou par concentration et maintiennent une certaine humidité autour des plantes des régions arides<sup>7</sup>. Elles protègent les parties reproductives de la plante contre les prédateurs (herbivores, insectes)<sup>8</sup>.

Elles interviennent lors de l'interaction végétal-animal et dans les communications plante-plante<sup>9</sup>. Elles attirent les insectes et favorisent la pollinisation par leurs odeurs caractéristiques<sup>10</sup>.

En outre, elles embaument l'atmosphère en exhalant différents parfums; c'est pour cela que beaucoup d'entre-elles sont utilisées en cuisine comme condiments.

Les HEs sont commercialisées et présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels en particulier en pharmacie par leurs propriétés thérapeutiques en tant qu'agents antiseptique, analgésique, antispasmodique, apéritif,...et antidiabétique, en cosmétologie-parfumerie par leurs propriétés odoriférantes,...en agroalimentaire par leurs activités

<sup>6</sup> Sallé, J.L. « *Les huiles essentielles; Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie* », Ed. Frison – Roche, Paris **1991**, p. 21.

<sup>7</sup> Stewart, G.H. *New. Zeal. J. Bot.* **1978**, 16, 185–205.

<sup>8</sup> Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J. *Plant physiol.* **2004**, 135, 1893–1902.

<sup>9</sup> Regnault-Roger, C. *Integrated Pest Manag. Rev.* **1997**, 2, 25–34.

<sup>10</sup> Capon, M.; Courilleau, V.; Valette, C. « *Chimie des couleurs et des odeurs* », Ed. Cultures et techniques **1990**, p. 204.

antioxydante et aromatisante, ainsi que dans le domaine de l'aromathérapie (la masso-kinésithérapie, l'ostéopathie, l'acupuncture, la podologie, la rhumatologie et également dans l'esthétique)<sup>11</sup>.

*Les HEs représentent une source inépuisable de remèdes naturels. Néanmoins, il y a lieu de souligner que l'automédication fréquente et abusive surtout en ce qui concerne le dosage ainsi que le mode d'application interne ou externe par les essences est nocive. Elle engendre des effets secondaires plus ou moins néfastes dans l'organisme (allergies, épilepsie, etc...)<sup>12</sup>.*

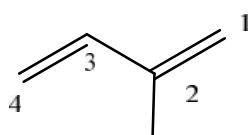
### I.3. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des HEs est très complexe d'un double point de vue, à la fois par le nombre élevé de constituants présents et surtout par la diversité considérable de leurs structures. Elle peut varier selon l'organe, l'origine géographique et botanique, la localisation des sites producteurs, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturelles, le procédé et les conditions d'extraction, ainsi que la conservation (séchage et stockage)<sup>13</sup>.

En effet, les HEs sont un mélange de molécules variées qui appartiennent principalement à deux grands groupes : Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes qui se différencient entre eux par l'origine biogénétique. D'autres substrats, corps en faible proportion, entrent dans la constitution de certaines HEs (acides organiques, esters et autres...)<sup>11</sup>.

#### I.3.1. Terpènes

Les terpènes constituent les principaux composants des HEs. Ce sont des hydrocarbures formés par l'assemblage de deux ou plusieurs unités isopréniques. Ce sont des polymères de l'isoprène de formule brute  $(C_5H_8)_n$ .



Isoprène (2méthylbuta-1,3-diène)

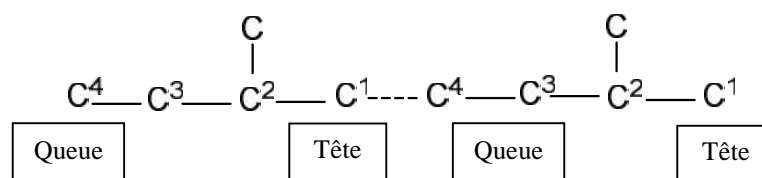
Ils résultent de la condensation de deux ou plusieurs unités isopréniques. Bien que de structures très diverses, ils ont un caractère commun : ils peuvent être virtuellement déconnectés en unités isopréniques<sup>14</sup>.

<sup>11</sup> Bruneton, J. « *Éléments de phytochimie et pharmacologie* », Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris **1997**, pp. 405–426.

<sup>12</sup> Degryse, A.C.; Delpla, I.; Voinier, M.A. « *Atelier Santé Environnement, Risques et bénéfices des huiles essentielles* », IGS. EHESP, **2008**.

<sup>13</sup> Guignard, J. L. « *Biochimie végétale* », Ed. Masson, Paris **2000**, p. 166.

<sup>14</sup> Allinger, N.L.; Cava, M.P.; De Jongh, D.C.; Johnson, C.R.; Lebel, N.A. et Stevens, C.L. « *Chimie organique* », Ediscience/Mc Graw-Hill, Paris **1975**, p. 813.



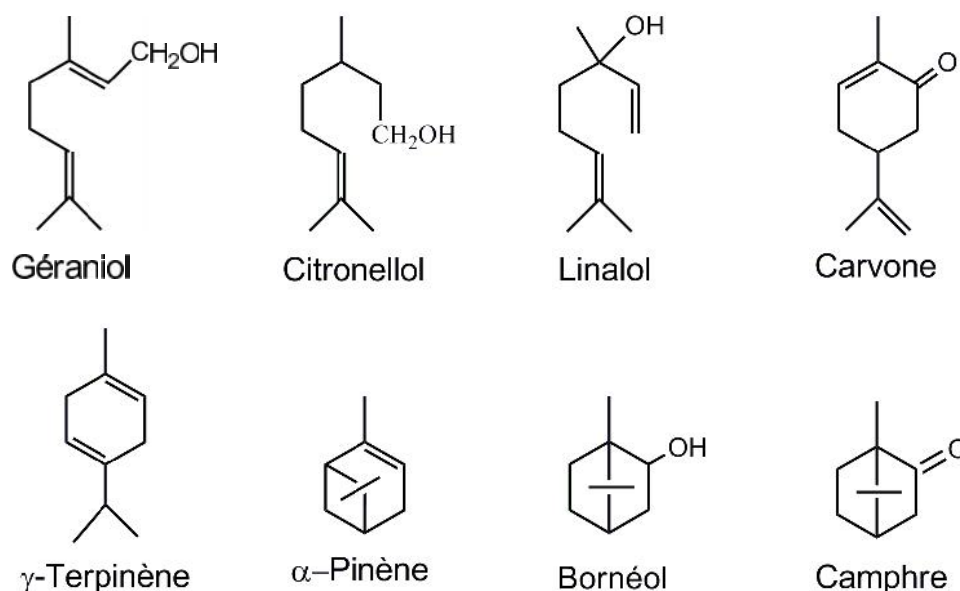
Ces unités isopréniques se lient entre elles le plus souvent par des liaisons dites régulières de type tête-queue<sup>15</sup>; comme ils peuvent se lier par des liaisons dites irrégulières de type artémésyl, santolinyll, lavandulyl et chrysanthémyle<sup>16</sup>.

Selon le nombre d'unités isopréniques associées, les terpènes sont classés : en hémis-(C<sub>5</sub>), mono-(C<sub>10</sub>); sesqui-(C<sub>15</sub>); di-(C<sub>20</sub>) ; tri-(C<sub>30</sub>); tétra-(C<sub>40</sub>) terpènes et polyterpènes.

Les HEs contiennent particulièrement des monoterpènes, des sesquiterpènes et peu souvent de diterpènes, et sont caractérisées par un point d'ébullition peu élevé ce qui leur confère le nom d'huiles volatiles. Les terpènes sont souvent responsables des odeurs caractéristiques des plantes<sup>17</sup>.

Les terpènes sont de structures très diverses. Ils peuvent être acycliques (géraniol, linalol, citronellol,...), monocycliques (menthol, -terpinéol, thymol,...) ou bicycliques (bornéol, fenchol,...) et contiennent la plupart des fonctions chimiques des matières organiques : alcool, aldéhyde,...et cétone.

A titre indicatif, quelques structures de monoterpènes et de sesquiterpènes sont représentées sur les figures I.1 et I.2.



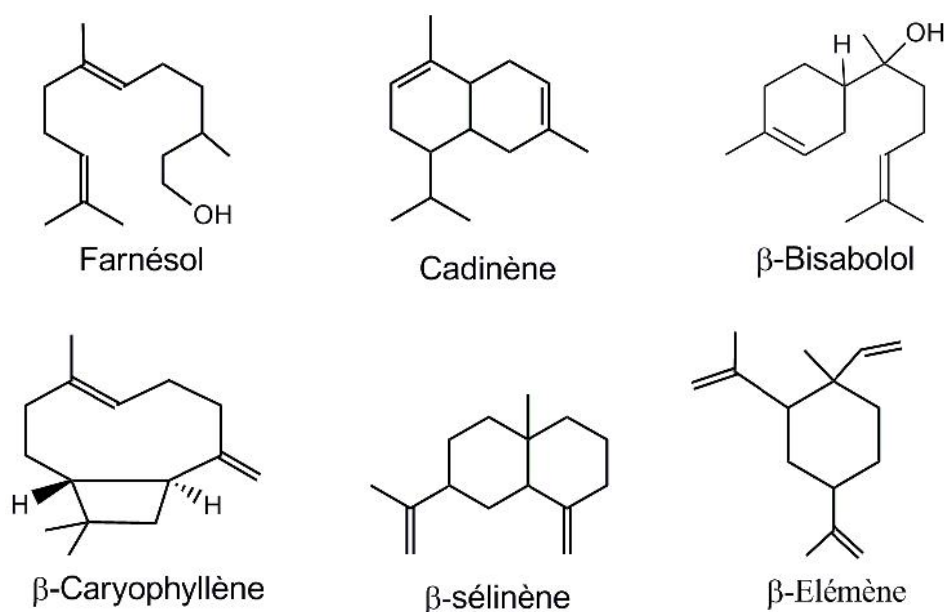
**Figure I.1 :** Monoterpènes acycliques et cycliques rencontrés dans les huiles essentielles.

<sup>15</sup> Teisseire, P.J. « *Chimie des Substances Odorantes* », Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris **1991**, p. 480.

<sup>16</sup> Poulter, C.D.; Marsh, L.L.; Hughes, J.M.; Argyle, J.C.; Satterwhite, D.M.; Goodfellow, R.J.; Moesinger, S.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 3816–3823.

<sup>17</sup> Finar, I.L. « *Organic chemistry* », Ed. Longman Scientific & Technical, New York **1994**, p. 965.





**Figure I.2 :** Sesquiterpènes rencontrés dans les huiles essentielles.

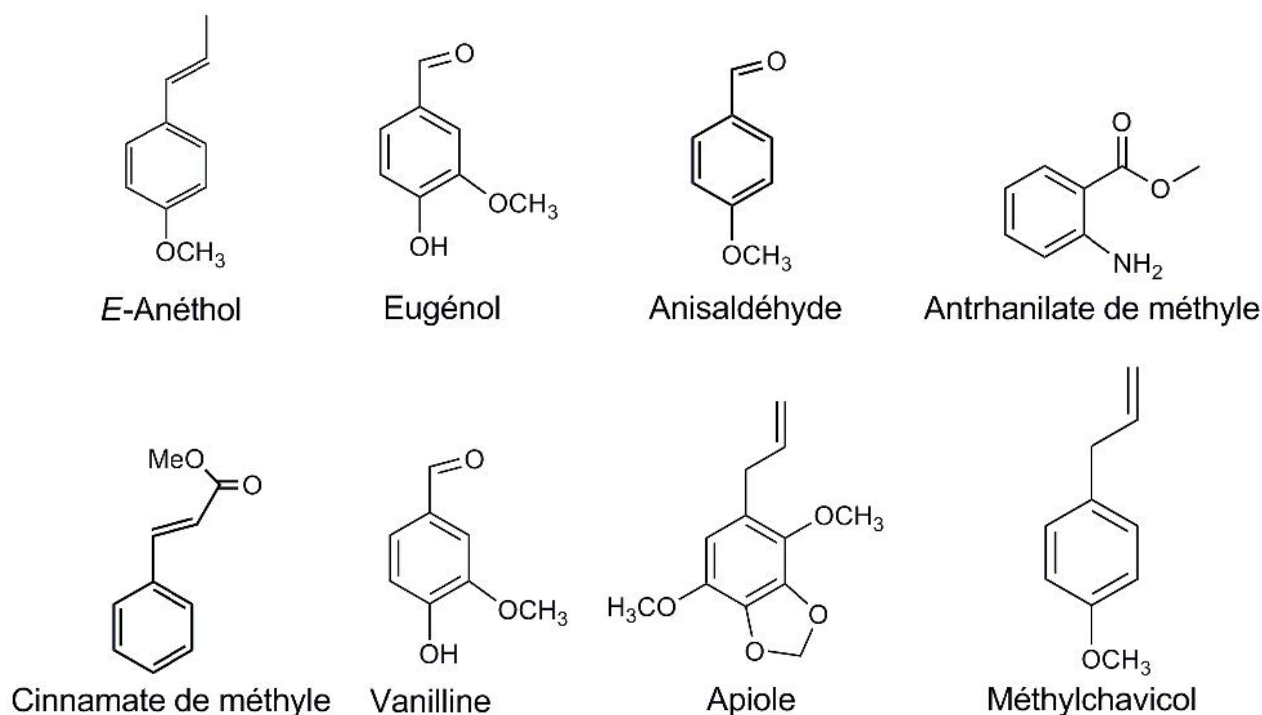
**Remarque :** Des monoterpènes, à chaîne aliphatique ou cyclique et porteur d'une fonction ester, sont aussi présents dans les essences végétales. L'acétate ou propionate de linalyle, l'acétate de citronelyle, l'acétate de géranyle, l'acétate de menthyle, ou d' - terpényle,...en sont des exemples. D'autres sont dotés d'une fonction phénol comme le thymol, le carvacrol, l'eugénol ou le 1,8 cinéole (eucalyptol).

### I.3.2. Composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivant du phénylpropane (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) sont moins fréquents que les terpènes dans les HEs et eux aussi peuvent contenir différentes fonctions. Ce sont très souvent des allyles et des propénylphénols. Afin d'illustrer la diversité structurale des dérivés du phénylpropane, nous avons rassemblé dans la figure **I.3** quelques exemples d'entre eux rencontrés dans les HEs. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline, l'anéthol, l'eugénol,...et le méthylchavicol ou estragole. Ils sont fréquemment rencontrés dans les HEs des Apiaceae (anis, fenouil, persil, etc...) et sont caractéristiques de celles de la vanille, de l'estragon, du basilic,...et du clou de girofle.

Ils se distinguent entre eux par :

- Le nombre et la position des groupements hydroxyle et méthoxy;
- La position de la double liaison de la chaîne latérale, allylique ou propénylique;
- Le degré d'oxydation de la chaîne aliphatique (alcool, aldéhyde, cétone ou acide...).



**Figure I.3 :** Phénylpropanoïdes rencontrés dans les huiles essentielles.

### I.3.3. Composés d'origine variée

En général, les composés d'origine variée de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydro-distillation, sont des hydrocarbures aliphatiques à chaîne linéaire ou ramifiée porteurs de différentes fonctions. A titre indicatif, on peut citer :

- Les acides en C<sub>3</sub> et C<sub>10</sub>;
- Les aldéhydes comme l'octanal et le décanal des Citrus;
- Les alcools comme le 1-octèn-3-ol de l'essence de la lavande;
- Les esters acycliques présents surtout dans les fruits : acétate de butyle (pomme); acétate d'isoamyle (banane);
- L'heptane et la paraffine dans l'essence de camomille;
- Les composés azotés ou soufrés comme l'isosulfocyanate;
- Les composés issus de la dégradation des terpènes comme les ionones.

### I.3.4. Chémotypes

La composition chimique de l'HE peut au sein d'une même espèce de plante présenter des profils chimiques ou chémotypes (chimiotypes) différents. Ce polymorphisme chimique existe chez certaines espèces de plusieurs familles. L'un des exemples le plus démonstratif qu'on peut citer est celui du thym (*Thymus vulgaris* L.). Cette espèce a six (06)

chémotypes différents. Cette différence est due à la nature du monoterpène majoritaire qui peut être soit le géraniol, le linalol, l' $\alpha$ -terpinéol, le 4-thuyanol, le carvacrol ou le thymol<sup>18</sup>.

#### I.4. Biosynthèse des constituants des huiles essentielles

La biosynthèse des constituants des HEs au sein du végétal emprunte deux voies utilisant comme intermédiaires :

- L'acide mévalonique pour les terpénoïdes<sup>19</sup> ;
- L'acide shikimique pour les phénylpropanoïdes<sup>20</sup>.

##### I.4.1. Biosynthèse des terpènes

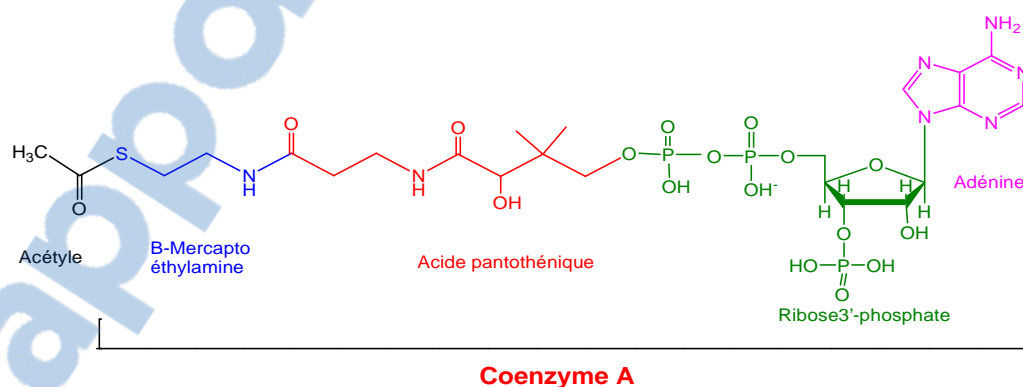
L'unité de base de la biosynthèse des terpènes est en réalité l'*isopentényl-diphosphate* (pyrophosphate d'*isopentén-3yle*) : **PPI<sub>3</sub>** et son isomère le *diméthylallyl-diphosphate* (pyrophosphate de *diméthylallyle*) : **PPI<sub>2</sub>**.

Deux voies de biosynthèse conduisent à ces unités de base à 5 atomes de carbone :

- La voie de l'acide mévalonique (**MVA**);
- La voie du méthylérythritol phosphate (**MEP**)

La voie mévalonique est la plus connue. Il existe, en particulier, chez certaines bactéries et plantes une voie dite « non mévalonique ».

La première est la *voie du mévalonate*. Elle prend son origine au niveau de l'acétyl coenzyme A (CH<sub>3</sub>COSCoA) (Figure I.4), produit de la glycolyse (catabolisme des sucres).



**Figure I.4 :** Structure de l'acétylCoenzyme A.

<sup>18</sup> Thompson, J.D.; Chalchat, J.C.; Michet, A.; Linhart, Y.B.; Ehlers, B. *J. Chem. Ecol.* **2003**, 29(4), 859–880.

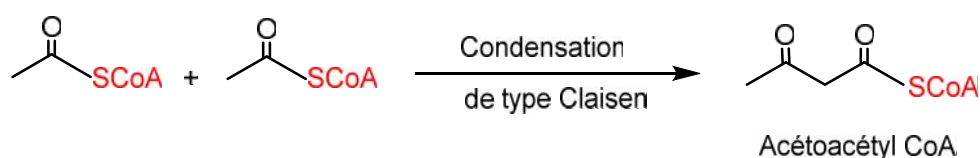
<sup>19</sup> a) Bruneton, J. « *Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales* », Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris **1999**, pp. 388–391; b) Newman, J.D.; Chappell, J. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* **1999**, 34, 95–106; c) Sell, C. « *Chemistry of Essential Oils* », In Baser, K.H.C.; Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*, Taylor & Francis Group, CRC Press: Boca Raton, FL, USA **2016**, pp. 165–194.

<sup>20</sup> a) Singh, N.; Luthra, T.; Sangwan, R.S.; Thakur, R.S. *Curr. Res. Med. Aromat. Plants* **1990**, 11, 174–196 ;  
b) Lamarti, A.; Badoc, A.; Deffieux, G.; Cadre, J.P. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* **1994**, 133, 79–99.

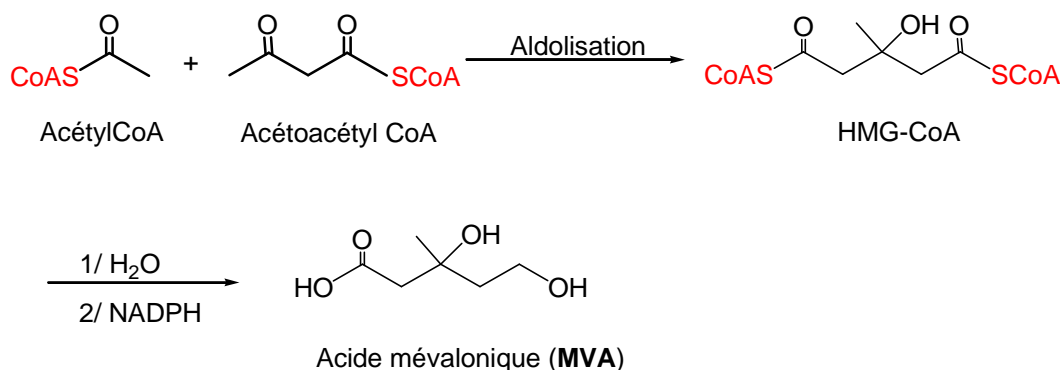
L'étude du mécanisme réactionnel régissant la biosynthèse des terpènes, a montré l'existence de plusieurs étapes :

La première étape débute par la condensation de trois unités d'acétylCoA, et passe par un composé en C<sub>6</sub> (le mévalonate) et conduit au **PPI<sub>3</sub>**.

Pour cette voie principale, la première étape est une condensation de type Claisen entre deux molécules d'acétylCoA pour conduire à l'acétoacétylCoA.

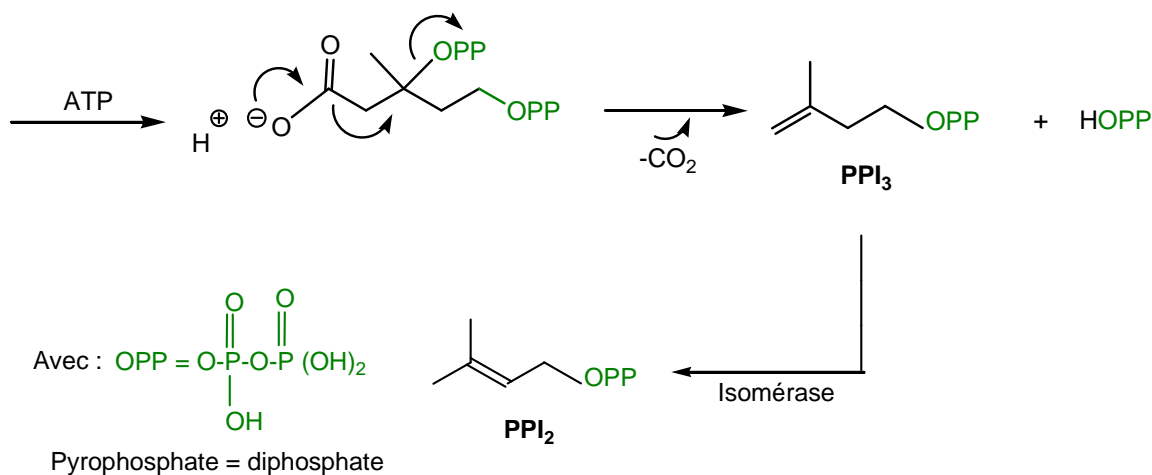


La deuxième étape est une réaction d'aldolisation entre une troisième molécule d'acétylCoA et l'acétoacétylCoA. Après hydrolyse et réduction par le NADPH (Nicotine Adénine Dinucléotide Phosphate), l'acide mévalonique se forme.

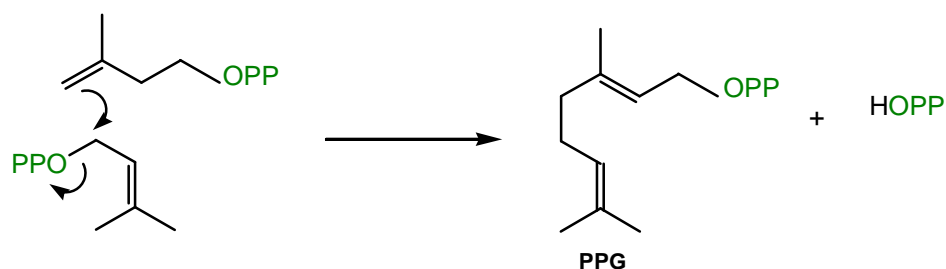


Après pyrophosphorylation par l'ATP (Adénosine triphosphate), la déshydratation et la décarboxylation de l'acide mévalonique (**MVA**) par une élimination concertée, permettent d'aboutir aux deux intermédiaires en C<sub>5</sub>, bio-précurseurs des terpènes :

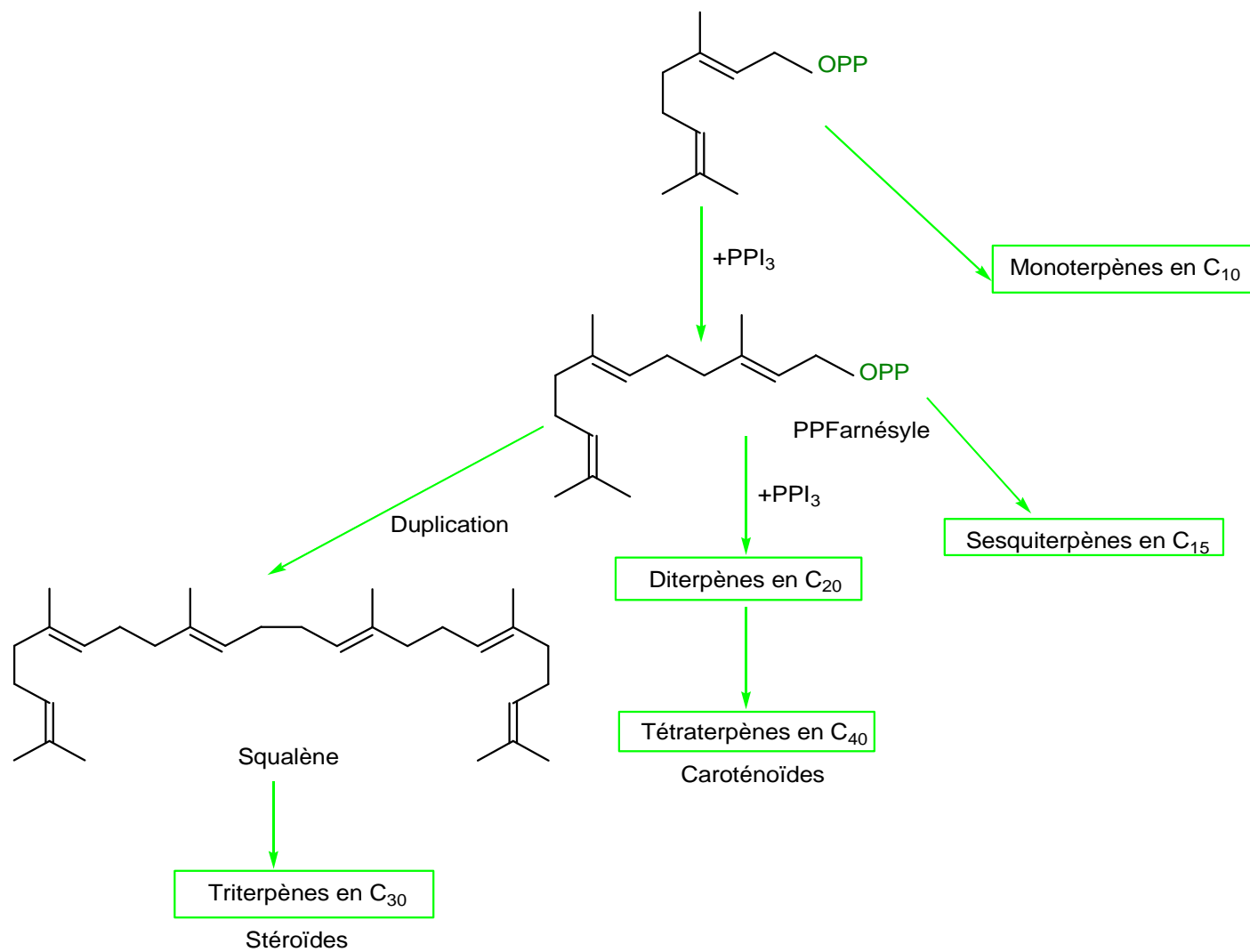
- Le pyrophosphate d'isopentén-3-yle (**PPI<sub>3</sub>**) en équilibre, par simple transfert de proton, avec le pyrophosphate de diméthylallyle (**PPI<sub>2</sub>**).



Les deux intermédiaires **en C5** réagissent entre eux pour conduire au pyrophosphate de géranyle (**PPG**) point de départ de tous les monoterpénoïdes :



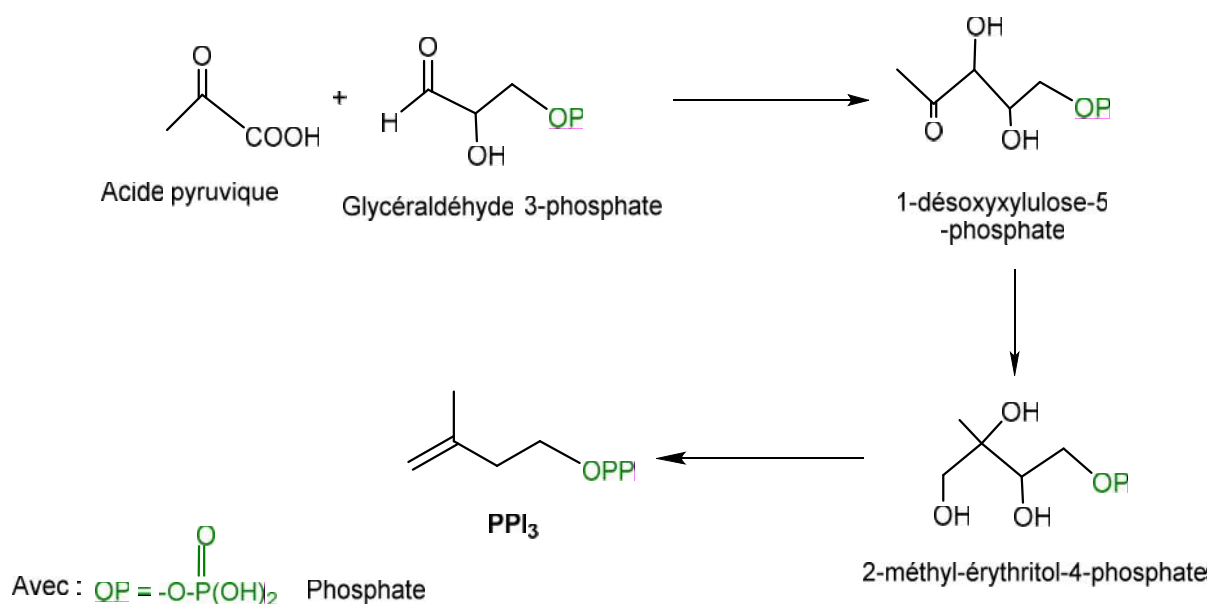
La condensation suivant le même principe d'une autre unité de **PPI<sub>3</sub>** sur le pyrophosphate de géranyle donne le pyrophosphate de farnésyle, précurseur de tous les sesquiterpènes. Selon ce processus, les diterpènes, triterpènes (squalène) ainsi que les tétraterpènes sont obtenus. La figure **I.5** montre le schéma indiquant les différentes étapes de la biosynthèse des terpénoïdes.



**Figure I.5 :** Schéma général de la biosynthèse des terpènes par la voie de l'acide mévalonique.

La seconde voie, voie du méthylérythritol phosphate (**MEP**) ou encore nommée voie non mévalonique, est spécifique aux végétaux et se fait au niveau des plastes. Elle commence par la condensation d'une unité pyruvate (C<sub>3</sub>) avec une unité de glycéraldéhyde 3-phosphate (C<sub>3</sub>) et conduit au méthylérythritol phosphate, un composé intermédiaire en C<sub>5</sub>.

Plusieurs étapes enzymatiques conduisent ensuite à la synthèse de **PPI<sub>3</sub>**. Cette voie n'a été mise en évidence qu'à la fin des années 90, mais elle s'est rapidement avérée être la voie majoritaire pour la biosynthèse de la majeure partie des terpènes (Figure I.6).



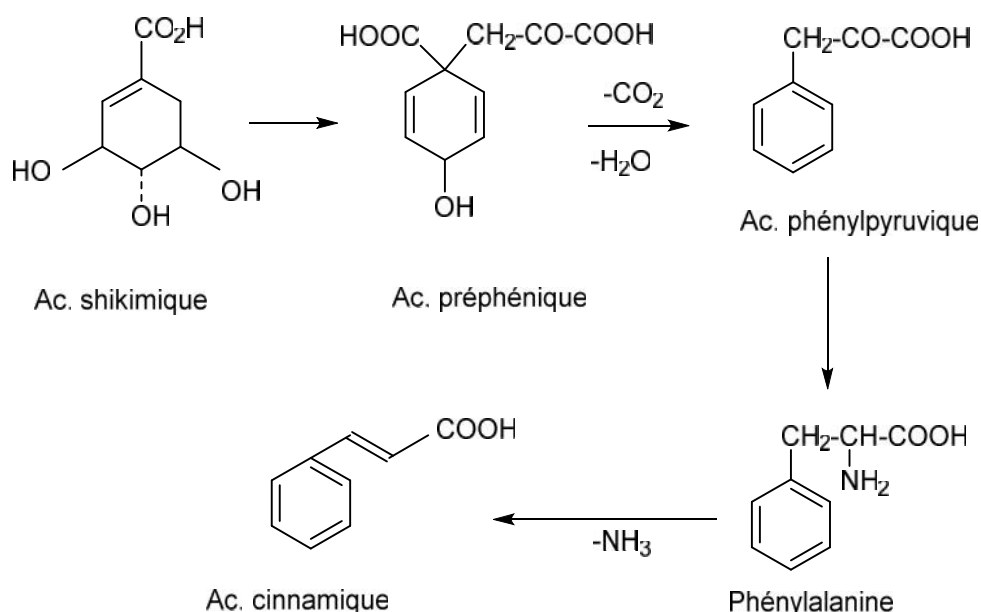
**Figure I.6 :** Schéma général de la biosynthèse des terpènes par la voie du méthylérythritol phosphate.

#### I.4.2. Biosynthèse des phénylpropanoïdes

La biosynthèse des dérivés du phénylpropane se fait par l'intermédiaire de l'acide shikimique qui représente le principal mode d'accumulation des phénols dans les plantes. Cette voie fait intervenir une série de réactions et représente le chemin biosynthétique des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tryptophane,...tyrosine).

L'acide shikimique est obtenu par condensation de l'acide pyruvique activé par phosphorylation sur un sucre phosphorylé. L'addition d'une deuxième molécule d'acide pyruvique activé fournit l'acide préphénique qui par déshydratation et décarboxylation donne l'acide phénylpyruvique. Cet acide aromatique se transforme en phénylalanine, acide aminé aromatique, qui est à l'origine du métabolisme des composés aromatiques. La figure I.7 résume les principales étapes de la biosynthèse de l'acide cinnamique par cette voie métabolique<sup>21</sup>.

<sup>21</sup> Hahlbrock, K.; Scheel, D. *Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1989**, 40, 347–369.



**Figure I.7 :** Exemple de la biosynthèse d'un dérivé du phénylpropane : acide cinnamique.

## I.5. Procédés d'extraction des produits bioactifs

Il existe plusieurs procédés pour extraire les produits bioactifs en autres les HEs du corps du végétal. Cela va de la distillation à la vapeur d'eau à l'extraction par les solvants organiques (racines, feuilles, tiges,...) en passant par la simple expression (fruits) et l'enfleurage (fleurs). Le choix de la technique dépend de la localisation histologique de l'essence dans le végétal et de son utilisation dans les diverses industries.

*Le rendement d'extraction d'une HE est de l'ordre de 1% par rapport à la masse du végétal, à l'exception du clou de girofle où il est supérieur à 15% ou la badiane de Chine qui renferme 5% d'essence<sup>22</sup>.*

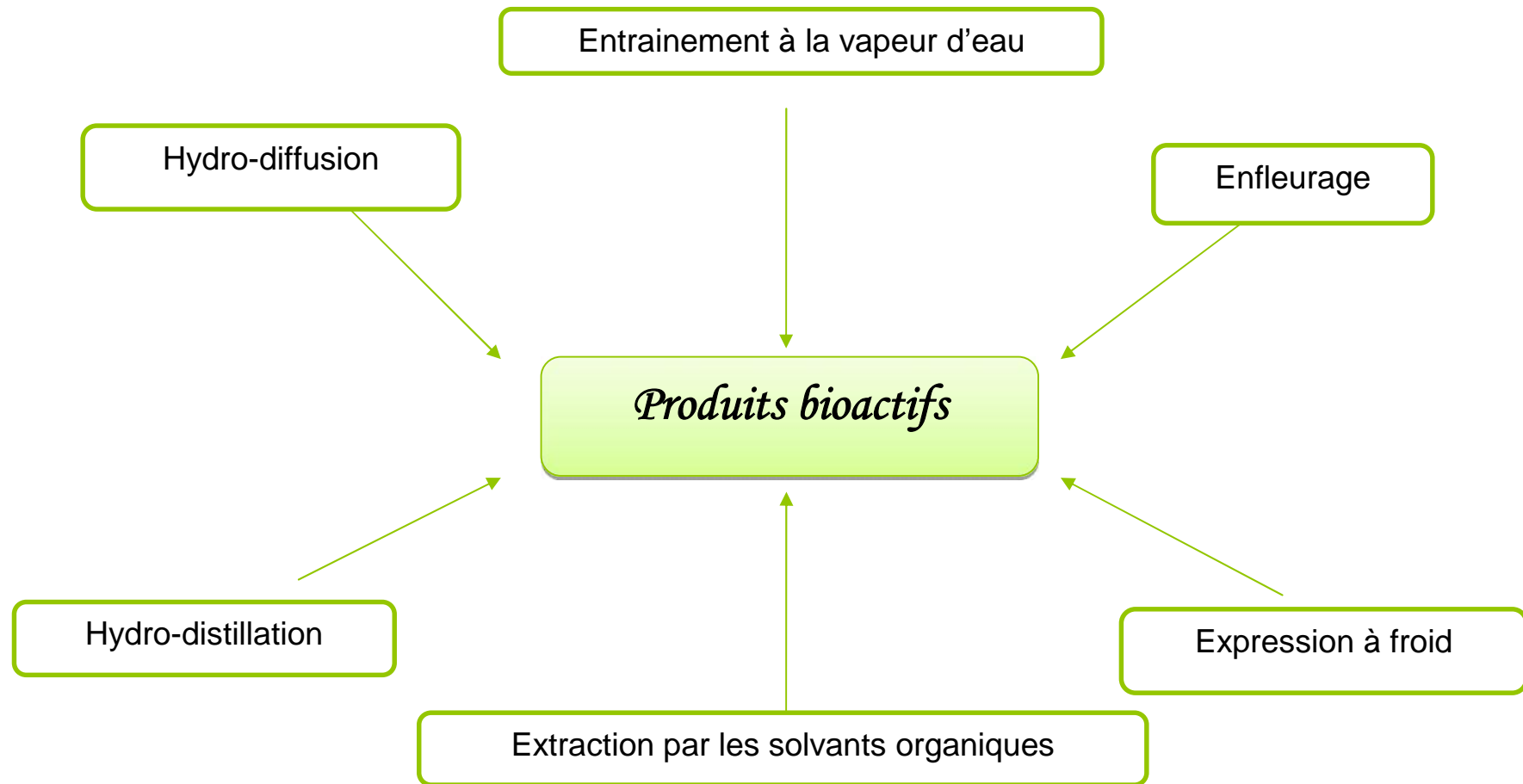
### I.5.1. Techniques d'extraction conventionnelles

L'extraction des produits bioactifs, ainsi que les HEs peut être réalisée au moyen de nombreux et divers procédés classiques (Figure I.8), basés sur des techniques anciennes :

- *Entrainement à la vapeur d'eau;*
- *Hydro-distillation;*
- *Expression;*
- *Enfleurage ;...*

<sup>22</sup> Valnet, J. « Aromathérapie : traitement des maladies par les essences des plantes », Ed. Vigot **2001**, p. 220.

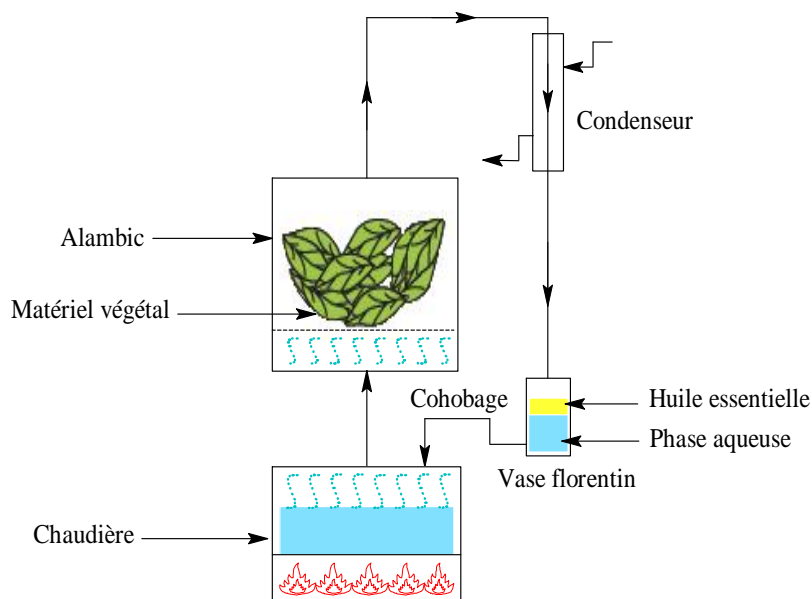




**Figure I.8 :** *Procédés d'extraction conventionnels des produits bioactifs.*

### I.5.1.1. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'un des procédés d'extraction les plus anciens pour l'obtention des HEs. Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur ascendant ou descendant sans macération préalable. Cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale, elle est basée sur le fait que la plupart des composés odorants volatils contenus dans les végétaux sont entraînaables par la vapeur d'eau. Le plus souvent, la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille perforée (Figure I.9).



**Figure I.9 :** Schéma de montage de l'entraînement à la vapeur d'eau.

Durant le passage de la vapeur à travers la matière végétale, l'HE est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau-HE ». Le mélange est ensuite conduit vers le condenseur et l'essencier (vase de décantation pour les HEs) avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique (HE). L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile<sup>23,24</sup>.

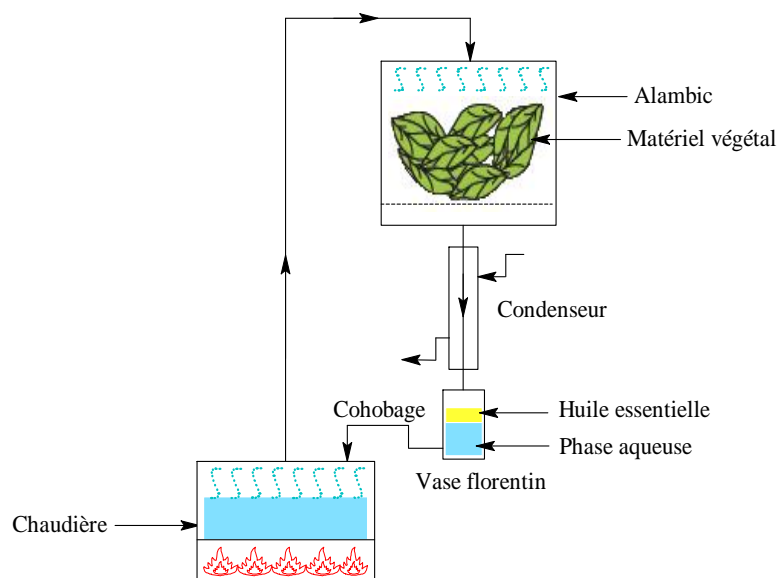
### I.5.1.2. Hydro-diffusion

L'hydro-diffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur (Figure I.10). Dans le cas de l'hydro-diffusion, le courant de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau-HE » dispersé dans la matière végétale. Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydro-diffusion présente l'avantage de ne pas mettre en

<sup>23</sup> Li, Y.; Fabiano-Tixier, A.S.; Chemat, F. « *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry* », SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability **2014**, p.78.

<sup>24</sup> Fernandez, X.; Chemat, F. et Tiên Do, T.K. « *Les huiles essentielles - Vertus et applications* », Ed. Vuibert, Paris **2012**, p.160.

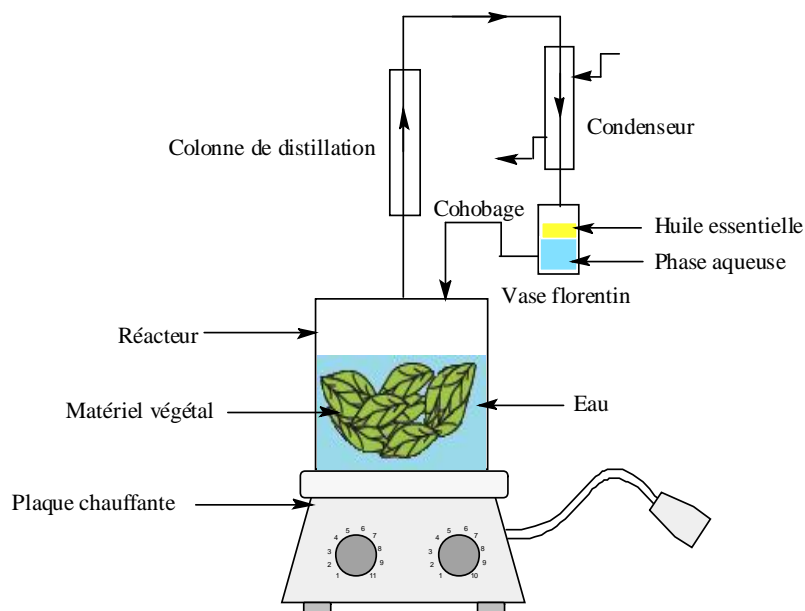
contact direct l'eau et la matière végétale. De plus, l'hydro-diffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur<sup>25</sup>.



**Figure I.10 :** Schéma du dispositif de l'hydro-diffusion.

### I.5.1.3. Hydro-distillation "HD"

L'hydro-distillation est l'une des méthodes les plus préconisées pour l'extraction des HEs à partir des épices sèches. Son principe consiste à immerger la matière végétale directement dans un réacteur rempli d'eau placé sur une source de chaleur (Figure I.11).



**Figure I.11 :** Schéma de montage de l'hydro-distillation.

<sup>25</sup> Tongnuanchan, P. and Benjakul, S. *J. Food Sci.* **2014**, 79(7), R1231.

L'ensemble est ensuite porté à ébullition sous une pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique.

Ce mélange constitué d'eau et d'HE est ensuite refroidi et condensé dans un essencier ou vase florentin. Une fois condensé, eau et molécules aromatiques, du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique contenant l'HE. La distillation peut s'effectuer avec ou sans cohobage (recyclage de l'eau de distillation à l'aide d'un siphon) des eaux aromatiques obtenues lors de la décantation<sup>24</sup>.

#### I.5.1.4. Extraction par les solvants organiques

La technique d'extraction « classique » par solvant a été mise en œuvre pour les matières végétales fragiles telles que les fleurs, qui ne tolèrent pas la chaleur de distillation à la vapeur. Son principe consiste à mélanger le solvant avec la matière végétale dans un soxhlet, ensuite chauffer le mélange. Par la suite, le filtrat est concentré par évaporation du solvant.

Le concentrât est une résine (résinoïde), ou concrète (une combinaison de cire et d'HE). Cette concrète pourra être par la suite mélangée avec de l'alcool absolu pour extraire l'huile, et distillée ainsi, à des températures basses.

Une fois distillée, l'huile aromatique est récupérée après évaporation de l'alcool. Cette technique présente toutefois des inconvénients qu'il est important de signaler. En effet, l'intervention des solvants organiques peut entraîner des risques de contamination par des impuretés parfois difficile à éliminer. Pour cela, le choix du solvant d'extraction s'avère très délicat, il devrait posséder une certaine stabilité, une faible température d'ébullition afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. Parmi les solvants qui peuvent être utilisés pour l'extraction, nous pouvons citer : l'acétone, l'hexane, l'éther de pétrole, le méthanol ou l'éthanol<sup>25</sup>.

#### I.5.1.5. Expression à froid

L'expression à froid est une extraction sans chauffage réservée aux fruits d'hespéridés ou d'agrumes (Figure I.12).



**Figure I.12 :** Photo du dispositif de l'expression à froid.

Le principe de ce procédé mécanique est basé sur la rupture des péricarpes riches en cellules sécrétrices. L'HE ainsi libérée est entraînée par un flux d'eau. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme. L'essence est alors isolée par décantation ou centrifugation<sup>26</sup>.

#### I.5.1.6. Enfleurage

L'enfleurage est l'un des plus anciens procédés. Il est basé sur l'affinité des parfums pour les graisses. Dans ce système d'extraction, on distingue deux méthodes selon la résistance de la plante à la chaleur : l'enfleurage à froid et l'enfleurage à chaud<sup>27,28</sup>.

L'enfleurage à froid permet de traiter les fleurs les plus délicates (comme le jasmin ou la tubéreuse). Pratiquement, on dépose manuellement et délicatement les pétales de fleurs une à une sur des plaques de verre enduites d'une mince couche de graisse inodore. Puis, on superpose ces plaques sur des châssis de bois. Les substances volatiles diffusent et sont absorbées par la couche de graisse. Au bout de quelques jours, la graisse est saturée en essence végétale (Figure I.13).



**Figure I.13 :** Photos du dispositif de l'enfleurage à froid<sup>27</sup>.

On renouvelle périodiquement les fleurs 10 à 15 fois jusqu'à saturation du corps gras (2kg de fleurs pour 1 kg de graisse). Une fois la graisse parfumée recueillie, on la fond au bain-marie, on la décante et on la filtre. Après refroidissement on obtient une pommade florale qui restitue fidèlement l'odeur de la fleur et qui est ensuite épuisée à l'alcool.

L'enfleurage à chaud consiste à faire infuser les fleurs les moins fragiles (telles que la rose de Mai, la cassie, la violette ou la fleur d'oranger) dans des graisses ou des huiles inodores préalablement chauffées au bain-marie.

<sup>26</sup> Ferhat, M.A.; Meklati, B.Y. *Flavour Frag. J.* **2007**, 22, 494–504.

<sup>27</sup> Beneteaud, E. « *Les techniques d'extraction* », Comité Français du Parfum **2011**.

<sup>28</sup> Salomé-Abarca, L.F.; Soto-Hernández, R.M.; Cruz-Huerta, N. and González-Hernández, V.A. *Bot. Sci.* **2015**, 9(3), 633–638.

Ce procédé est pratiquement en voie de disparition en raison de son coût élevé et de la nécessité d'une main d'œuvre importante.

### 1.5.2. Techniques d'extraction innovantes

Les techniques traditionnelles d'extraction ont certes démontré leur efficacité mais aussi leurs limites en termes de productivité, de rentabilité et de qualité des extraits. En effet, la perte de certains constituants, la dégradation de certains composés insaturés par effet thermique, ainsi que la présence de résidus de solvants organiques plus ou moins toxiques peuvent être engendrés par ces techniques d'extraction.

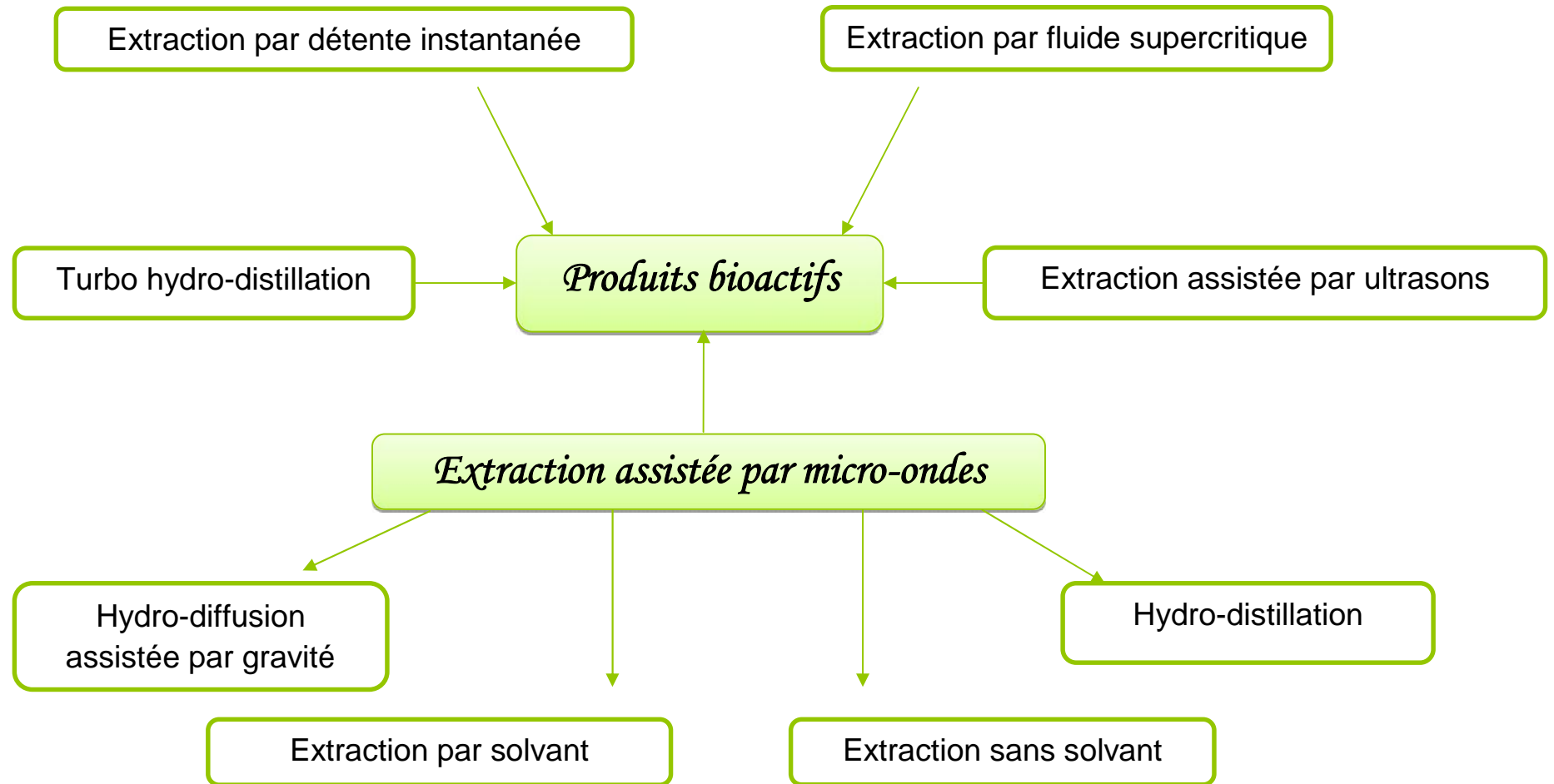
Pour pallier à ces inconvénients, de nouvelles techniques respectant le concept et les principes d'extraction verte se sont développées, ces dernières années, offrant ainsi de nombreux avantages (réduction du temps d'extraction sans altérer la composition des extraits, diminution de la consommation d'énergie, utilisation de petite quantité de solvant ou absence de solvant,...).

Parmi ces procédés récents, basés sur des techniques nouvelles (Figure **I.14**), nous pouvons citer :

- *L'extraction assistée par ultrasons;*
- *L'extraction par fluide supercritique;*
- *L'extraction par détente instantanée contrôlée;*
- *La turbo hydro-distillation;*
- *L'extraction assistée par micro-ondes associée avec différentes techniques classiques (hydro-distillation, extraction sans solvant, extraction par solvant et extraction par hydro-diffusion et gravité).*

A noter que d'autres techniques d'extraction des HEs ont été développées comme par exemple : Entraînement à l'air assisté par micro-ondes « *Compressed Air Microwave Distillation (CAMD)* », Entraînement à la vapeur assisté sous micro-ondes « *Microwave Steam Distillation (MSD)* », Hydro-distillation par micro-ondes sous vide pulsé « *Vacuum Microwave Hydrodistillation (VMHD)* », Vapo-diffusion Assistée par Micro-ondes « *Microwave Steam Diffusion (MSDf)* », Extraction sans solvant améliorée assistée par micro-ondes « *Improved Solvent Free Microwave Extraction (Improved SFME)* »<sup>29</sup>,...

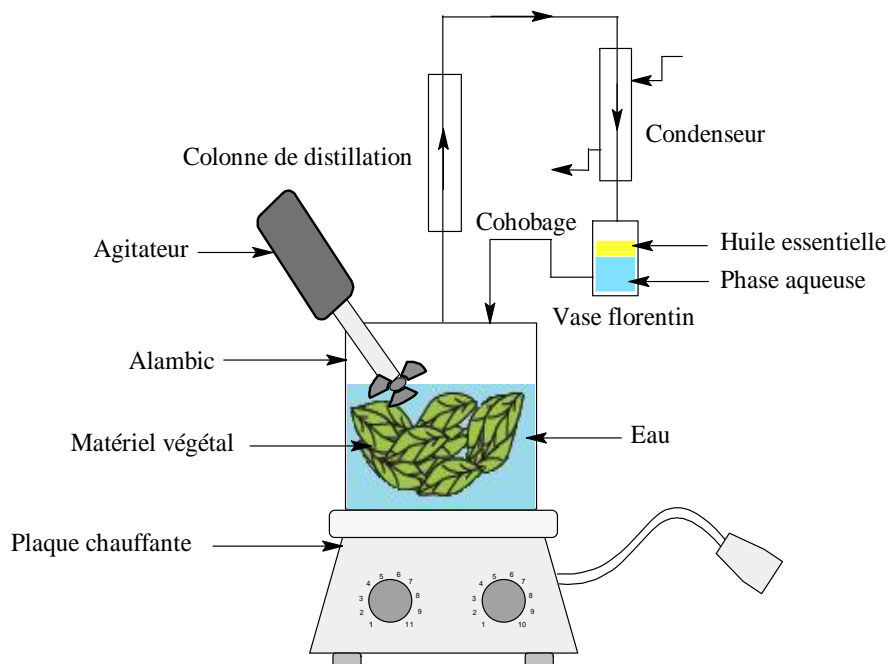
<sup>29</sup> a) Chemat, F.; Abert-Vian, M. « Microwave-Assisted Extraction of Essential Oils and Aromas », In Chemat, F.; Cravotto, G. (Eds.), *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, Food Engineering Series, Springer, New York **2013**, pp. 53–68; b) Chemat, F. and Boutekedjiret, C. « Extraction // Steam Distillation », In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier B.V, Amsterdam **2015**, pp. 12.



**Figure I.14 :** *Procédés d'extraction récents des produits bioactifs.*

### I.5.2.1. Turbo hydro-distillation "THD"

La turbo hydro-distillation ou THD est un procédé d'hydro-distillation accéléré en discontinu. Son principe consiste à immerger la matière végétale dans un alambic et ensuite l'ensemble est porté continuellement à ébullition sous pression atmosphérique et agité avec un agitateur en acier inoxydable. Cette technique représente une alternative aux hydro-distillations de longue durée ou en surpression (Figure I.15).



**Figure I.15 :** Schéma du procédé de la Turbo Hydro-distillation.

L'alambic contenant la matière végétale est équipé d'un robot agitateur qui permet d'une part, la dilacération des matières végétales, d'autre part, une agitation turbulente, d'où un meilleur coefficient de transfert thermique et une augmentation de la surface de vaporisation. Outre le recyclage des eaux de cohobage, ce procédé permet la récupération des fractions les plus volatiles grâce à un système de condensation secondaire<sup>23</sup>.

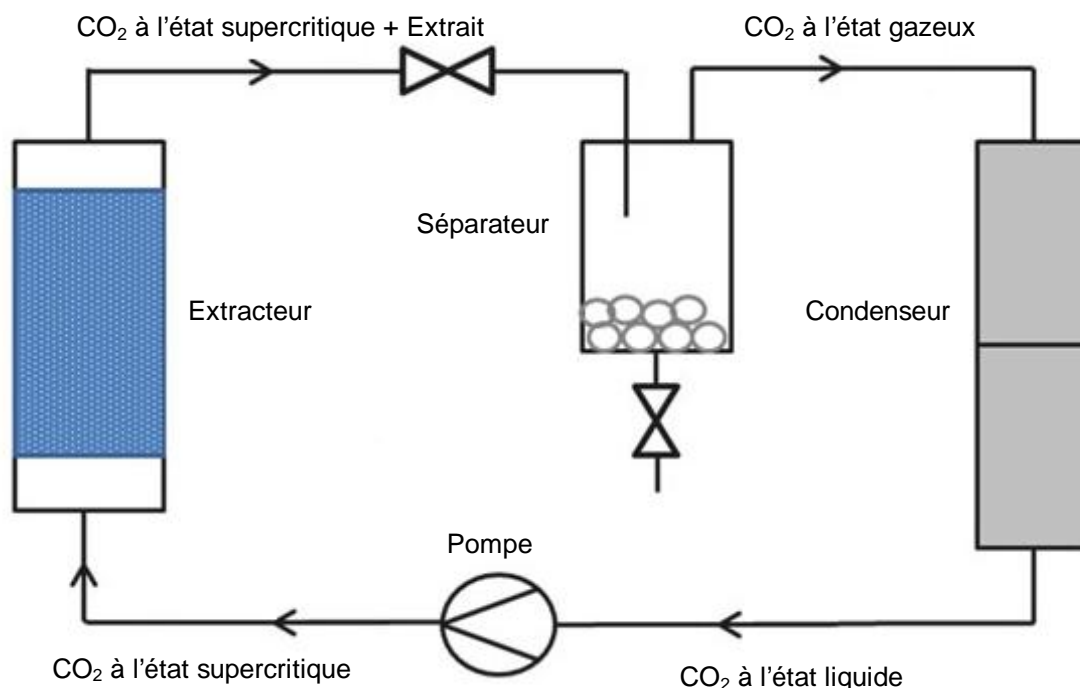
### I.5.2.2. Extraction par fluide supercritique

Les fluides supercritiques ont été considérés comme un moyen alternatif pour l'extraction des HEs. Le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) est le fluide supercritique le plus couramment utilisé du fait de ses conditions critiques modérées. Dans des conditions de haute pression et à température supérieure à  $31^\circ\text{C}$ , le  $\text{CO}_2$  se trouve dans un état dit « supercritique », intermédiaire entre le gaz et le liquide. Dans cet état, le  $\text{CO}_2$  présente la particularité d'extraire les molécules aromatiques à partir de la matière première.

L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. Son principe consiste à charger la matière végétale dans



l'extracteur, puis le CO<sub>2</sub> introduit sous pression est réfrigéré<sup>25,27</sup>. La figure **I.16** illustre le schéma de ce procédé.



**Figure I.16** : Schéma du procédé de l'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique<sup>30</sup>.

La pression y étant réduite, le CO<sub>2</sub> reprend sa forme gazeuse pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant. Après évaporation du solvant, l'extrait est décanté pour obtenir l'absolue. Le dioxyde de carbone, quant à lui, est récupéré dans un condensateur et recyclé pour de nouvelles opérations.

### I.5.2.3. Extraction par détente instantanée contrôlée "DIC"

Le procédé détente instantanée contrôlée (DIC) est une technique d'extraction-séparation directe basée sur la thermodynamique de l'instantanéité et des processus d'auto-vaporisation couplée à l'évolution hydro-thermo-mécanique de nombreux polymères à usages alimentaire, cosmétique et pharmaceutique<sup>30</sup>. Cette méthode d'extraction permet d'extraire les composés volatils par évaporation pendant une courte durée sous haute température (180°C) et haute pression (10 bars) suivi d'une auto-vaporisation de structures végétales résultant de multi-cycles de chute de pression instantanée. Ce procédé sans solvant présente une amélioration significative dans l'efficacité ou la consommation d'énergie et un temps de chauffage très court dans chaque cycle DIC limitant la dégradation thermique.

<sup>30</sup> Meullemiestre, A.; Breil, C.; Abert-Vian, M.; Chemat, F. « Modern Techniques and Solvents for the Extraction of Microbial Oils », SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability **2015**, p. 52.

En outre, la DIC permet d'obtenir des HEs avec des rendements plus élevés et une qualité supérieure à celle des procédés classiques<sup>23</sup>. La figure **I.17** représente l'appareillage de ce procédé.



**Figure I.17** : Appareillage du procédé de l'extraction par DIC<sup>31</sup>.

#### I.5.2.4. Extraction assistée par ultrasons

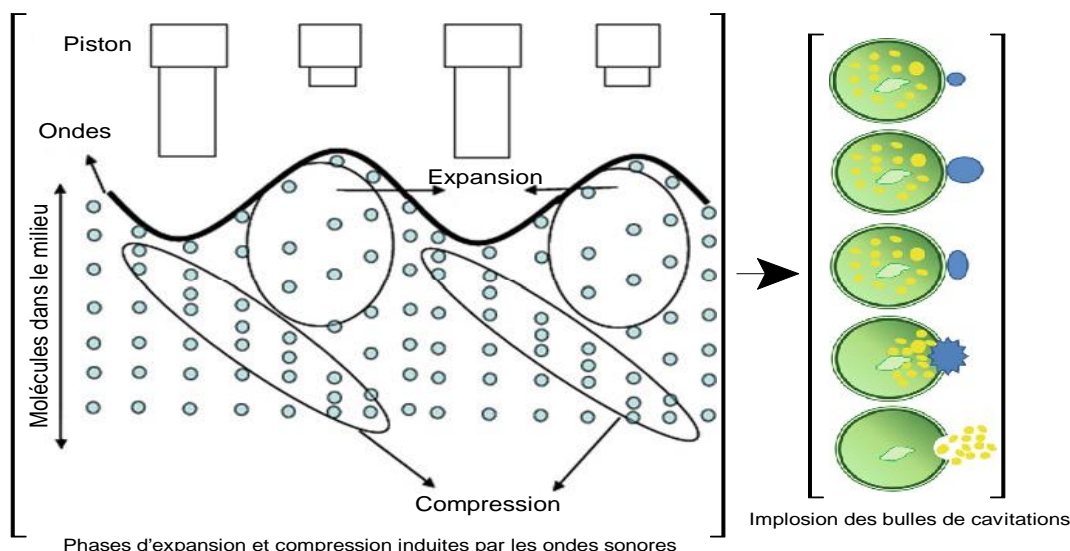
L'extraction assistée par ultrasons est une technologie émergente qui a été mise au point dans le but d'améliorer l'efficacité et le rendement d'extraction, et de réduire le temps et la consommation d'énergie durant l'extraction.

Son principe consiste à immerger la matière végétale dans l'eau ou dans le solvant, et en même temps elle est soumise à l'action des ultrasons<sup>32</sup>. Pendant la sonication, les ondes sonores (20 kHz à 10 MHz) utilisées induisent des vibrations mécaniques agissant comme un piston dans la surface du milieu, et conduisent au phénomène de cavitation à travers une succession de phases d'expansion et de compression. L'implosion des bulles de cavitation générées donne lieu à des micro-jets pour détruire les glandes sécrétrices des HEs afin de faciliter le transfert de masse et la libération de l'HE (Figure **I.18**).

Cet effet de cavitation est fortement dépendant des paramètres de fonctionnement (fréquence ultrasonique, intensité, température et temps de traitement, etc...) qui sont importants pour un fonctionnement effectif des sono-réacteurs.

<sup>31</sup> Perez, I.; Bald, C.; de Maranon, I.M.; Allaf, K. « DIC Intensification of the Mechanical Extraction of Lipids by Pressing », In Allaf, T.; Allaf, K. (Eds.), *Instant Controlled Pressure Drop (D.I.C.) in Food Processing: From Fundamental to Industrial Applications*, Food Engineering Series, Springer Science, New York **2014**, pp. 163–176.

<sup>32</sup> Chemat, F.; Zill-e-Huma, H.; Khan, M.K. *Ultrason. Sonochem.* **2011**, 18, 813–835.



**Figure I.18 :** Schéma démonstratif de la cavitation ultrasonore<sup>30</sup>.

En plus de l'amélioration du rendement, l'extraction assistée par ultrasons fournit des HEs de très haute qualité avec moins de dégradation thermique. L'extraction par ultrasons peut être couplée ou associée avec d'autres techniques d'extraction telles que l'énergie des micro-ondes, l'extraction par fluide supercritique, ou par des méthodes classiques telle que l'extraction au Soxhlet<sup>23,30</sup>.

#### I.5.2.5. Extraction assistée par micro-ondes

Les micro-ondes sont une source de chaleur sans contact qui permet d'obtenir un chauffage plus efficace et plus sélective. Avec l'aide de micro-ondes, la distillation peut maintenant être achevée en quelques minutes au lieu des heures avec divers avantages qui sont en conformité avec la chimie verte et les principes d'extraction.

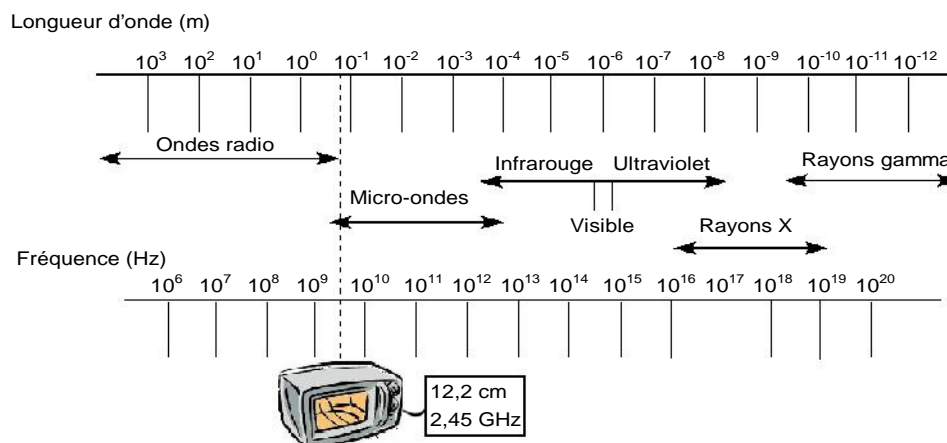
Dans ce procédé, les matières végétales sont extraites dans un réacteur micro-ondes avec ou sans solvants organiques ou dans l'eau, dans des conditions différentes selon le protocole expérimental.

##### Principes des micro-ondes

Les radiations micro-ondes utilisent un champ électromagnétique à une fréquence spécifique allant de 300 MHz à 300 GHz. Les fréquences des micro-ondes se situent sur le spectre électromagnétique entre les infrarouges et les ondes radio, avec des longueurs d'ondes comprises entre 1 mm et 1 m (Figure I.19).

Cependant, seules quelques fréquences sont autorisées pour des utilisations industrielles, scientifiques et médicales afin d'éviter toutes interférences avec les

radiocommunications et les radars, et en général 0,915 et 2,45 GHz (  $\lambda = 12,2$  cm) sont les plus utilisés dans le monde entier<sup>33</sup>.



**Figure I.19 :** *Spectre électromagnétique.*

Les principes de base de l'extraction par micro-ondes sont différents de ceux des méthodes classiques (solide-liquide ou extraction simple), parce que l'extraction se produit à la suite de changement dans la structure cellulaire provoquée par les ondes électromagnétiques.

Dans l'extraction par micro-ondes, l'accélération des procédés et l'élévation du rendement d'extraction peuvent être le résultat d'une combinaison synergique de deux phénomènes de transfert : transfert de chaleur et de masse qui se propagent dans la même direction, de l'intérieur vers l'extérieur.

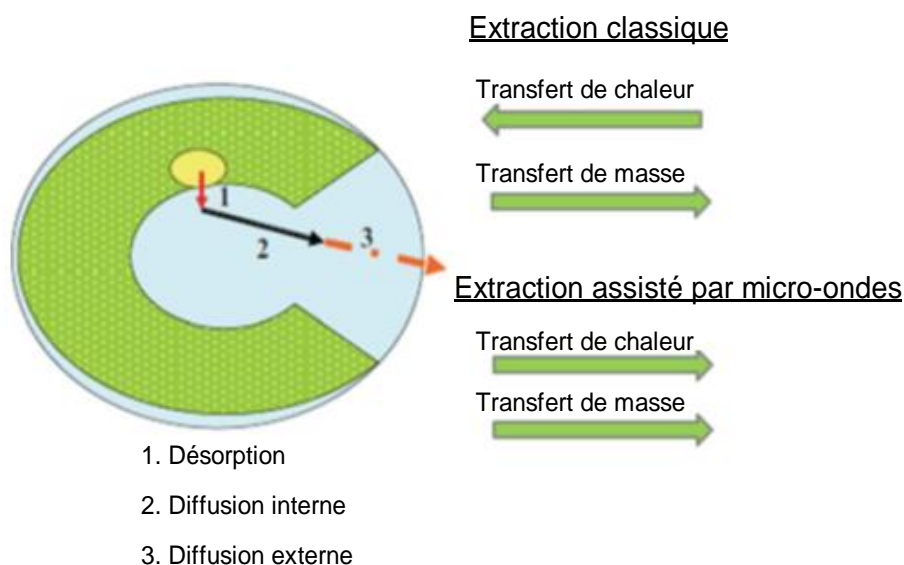
D'autre part, dans l'extraction classique, le transfert de masse s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur, bien que le transfert de chaleur se transmette de l'extérieur vers l'intérieur du substrat (Figure I.20).

Par ailleurs, bien que dans l'extraction conventionnelle, la chaleur est transférée du fluide de chauffage à l'intérieur de l'échantillon, dans l'extraction par micro-ondes la chaleur est dissipée de façon volumétrique à l'intérieur du milieu irradié<sup>34,35</sup>.

<sup>33</sup> Leonelli, C.; Veronesi, P.; Cravotto, G. « Microwave-Assisted Extraction: An Introduction to Dielectric Heating », In Chemat, F.; Cravotto, G. (Eds.), *Microwave-Assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, Food Engineering Series, Springer, New York **2013**, pp. 1–14.

<sup>34</sup> Veggi, P.C.; Martinez, J.; Meireles, M.A.A. « Fundamentals of Microwave Extraction », In Chemat, F.; Cravotto, G. (Eds.), *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, Food Engineering Series, Springer, New York **2013**, pp. 15–52.

<sup>35</sup> Chemat, F.; Marie E. Lucchesi, M.E. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.* **2005**, 20, 77–99.



**Figure I.20 :** Mécanismes de base de transfert de chaleur et de masse dans l'extraction classique et par micro-ondes des produits naturels.

Dans le procédé de chauffage par micro-ondes, le transfert d'énergie se produit par deux mécanismes : la conduction ionique et la rotation dipolaire à travers des inversions de dipôles et de déplacement d'ions chargés présents dans le soluté et le solvant.

Dans de nombreuses applications, ces deux mécanismes se produisent simultanément. La conduction ionique est la migration électrophorétique des ions lorsqu'un champ électromagnétique est appliqué, et la résistance de la solution à ce flux d'ions entraîne la friction qui réchauffe la solution. La rotation dipolaire signifie réarrangement des dipôles avec le champ appliqué.

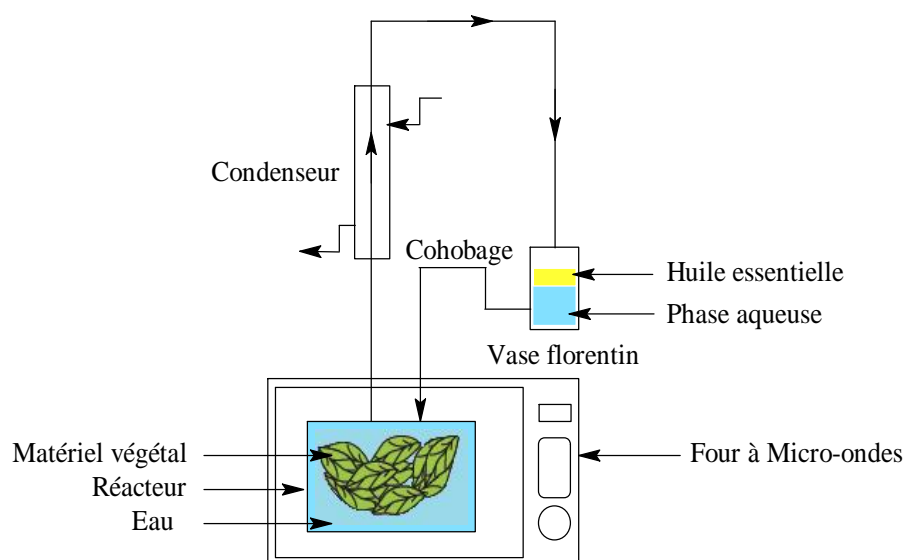
Le transfert d'énergie est la principale caractéristique du chauffage par micro-ondes. Traditionnellement, dans le transfert de chaleur du procédé classique, l'énergie est transférée à la matière par convection, par conduction et par le phénomène de radiation à travers la surface externe de la matière en présence de gradients thermiques.

En revanche, dans l'extraction par micro-ondes, l'énergie des micro-ondes est délivrée directement aux matériaux à travers les interactions moléculaires avec le champ électromagnétique par l'intermédiaire de la conversion d'énergie électromagnétique en énergie thermique<sup>34</sup>.

#### I.5.2.5.1. Hydro-distillation assistée par micro-ondes

L'hydro-distillation assistée par micro-ondes est un procédé basé entièrement sur le principe de l'hydro-distillation classique, dont une partie du montage est installée dans le four à micro-ondes, et l'autre partie : le système de réfrigération et la partie estimée à récupérer les essences sont situées à l'extérieur du four (Figure I.21).

La matière végétale est donc placée en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un réacteur disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes. Cette technique offre un temps d'extraction plus court, pour un rendement et une composition chimique de l'huile similaire par rapport à une hydro-distillation classique<sup>35</sup>.



**Figure I.21** : Schéma de montage de l'hydro-distillation assistée par micro-ondes.

#### I.5.2.5.2. Extraction par solvant assistée par micro-ondes

La méthode d'extraction par solvant assistée par micro-ondes a été mise au point pour l'extraction de divers composés et plus particulièrement pour l'extraction de composés aromatiques d'origine végétale. Ce procédé consiste à irradier par micro-ondes de la matière, végétale ou non, broyée au préalable en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (le méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les micro-ondes (hexane) pour l'extraction de composés apolaires<sup>35,36</sup>.

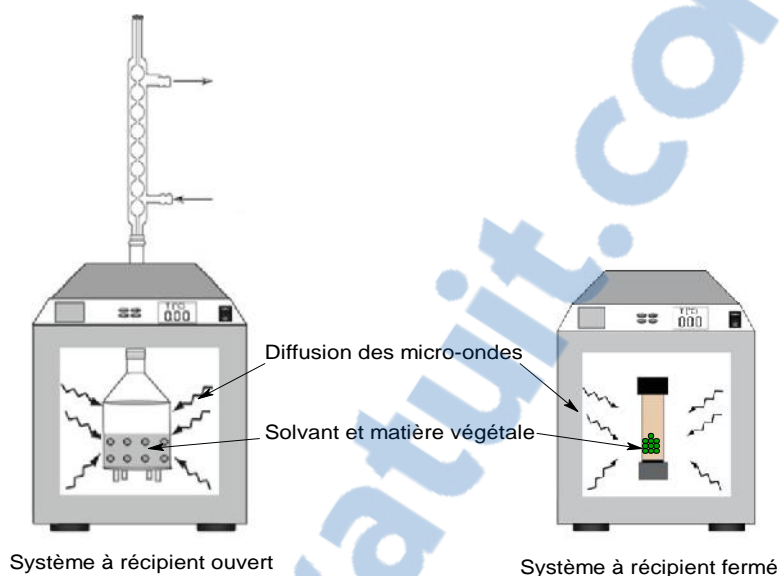
Ensuite, cette technique a été brevetée en 1990 comme étant un processus assisté par micro-ondes. Son principe consiste à traiter sous irradiation micro-ondes la matière végétale immergée dans un solvant n'absorbant pas les rayonnements micro-ondes tel que l'hexane.

Lorsque les cellules d'huile végétale sont soumises à des contraintes thermiques sévères et des pressions locales élevées, la montée en pression dans les cellules de l'HE excède leur capacité d'expansion et provoque une rupture des glandes contenant les HEs plus rapide que dans l'extraction conventionnelle. Les matières volatiles et l'HE se dissolvent dans le solvant organique avant d'être séparées par extraction liquide-liquide.

<sup>36</sup> Li, Y.; Fabiano-Tixier, A-S.; Abert-Vian, M.; Chemat, F. « Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants and Food Colors », In Chemat, F.; Cravotto, G. (Eds.), *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, Food Engineering Series, Springer, New York **2013**, pp. 103–126.



Les micro-ondes peuvent être appliquées à des échantillons en utilisant deux technologies : un système à récipient fermé à température et pression contrôlées et l'autre système à récipient ouvert sous pression atmosphérique (Figure I.22).



**Figure I.22 :** Extraction par solvant assistée par micro-ondes<sup>36</sup>.

Dans tous les cas, les rendements et la composition des extraits de micro-ondes sont comparables à ceux obtenus par extraction par solvant classique tel que le procédé d'extraction au Soxhlet, mais avec une réduction du temps d'extraction<sup>37</sup>.

#### I.5.2.5.3. Hydro-diffusion assistée par micro-ondes et gravité

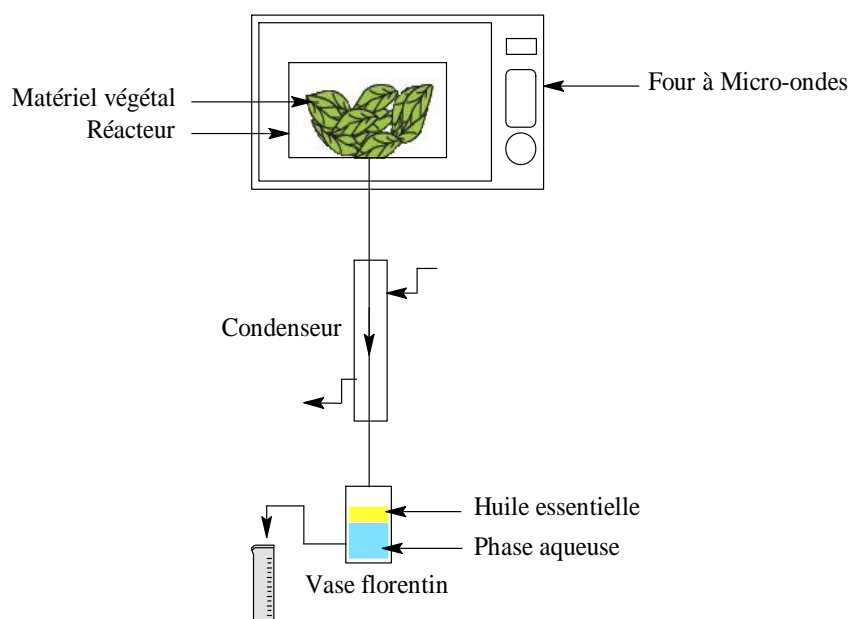
L'hydro-diffusion assistée par micro-ondes et gravité a été brevetée en 2008, par Chemat *et al.*<sup>38</sup>. Ce procédé récent a été désigné pour l'extraction des HEs de différentes matrices végétales par hydro-diffusion *via* un rayonnement micro-ondes sous pression atmosphérique. Cette technique consiste à placer la matière végétale dans un réacteur à l'intérieur du four micro-ondes, sans ajout d'eau ou de solvant organique (Figure I.23).

Le chauffage de l'eau de constitution de la matière première permet la rupture des glandes contenant les HEs. Les essences ainsi que l'eau interne du matériel végétal sont libérées, puis transférées de l'intérieur de la plante vers l'extérieur : il s'agit du phénomène d'hydro-diffusion. Le mélange « eau-HE » est ensuite condensé par un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes, puis recueilli dans un vase florentin.

<sup>37</sup> Proctor, A. « *Alternatives to Conventional Food Processing* », Royal Society of Chemistry, Great Britain 2011, p. 481.

<sup>38</sup> Chemat, F.; Abert-Vian, M.; Visoni, F. *Brevet Européen*, EP. 1.955.749 A1, 2008.

Cette technique permet d'obtenir des rendements similaires à ceux recueillis par extraction conventionnelle, une meilleure qualité des HEs, une réduction du temps d'extraction et un gain d'énergie<sup>29a</sup>.



**Figure I.23 :** Schéma de montage de l'hydro-diffusion assistée par micro-ondes et gravité.

#### I.5.2.5.4. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes "SFME"

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes « Solvent Free Microwave Extraction (SFME) » est l'un des procédés d'extraction le plus récent, qui a été développé et breveté en 2004, par Chemat *et al.*<sup>39</sup>.

Cette nouvelle technologie a été conçue pour l'extraction des produits naturels par distillation sèche *via* un rayonnement micro-ondes sous pression atmosphérique, en l'absence d'eau et de solvant organique.

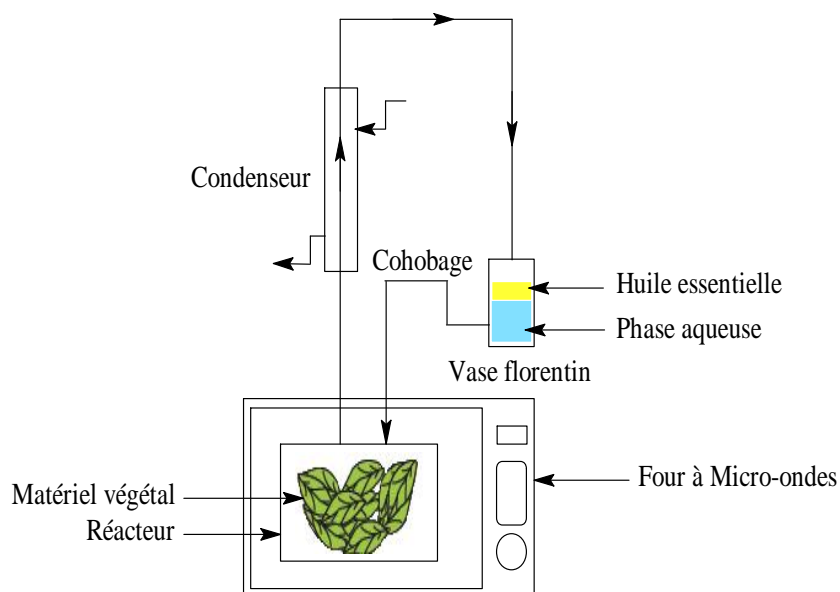
Basée sur un principe relativement simple, cette technique consiste à placer la matière végétale fraîche dans un réacteur à l'intérieur du four micro-ondes, sans ajout de solvant ou d'eau (Figure I.24).

Les micro-ondes provoquent le réchauffement de l'eau contenue dans la matière première ce qui engendre un éclatement des cellules de la plante et conduit au relargage des HEs.

<sup>39</sup> a) Chemat, F.; Smadja, J.; Lucchesi, M.E. *Brevet Européen*, EP. 1.439.218 B1, **2004**; b) Chemat, F.; Lucchesi, M.E.; Smadja, J. *Brevet Américain*, US. 2004/0187340 A1, **2004**.



Les HEs libérées sont ensuite entraînées par la vapeur d'eau produite à partir de l'eau interne du matériel végétal.



**Figure I.24 :** Schéma de montage de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME).

Le mélange « eau-HE » est ensuite condensé de façon continue par un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes, puis recueilli dans un vase florentin. L'excès de la phase aqueuse est réintroduit par un système de cohobage à l'intérieur du réacteur afin de maintenir un taux d'humidité adéquat à la matrice végétale<sup>29a</sup>.

***Remarque :** Une fois extraite l'HE doit être conservée à l'abri de la lumière et de l'air pour éviter son oxydation, sa polymérisation et sa résinification.*

### I.5.3. Etude comparative entre les extractions classiques et celles par micro-ondes

Dans de nombreux articles publiés comparant l'extraction assistée par micro-ondes avec d'autres méthodes d'extraction récentes et conventionnelles, l'extraction assistée par micro-ondes a été reconnu comme une alternative potentielle et performante pour l'extraction de substances bioactives à partir des matières végétales<sup>34</sup>.

Une étude comparative entre les méthodes d'extraction conventionnelles et celles assistées par micro-onde est exposée sur le tableau **I.1**.

**Tableau I.1** : Comparaison entre les méthodes d'extraction conventionnelles et celles assistées par micro-ondes<sup>40</sup>.

Méthodes d'extraction conventionnelles	Méthodes d'extraction assistées par micro-ondes
- Le mécanisme de chauffage se fait à partir de la surface du récipient à l'intérieur du récipient réactionnel.	- Etant donné que le réacteur est transparent aux micro-ondes, le contenu du réacteur est chauffé simultanément entraînant un chauffage volumétrique.
- Le récipient doit être en contact physique avec la source de chaleur.	- Le réacteur n'a pas besoin d'un contact physique avec la source de chaleur.
- Le chauffage s'effectue par la source thermique.	- Le chauffage s'effectue par des ondes électromagnétiques.
- Le mécanisme de chauffage est la conduction suivie par convection à l'intérieur du récipient.	- Le mécanisme de chauffage est la polarisation diélectrique et la conduction ionique.
- Le transfert d'énergie se produit depuis la surface du récipient au mélange pour faire réagir les espèces.	- Le noyau du contenu est chauffé directement tandis que la surface agit en tant que moyen de perte thermique.
- Tous les composants du mélange réactionnel reçoivent la même quantité d'énergie thermique.	- Les composants spécifiques du mélange réactionnel peuvent être chauffés à des degrés différents en fonction de leur capacité à absorber les micro-ondes.
- Le taux de chauffage est minime.	- Le taux de chauffage est très élevé.
- La température la plus élevée qui peut être atteinte est contrôlée par le point d'ébullition du mélange.	- La température du mélange peut être beaucoup plus élevée que son point d'ébullition, elle est donc indépendante du point d'ébullition des solvants.
- L'extraction nécessite plusieurs heures.	- L'extraction nécessite quelques minutes.

En plus des nombreux mérites énumérés dans le tableau **I.1**, l'extraction assistée par micro-ondes offre d'autres avantages comme le taux d'extraction très rapide, une meilleure stabilité des produits, l'augmentation de la pureté des extraits bruts, la possibilité d'utiliser des solvants moins toxiques, la réduction d'énergie et de la consommation de solvant; ce qui permet de diminuer l'impact sur l'environnement<sup>34,41,42</sup>.

<sup>40</sup> Mandal, S.C.; Mandal, V.; Das, K.A. « *Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications* », Elsevier, USA **2015**, p. 206.

<sup>41</sup> Sanchez-Prado, L.; Garcia-Jares, C.; Dagnac, T.; Llompert, M. *Trends Analyt. Chem.* **2015**, 71, 119–143.

<sup>42</sup> Segneanu, A.E.; Cziple, F.; Vlazan, P.; Sfirloaga, P.; Grozescu, I. and Gherman, V.D. « Biomass Extraction Methods », In Matovic, M.D. (Ed.), *Biomass Now: Sustainable Growth and Use*, InTech, Rijeka, Croatia **2013**, pp. 389–400.

Aussi d'un point de vue économique, l'extraction assistée par micro-ondes est réalisable car elle nécessite un coût modéré de l'installation d'équipement, beaucoup moins cher par rapport aux autres méthodes d'extraction conventionnelles et récentes.

En outre, cette technique présente de faibles risques avec aucun problème majeur sur le plan de la sécurité, du fait que la plupart des extractions sont généralement effectuées dans des conditions atmosphériques.

Cependant, l'extraction assistée par micro-ondes présente quelques inconvénients et des limites liées à sa faible sélectivité car elle est fortement dépendante de la nature du solvant (les solvants non polaires n'absorbent pas les micro-ondes) et de la température d'extraction. Malgré les inconvénients associés à l'extraction assistée par micro-ondes, ses avantages sont considérables.

D'une manière générale, les techniques d'extraction assistée par micro-ondes sont remarquables en termes d'efficacité de l'extraction, de stabilité et de reproductibilité de la technique et également la possibilité de conserver les valeurs fonctionnelles des substances bioactives extraites<sup>43</sup>.

Les avantages et les inconvénients des différents procédés d'extraction conventionnels et innovants sont décrits dans la figure **I.25**.

Par ailleurs, plusieurs études appliquées à différents types de plantes fraîches et sèches ont montré les performances et la fiabilité de l'extraction assistée par micro-ondes dans l'extraction de leurs HEs.

A titre indicatif les plantes ayant fait l'objet d'une extraction de leurs HEs par le procédé HD et SFME, accompagnées des conditions opératoires d'extraction, sont regroupées dans le tableau **I.2**.

---

<sup>43</sup> Chan, C.H.; Yusoff, R.; Ngoh, G.C.; Kung, F.W.L. *J. Chromatogra. A*. **2011**, 1218(37), 6213–6225.

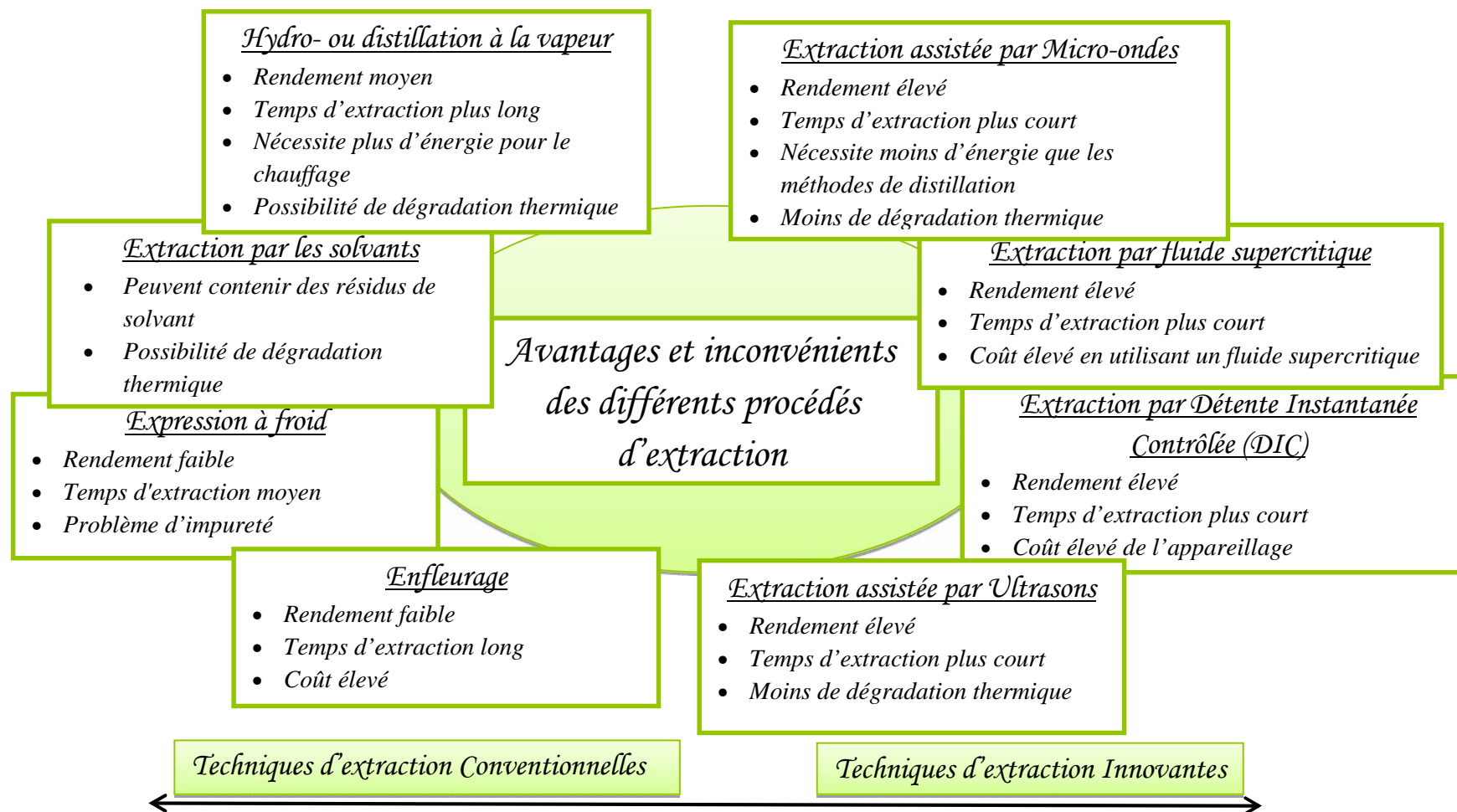


Figure I.25 : Avantages et inconvénients des différents procédés d'extraction conventionnels et innovants<sup>44</sup>.

<sup>44</sup> Park, Y.L.; Tak, J.H. « Essential Oils for Arthropod Pest Management in Agricultural Production Systems », In Preedy, V.R. (Ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Elsevier Science & Technology Books, USA 2016, pp. 61–70.

Tableau I.2 : Données de la littérature de quelques HEs extraites par HD et SFME.

Noms des plantes	Conditions opératoires d'extraction	Références
Pamplemousse <i>Citrus paradisi</i> L.	250g (250g + 2 L eau HD), P (atm), 85 W, <u><math>t = 20 \text{ min (180 min HD)}</math></u> Rdt = 0,44% (0,42% HD)	Uysal et al. <sup>45</sup>
Fougère <i>Dryopteris fragrans</i> L.	200g imbibé dans l'eau pour 1 h (200g + 1,4 L eau HD), P (atm), 520 W, <u><math>t = 34 \text{ min (5 h HD)}</math></u> , Rdt = 0,33 % (0,29 %HD)	Li et al. <sup>46</sup>
Myrte <i>Myrtus communis</i> L.	200g (200g + 1,5 L eau HD), P (atm), 1 KW, <u><math>t = 30 \text{ min (180 min HD)}</math></u> Rdt = 0,33% (0,32% HD)	Berka-Zougali et al. <sup>47</sup>
Romarin <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	200g, (200g + 2 L eau HD), P (atm), 1000 W, <u><math>t = 30 \text{ min (3 h HD)}</math></u> Rdt = 0,56 % (0,57 % HD)	Tigrine-Kordjani et al. <sup>48</sup>
Romarin <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	150g (1000g + 7 L eau HD), P (atm), 150 W, <u><math>t = 30 \text{ min (2 h HD)}</math></u> Rdt = 0,54 % (0,57 % HD)	Filly et al. <sup>49</sup>
Pin maritime <i>Pinus pinaster</i>	150g (500g + 9 L eau HD), P (atm), 600 W, <u><math>t = 60 \text{ min (8 h HD)}</math></u> Rdt = 0,27 % (0,26 % HD)	Meullemiestre et al. <sup>50</sup>

<sup>45</sup> Uysal, B.; Sozmen, F.; Aktas, O.; Oksal, B.S.; Kose, E.O. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2011**, *46*, 1455–1461.<sup>46</sup> Li, X.J.; Wang, W.; Luo, M.; Li, C.Y.; Zu, Y.G.; Mu, P.S.; Fu, Y.J. *Food Chem.* **2012**, *133*, 437–444.<sup>47</sup> Berka-Zougali, B.; Ferhat, M.A.; Hassani, A.; Chemat, F and Allaf, K.S. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 4673–4695.<sup>48</sup> Tigrine-Kordjani, N.; Meklati, B.Y.; Chemat, F. *Food Anal. Method.* **2012**, *5*, 596–603.<sup>49</sup> Filly, A.; Fernandez, X.; Minuti, M.; Visinoni, F.; Cravotto, G.; Chemat, F. *Food Chem.* **2014**, *150*, 193–198.<sup>50</sup> Meullemiestre, A.; Petitcolas, E.; Maache-Rezzoug, Z.; Ginies, C.; Chemat, F.; Rezzoug, S.A. *Wood. Mater. Sci. Eng.* **2014**, *9*(2), 76–83.

Tableau I.2 (suite)

Noms des plantes	Conditions opératoires d'extraction	Références
Pois d'Angole <i>Cajanus cajan</i> L. Millsp.	200g imbibé dans l'eau pour 1 h (200g + 1,5 L eau HD), P (atm), 660 W, <u><math>t = 44 \text{ min (5 h HD)}</math></u> Rdt = 0,33 % (0,29 % HD)	Qi et al. <sup>51</sup>
Millepertuis <i>Hypericum perforatum</i> L.	100g imbibé dans l'eau pour 1 h (100g + 2 L eau HD), P (atm), 468 W, <u><math>t = 33 \text{ min (4 h HD)}</math></u> Rdt = 0,36 % (0,08 % HD)	Abdelhadi et al. <sup>52</sup>
Galbanum <i>Ferula gummosa</i> Boiss	50g imbibé dans l'eau pour 1 h (150g + 2 L eau HD), P (atm), 800 W, <u><math>t = 30 \text{ min (3,5 h HD)}</math></u> Rdt = 0,4 % (0,32 % HD)	Mohammadhosseini et al. <sup>53</sup>
Fenouil <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	100g imbibé dans l'eau pour 20 min (100g + 1 L eau HD), P (atm), 600 W, <u><math>t = 37 \text{ min (3 h HD)}</math></u> Rdt = 0,46 % (0,46 % HD)	Benmoussaa et al. <sup>54</sup>
Lavande <i>Lavandula hybrida</i> L.	125g imbibé dans l'eau pour 10 min (250g + 3 L eau HD), P (atm), 500 W, <u><math>t = 30 \text{ min (90 min HD)}</math></u> Rdt = 5,4 % (4,55 % HD)	Filly et al. <sup>55</sup>

<sup>51</sup> Qi, X.L.; Li, T.T.; Wei, Z.F.; Guo, N.; Luo, M.; Wang, W.; Zu, Y.G.; Fu, Y.J.; Peng, X. *Ind. Crops Prod.* **2014**, 58, 322–328.<sup>52</sup> Abdelhadi, M.; Meullemiestre, A.; Gelicus, A.; Hassani, A.; Rezzoug, S.A. *Chem. Eng. Res. Des.* **2015**, 93, 621–631.<sup>53</sup> Mohammadhosseini, M.; Mahdavi, B.; Shahnava, M. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* **2015**, 18(6), 1321–1328.<sup>54</sup> Benmoussaa, H.; Farhat, A.; Romdhane, M.; Bouajila, J. *Arab J. Chem.* **2016**.<sup>55</sup> Filly, A.; Fabiano-Tixier, A.S.; Louis, C.; Fernandez, X.; Chemat, F. *C. R. Chimie* **2016**, 1–11.

L'examen des données du tableau **I.2**, révèle que le procédé SFME est avantageux par rapport à l'hydro-distillation classique du point de vue :

- *Quantitatif* : des rendements similaires ou parfois meilleurs à ceux obtenus par Hydro-distillation classique;
- *Qualitatif* : les HEs obtenues par SFME présentent une proportion plus importante de composés oxygénés, les plus valorisables sur le plan olfactif;
- *Temps d'extraction* : le temps d'extraction par SFME est réduit considérablement par rapport à l'hydro-distillation classique;
- *Economique* : le temps d'extraction étant réduit, le procédé est plus économique en temps, en énergie et puis en coût.
- *Environnemental* : le système SFME n'utilise ni solvant organique ni eau.

## I.6. Conclusion

Les différents aspects développés dans cette synthèse bibliographique sur les substances bioactives et particulièrement les HEs indiquent que ces essences végétales jouent un rôle important dans divers et multiples domaines. Ces substances de composition chimique complexe (composés terpéniques, aromatiques et autres...), peuvent être isolées à partir des différents organes de la plante (feuilles, fruits, fleurs, graines, etc.) et cela par des techniques traditionnelles d'une part, et par des procédés innovants d'autre part. Il a été montré que les nouvelles méthodes sont beaucoup plus rentables d'un point de vue coût, rendement et temps d'extraction.

L'extraction des feuilles brisées du basilic par hydro-distillation classique (HD) et par extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME), ainsi que la détermination des propriétés physico-chimiques des essences recueillies par ces deux méthodes feront l'objet du chapitre suivant.

## Références

- <sup>1</sup> Beloued, A. « *Plantes médicinales d'Algérie* », OPU, Alger **1998**.
- <sup>2</sup> Lafon, J.P.; Tharaud-Prayer, C. et Lévy, G. « *Biologie des plantes cultivées. Tome 1 : organisation, physiologie de la nutrition* », Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris **1988**, p. 240.
- <sup>3</sup> El Abed, D. et Kambouche, N. « *Les Huiles essentielles* », Editions Dar El Gharb, **2003**.
- <sup>4</sup> Richter, G. « *Métabolisme des végétaux: Physiologie et Biochimie* », Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, **1993**, p. 526.
- <sup>5</sup> Bernard, T.; Perineau, F.; Bravo, P.; Delmas, M. et Gaset, A. « *Informations chimie* », n° 298, Oct, **1988**, pp. 179–184.
- <sup>6</sup> Sallé, J.L. « *Les huiles essentielles ; Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie* », Ed. Frison – Roche, Paris **1991**, p. 21.
- <sup>7</sup> Stewart, G.H. *New. Zeal. J. Bot.* **1978**, 16, 185–205.
- <sup>8</sup> Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J. *Plant physiol.* **2004**, 135, 1893–1902.
- <sup>9</sup> Regnault-Roger, C. *Integrated Pest. Manag. Rev.* **1997**, 2, 25–34.
- <sup>10</sup> Capon, M.; Courilleau, V.; Valette, C. « *Chimie des couleurs et des odeurs* », Ed. Cultures et techniques **1990**, p. 204.
- <sup>11</sup> Bruneton, J. « *Eléments de phytochimie et pharmacologie* », Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris **1997**, pp. 405–426.
- <sup>12</sup> Degryse, A.C.; Delpla, I.; Voinier, M.A. « *Atelier Santé Environnement, Risques et bénéfices des huiles essentielles* », IGS. EHESP, **2008**.
- <sup>13</sup> Guignard, J. L. « *Biochimie végétale* », Ed. Masson, Paris **2000**, p. 166.
- <sup>14</sup> Allinger, N.L.; Cava, M.P.; De Jongh, D.C.; Johnson, C.R.; Lebel, N.A. et Stevens, C.L. « *Chimie organique* », Ediscience/Mc Graw-Hill, Paris **1975**, p. 813.
- <sup>15</sup> Teisseire, P.J. « *Chimie des Substances Odorantes* », Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris **1991**, p. 480.
- <sup>16</sup> Poulter, C.D.; Marsh, L.L.; Hughes, J.M.; Argyle, J.C.; Satterwhite, D.M.; Goodfellow, R.J.; Moesinger, S.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 3816–3823.
- <sup>17</sup> Finar, I.L. « *Organic chemistry* », Ed. Longman Scientific & Technical, New York **1994**, p. 965.
- <sup>18</sup> Thompson, J.D.; Chalchat, J.C.; Michel, A.; Linhart, Y.B.; Ehlers, B. *J. Chem. Ecol.* **2003**, 29(4), 859–880.



- <sup>19</sup> a) Bruneton, J. « *Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales* », Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris **1999**, pp. 388–391; b) Newman, J.D.; Chappell, J. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* **1999**, *34*, 95–106; c) Sell, C. « Chemistry of Essential Oils », In Baser, K.H.C.; Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*, Taylor & Francis Group, CRC Press: Boca Raton, FL, USA **2016**, pp. 165–194.
- <sup>20</sup> a) Singh, N.; Luthra, T.; Sangwan, R.S.; Thakur, R.S. *Curr. Res. Med. Aromat. Plants* **1990**, *11*, 174–196 ; b) Lamarti, A.; Badoc, A.; Deffieux, G.; Cadre, J.P. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* **1994**, *133*, 79–99.
- <sup>21</sup> Hahlbrock, K.; Scheel, D. *Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1989**, *40*, 347–369.
- <sup>22</sup> Valnet, J. « *Aromathérapie : traitement des maladies par les essences des plantes* », Ed. Vigot **2001**, p. 220.
- <sup>23</sup> Li, Y.; Fabiano-Tixier, A.S.; Chemat, F. « *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry* ». SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability **2014**, p.78.
- <sup>24</sup> Fernandez, X.; Chemat, F. et Tiên Do, T.K. « *Les huiles essentielles - Vertus et applications* ». Ed. Vuibert, Paris **2012**, p.160.
- <sup>25</sup> Tongnuanchan, P. and Benjakul, S. *J. Food Sci.* **2014**, *79*(7), R1231.
- <sup>26</sup> Ferhat, M.A.; Meklati, B.Y. *Flavour Frag. J.* **2007**, *22*, 494–504.
- <sup>27</sup> Beneteaud, E. « *Les techniques d'extraction* », Comité Français du Parfum **2011**.
- <sup>28</sup> Salomé-Abarca, L.F.; Soto-Hernández, R.M.; Cruz-Huerta, N. and González-Hernández, V.A. *Bot. Sci.* **2015**, *9*(3), 633–638.
- <sup>29</sup> a) Chemat, F.; Abert-Vian, M. « Microwave-Assisted Extraction of Essential Oils and Aromas », In Chemat, F.; Cravotto, G. (Eds.), *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice, Food Engineering Series*, Springer, New York **2013**, pp. 53–68; b) Chemat, F. and Boutekedjiret, C. « Extraction // Steam Distillation », In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier B.V, Amsterdam **2015**, pp. 12.
- <sup>30</sup> Meullemiestre, A.; Breil, C.; Abert-Vian, M.; Chemat, F. « Modern Techniques and Solvents for the Extraction of Microbial Oils ». SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability **2015**, p. 52.
- <sup>31</sup> Perez, I.; Bald, C.; de Maranon, I.M.; Allaf, K. « DIC Intensification of the Mechanical Extraction of Lipids by Pressing », In Allaf, T.; Allaf, K. (Eds.), *Instant Controlled Pressure Drop (D.I.C.) in Food Processing: From Fundamental to Industrial Applications*, Food Engineering Series, Springer Science, New York **2014**, pp. 163–176.
- <sup>32</sup> Chemat, F.; Zill-e-Huma, H.; Khan, M.K. *Ultrason. Sonochem.* **2011**, *18*, 813–835.
- <sup>33</sup> Leonelli, C.; Veronesi, P.; Cravotto, G. « Microwave-Assisted Extraction: An Introduction to Dielectric Heating », In Chemat, F.; Cravotto, G. (Eds.), *Microwave-Assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, Food Engineering Series, Springer, New York **2013**, pp. 1–14.

- <sup>34</sup> Veggi, P.C.; Martinez, J.; Meireles, M.A.A. « Fundamentals of Microwave Extraction », In Chemat, F.; Cravotto, G. (Eds.), *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, Food Engineering Series, Springer, New York **2013**, pp. 15–52.
- <sup>35</sup> Chemat, F.; Marie E. Lucchesi, M.E. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.* **2005**, 20, 77–99.
- <sup>36</sup> Li, Y.; Fabiano-Tixier, A.S.; Abert-Vian, M.; Chemat, F. « Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants and Food Colors », In Chemat, F.; Cravotto, G. (Eds.), *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, Food Engineering Series, Springer, New York **2013**, pp. 103–126.
- <sup>37</sup> Proctor, A. « *Alternatives to Conventional Food Processing* », Royal Society of Chemistry, Great Britain **2011**, p. 481.
- <sup>38</sup> Chemat, F.; Abert-Vian, M.; Visioni, F. *Brevet Européen*, EP. 1.955.749 A1, **2008**.
- <sup>39</sup> a) Chemat, F.; Smadja, J.; Lucchesi, M.E. *Brevet Européen*, EP. 1.439.218 B1, **2004**; b) Chemat, F.; Lucchesi, M.E.; Smadja, J. *Brevet Américain*, US. 2004/0187340 A1, **2004**.
- <sup>40</sup> Mandal, S.C.; Mandal, V.; Das, K.A. « *Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications* ». Elsevier, USA **2015**, p. 206.
- <sup>41</sup> Sanchez-Prado, L.; Garcia-Jares, C.; Dagnac, T.; Llompарт, M. *Trends Analyt. Chem.* **2015**, 71, 119–143.
- <sup>42</sup> Segneanu, A.E.; Cziple, F.; Vlazan, P.; Sfirloaga, P.; Grozescu, I. and Gherman, V.D. « Biomass Extraction Methods », In Matovic, M.D. (Ed.), *Biomass Now: Sustainable Growth and Use*, InTech, Rijeka, Croatia **2013**, pp. 389–400.
- <sup>43</sup> Chan, C.H.; Yusoff, R.; Ngoh, G.C.; Kung, F.W.L. *J. Chromatogra. A* **2011**, 1218(37), 6213–6225.
- <sup>44</sup> Park, Y.L.; Tak, J.H. « Essential Oils for Arthropod Pest Management in Agricultural Production Systems », In Preedy, V.R. (Ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Elsevier Science & Technology Books, USA **2016**, pp. 61–70.
- <sup>45</sup> Uysal, B.; Sozmen, F.; Aktas, O.; Oksal, B.S.; Kose, E.O. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2011**, 46, 1455–1461.
- <sup>46</sup> Li, X.J.; Wang, W.; Luo, M.; Li, C.Y.; Zu, Y.G.; Mu, P.S.; Fu, Y.J. *Food Chem.* **2012**, 133, 437–444.
- <sup>47</sup> Berka-Zougali, B.; Ferhat, M.A.; Hassani, A.; Chemat, F and Allaf, K.S. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 4673–4695.
- <sup>48</sup> Tigrine-Kordjani, N.; Meklati, B.Y.; Chemat, F. *Food Anal. Method.* **2012**, 5, 596–603.
- <sup>49</sup> Filly, A.; Fernandez, X.; Minuti, M.; Visinoni, F.; Cravotto, G.; Chemat, F. *Food Chem.* **2014**, 150, 193–198.
- <sup>50</sup> Meullemiestre, A.; Petitcolas, E.; Maache-Rezzoug, Z.; Ginies, C.; Chemat, F.; Rezzoug, S.A. *Wood. Mater. Sci. Eng.* **2014**, 9(2), 76–83.
- <sup>51</sup> Qi, X.L.; Li, T.T.; Wei, Z.F.; Guo, N.; Luo, M.; Wang, W.; Zu, Y.G.; Fu, Y.J.; Peng, X. *Ind. Crops Prod.* **2014**, 58, 322–328.

- <sup>52</sup> Abdelhadi, M.; Meullemiestre, A.; Gelicus, A.; Hassani, A.; Rezzoug, S.A. *Chem. Eng. Res. Des.* **2015**, 93, 621–631.
- <sup>53</sup> Mohammadhosseini, M.; Mahdavi, B.; Shahnama, M. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* **2015**, 18(6), 1321–1328.
- <sup>54</sup> Benmoussaa, H.; Farhat, A.; Romdhane, M.; Bouajila, J. *Arab J. Chem.* **2016**.
- <sup>55</sup> Filly, A.; Fabiano-Tixier, A.S.; Louis, C.; Fernandez, X.; Chemat, F. *C. R. Chimie* **2016**, 1–11.

## *Chapitre II*

*Extraction et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de basilic "Ocimum basilicum L."*

## II.1. Introduction

L'avènement des techniques innovatrices d'extraction des HEs, qu'on vient de présenter dans le chapitre précédent, a permis à ces essences végétales d'occuper une place de plus en plus importante dans diverses industries particulièrement celles de l'agroalimentaire, des cosmétiques, de la parfumerie et de la pharmacie. De ce fait, la connaissance du mode d'extraction et des propriétés physico-chimiques de l'huile est nécessaire pour répondre aux normes internationales de caractérisation et de contrôle de la qualité des HEs.

Avant d'aborder l'extraction proprement dite de l'HE de basilic par hydro-distillation (HD) et par extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME), une étude botanique de la plante étudiée s'impose.

## II.2. Etude botanique de la plante étudiée : "*Ocimum basilicum* L."

### II.2.1. Présentation de la famille des Lamiaceae

#### II.2.1.1. Généralités sur les Lamiaceae

La famille des Lamiaceae, dénommée aussi Labiées, regroupe des plantes herbacées et sous-arbustes répartis dans le monde entier. Cette famille compte 6500 espèces, et quelques 200 genres très diversifiés qui caractérisent les climats de type méditerranéen. C'est une famille très homogène : une Lamiaceae est facile à reconnaître.

Dans cette famille, un même nom vernaculaire fait souvent référence à un très grand nombre d'espèces appartenant toutes au même genre, comme par exemple pour les menthes, les lavandes ou les basilics. Un bon nombre de ces espèces sont des plantes médicinales. Du point de vue chimique, cette famille a fait l'objet d'intenses investigations particulièrement sur les *Ocimum*<sup>1,2</sup>.

#### II.2.1.2. Description botanique de la famille des Lamiaceae

##### ❖ Appareil végétatif<sup>1,2</sup>

- Les tiges sont quadrangulaires généralement ligneuses à leur base et très ramifiées.
- Les feuilles sont pétiolées et opposées.

Ce sont des plantes à essence dont l'odeur se dégage par simple attouchement des feuilles ou des tiges. En effet, les HEs des Lamiaceae se forment dans des poils à essence et se localisent à l'extérieur sous la cuticule qui se soulève.

<sup>1</sup> Fernandez, X.; Chemat, F. et Tiên Do, T.K. « *Les huiles essentielles - Vertus et applications* », Ed. Vuibert, Paris **2012**, p.160.

<sup>2</sup> Dupont, F. et Guignard, J.L. « *Botanique : Les familles de plantes* », Ed. Elsevier Masson SAS, Issy-les-Moulineaux Cedex, France **2012**, pp. 237–240.

### ❖ Appareil reproducteur<sup>2</sup>

- Les inflorescences, situées à l'aisselle des feuilles supérieures, sont toutes de type cyme : d'abord bipares, puis unipares par manque de place. Elles sont fréquemment condensées en glomérules et, souvent, simulent autour de la tige un verticille de fleurs.
- Les fleurs sont irrégulières.
  - La corolle est souvent à deux lèvres, d'où le nom de Labiées donné à cette famille. Ce nom provient du latin *labium* signifiant « lèvre » du fait de la forme des fleurs dont les cinq sépales soudés entre eux forment un calice bilabié.
  - L'androcée possède 4 ou 2 étamines soudées à la corolle, mais on trouve chez quelques rares Lamiacées tropicales une cinquième étamine (la supérieure) et, quelques genres dont les Sauges, le Romarin, n'ont plus que deux étamines.
  - Le gynécée comporte deux carpelles soudés qui se subdivisent chacun par une fausse cloison en deux demi-loges, chacune contenant un ovule.
- Le fruit est un tétrakène logé au fond d'un calice persistant, chaque demi-carpelle donnant naissance à un akène élémentaire.

## II.2.2. Etude botanique du basilic

### II.2.2.1. Classification

Le genre *Ocimum* considéré comme l'un des plus grands genres de la famille des Lamiaceae compte plus de 150 espèces de plantes herbacées annuelles<sup>3</sup>, parmi lesquelles figurent :

- le basilic citron (*Ocimum canum* L.),
- le basilic de Ceylan (*Ocimum gratissimum*),
- le basilic sacré (*Ocimum sanctum* L.) et
- le plus connu est le basilic commun (*Ocimum basilicum* L.).

La classification de la plante "*Ocimum basilicum* L." dans la systématique est donnée dans le tableau II.1<sup>4</sup>.

<sup>3</sup> Sajjadi, S. E. *DARU* **2006**, 14(3), 128–130.

<sup>4</sup> Sullivan, C. « *Herbs Basil (Ocimum basilicum)* », Hamilton College Seminar - Food For Thought: The Science, Culture & Politics of Food in Springer **2009**.

**Tableau II.1 :** Classification et systématique d'*Ocimum basilicum* L.

Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphyte (phanérogame)
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales (dicotylédones gamopétales)
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Ocimum</i>
Espèce	<i>Ocimum basilicum</i>

### II.2.2.2. Noms et synonymes du basilic

Les *Ocimum* ont pour nom commun le basilic. Le mot basilic, à l'origine, vient du grec basilikon qui signifie plante royale<sup>5</sup>. Il faut noter que plusieurs noms et synonymes lui sont attribués dans la littérature :



Nom scientifique : *Ocimum basilicum* L.

Synonymes : *Ocimum basilicum* var. *glabratum* Benth, *Ocimum basilicum* var. *majus* Benth<sup>6</sup>.

Noms vernaculaires : Lahbeq, habeq, hamahim, hebeq el aïlaa, rehan<sup>7</sup>.

Autres noms : Basilic, basilic commun, basilic officinal, basilic des jardins, herbe royale, oranger des savetiers<sup>8</sup>, herbe aux sauces, pistou ou pesto son équivalent italien, reyhan en Turquie<sup>9</sup>.

<sup>5</sup> Boullard, B. « *Plantes médicinales du monde: croyances et réalités* », Ed. De Boeck Secundair, **2001**, p. 636.

<sup>6</sup> Duke, J.A.; Bogenschutz-Godwin, M.J.; duCellier, J.; Duke, P.A.K. « *Handbook of Medicinal Herbs* », 2<sup>ème</sup> Ed. CRC Press, New York **2002**, p. 870.

<sup>7</sup> Aït-Youcef, M. « *Plantes médicinales de Kabylie* », Ed. Ibis Press, Paris **2006**, p. 350.

<sup>8</sup> Delille, L. « *Les plantes médicinales d'Algérie* », Ed. Berti, Alger **2007**, pp. 47–48.

<sup>9</sup> Chalchat, J.C.; Özcan, M. *Food Chem.* **2008**, 110, 501–503.

### II.2.2.3. Origine et répartition géographique du basilic

Le basilic (*Ocimum basilicum* L.) appartient au genre *Ocimum* et à la famille des Lamiaceae ou Labiées. C'est une plante herbacée annuelle originaire de l'Inde et de l'Asie tropicale qui s'est acclimatée en Europe tout au début des temps historiques<sup>7</sup>.

Actuellement, elle pousse à l'état sauvage dans les régions tropicales et subtropicales, incluant l'Afrique centrale et le Sud-Est d'Asie<sup>10</sup>. Cette espèce cultivée depuis plusieurs décennies pour son utilisation médicinale et aromatique, est commercialisée dans de nombreux pays à travers le monde, dont la France, la Hongrie, la Grèce et d'autres pays du Sud de l'Europe, l'Egypte, le Maroc et l'Indonésie. Elle pousse également dans plusieurs États américains, dont l'Arizona, le Nouveau-Mexique et en Caroline du Nord, ainsi qu'en Californie, où une qualité supérieure de feuille est cultivée<sup>11</sup> (Figure II.1).



**Figure II.1 :** Répartition géographique du basilic.

Cette plante est facilement cultivée en climat méditerranéen. Elle est devenue une plante très appréciée pour son bon goût, son odeur et ses vertus curatives. Elle est surtout destinée à servir d'aromate aux salades, aux soupes et aux viandes.

L'extraction de son HE s'effectue dans la plupart des régions tempérées chaudes du monde comme par exemple en Inde, en Bulgarie, au Pakistan<sup>12</sup> ...et les pays du Maghreb, en particulier en Algérie, au Maroc, en Tunisie et en Egypte<sup>7</sup>.

<sup>10</sup> Simon, J.E.; Morales, M.R.; Phippen, W.B.; Vieira, R.F.; Hao, Z. « Basil: A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb », In Janick, J. (Ed.), *Perspectives on New Crops and New Uses*, ASHS Press: Alexandria, VA, USA **1999**, pp. 499–505.

<sup>11</sup> Pushpangadan, P. and George, V. « Basil », In Peter, K.V. (Ed.), *Handbook of herbs and spices*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK **2012**, pp. 55–72.

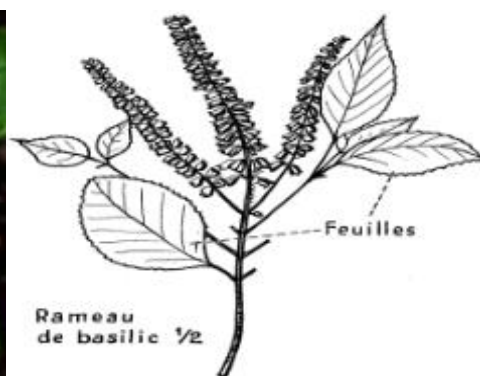
<sup>12</sup> Hiltunen, R. and Holm, Y. « Essential Oil of *Ocimum* », In Hiltunen, R. and Holm, Y. (Eds.), *Basil: the genus *Ocimum**, Harwood Academic Publishers, The Netherlands **1999**, pp. 77–111.



#### II.2.2.4. Description botanique du basilic

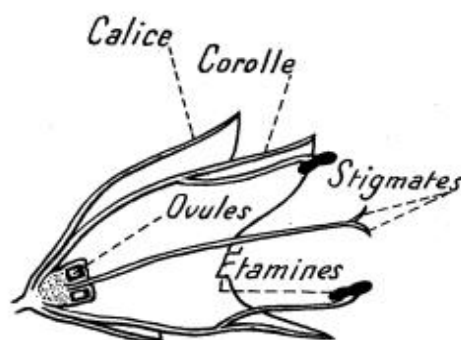
##### ❖ Appareil végétatif

Le basilic est une plante herbacée annuelle pouvant atteindre 30 à 60 cm de hauteur, son odeur et sa saveur sont fortement aromatiques. Sa culture exige un climat chaud et ensoleillé et un sol irrigable et riche en matières organiques<sup>1</sup>.



- Les tiges anguleuses et ramifiées portent des feuilles opposées de forme ovale à oblongue et de couleur généralement verte à l'aspect brillant<sup>13</sup>.
- Les feuilles sont nombreuses, opposées, pétiolées, de forme ovale-lancéolée et ailées. Elles sont longues de 2 à 5 cm, entières ou dentées et ciliées sur les bords. Elles sont de couleur vert pâle à vert foncé<sup>7</sup>.

##### ❖ Appareil reproducteur<sup>7,14</sup>



- L'inflorescence est en long épis de fleurs groupées en glomérules.
- Les fleurs de couleur blanc rosé sont disposées au sommet des rameaux en verticilles très serrés le long de l'axe. Chaque verticille, comprend 4 à 6 fleurs portées par de courts

<sup>13</sup> Belkamel, A.; Bammi, J.; Janneot, V.; Belkamel, A.; Dehbi, Y et Douira, A. *Acta. Bot. Gallica* **2008**, 155(4), 467–476.

<sup>14</sup> Surville, N. « *Quelques types de plantes des principales familles Camerounaises* », Office de la recherche scientifique et technique Outre-Mer. Institut de recherches scientifiques du Cameroun. Ed. J. & R. Sennac, Paris, France **1959**, p. 79.

pédoncules et 1 ou 2 bractées. L'ensemble a l'allure d'un épi qui peut atteindre 10 à 15 cm de long.

Ses fleurs, assez petites, sont très irrégulières. Elles comprennent :

- Le calice composé de cinq (05) pétales soudés (d'où le terme gamopétale) : un grand sépale supérieur et 4 petites dents pointues en-dessous;
  - La corolle est constituée d'un tube qui se divise vers le haut en deux lèvres distinctes, d'où le nom de Labiée donné à la famille : une inférieure entière est formée d'un seul concave, et une supérieure organisée autour de quatre (04) dents régulières;
  - L'androcée est à quatre (04) étamines à long filet attachées à la partie inférieure de la corolle;
  - Le gynécée ressemble à quatre petits mamelons au milieu de la fleur, ce sont les 4 loges de l'ovaire, entre ces loges part un long style qui porte un stigmate fourchu.
- Le fruit de couleur brune est un ensemble de quatre akènes noirs soudés provenant de la transformation des quatre loges de l'ovaire, chacun de ces akènes contient une petite graine à deux cotylédons.

#### II.2.2.5. Usage et propriétés thérapeutiques

Le basilic est une herbe aromatique qui est largement utilisée comme additif d'arômes dans les aliments, les produits pharmaceutiques et cosmétiques<sup>15</sup>.

La plante est employée en usage externe pour traiter les lésions cutanées allergiques comme l'urticaire, les brûlures par l'ortie ou les piqures d'insectes. C'est un antiallergique et, en même temps, elle agit contre la douleur localement, son effet est soit analgésique soit anti-inflammatoire.

La plante fraîche et en particulier ses feuilles sont réputées pour avoir une action répulsive contre la plupart des insectes, et surtout les moustiques. C'est pourquoi on la trouve souvent, en pot, dans les maisons près des entrées et des fenêtres<sup>7</sup>.

Les feuilles d'*Ocimum basilicum* sont utilisées dans la médecine traditionnelle comme tonique, stimulant, carminatif, stomachique, antispasmodique, antiviral et vermifuge.

C'est une plante médicinale utilisée généralement pour le traitement des crampes d'estomac, les diarrhées, la constipation, les angines, la toux, le dysfonctionnement du rein, la bronchite, les affections pulmonaires, les rhumatismes, l'inflammation, les maux de tête, l'hypertension et comme contraceptif. Elle est prise en tisane contre les nausées, les flatulences, et la dysenterie.

<sup>15</sup> Lee, S.J.; Umamo, K.; Shibamoto, T.; Lee, K.G. *Food Chem.* **2005**, *91*, 131–137.

A noter que l'huile de basilic a été jugée bénéfique pour la réduction de la fatigue mentale, les rhumes, les spasmes, la rhinite, et en tant que traitement des premiers soins pour les piqûres de guêpes et les morsures de serpent<sup>16,17</sup>.

## II.3. Extraction de l'HE de basilic

### II.3.1. Matériel et méthodes

#### II.3.1.1. Matériel végétal

Notre étude porte sur les feuilles sèches brisures du basilic "*Ocimum basilicum* L." avec un taux d'humidité de  $9,4 \pm 0,4$  %. Elles ont été achetées auprès de l'Herbier du Diois, spécialiste des produits de l'agriculture biologique, F26410 Chatillon en Diois en Diois-France. Il y a lieu de préciser que ces feuilles du basilic ont été collectées en Egypte en 2011, Lot 28587.



#### II.3.1.2. Méthodes d'extraction : description expérimentale de HD et SFME

L'HE des feuilles sèches brisures du basilic a été extraite par deux méthodes, l'une traditionnelle HD et l'autre innovante SFME.

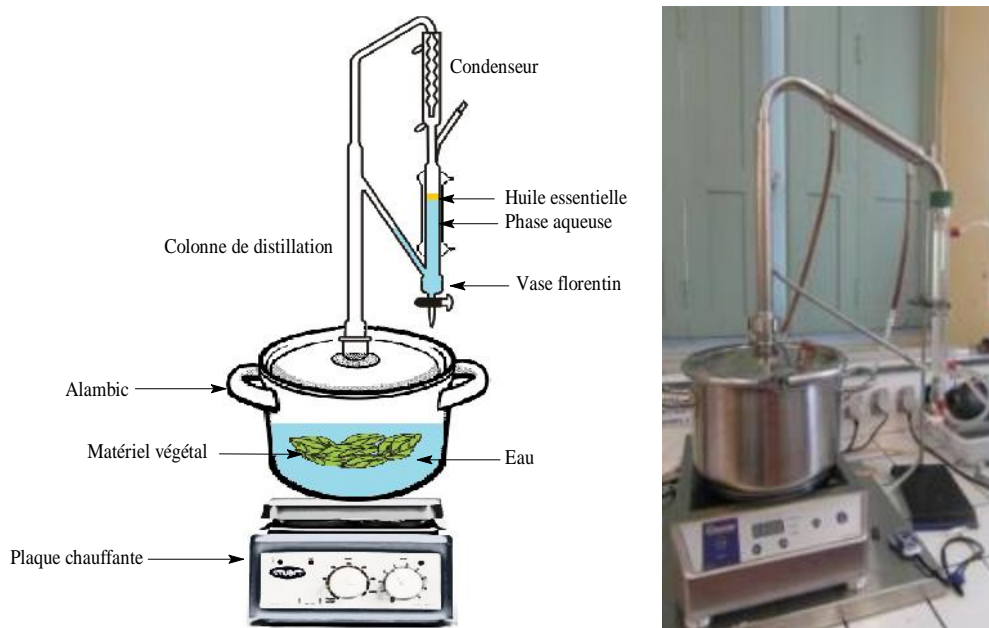
##### II.3.1.2.1. Conduite de l'hydro-distillation "HD"

Plusieurs expériences préliminaires ont été menées sur le basilic, afin de mettre en place un protocole applicable à la plante choisie et d'optimiser le rendement de l'extraction tout en conservant la qualité de l'HE. La charge de matière végétale traitée, la durée de l'hydro-distillation, ainsi que la quantité d'eau à utiliser sont les paramètres qui ont été modifiés au fil des expériences dans le but de trouver le meilleur compromis entre chacun d'eux.

Pratiquement, 150 g de feuilles brisures sèches du basilic accompagnées de 6 litres d'eau distillée ont été introduites dans l'alambic, puis chauffés pendant 1 heure. Grâce au système de cohobation la quantité d'eau au sein de l'alambic est quasiment la même tout au long de la distillation (Figure II.2). L'HE obtenue est séparée de l'eau par pipette pasteur.

<sup>16</sup> a) Paul Iserin. « *Encyclopedie des plantes médicinales* », 2<sup>ème</sup> Ed. Larousse, Paris **2001**, p. 180; b) Klimankova, E.; Holadova, K.; Hajslova, J.; Cajka, T.; Poustka, J.; Koudela, M. *Food Chem.* **2008**, *107*, 464–472.

<sup>17</sup> a) Ismail, M. *Pharm. Biol.* **2006**, *44*, 619–626; b) Hanif, M.A.; Al-Maskari, M.Y.; Al-Maskari, A.; Al-Shukaili, A.; Al-Maskari A.Y and Al-Sabahi, J.N. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 751–757; c) Purkayastha, J. and Nath, S.C. *J. Essent. Oil Res.* **2006**, *18*, 332–334.



**Figure II.2 :** Schéma de montage de l'hydro-distillation.

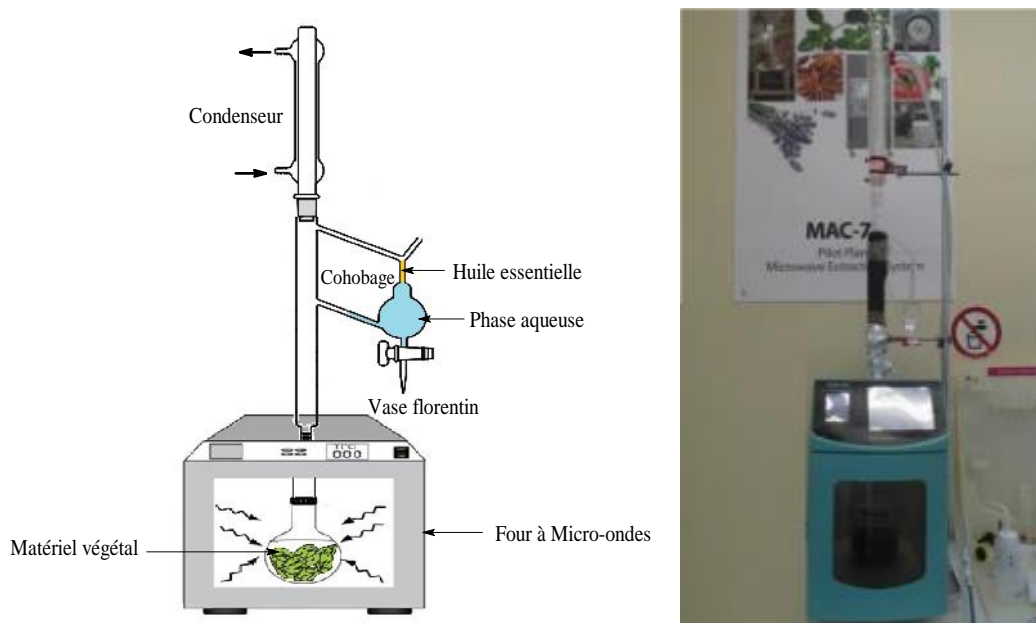
Aucun solvant organique n'est utilisé au cours de ce protocole. L'HE est au préalable placée sur du sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ), afin d'éliminer toute trace éventuelle d'eau, puis est pesée afin de calculer le rendement de l'extraction par rapport à la masse du matériel végétal. Trois expériences ont été effectuées.

*L'huile essentielle est conservée au réfrigérateur à l'abri de la lumière et à 4°C.*

#### **II.3.1.2.2. Conduite de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes "SFME"**

Le four micro-ondes MILESTONE EOS-GR (1000 W maximum) est utilisé pour l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes « Solvent Free Microwave Extraction (SFME) ». Cet appareil multi-mode est doté d'un réacteur de 2,450 MHz de fréquence.

L'expérience est réalisée à la pression atmosphérique avec *150 g de feuilles brisures sèches* humidifiées par *600 mL d'eau distillée*. Les feuilles humides ont été filtrées ensuite introduites sans ajout d'eau ni de solvant organique à 600 W dans un réacteur de type ballon d'une contenance de 2 litres placé dans la cavité multi-mode du four micro-ondes (Figure II.3).



**Figure II.3 :** Schéma de montage de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes.

La durée de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes a été fixée après observation de la quantité d'HE extraite au cours du temps. Il est apparu qu'après trente minutes d'extraction celle-ci cesse d'évoluer de façon significative. La durée totale d'une extraction sans solvant assistée par micro-ondes a donc été fixée à trente minutes, étape de chauffage comprise.

Grâce au système de cohobation, le taux d'humidité au sein du ballon est quasiment le même tout au long de l'extraction. L'HE obtenue est séparée de l'eau par pipette pasteur. Aucun solvant organique n'est utilisé au cours de ce protocole. L'HE est au préalable placée sur desséchant de type sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ), afin d'éliminer toute trace éventuelle d'eau, puis est pesée afin de calculer le rendement de l'extraction par rapport à la masse des feuilles du basilic. Trois expériences ont été effectuées.

*L'huile essentielle est conservée au réfrigérateur à l'abri de la lumière et à 4°C.*

### II.3.1.3. Détermination des propriétés physico-chimiques et organoleptiques

#### Constantes physico-chimiques

Les constantes physico-chimiques (densité, indice de réfraction et solubilité) de l'HE de basilic ont été déterminées selon les normes AFNOR sur les huiles essentielles à 20 °C<sup>18</sup>.

- *Mesure de la densité* : Cette mesure a été effectuée à l'aide d'un pycnomètre de volume 5 mL à la température de 20°C.
- *Mesure de l'indice de réfraction* : Cette mesure a été effectuée à l'aide d'un réfractomètre d'Abbe Prisma-CETI Convex.

<sup>18</sup> Agence Française de Normalisation. « Les Huiles Essentielles », Ed. AFNOR, Paris 2007.

➤ *La solubilité* : La miscibilité des HEs a été déterminée dans de l'éthanol pur à 70%.

### Propriétés organoleptiques

Les propriétés organoleptiques de l'HE de basilic ont été analysées par une évaluation sensorielle suivant la couleur, l'odeur et l'aspect. Ces analyses ont été conduites par un groupe de témoin de 10 étudiants de post-graduation de l'Université d'Oran 1 Ahmed BenBella, Algérie.

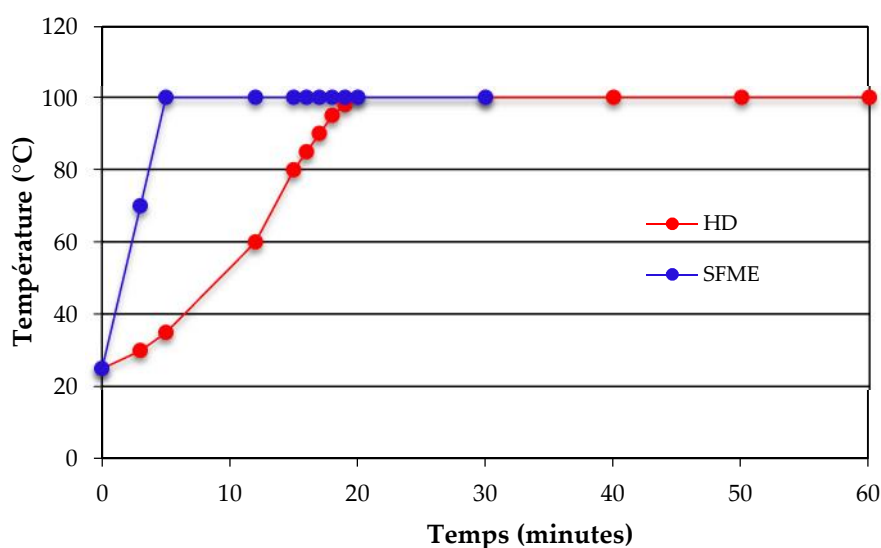
## **II.4. Résultats et discussion**

### **II.4.1. Facteurs influençant l'extraction**

Deux facteurs ont un impact sur l'extraction des HEs de basilic par HD et SFME : la température et le temps d'extraction.

#### **II.4.1.1. Influence de la température sur l'extraction par HD et SFME**

Afin de mieux expliquer la rapidité de l'extraction par SFME en comparaison à celle par HD, nous avons suivi la cinétique *d'évolution de la température* de l'HE de basilic obtenue par la technique SFME, ainsi que celle obtenue par HD. La Figure II.4 montre l'évolution de la température durant les étapes de chauffage et d'extraction de l'HE de basilic par les deux techniques.



**Figure II.4 :** Cinétique d'évolution de la température au cours de l'extraction de l'HE de basilic par HD et SFME.

La cinétique d'évolution de la température durant l'extraction de l'HE de basilic par HD et SFME s'effectue en deux étapes. Pour les deux techniques, la première étape est représentée par une droite croissante jusqu'à ce que la température, sensiblement égale à la température d'ébullition de l'eau : 100°C, soit atteinte à la 20<sup>ième</sup> minute pour la HD et à la 5<sup>ième</sup> minute pour la SFME. On observe alors l'extraction de la première gouttelette d'HE.



Dans la deuxième étape, la température d'extraction se traduit par un palier de température situé au niveau de la température d'ébullition de l'eau. Nous avons pu constater que le procédé SFME permet une augmentation plus rapide de la température d'extraction par rapport au procédé classique; ce qui engendre une accélération du taux d'extraction.

En effet, l'élévation de la température observée avec le procédé SFME a un effet certain sur la cinétique d'extraction de l'huile et provoque ainsi la destruction des glandes sécrétrices; ce qui favorise l'éclatement des cellules et entraîne l'extraction d'une plus grande quantité d'HE sans dégradation de sa qualité.

#### II.4.1.2. Influence du temps sur l'extraction par HD et SFME

Nous avons également suivi la cinétique *d'évolution du rendement* au cours du temps d'extraction de l'HE des feuilles du basilic par SFME et nous l'avons comparé à celle obtenue par la méthode conventionnelle HD.

En principe, le temps nécessaire pour la récupération de la totalité de l'HE contenue dans le matériel végétal correspond au temps d'extraction. Néanmoins expérimentalement, il est impossible de recueillir toute la quantité d'huile. Par conséquent ce temps équivaut au moment où aucune augmentation de la quantité d'huile n'est plus constatée dans le distillat. Il indique la fin du processus d'extraction.

La Figure II.5 représente l'évolution du rendement en HE des feuilles du basilic pour les deux techniques (HD et SFME).

L'extraction par *SFME* permet l'obtention de l'HE avec des rendements similaires à ceux obtenus par *HD* ( $0,48 \pm 0,02$  %). Ces résultats sont d'autant plus intéressants que le temps d'extraction par SFME ne dépasse pas les 30 minutes alors que la méthode HD nécessite un temps d'extraction de l'ordre de 60 minutes.

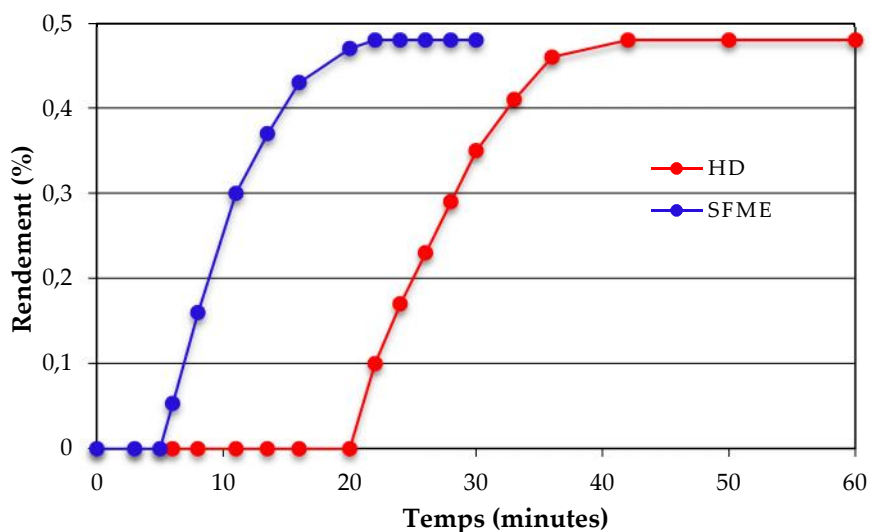


Figure II.5 : Cinétique d'évolution du rendement en HE de basilic au cours de l'extraction par HD et SFME.

Au regard des résultats expérimentaux obtenus, il apparaît que l'un des avantages de l'extraction par SFME est évidemment le *gain de temps* et en conséquence *l'économie d'énergie*.

L'allure des deux courbes de cinétique d'extraction pour les deux techniques est identique et comporte trois phases :

- La première est une droite croissante qui montre une augmentation rapide en rendement. Dans cette phase, l'extrait représente les HEs localisées à la surface de la plante.
- La deuxième phase de la courbe correspond à une droite qui se rapporte à l'extraction des HEs situées au cœur de la matière végétale et se caractérise par une pente inférieure à la première.
- Au cours de la troisième phase, la courbe tend vers un palier (ligne horizontale) qui désigne le temps à partir duquel le rendement en HE atteint son maximum.

Il est important de signaler que la littérature révèle que l'extraction des HEs à partir de différentes plantes par micro-ondes, pour des rendements similaires en HEs, conduit à une réduction significative du temps d'extraction en comparaison avec la méthode classique (cf. Chap.1 : p.40).

#### II.4.2. Propriétés physico-chimiques et organoleptiques

Les constantes physico-chimiques des HEs, extraites par HD et SFME, ont été déterminées selon les normes AFNOR sur les HEs. Les résultats de la mesure des constantes physico-chimiques et des propriétés organoleptiques sont regroupés dans le tableau II.2.

**Tableau II.2 :** Propriétés physico-chimiques et organoleptiques des HEs de basilic obtenues par HD et SFME.

	Méthodes d'extraction	
	HE-HD	HE-SFME
Propriétés physico-chimiques		
Densité (20 °C)	0,917	0,926
Indice de réfraction (20 °C)	1,480	1,486
Solubilité	Insoluble dans l'eau. Soluble dans les alcools et d'autres solvants organiques	
Propriétés organoleptiques		
Couleur	Jaune verdâtre	Jaune pâle
Odeur	Odeur piquante de la menthe forte	Odeur agréable de la menthe douce
Aspect	Liquide mobile	Liquide mobile

Au vu des résultats obtenus, aucune différence significative n'a été observée entre les propriétés physico-chimiques et organoleptiques des HEs issues des deux méthodes



d'extraction (HD et SFME). La seule différence réside dans la couleur et l'odeur de l'extrait obtenu par SFME, qui est de couleur plus légère et d'une odeur agréable que celui isolé par le procédé classique HD.

Par conséquent, SFME offre la possibilité pour une meilleure extraction de l'HE reflétant plus étroitement l'arôme naturel des feuilles du basilic que la méthode traditionnelle HD.

A titre indicatif, nous avons reporté sur le Tableau II.3 les propriétés physico-chimiques et organoleptiques de l'HE de basilic Européen.

**Tableau II.3 :** Constantes physico-chimiques et propriétés organoleptiques de l'HE de basilic à chémotype Européen<sup>11</sup>.

Constantes physico-chimiques et propriétés organoleptiques de l'HE de basilic à chémotype Européen	
Constantes physiques	
Densité (15 °C)	0,895 – 0,930
Indice de réfraction	1,477 – 1,495
Pouvoir rotatoire	–22° à –86°
Constantes chimiques	
Indice d'ester	3 – 15
Indice d'acide	0 – 4
Solubilité	Alcools
Propriétés organoleptiques	
Couleur	Jaune pâle
Odeur	Odeur épicée
Aspect	Liquide mobile

L'analyse des données de ce tableau montre que les propriétés physico-chimiques et organoleptiques de l'HE de basilic que nous avons évaluées sont comparables à ceux relevés dans la littérature.

## II.5. Conclusion

L'extraction de l'HE des feuilles du basilic par la technique HD et SFME a fourni une essence avec des rendements similaires (0,48%). Néanmoins, le procédé utilisant comme source de chaleur les micro-ondes s'est avéré rapide et écologique. Il a permis une réduction considérable du temps d'extraction (30 min pour SFME contre 60 min pour HD).

Par ailleurs, l'évaluation des propriétés physico-chimiques des deux essences, critères de pureté et de qualité pour une HE, a conduit à des résultats conformes à ceux de la littérature. L'identification des constituants des HEs extraites par les deux techniques sera traitée dans le chapitre suivant.

## Références

- <sup>1</sup> Fernandez, X.; Chemat, F. et Tiên Do, T.K. « *Les huiles essentielles - Vertus et applications* », Ed. Vuibert, Paris **2012**, p.160.
- <sup>2</sup> Dupont, F. et Guignard, J.L. « *Botanique : Les familles de plantes* », Ed. Elsevier Masson SAS, Issy-les-Moulineaux Cedex, France **2012**, pp. 237–240.
- <sup>3</sup> Sajjadi, S. E. *DARU* **2006**, 14(3), 128–130.
- <sup>4</sup> Sullivan, C. « *Herbs Basil (Ocimum basilicum)* », Hamilton College Seminar - Food For Thought: The Science, Culture & Politics of Food in Springer **2009**.
- <sup>5</sup> Boullard, B. « *Plantes médicinales du monde: croyances et réalités* », Ed. De Boeck Secundair, **2001**, p. 636.
- <sup>6</sup> Duke, J.A.; Bogenschutz-Godwin, M.J.; duCellier, J.; Duke, P.A.K. « *Handbook of Medicinal Herbs* », 2<sup>ème</sup> Ed. CRC Press, New York **2002**, p. 870.
- <sup>7</sup> Aït-Youcef, M. « *Plantes médicinales de Kabylie* », Ed. Ibis Press, Paris **2006**, p. 350.
- <sup>8</sup> Delille, L. « *Les plantes médicinales d'Algérie* », Ed. Berti, Alger **2007**, pp. 47–48.
- <sup>9</sup> Chalchat, J.C.; Özcan, M. *Food Chem.* **2008**, 110, 501–503.
- <sup>10</sup> Simon, J.E.; Morales, M.R.; Phippen, W.B.; Vieira, R.F.; Hao, Z. « Basil: A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb », In Janick, J. (Ed.), *Perspectives on New Crops and New Uses*, ASHS Press: Alexandria, VA, USA **1999**, pp. 499–505.
- <sup>11</sup> Pushpangadan, P. and George, V. « Basil », In Peter, K.V. (Ed.), *Handbook of herbs and spices*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK **2012**, pp. 55–72.
- <sup>12</sup> Hiltunen, R. and Holm, Y. « Essential Oil of *Ocimum* », In Hiltunen, R. and Holm, Y. (Eds.), *Basil: the genus Ocimum*, Harwood Academic Publishers, The Netherlands **1999**, pp. 77–111.
- <sup>13</sup> Belkamel, A.; Bammi, J.; Janneot, V.; Belkamel, A.; Dehbi, Y et Douira, A. *Acta. Bot. Gallica* **2008**, 155(4), 467–476.
- <sup>14</sup> Surville, N. « *Quelques types de plantes des principales familles Camerounaises* », Office de la recherche scientifique et technique Outre-Mer. Institut de recherches scientifiques du Cameroun. Ed. J. & R. Sennac, Paris, France **1959**, p. 79.
- <sup>15</sup> Lee, S.J.; Umamo, K.; Shibamoto, T.; Lee, K.G. *Food Chem.* **2005**, 91, 131–137.
- <sup>16</sup> a) Paul Iserin. « *Encyclopedie des plantes médicinales* », 2<sup>ème</sup> Ed. Larousse, Paris **2001**, p. 180; b) Klimankova, E.; Holadova, K.; Hajslova, J.; Cajka, T.; Poustka, J.; Koudela, M. *Food Chem.* **2008**, 107, 464–472.
- <sup>17</sup> a) Ismail, M. *Pharm. Biol.* **2006**, 44, 619–626; b) Hanif, M.A.; Al-Maskari, M.Y.; Al-Maskari, A.; Al-Shukaili, A.; Al-Maskari A.Y and Al-Sabahi, J.N. *J. Med. Plants Res.* **2011**, 5, 751–757; c) Purkayastha, J. and Nath, S.C. *J. Essent. Oil Res.* **2006**, 18, 332–334.
- <sup>18</sup> Agence Française de Normalisation. « *Les Huiles Essentielles* », Editions AFNOR, Paris **2007**.

## *Chapitre III*

### *Composition chimique de l'huile essentielle de basilic "Ocimum basilicum L."*

*Les travaux relatés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication :  
Chenni, M.; El Abed, D.; Rakotomanomana, N.; Fernandez, X.; Chemat, F.  
Molecules 2016, 21(1), 113.*

### III.1. Introduction

En plus de la détermination des propriétés physico-chimiques des HEs, d'autres moyens plus précis et plus fiables tels que les méthodes chromatographiques et spectroscopiques ont été développés, permettant ainsi la séparation et l'identification des constituants des HEs.

Le mode d'extraction et l'évaluation des propriétés physico-chimiques de l'HE de basilic exposés dans le chapitre précédent ne sont pas suffisants pour établir l'identité de l'HE de basilic, il est nécessaire d'en faire une analyse chromatographique et spectroscopique pour identifier les constituants de l'huile afin de répondre, conformément aux exigences des normes internationales des HEs.

Pour ce faire, nous avons eu recours à la chromatographie en phase gazeuse (CG) et à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG/SM).

Le but visé est, en plus de l'identification des constituants des essences recueillies, de faire une étude comparative de la composition chimique des deux extraits obtenus par la méthode traditionnelle HD et la technique novatrice SFME.

### III.2. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles<sup>1,2</sup>

#### III.2.1. Chromatographie en phase gazeuse (CG)

La chromatographie en phase gazeuse (CG) représente l'une des techniques clés de l'identification pour de nombreux composés volatils contenus dans les HEs. Le pouvoir de séparation élevé de la CG dans une combinaison avec une large gamme de détecteurs est un outil important dans la détermination des différents constituants des HEs.

En général, le principe de la chromatographie est basé sur la répartition des constituants à séparer entre deux phases non miscibles; l'une des deux est une phase stationnaire avec une grande surface spécifique, tandis que l'autre est une phase mobile qui passe à travers la phase stationnaire dans une direction précise.

Dans l'analyse CG, les composés à analyser sont vaporisés, ensuite élués par la phase mobile gazeuse (gaz vecteur H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, He) à travers la colonne. A la sortie de la colonne de chromatographie, les analytes sont séparés dans le temps en fonction de leurs pressions relatives de vapeur (volatilité) et de leurs affinités pour la phase stationnaire.

Lorsque les analytes arrivent au niveau du détecteur (le détecteur à ionisation de flamme « DIF ou FID » est le plus fréquemment utilisé), un signal est enregistré générant un chromatogramme sous forme de pics qui sont caractérisés par un temps de rétention.

<sup>1</sup> Bouchonnet, S. « La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse », Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris **2009**, p. 194.

<sup>2</sup> Zellner, B.A.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. « Analysis of Essential Oils », In Baser, K.H.C.; Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications*, Taylor & Francis Group, CRC Press: Boca Raton, FL, USA **2016**, pp. 195–228.

Chaque pic est caractérisé par un temps de rétention (qui correspond au temps écoulé entre l'injection de l'analyte et l'instant de son arrivée au détecteur) et une surface qui permettent de déterminer l'identité du constituant ainsi que sa proportion dans le mélange.

Etant donné que l'analyse CG, utilisant un détecteur à ionisation de flamme (DIF), un détecteur de conductivité thermique (DCT), ou d'autres détecteurs qui ne fournissent pas d'informations structurales des molécules analysées et les données de rétention, des indices de rétention plus précis sont utilisés comme le principal critère pour l'attribution des pics.

Le système de l'indice de rétention est fondé sur le fait que chaque analyte est classé en fonction de sa position entre les deux n-paraffines. En outre, le calcul de l'indice est basé sur une interpolation linéaire de la longueur de la chaîne de carbone de ces paraffines.

Ces indices calculés sont généralement appelés dans la littérature comme indice de rétention (IR) ou indice de rétention linéaire (IRL). Dans la caractérisation des composés volatils, la série de référence la plus communément appliquée est celle des n-alcanes.

### III.2.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

La spectrométrie de masse permet l'identification des analytes. Cette technique est réservée à l'analyse de molécules aisément vaporisables et thermiquement stables.

La spectrométrie de masse (SM) peut être définie comme l'étude des systèmes par la formation d'ions gazeux, avec ou sans fragmentation, qui sont ensuite caractérisés par leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ) et l'abondance relative. L'analyte peut être ionisé par voie thermique, par un champ électrique ou par un impact énergétique d'électrons, des ions ou des photons. En outre, le potentiel de la CG couplée à la SM est bien connu pour la détermination des composés volatils contenus dans les échantillons complexes de parfums, d'arômes et d'HEs.

L'introduction ultérieure d'un système de recueil et de traitement de données efficaces, comprenant des techniques de recherche de librairie automatique, assure l'exploitation entière du contenu de l'information des grandes quantités de données générées par les instruments de la CG/SM. Le procédé d'identification le plus fréquent et simple en CG/SM consiste à comparer les spectres de masse inconnus avec ceux contenus dans la librairie SM de référence.

Afin d'augmenter la fiabilité des résultats de l'analyse et d'aborder la détermination qualitative des compositions d'échantillons complexes par la CG/SM, les indices de rétention peuvent être un outil efficace. Les indices de rétention en combinaison avec les informations structurales fournies par la CG/SM sont utilisés généralement pour confirmer l'identité des composés.

En outre, les indices de rétention lorsqu'ils sont intégrés aux bibliothèques SM peuvent être appliqués comme un filtre, réduisant ainsi la routine de recherche pour faire correspondre les résultats et l'amélioration de la crédibilité de l'identification SM.

### III.3. Chémotypes de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* L.

L'HE de basilic dont le rendement est inférieur à 1%, possède un arôme chaud et pénétrant, et un goût légèrement citronné et anisé. Les fleurs donnent une moyenne d'huile de 0,4%, tandis que la plante entière contient 0,1–0,25%. La composition de l'HE d'*Ocimum basilicum* L. peut être influencée selon plusieurs paramètres géographiques, comme le sol, le climat, les heures et les périodes de récolte<sup>3</sup>.

Plusieurs revues ont montré que la composition de l'HE d'*O. basilicum* L. est caractérisée par différents chémotypes, qui sont classés selon les composés majoritaires identifiés. Ces principaux composés sont : le linalol, le méthylchavicol, et moins fréquemment le cinnamate de méthyle et l'eugénol. Ils peuvent être accompagnés par des quantités relativement importantes du 1,8-cinéole ou du méthyleugénol<sup>4,5,6,7</sup>.

Lawrence<sup>8</sup> a réparti l'HE de basilic en quatre grands chémotypes chacun avec une certaine variation, sur la base de plus de 200 analyses d'huiles d'*O. basilicum* L. :

- Chémotype 1 à méthylchavicol;
- Chémotype 2 à linalol;
- Chémotype 3 à méthyleugénol;
- Chémotype 4 à cinnamate de méthyle.

Simon et al.<sup>6</sup> ont classé l'HE de basilic en quatre chémotypes selon les différentes origines géographiques (Tableau III.1).

**Tableau III.1** : Quatre chémotypes d'*O. basilicum* L. selon Simon et al.<sup>6</sup>

Chémotypes	Composés majoritaires (%)	Origine
I. Européen	<i>Linalol</i> (40%); <i>Méthylchavicol</i> (25%)	Europe (France, Italie, Bulgarie), USA (Brésil) et Afrique (Côte d'Ivoire et Cameroun)
II. Réunion	<i>Méthylchavicol</i> (85%)	Ile de la Réunion, Ile Comores, Mongolie, Thaïlande, etc...
III. Tropical	<i>Cinnamate de méthyle</i> (82%)	Bulgarie, Sicile, Inde, Haïti et Afrique
IV. Eugénol	<i>Eugénol</i> (53%)	Afrique du nord, Russie et une partie de l'Asie

<sup>3</sup> Pushpangadan, P. « Basil », In Peter, K.V. (Ed.), *Handbook of herbs and spices*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge **2012**, p. 55–72.

<sup>4</sup> a) Chalchat, J.C.; Garry, R.P.; Sidibé, L. & Harama, M. *J. Essen. Oil Res.* **1999**, 11(3), 375–380; b) Zheljazkov, V.D. *Hortscience* **2008**, 43(3), 737–741; c) Adam, F.; Vahirua-Lechat, I.; Deslandes, E.; Bessiere, J.M.; Menut, C. *J. Essen. Oil Res.* **2009**, 21(3), 237–240.

<sup>5</sup> Grayer, R.J.; Kite, G.C.; Goldstone, F.J.; Bryan, S.E.; Paton, A. and Putiesky, E. *Phytochemistry* **1996**, 43, 1033–1039.

<sup>6</sup> Simon, J.E.; Morales, M.R.; Phippen, W.B.; Vieira, R.F.; Hao, Z. « Basil: A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb », In Janick, J. (Ed.), *Perspectives on New Crops and New Uses*, ASHS Press, Alexandria, VA, USA **1999**, pp. 499–505.

<sup>7</sup> Hiltunen, R. and Holm, Y. « Essential Oil of *Ocimum* », In Hiltunen, R. and Holm, Y. (Eds.), *Basil: the genus *Ocimum**, Harwood Academic Publishers, The Netherlands **1999**, pp. 77–111.

<sup>8</sup> Lawrence, B.M. « A further examination of the variation of *Ocimum basilicum* L. », In Lawrence, B.M.; Mookherjee, B.D. and Willis, B.J. (Eds.), *Flavors and Fragrances; A World Perspective*. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam **1988**, pp. 161–170.

Le premier chémotype, généralement classé comme chémotype Européen est caractérisé par une grande proportion de *linalol* et de *méthylchavicol*.

Le deuxième chémotype, répertorié comme chémotype de la Réunion, contient majoritairement du *méthylchavicol*. Il a été décrit dans différents pays tels que le Togo, le Bénin, la Côte-d'Ivoire, le Congo, l'Egypte, l'Allemagne, l'Autriche, la Mongolie et le Brésil.

Le troisième chémotype, classé comme chémotype Tropical contient un pourcentage élevé de *cinnamate de méthyle*.

Enfin, le quatrième chémotype renferme de l'*eugénol* comme produit dominant.

Aussi, Baritiaux *et al.*<sup>9</sup> ont proposé quatre principaux chémotypes à partir des données rapportées sur les HEs de basilic de la France, du Portugal, de la Bulgarie, de la Finlande, de l'Egypte, du Nigeria, des Iles Comores, de Madagascar, de Cuba et de l'Inde (Tableau III.2).

**Tableau III.2 : Chémotypes d'*O. basilicum* L. selon Baritiaux *et al.*<sup>9</sup>**

Chémotypes	Composés majoritaires (%)	Origine
A	<i>Linalol</i> (59,6%)	Bulgarie
B	<i>Méthylchavicol</i> (84,1–86,3%)	Nigéria, Madagascar, Ile Comores
AB	<i>Linalol</i> (39,9–41,1%); <i>Méthylchavicol</i> (23,4–28,2%)	France, Portugal, Egypte
BA	<i>Méthylchavicol</i> (56,6–77,5%); <i>Linalol</i> (10,0–19,05%)	Finlande, Cuba, Inde

Par ailleurs, l'Agence Française de Normalisation (AFNOR) a mentionné deux chémotypes d'HE de basilic :

- Chémotype à *linalol* caractérisé par un pourcentage élevé de *linalol* variant de 48–62%, accompagné de *méthylchavicol* (présent en faible quantité mais atteignant parfois un pourcentage plus important, 30% de l'huile).
- Chémotype à *méthylchavicol* représentant une proportion de 75–87% de l'huile<sup>10</sup>.

Marotti *et al.*<sup>11</sup> ont montré que la composition des HEs de basilic caractérisée par une forte teneur en *linalol*, comprend trois chémotypes : *Linalol*, *linalol/méthylchavicol* et *linalol/eugénol*.

En outre, Telci *et al.*<sup>12</sup> ont identifié sept chémotypes différents dans les variétés locales du basilic Turc : (I) *linalol*, (II) *cinnamate de méthyle*, (II) *cinnamate de méthyle/linalol*, (IV) *méthyleugénol*, (V) *citral*, (VI) *méthylchavicol* et (VII) *méthylchavicol/citral* (Tableau III.3).

<sup>9</sup> Baritiaux, O.; Richard, H.; Touche, J. and Derbesy, M. *Flav. Fragr. J.* **1992**, 7, 267–271.

<sup>10</sup> Agence Française de Normalisation. « *Les Huiles Essentielles, Monographies Relatives aux Huiles Essentielles* », Editions AFNOR, Paris **2000**.

<sup>11</sup> Marotti, M.; Piccaglia, R. and Giovanelli, E. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 3926–3929.



**Tableau III.3** : Chémotypes d'*O. basilicum* L. selon Telci et al.<sup>12</sup>

Chémotypes	Composés majoritaires (%)
I	<i>Linalol</i> (37,7–60,2%); <i>1,8-cinéole</i> (0,2–14,5%); <i>Eugénol</i> (3,1–21,1%); <i>-cadinène</i> (7,4–8,7%)
II	<i>Cinnamate de méthyle</i> (58,6–63,1%); <i>Linalol</i> (17,3–27,3%); <i>-cadinol</i> (2,4–2,9%); <i>-cadinène</i> (1,2–1,6%); <i>-cadinène</i> (trace–2,4%); <i>Zingiberène</i> (1,1–1,3%); <i>1,8-cinéole</i> (0,1%)
III	<i>Cinnamate de méthyle</i> (30,3%); <i>Linalol</i> (23,2%); <i>1,8-cinéole</i> (6,1%); <i>-cadinène</i> (5,5%); <i>Zingiberène</i> (3,4%); <i>Eugénol</i> (3,1%)
IV	<i>Méthyleugénol</i> (34,2%); <i>Linalol</i> (12,3%); <i>1,8-cinéole</i> (10,3%); <i>Cinnamate de méthyle</i> (4,6%); <i>Eugénol</i> (4,2%); <i>-cadinène</i> (3,9%)
V	<i>Citral</i> (56,6–65,6%); <i>Linalol</i> (3,2–5,3%); <i>-bisabolène</i> (2,1–3,4%); <i>Géranol</i> (1,0–3,9%); <i>Méthyleugénol</i> (0,8–3,3%)
VI	<i>Méthylchavicol</i> (60,3–76,3%); <i>Linalol</i> (1,7–8,4%); <i>1,8-cinéole</i> (0,4–5,0%); <i>-cadinène</i> (5,4%); <i>Germacrène D</i> (2,4–2,7%); <i>Méthyleugénol</i> (1,3–3,4%)
VII	<i>Méthylchavicol</i> (41,8%); <i>Citral</i> (33,9%); <i>Linalol</i> (2,7%); <i>trans- -caryophyllène</i> ; (2,5%); <i>-bisabolène</i> (2,1%)

Les deux chémotypes I et VI caractérisés par des teneurs élevées en *linalol* et en *méthylchavicol* pourraient être issues du chémotype Européen. Le chémotype II contenant le *cinnamate de méthyle* est similaire au chémotype Tropical.

Le chémotype III est un mélange de chémotypes Européen et Tropical riche en *cinnamate de méthyle* et en *linalol*.

Le chémotype V est un nouveau chémotype caractérisé par le *citral* en tant que composé majoritaire.

Enfin, le chémotype VII, récemment identifié dans les basilics Turcs, est caractérisé par des teneurs élevées en *méthylchavicol* et en *citral*.

### III.4. Matériel et méthodes

#### III.4.1. Matériel végétal

L'HE analysée a été obtenue par HD et SFME à partir des feuilles brisures d'*O. basilicum* (cf. Chap.II p.54).

<sup>12</sup> Telci, I.; Bayram, E.; Yilmaz, G.; Avci, B. *Biochem. Sys. Ecol.* **2006**, 34, 489–497.



### III.4.2. Description des méthodes d'analyse chromatographique des HEs de basilic

#### III.4.2.1. Analyse par chromatographie en phase Gazeuse (CG) par détecteur à ionisation de flamme (DIF)

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse a été effectuée sur un appareil de marque Agilent 6890N en utilisant deux colonnes capillaires, l'une polaire (HP-INNOWAX) et l'autre apolaire (HP-1). Les conditions opératoires sont regroupées dans le tableau **III.4**.

**Tableau III.4** : Conditions opératoires de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG).

Paramètres		
Colonne capillaire	HP-1	HP-INNOWAX
Phase stationnaire	Polydiméthyle siloxane	Polyéthylène glycol
Longueur	50 m	50 m
Diamètre interne	0,20 mm	0,20 mm
Epaisseur de phase	0,33 µm	0,4 µm
Température du détecteur	250°C	250°C
Température de l'injecteur	250°C	250°C
Gaz vecteur	Hélium	Hélium
Débit	1 mL/min	1 mL/min
Programmation du four	2°C/min de 45°C à 250°C	2°C/min de 45°C à 250°C
	60 min à 250°C	60 min à 250°C
Concentration des échantillons	Pur	Pur
Quantité injectée	1,0 µl	1,0 µl
Mode d'injection	Split 1:100	Split 1:100

Les indices de rétention ont été déterminés avec les standards d'alcane de référence de C<sub>5</sub> à C<sub>24</sub>. Les quantités relatives des différents composants sont basées sur des surfaces de pics obtenus par détecteur à ionisation de flamme (DIF) sans correction du facteur de réponse.

Trois répliques ont été réalisées pour chaque échantillon. La moyenne de ces trois valeurs et l'écart type ont été calculés pour chaque composant identifié.

#### III.4.2.2. Analyse par chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée sur un appareil Agilent 6890N couplé à un spectromètre de masse Agilent 5973 SM (Agilent, Massy, France) en utilisant deux colonnes capillaires, l'une polaire (HP-INNOWAX) et l'autre apolaire (HP-1). Les conditions opératoires sont regroupées dans le tableau **III.5**.

**Tableau III.5 :** Conditions opératoires de l'analyse en CG/SM.

Paramètres		
Energie d'ionisation	70 eV	70 eV
Masse d'électron d'ionisation	35–400 amu	35–400 amu
Colonne capillaire	HP–1	HP–INNOWAX
Phase stationnaire	Polydiméthyle siloxane	Polyéthylène glycol
Longueur	50 m	50 m
Diamètre interne	0,20 mm	0,20 mm
Epaisseur de phase	0,33 µm	0,40 µm
Température de l'injecteur	250°C	250°C
Température de la source d'ion	250°C	250°C
Température de la ligne de transfert	250°C	230°C
Gaz vecteur	Hélium	Hélium
Débit	1 mL/min	1 mL/min
Programmation du four	2°C/min de 45°C à 250°C ou 230°C 20 min à 250°C	2°C/min à 45-250°C ou 230°C 20 min à 230°C
Concentration des échantillons	Pur	Pur
Quantité injectée	1,0 µl	1,0 µl
Mode d'injection	Split 1:100	Split 1:100

### III.4.3. Identification des composés

L'identification des composés a été effectuée par comparaison de leurs indices de rétention (IR) de la CG sur colonne apolaire et polaire, et des spectres de masse ions-fragments caractéristiques obtenus expérimentalement avec ceux basés dans les ordinateurs de librairies commerciales<sup>13</sup> et avec ceux inventoriés dans la librairie de SM du laboratoire à partir de substances pures et citées dans la littérature<sup>14,15</sup>.

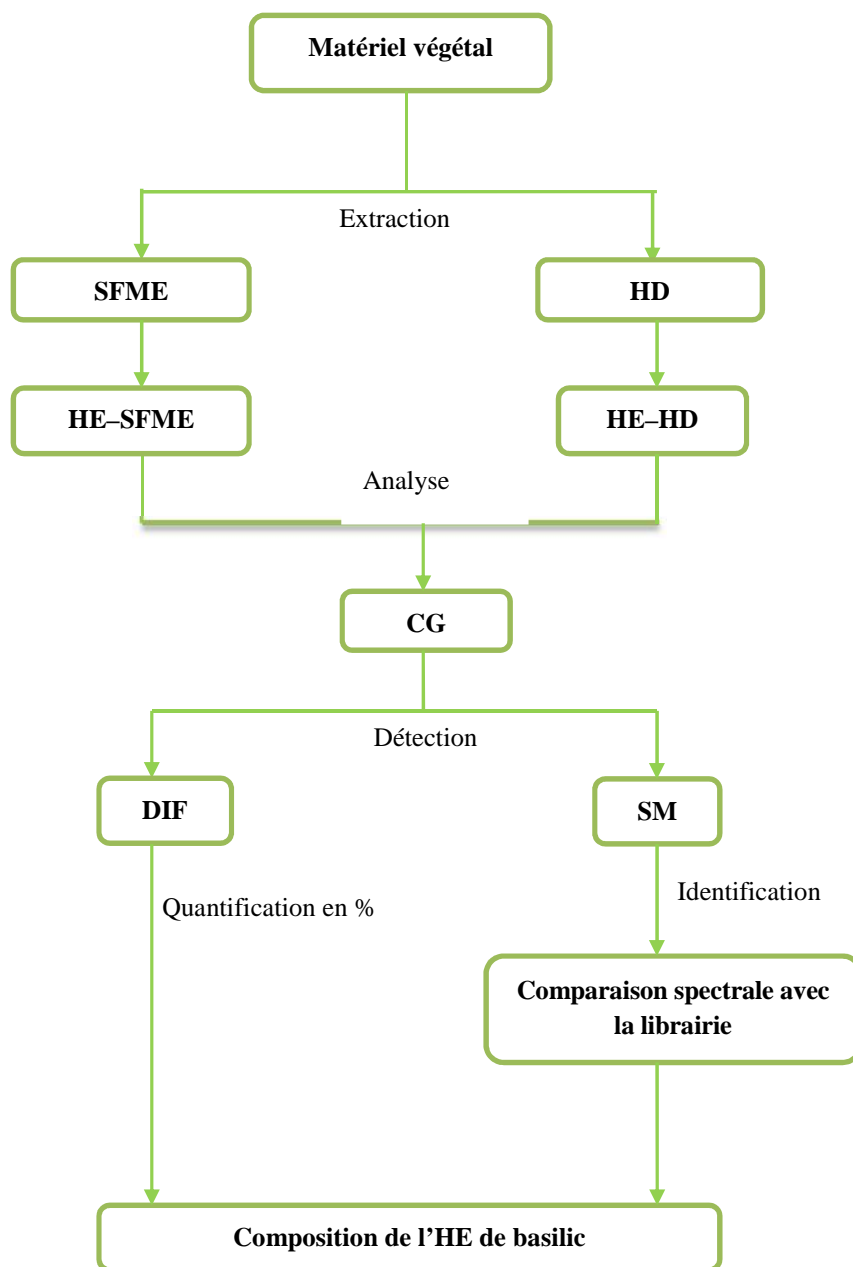
Les indices de rétention (IR) ont été calculés à l'aide d'une série d'alcane linéaires en C<sub>8</sub> à C<sub>24</sub> sur colonne apolaire (HP–1) et polaire (HP–INNOWAX) et par co-injection de composés standards, disponibles au laboratoire, avec l'HE de basilic.

Les différentes étapes d'identification et de quantification des constituants de l'HE de basilic sont représentées dans la figure **III.1**.

<sup>13</sup> Wiley, Mass Finder 2.1 Library, NIST98.

<sup>14</sup> a) Joulain, D.; König, W.A. « *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons* », 1st Ed. E.B. Verlag: Hamburg, Germany **1998**, p. 658. b) Joulain, D.; König, W.A.; Hochmuth, D.H. « *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils* », Library of Mass Finder 2.1: Hamburg, Germany **2001**.

<sup>15</sup> a) McLafferty, F.W.; Stauffer, D.B. « *The Wiley/Nbs Registry of Mass Spectral Data.Rev* », Ed. J. Wiley & Sons, New York **1989**, p. 7872; b) Boelens Aroma Chemical Information Service, B. A. C. I. S. Eso 2000 « the Complete Database of Essential Oils », The Netherlands **1999**.



**Figure III.1 :** Schéma d'identification et de quantification des constituants de l'HE de basilic.

### III.5. Résultats et Discussion

#### III.5.1. Composition chimique de l'HE d'*Ocimum basilicum* L.<sup>16</sup>

Les HEs récupérées selon les deux procédés HD et SFME ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). Les conditions opératoires de l'analyse ont été mentionnées dans le paragraphe précédent sur le tableau III.5.

Les pourcentages relatifs des différents composés volatils de l'HE de basilic sont regroupés dans le tableau III.6.

**Tableau III.6 :** Composition chimique de l'HE des feuilles du basilic extraite par HD et SFME.

No	Constituants <sup>a</sup>	IRL <sub>HP1</sub> <sup>b</sup>	IRL <sub>INNO</sub> <sup>b</sup>	HE-HD (% ± SD) <sup>c</sup>	HE-SFME (% ± SD) <sup>c</sup>	Identification <sup>e</sup>
<b>Monoterpènes Hydrocarbonés</b>				1,9	1,3	
1	Tricyclène	915	1017	tr	tr	IRL, SM
2	-Thujène	919	1030	0,1	0,1	IRL, SM
3	-Pinène	929	1070	0,2	0,1	IRL, SM, Std
4	Camphène	940	1072	0,1	0,1	IRL, SM, Std
5	Sabinène	962	1125	0,2	0,2	IRL, SM, Std
6	-Pinène	969	1114	0,4	0,3	IRL, SM, Std
7	-Phellandrène	981	1167	0,3	0,2	IRL, SM, Std
8	(E)- -Ocimène	1034	1249	0,2	0,1	IRL, SM, Std
9	-Terpinène	1048	1245	0,4 ± 0,1	0,2	IRL, SM, Std
10	Terpinolène	1075	1285	tr	tr	IRL, SM, Std
<b>Monoterpènes Oxygénés / Phénylpropanes</b>				83,2	82,9	
11	1,8-cinéole	1026	1212	7,3 ± 0,3	6,8 ± 0,2	IRL, SM, Std
12	<b>Linalol</b>	<b>1095</b>	<b>1552</b>	<b>48,4 ± 0,9</b>	<b>43,5 ± 0,8</b>	IRL, SM, Std
13	Camphre	1130	1523	0,3	0,4 ± 0,1	IRL, SM, Std
14	Menthone	1145	1480	0,3 ± 0,1	0,1	IRL, SM, Std
15	Bornéol	1160	1700	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1	IRL, SM, Std
16	<b>Méthylchavicol</b>	<b>1181</b>	<b>1167</b>	<b>14,3 ± 0,4</b>	<b>13,3 ± 0,2</b>	IRL, SM, Std
17	Acétate de fenchyle	1198	1480	0,2	0,1	IRL, SM
18	Citronellol	1210	1760	tr	tr	IRL, SM, Std
19	Cuminaldéhyde	1213	1780	tr	tr	IRL, SM
20	Néral	1215	1670	tr	tr	IRL, SM
21	Carvone	1217	1732	0,1	tr	IRL, SM, Std
22	Chavicol	1231	2325	0,1	tr	IRL, SM
23	Géraniol	1235	1841	0,2	0,1	IRL, SM, Std
24	Acétate de linalyle	1241	1556	0,1	tr	IRL, SM, Std
25	Anéthol	1264	1825	0,7	0,6	IRL, SM, Std
26	Acétate de bornyle	1271	1590	1,5 ± 0,1	1,1	IRL, SM, Std
27	(Z)-Cinnamate de méthyle	1274	1969	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	IRL, SM, Std
28	Acétate de myrtényle	1299	1688	tr	tr	IRL, SM
29	Eugénol	1330	2155	2,4 ± 0,1	2,9 ± 0,1	IRL, SM
30	(E)- Cinnamate de méthyle	1356	2091	2,3 ± 0,1	6,5 ± 0,1	IRL, SM, Std
31	Méthyleugénol	1371	1989	3,7 ± 0,1	6,1 ± 0,1	IRL, SM, Std

<sup>16</sup> Chenni, M.; El Abed, D.; Rakotomanomana, N.; Fernandez, X.; Chemat, F. *Molecules* **2016**, 21(1), 113.

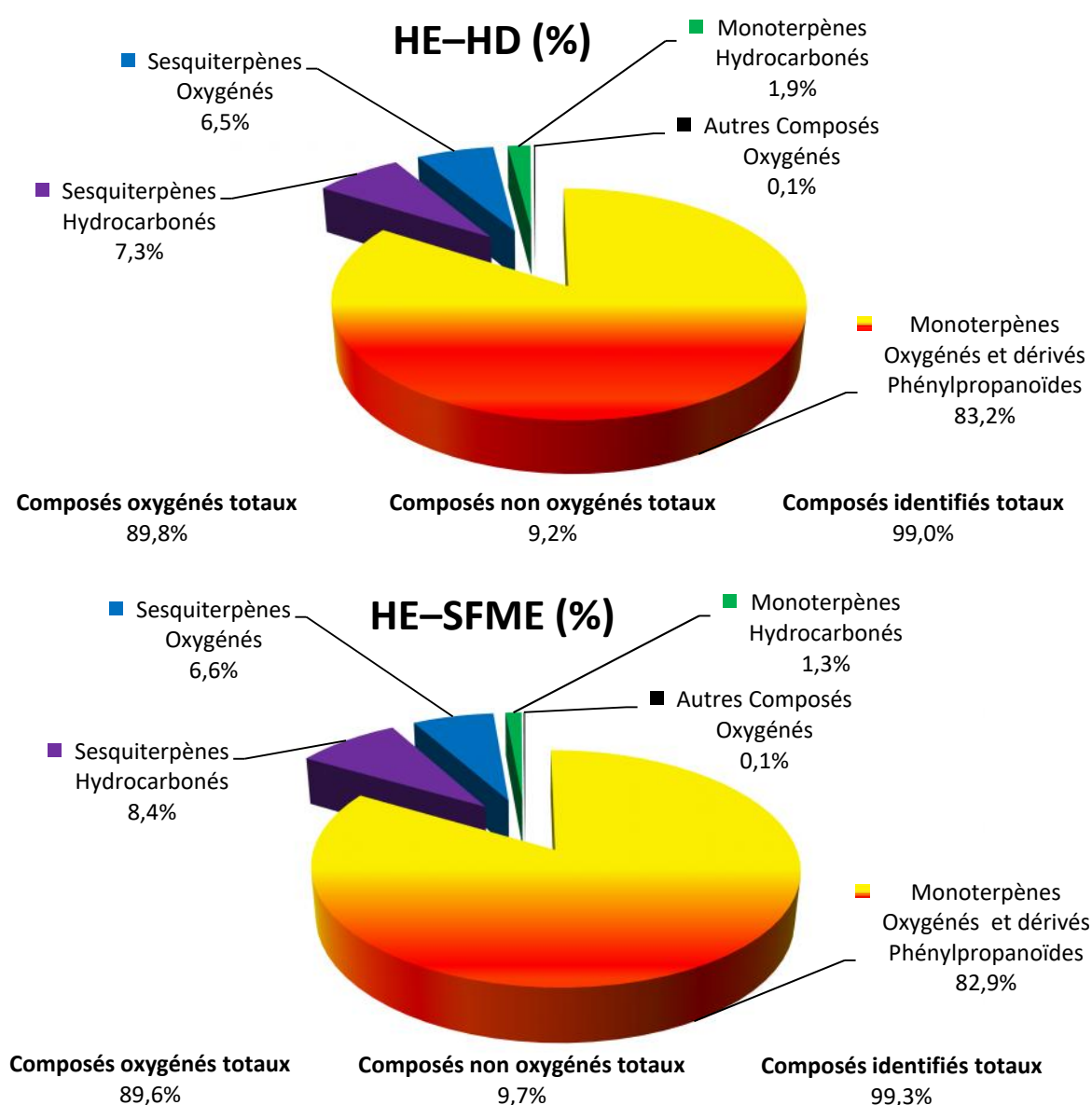
Tableau III.6 : (Suite)

No	Constituants <sup>a</sup>	IRL <sub>HP1</sub> <sup>b</sup>	IRL <sub>INNO</sub> <sup>b</sup>	HE-HD (% ± SD) <sup>c</sup>	HE-SFME (% ± SD) <sup>c</sup>	Identification <sup>e</sup>
<b>Sesquiterpènes Hydrocarbonés</b>				7,3	8,4	
32	-Cubébène	1342	1463	tr	tr	IRL, SM
33	-Bourbonène	1378	1542	0,2	0,2 ± 0,1	IRL, SM
34	-Elémène	1380	1589	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	IRL, SM
35	-Copaène	1381	1490	0,1	0,2	IRL, SM, Std
36	-Caryophyllène	1411	1602	0,1	0,1	IRL, SM, Std
37	-Cédrène	1412	1589	tr	tr	IRL, SM
38	-Cubébène	1413	1545	0,1	tr	IRL, SM
39	-Bergamotène	1430	1568	2,5 ± 0,1	2,7 ± 0,2	IRL, SM
40	-Humulène	1445	1667	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	IRL, SM, Std
41	-Guaiène	1447	1597	tr	tr	IRL, SM
42	-Farnésène	1457	1698	0,4	0,4 ± 0,1	IRL, SM
43	-Curcumène	1470	1782	tr	tr	IRL, SM
44	-Muuroène	1473	1669	0,1	0,2	IRL, SM
45	Alloaromadendrène	1475	1637	0,3	0,4 ± 0,1	IRL, SM
46	Germacrène D	1478	1705	0,8	0,9 ± 0,1	IRL, SM
47	-Guaiène	1492	1715	0,2 ± 0,1	0,1	IRL, SM
48	-Cadinène	1505	1757	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1	IRL, SM
49	Calaménène	1508	1830	0,5	0,7 ± 0,1	IRL, SM
<b>Sesquiterpènes Oxygénés</b>				6,5	6,6	
50	-Ionone	1455	1920	0,1	tr	IRL, SM, Std
51	Nérolidol	1538	2009	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,2	IRL, SM, Std
52	Spathulénol	1561	2131	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	IRL, SM
53	Oxyde de caryophyllène	1565	1981	0,2	0,3	IRL, SM
54	Carotol	1592	2006	0,5	0,8 ± 0,1	IRL, SM
55	Cadinol <sup>d</sup>	1615	2147	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,2	IRL, SM
56	-Cadinol	1629	2165	0,1	0,1	IRL, SM
57	-Cadinol	1637	2201	tr	tr	IRL, SM
58	-Bisabolol	1650	2215	4,1 ± 0,1	3,5 ± 0,1	IRL, SM
59	Phytol	2080	–	tr	tr	IRL, SM
<b>Autres Composés Oxygénés</b>				0,1	0,1	
60	2-méthylbutyrate de méthyle	758	1008	tr	–	IRL, SM
61	Hexanal	773	1090	tr	tr	IRL, SM, Std
62	(Z)-2-Hexénal	823	1120	tr	tr	IRL, SM, Std
63	Benzoate de benzyle	1710	2571	tr	tr	IRL, SM, Std
64	6,10,14-Triméthyl pentadécane-2-one	1816	–	0,1	0,1	IRL, SM
65	Farnésyl acétone	1867	2382	tr	tr	IRL, SM
Temps d'extraction				60 min	30 min	
Rendement				0,48 ± 0,02 %	0,48 ± 0,02 %	
Composés oxygénés totaux				89,8 %	89,6 %	
Composés non oxygénés totaux				9,2 %	9,7 %	
Composés identifiés totaux				99,0 %	99,3 %	

<sup>a</sup> Les composés sont listés dans l'ordre de leur temps d'élution. <sup>b</sup> IRL = Indices de rétention linéaire sont déterminés sur des colonnes HP-1 et INNOWAX utilisant la série homologue de n-alcanes (C<sub>8</sub>–C<sub>24</sub>). <sup>c</sup> La présence d'un composé est indiqué par son pourcentage CG-DIF avec le standard de déviation (SD), les valeurs de composition moins de 0,1% sont notées comme des traces (tr), et l'absence est indiquée par (–). <sup>d</sup> Isomère non identifié. <sup>e</sup> Identification : Méthodes d'identification ; IRL ; SM ; Standard chimique (Std).

L'HE isolée à partir des feuilles de basilic soit par HD ou SFME contient les mêmes composés dominants. Soixante-cinq (65) constituants ont été identifiés représentant 99,0 et 99,3% de la composition chimique totale des HEs de basilic obtenues par HD et SFME, respectivement. Des monoterpènes, des sesquiterpènes et des composés phénylpropanoïdes ont été identifiés (Figure III.2).

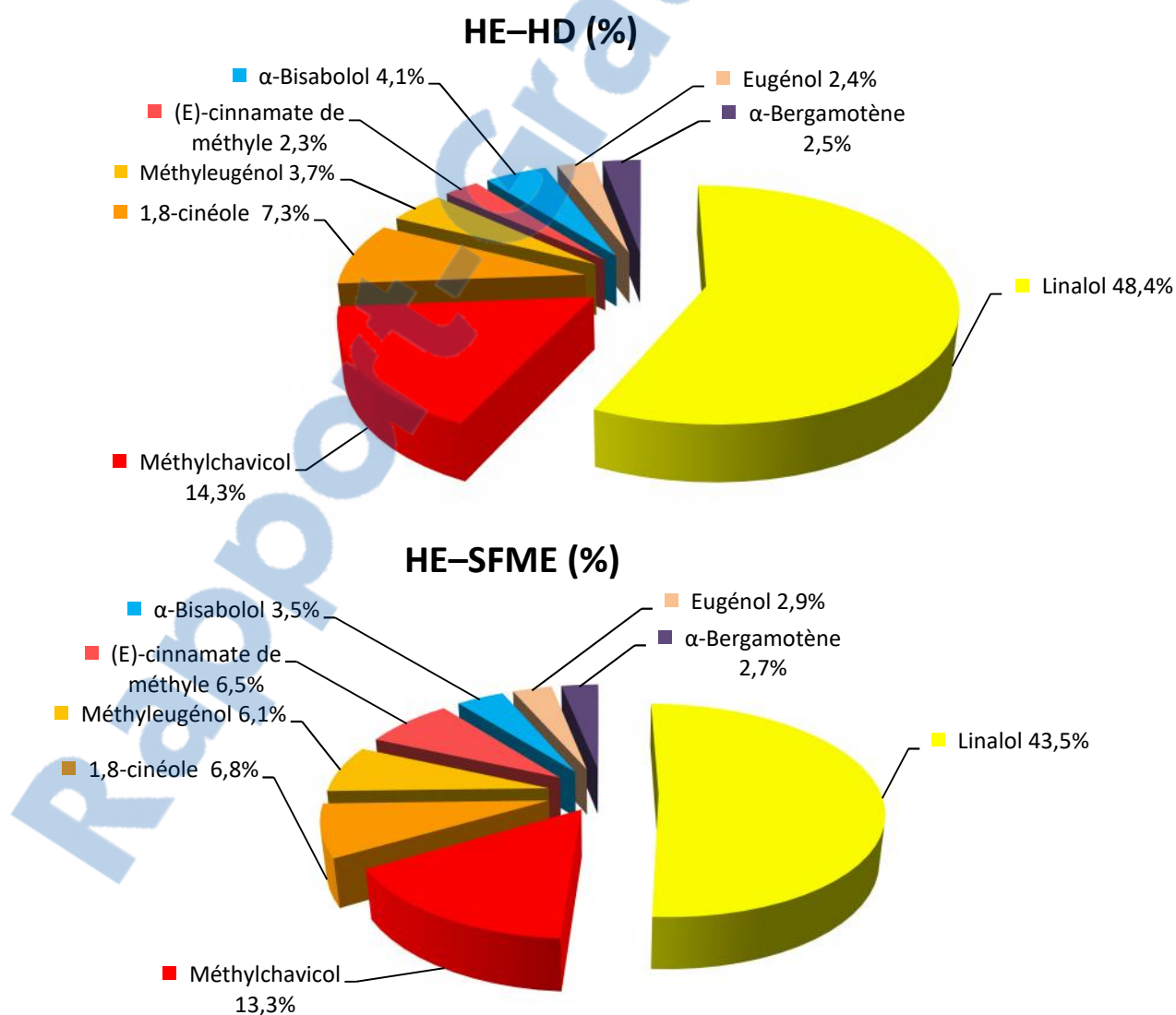
L'étude comparative des résultats obtenus de la composition chimique de l'HE d'*O. basilicum* a montré des quantités légèrement faibles de composés oxygénés (89,6% contre 89,8%) et de plus grandes quantités d'hydrocarbures (9,7% contre 9,2%) présentes dans l'HE de basilic extrait par SFME en comparaison avec la HD. Les monoterpènes oxygénés et les dérivés du phénylpropane constituent les principaux composants de l'HE, mais les quantités relatives diffèrent pour les deux méthodes d'extraction (83,2% par HD et 82,9% par SFME).



**Figure III.2 :** Répartition en % des principales familles de composés de l'HE de basilic extraite par HD et SFME.

Il s'agit essentiellement du *linalol* (48,4% par HD et 43,5% par SFME), composé le plus abondant, suivi par le *méthylchavicol* ou l'*estragole* (14,3% par HD et 13,3% par SFME), le *1,8-cinéole* (7,3% par HD et 6,8% par SFME), le *méthyleugénol* (3,7% par HD et 6,1% par SFME), le (*E*)-*cinnamate de méthyle* (2,3% par HD et 6,5% par SFME) et l'*eugénol* (2,4% par HD et 2,9% par SFME).

Qualitativement, les monoterpènes sont les plus nombreux, ils représentent plus de 50% de l'HE totale d'*O. basilicum* extraite par HD et SFME, parmi les principaux monoterpènes sont des composés oxygénés, le *linalol* et le *1,8-cinéole*. Les dérivés phénylpropanoïdes représentent plus de 25% de l'HE totale d'*O. basilicum* avec le *méthylchavicol*, le *méthyleugénol*, le (*E*)-*cinnamate de méthyle* et l'*eugénol*. Aussi, des composés sesquiterpéniques ont été identifiés dans l'HE de basilic étudiée mais à des quantités faibles comparées aux monoterpènes. Parmi ces sesquiterpènes figurent des teneurs importantes de composés oxygénés comme l'*α*-bisabolol (4,1% par HD et 3,5% par SFME) ou de composés hydrocarbonés comme l'*α*-bergamotène (2,5% par HD et 2,7% par SFME) (Figure III.3).



**Figure III.3 :** Répartition en % des principaux composés de l'HE de basilic extraite par HD et SFME.

Le profil chimique de l'HE de basilic isolé par HD et SFME dans notre étude, est comparable à celui rapportée par Figueredo et *al.*<sup>17</sup>.

La richesse de la composition chimique totale de l'huile extraite par SFME (99,3% contre 99,0% par HD) est liée au chauffage rapide des substances avec les micro-ondes et au faible volume d'eau présent dans le milieu, ce qui diminue la dégradation des composés par réactions thermiques et/ou hydrolytiques, comparé à l'hydro-distillation qui nécessite une grande quantité d'eau et d'énergie. Cependant, il est important de noter que la composition chimique des HEs des plantes aromatiques est fortement influencée par la technique d'extraction appliquée.

### III.5.2. Comparaison de la composition chimique de l'HE de basilic extraite avec les essences étrangères

D'après la littérature, plusieurs études menées sur la composition de l'HE de basilic ont révélé l'existence d'un nombre important de chémotypes dans différentes régions du monde avec une grande diversité dans les principaux constituants correspondant aux linalol, méthylchavicol, l'eugénol, cinnamate de méthyle, 1,8-cinéole, bergamotène, limonène, camphre, -cardinol et au géraniol, etc...<sup>18</sup>.

Afin de classer l'HE de basilic des feuilles brisures obtenue par HD et SFME par rapport aux essences étrangères et pour en déduire à quel chémotype elle appartient, nous avons comparé sa composition chimique à celle des HEs provenant de différents pays (Inde, Brésil, USA,...). Les principaux constituants identifiés dans les essences de basilic étrangères, ainsi que leur pourcentage relatif sont consignés dans le tableau **III.7**.

<sup>17</sup> Figueredo, G.; Ünver, A.; Chalchat, J.C.; Arsalan, D.; Özcan, M.M. *J. Food Biochem.* **2012**, 6, 334–343.

<sup>18</sup> Pandey, A.K.; Singh, P. and Tripathi, N.N. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, 4, 682–694.



**Tableau III.7 :** Composés majoritaires présents dans l'HE d'*O. basilicum* L. de différents pays.

Pays	Partie utilisée	Composés majoritaires (%)	Références
Brésil	Feuilles sèches	Linalol (72,14), géraniol (12,95), 1,8-cinéole (7,90)	[19]
		Linalol (68,96), géraniol (13,09), 1,8-cinéole (6,12)	[20]
Oman	Plante	Linalol (69,9), géraniol (10,9), 1,8-cinéole (6,4), $\alpha$ -bergamotène (1,6), acétate de géranyle (1,4)	[21]
Pologne	Plante sèche	Linalol (64,7), géraniol (12,6), 1,8-cinéole (4,1), épi- $\alpha$ -cadinol (3,8)	[22]
Italie	Partie aérienne fraîche	Linalol (41,17–76,20), méthylchavicol (18,01–41,40), eugénol (1,16–3,89), 1,8-cinéole (0,94–12,91)	[11]
Burkina Faso	Partie aérienne	Linalol (48,7), eugénol (27,4), 1,8-cinéole (3,1–20,2), <i>trans</i> - $\alpha$ -bergamotène (5,4)	[23]
République Tchèque	Feuilles fraîches	Linalol (15,6–32,2), eugénol (9,1–22,2), 1,8-cinéole (3,1–20,2), bergamotène (1–20,2)	[24]
Nigéria	Feuilles; fruits	Linalol (61,7; 62,9), 1,8-cinéole (17,2; 18,7), bornéol (8,5; 6,4), eugénol (5,7; 5,4), $\alpha$ -caryophyllène (4,3; 4,0)	[25]
Sénégal	Feuilles; fleurs	Méthylchavicol (27,85; 38,78), linalol (18,45; 18,87), méthyleugénol (9,98; 14,40), bergamotène (8,48; 10,46)	[26]
Guinée	Plante	Linalol (69,00), eugénol (10,00), ( <i>E</i> )- $\alpha$ -bergamotène (3,00), thymol (2,00)	[27]
Réunion	Plante fraîche	Linalol (25,3–39,1), eugénol (11,0–43,2), <i>trans</i> - $\alpha$ -bergamotène (6,0–7,6)	[28]
Autriche	Feuilles sèches	Linalol (28,6), méthylchavicol (21,7), ( <i>E</i> )-cinnamate de méthyle (14,3), $\alpha$ -cadinol (7,1), eugénol (5,9), 1,8-cinéole (4,0), méthyleugénol (3,1), $\alpha$ -bergamotène (2,2)	[29]
Bulgarie	Feuilles sèches	Linalol (54,95), méthylchavicol (11,98), cinnamate de méthyle (7,24), linolène (0,14)	[30]
USA	Feuilles sèches	Linalol (3,94), méthylchavicol (2,03), cinnamate de méthyle (1,28), eugénol (0,99), 1,8-cinéole (0,29)	[31]
Polynésie Française	Feuilles fraîches	( <i>E</i> )-cinnamate de méthyle (43,4–62,3), ( <i>Z</i> )-cinnamate de méthyle (8,1–8,6), linalol (4,6–21,9)	[4c]
Inde (Sud)	Feuilles fraîches	Cinnamate de méthyle (70,1), linalol (17,5), $\beta$ -élémane (2,6), camphre (1,52)	[32]
Inde (Nord-Ouest)	Feuilles fraîches	Méthyleugénol (39,3), méthylchavicol (38,3), terpinolène (7,7), eugénol (4,5), cubéol (1,9)	[33]
Roumanie	Plante sèche	Linalol (46,95), $\beta$ -élémane (7,84), farnesène (6,86), épi-bicyclosquiphellandène (5,92), -guaïène (5,26)	[34]
Iran	Partie aérienne sèche	Méthylchavicol (37,2–56,7), linalol (21,1–13,1), $\alpha$ -cadinol (6,1–3), germacrène D (6,1–2,7), 1,8-cinéole (2,4–3,5)	[35]
	Feuilles sèches	Méthylchavicol (46,9), géraniol (19,1), néral (15,15), géraniol (3,0), nérol (3,0), caryophyllène (2,4)	[36]
Madagascar	Plante	Méthylchavicol (74–87), 1,8-cinéole (2,55–4,43), linalol (0,97–2,72), méthyleugénol (0,87–4,16)	[37]

Tableau III.7 : (Suite)

Pays	Partie utilisée	Composés majoritaires (%)	Réf.
Malaisie	Feuilles fraîches	Méthylchavicol (30,87–80,95)	[38]
Thaïlande	Partie aérienne	Méthylchavicol (92,48), s-ocimène (2,27), <i>trans</i> - $\gamma$ -bergamotène (2,14)	[39]
Pakistan	Partie aérienne sèche	Linalol (56,7–60,6), épi- $\alpha$ -cadinol (8,6–11,4), $\alpha$ -bergamotène (7,4–9,2), $\gamma$ -cadinène (3,2–5,4)	[40]
Turquie	Fleurs ; feuilles ; tiges	Méthylchavicol (58,26; 52,60; 15,91), limonène (19,41; 13,64; 2,40), <i>p</i> -cymène (0,38; 2,32; 2,40)	[41]
	Partie aérienne sèche	Méthyleugénol (78,02), $\alpha$ -cubébène (6,17), nérol (0,83), -muurolène (0,74)	[42]
Inde (Nord-Est)	Partie aérienne	Camphre (42,1), limonène (7,6), -sélinène (5,6)	[43]
Cameroun	Feuilles fraîches	Limonène (30,9), linalol (18,9), thymol (6,5)	[44]
Éthiopie	Partie aérienne	Copaène (25,5), <i>p</i> -menth-2-en-1-ol (7,7), acétate d'eugényle (4,8), acétate de bornyle (4,0), himachalène (3,6), rosifoliol (3,0), cubébène (2,5)	[45]
Maroc	Partie aérienne fraîche	Linalol (54), <i>trans</i> -cinnamate de méthyle (15,3), 1,8-cinéole (9,33), Farnesol (4,56), <i>cis</i> -caryophyllène (3,43)	[46]
Tunisie	Partie aérienne fraîche	Linalol (42,1), ( <i>E</i> )-cinnamate de méthyle (16,9), 1,8-cinéole (7,6), T-cadinol (3,4)	[47]
Algérie	Feuilles sèches	Linalol (32,83), acétate de linalyle (16), élémol (7,44), acétate de géranyle (6,18), myrcène (6,12), allo-ocimène (5,02), -terpinéol (4,9)	[48]
	Partie aérienne	Linalol (44,7), acétate de linalyle (14,0), 1,8-cinéole (6,7), myrcène (5,6), -terpinéol (5,1)	[49]
Egypte	Partie aérienne	Linalol (44,18), 1,8-cinéole (13,65), eugénol (8,59), cinnamate de méthyle (4,26), iso-caryophyllène (3,10), $\alpha$ -cubébène (4,97)	[50]
	Plante	Méthylchavicol (75,45), 1,8-cinéole (7,56), linalol (5,01), <i>trans</i> -anéthole (3,72), méthyleugénol (3,48)	[51]

Dans l'HE des feuilles de basilic du Brésil<sup>19,20</sup>, le linalol, le géraniol, et le 1,8-cinéole sont les principaux composés. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés dans le basilic d'Oman<sup>21</sup> et de la Pologne<sup>22</sup>.

En Italie<sup>11</sup>, les composés majoritaires : le linalol, le méthylchavicol, l'eugénol et le 1,8-cinéole ont été révélés dans l'HE de basilic. Il a été également rapporté que les composés

<sup>19</sup> Oliveira, J.S.; Porto, L.A.; Estevam, C.S.; Siqueira, R.S.; Alves, P.B.; Niculau, E.S.; Blank, A.F.; Reinaldo, N.; Almeida, R.N.; Marchioro, M.; Lucindo, J.; Quintans-Júnior, L.J. *B. Latinoam. Caribe. Pl.* **2009**, *8*, 195–202.

<sup>20</sup> Nascimento, S.S.; Araújo, A.A.S.; Brito, R.G.; Serafini, M.R.; Menezes, P.P.; DeSantana, J.M.; Júnior, W.L.; Alves, P.B.; Blank, A.F.; Oliveira, R.C.M.; Oliveira, A.P.; Ricardo, L.C.; Albuquerque-Júnior, R.L.C.; Almeida, J.R.G.S. and Quintans-Júnior, L.J. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 547–563.

<sup>21</sup> Hanif, M.A.; Al-Maskari, M.Y.; Al-Maskari, A.; Al-Shukaili, A.; Al-Maskari, A.Y. and Al-Sabahi, J.N. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 751–757.

<sup>22</sup> Nurzy ska-Wierdak, R.; Borowski, B.; Dzida, K.; Zawilak, G. and Kowalski, R. *Turk. J. Agric. For.* **2013**, *37*, 1–10.

majoritaires : le linalol, l'eugénol et le 1,8-cinéole caractérisent le basilic du Burkina Faso<sup>23</sup>, la République tchèque<sup>24</sup>, et le Nigeria<sup>25</sup>.

Au Sénégal<sup>26</sup>, trois composés majoritaires ont été trouvés dans l'HE de basilic, le méthylchavicol, le linalol et le méthyleugénol. Aussi, le linalol et l'eugénol ont été identifiés en tant que composés majoritaires dans l'HE de basilic de la Guinée<sup>27</sup> et de la Réunion<sup>28</sup>.

En Autriche<sup>29</sup>, l'HE de basilic s'est distinguée par trois composés majoritaires qui sont : le linalol, le méthylchavicol et le cinnamate de méthyle. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans les travaux précédents en Bulgarie<sup>30</sup> et les États-Unis<sup>31</sup>.

D'autre part, les composés majoritaires caractérisant le basilic de la Polynésie française<sup>4c</sup> et le sud de l'Inde<sup>32</sup> sont le cinnamate de méthyle et le linalol. Au Nord-Ouest de l'Inde<sup>33</sup>, le méthyleugénol et le méthylchavicol ont été présentés comme composés majoritaires dans l'HE de basilic.

Dans l'HE d'*O. basilicum* de la Roumanie<sup>34</sup>, le linalol a été signalé comme étant le seul composé majoritaire. En outre, le basilic de l'Iran<sup>35,36</sup>, Madagascar<sup>37</sup>, Malaisie<sup>38</sup> et la Thaïlande<sup>39</sup> est riche en méthylchavicol.

A propos de l'HE de basilic du Pakistan<sup>40</sup>, trois composés principaux ont été révélés : le linalol, l'épi- -cardinol et le -bergamotène.

En ce qui concerne le basilic de la Turquie, Chalchat *et al.*<sup>41</sup> ont cité trois principaux composants qui sont le méthylchavicol, le limonène et le *p*-cymène, tandis que Özcan *et al.*<sup>42</sup> ont trouvé le méthyleugénol et le cubébène comme composés majoritaires.

Au Nord-Est de l'Inde, Purkayastha et Nath<sup>43</sup> ont rapporté que le camphre, le limonène et le -sélénène sont les principaux composés de l'HE d'*O. basilicum*.

<sup>23</sup> Dabire, C.; Nebie, R.H.C.; Belanger, A.; Nacro, M. and Sib, F.S. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **2011**, 5, 1082–1095.

<sup>24</sup> Klimankova, E.; Holadova, K.; Hajslova, J.; Cajka, T.; Poustka, J. and Koudela, M. *Food Chem.* **2008**, 107, 464–472.

<sup>25</sup> Usman, L.A.; Ismaeel, R.O.; Zubair, M.F.; Saliu, B.K.; Olawore, N.O. and Elelu, N. *IJCBS* **2013**, 3, 47–52.

<sup>26</sup> Ngom, S.; Faye, F.D.; Kornprobst, J.M.; Diop, M. and Samb, A. *Bull. Soc. R. Sci. Liege* **2012**, 81, 166–175.

<sup>27</sup> Keita, S.M.; Vincent, C.; Schmit, J.P. and Belanger, A. *Flav. Fragr. J.* **2000**, 15, 339–341.

<sup>28</sup> Lucchesie, M.E.; Chemat, F. and Smadja, J. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1043, 323–327.

<sup>29</sup> Politeo, O.; Jukic, M. and Milos, M. *Food Chem.* **2007**, 101, 379–385.

<sup>30</sup> Opalchenova, G. and Obreshkova, D. *J. Microbiol. Methods* **2003**, 54, 105–110.

<sup>31</sup> Lee, S.J.; Umamo, K.; Shibamoto, T. and Lee, K.G. *Food Chem.* **2005**, 91, 131–137.

<sup>32</sup> Kathirvel, P. and Ravi, S. *Nat. Prod. Res.* **2012**, 26, 1112–8.

<sup>33</sup> Joshi, R.K. *India. Anc. Sci. Life* **2014**, 33, 151–156.

<sup>34</sup> Benedec, D.; Oniga, I.; Oprean, R. and Tamas, M. *Farmacia* **2009**, 57, 625–629.

<sup>35</sup> Hassanpouraghdam, M.B.; Gohari, G.R.; Tabatabaei, S.J. and Dadpour, M.R. *J. Serb. Chem. Soc.* **2010**, 75, 1361–1368.

<sup>36</sup> Shirazi, M.T.; Gholami, H.; Kavosi, G.; Rowshan, V. and Tafsiry, A. *Food Sci. Nutr.* **2014**, 2, 146–155.

<sup>37</sup> Ramdriamiharisoa, R.; Gaydou, E.M.; Bianchini, J.P.; Ravelojaona, G. and Vernin, G. *Sci. Aliments* **1986**, 6, 221–231.

<sup>38</sup> Raseetha Vani, S.; Cheng, S.F. and Chuah, C.H. *Am. J. Applied Sci.* **2009**, 6, 523–528.

<sup>39</sup> Bunrathep, S.; Palanuvej, C. and Ruangrunsi, N. *J. Health Res.* **2007**, 21, 201–206.

<sup>40</sup> Hussain, A.I.; Anwar, F.; Sherazi, S.T.H. and Przybylski, R. *Food Chem.* **2008**, 108, 986–995.

<sup>41</sup> Chalchat, J.C. and Özcan, M.M. *Food Chem.* **2008**, 110, 501–503.

<sup>42</sup> Özcan, M. and Chalchat, J.C. *Czech J. Food Sci.* **2002**, 20, 223–228.

<sup>43</sup> Purkayastha, J. and Nath, S.C. *J. Essent. Oil Res.* **2006**, 18, 332–334.

Au Cameroun<sup>44</sup>, l'HE de basilic a été caractérisée par deux composés majoritaires, le limonène et le linalol.

L'isolement de la copaène de l'HE d'*O. basilicum* a été signalé pour la première fois en Ethiopie en tant que composé majoritaire par Unnithan et al.<sup>45</sup>.

Au Maroc, Talbaoui et al.<sup>46</sup> ont présenté trois principaux constituants dans l'HE de basilic à savoir le linalol, le cinnamate de méthyle et le 1,8-cinéole. Aussi, l'espèce étudiée récemment en Tunisie par Snoussi et al.<sup>47</sup> a révélé les mêmes composés majoritaires.

Par ailleurs, en Algérie<sup>48</sup>, les principaux composés de l'HE extraite des feuilles du basilic qui ont été signalés, sont le linalol et l'acétate de linalyle. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Brada et al.<sup>49</sup>.

Dans le cas des huiles de basilic d'Egypte, Ismail<sup>50</sup> a rapporté que quatre composés majoritaires ont été identifiés, le linalol, le 1,8-cinéole, l'eugénol, et le cinnamate de méthyle, tandis que Mahmoud<sup>51</sup> a trouvé le méthylchavicol, le 1,8-cinéole, le linalol et le *trans*-anéthol en tant que composés majoritaires.

### III.6. Conclusion

Les résultats de l'analyse par CG/SM de l'HE de basilic indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les constituants de l'HE obtenue par HD et ceux obtenus par la technique innovante SFME. En effet, dans les deux huiles, le composé majoritaire est un alcool monoterpénique : le linalol avec un pourcentage de 48,4% par HD et 43,5% par SFME, suivi par le méthylchavicol avec un pourcentage de 14,3% par HD et 13,3% par SFME.

Les données sur les chémotypes du basilic puisées dans la littérature et particulièrement ceux rapportées par Simon et al.<sup>6</sup>, nous ont permis de confirmer que l'HE de basilic Egyptien, que nous avons étudiée, appartient bien au chémotype Européen riche en linalol et en méthylchavicol.

Par ailleurs, les variations observées dans la structure et les pourcentages des différents composants dans les essences des différents pays, que nous avons exposées, sont dues à plusieurs sources, entre autres : l'origine géographique, la nature du sol, le mode d'extraction, le matériel végétal frais ou sec, l'organe de la plante à partir duquel est retiré l'essence (plante entière, partie aérienne, feuilles, fleurs, fruits,...) et les conditions d'analyse.

<sup>44</sup> Akono, N.P.; Belong, P.; Tchoumboungang, F.; Bakwo Fils, E.M. and Fankem, H. *J. Appl. Biosci.* **2012**, 59, 4340–4348.

<sup>45</sup> Unnithan, C.R.; Dagnaw, W.; Undrala, S. and Subban, R. *Int. Res. J. Biological Sci.* **2013**, 2, 1–4.

<sup>46</sup> Belkamel, A.; Bamm, J.; Janneot, V.; Belkamel, A.; Dehbi, Y et Douira, A. *Acta Bot. Gallica* **2008**, 155( 4), 467–476.

<sup>47</sup> Snoussi, M.; Dehmani, A.; Noumi, E.; Flamini, G.; Papetti, A. *Microb. Pathog.* **2016**, 90, 13–21.

<sup>48</sup> Hadj-Khelifa, L.; Brada, M.; Brahmi, F.; Achour, D.; Fauconnier, M.L. and Lognay, G. *Topcls. J. Herbal Med.* **2012**, 1, 25–30.

<sup>49</sup> Brada, M.; Hadj Khelifa, L.; Achour, D.; Wathelet, J.P.; Lognay, G. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* **2011**, 14(6), 810–81.

<sup>50</sup> Ismail, M. *Pharm. Biol.* **2006**, 44, 619–626.

<sup>51</sup> Mahmoud, G.I. *J. Med. Plants Res.* **2013**, 7, 561–572.

## Références

- <sup>1</sup> Bouchonnet, S. « La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse », Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris **2009**, p. 194.
- <sup>2</sup> Zellner, B.A.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. « Analysis of Essential Oils », In Baser, K.H.C.; Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications*, Taylor & Francis Group, CRC Press: Boca Raton, FL, USA **2016**, pp. 195–228.
- <sup>3</sup> Pushpangadan, P. « Basil », In Peter, K.V. (Ed.), *Handbook of herbs and spices*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge **2012**, p. 55–72.
- <sup>4</sup> a) Chalchat, J.C.; Garry, R.P.; Sidibé, L.; Harama, M. *J. Essen. Oil Res.* **1999**, 11(3), 375–380; b) Zheljaskov, V.D. *Hortscience* **2008**, 43(3), 737–741; c) Adam, F.; Vahirua-Lechat, I.; Deslandes, E.; Bessiere, J.M.; Menut, C. *J. Essent. Oil Res.* **2009**, 21(3), 237–240.
- <sup>5</sup> Grayer, R.J.; Kite, G.C.; Goldstone, F.J.; Bryan, S.E.; Paton, A. and Putiesky, E. *Phytochemistry* **1996**, 43, 1033–1039.
- <sup>6</sup> Simon, J.E.; Morales, M.R.; Phippen, W.B.; Vieira, R.F.; Hao, Z. « Basil: A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb », In Janick, J. (Ed.), *Perspectives on New Crops and New Uses*, ASHS Press: Alexandria, VA, USA **1999**, pp. 499–505.
- <sup>7</sup> Hiltunen, R. and Holm, Y. « Essential Oil of *Ocimum* », In Hiltunen, R. and Holm, Y. (Eds.), *Basil: the genus *Ocimum**, Harwood Academic Publishers, The Netherlands **1999**, pp. 77–111.
- <sup>8</sup> Lawrence, B.M. « A further examination of the variation of *Ocimum basilicum* L. », In Lawrence, B.M.; Mookherjee, B.D. and Willis, B.J. (Eds.), *Flavors and Fragrances; A World Perspective*. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam **1988**, pp. 161–170.
- <sup>9</sup> Baritoux, O.; Richard, H.; Touche, J. and Derbesy, M. *Flav. Fragr. J.* **1992**, 7, 267–271.
- <sup>10</sup> Agence Française de Normalisation. « *Les Huiles Essentielles, Monographies Relatives aux Huiles Essentielles* », Editions AFNOR, Paris **2000**.
- <sup>11</sup> Marotti, M.; Piccaglia, R. and Giovanelli, E. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 3926–3929.
- <sup>12</sup> Telci, I.; Bayram, E.; Yilmaz, G.; Avcı, B. *Biochem. Sys. Ecol.* **2006**, 34, 489–497.
- <sup>13</sup> Wiley, Mass Finder 2.1 Library, NIST98.
- <sup>14</sup> a) Joulain, D.; König, W.A. « *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons* », 1st Ed. E.B. Verlag: Hamburg, Germany **1998**, p. 658. b) Joulain, D.; König, W.A.; Hochmuth, D.H. « *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils* », Library of Mass Finder 2.1. Hamburg, Germany **2001**.
- <sup>15</sup> McLafferty, F.W.; Stauffer, D.B. « *The Wiley/Nbs Registry of Mass Spectral Data.Rev* », Ed. J. Wiley & Sons, New York **1989**, p. 7872; b) Boelens Aroma Chemical Information Service, B. A. C. I. S. Eso 2000 « *The Complete Database of Essential Oils* », The Netherlands **1999**.
- <sup>16</sup> Chenni, M.; El Abed, D.; Rakotomanomana, N.; Fernandez, X.; Chemat, F. *Molecules* **2016**, 21(1), 113.
- <sup>17</sup> Figueredo, G.; Ünver, A.; Chalchat, J.C.; Arsalan, D.; Özcan, M.M. *J. Food Biochem.* **2012**, 6, 334–343.

- <sup>18</sup> Pandey, A.K.; Singh, P. and Tripathi, N.N. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, 4, 682–694.
- <sup>19</sup> Oliveira, J.S.; Porto, L.A.; Estevam, C.S.; Siqueira, R.S.; Alves, P.B.; Niculau, E.S.; Blank, A.F.; Reinaldo, N.; Almeida, R.N.; Marchioro, M.; Lucindo, J.; Quintans-Júnior, L.J. *B. Latinoam. Caribe. Pl.* **2009**, 8, 195–202.
- <sup>20</sup> Nascimento, S.S.; Araújo, A.A.S.; Brito, R.G.; Serafini, M.R.; Menezes, P.P.; DeSantana, J.M.; Júnior, W.L.; Alves, P.B.; Blank, A.F.; Oliveira, R.C.M.; Oliveira, A.P.; Ricardo, L.C.; Albuquerque-Júnior, R.L.C.; Almeida, J.R.G.S. and Quintans-Júnior, L.J. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16, 547–563.
- <sup>21</sup> Hanif, M.A.; Al-Maskari, M.Y.; Al-Maskari, A.; Al-Shukaili, A.; Al-Maskari, A.Y. and Al-Sabahi, J.N. *J. Med. Plants Res.* **2011**, 5, 751–757.
- <sup>22</sup> Nurzy ska-Wierdak, R.; Borowski, B.; Dzida, K.; Zawilak, G. and Kowalski, R. *Turk. J. Agric. For.* **2013**, 37, 1–10.
- <sup>23</sup> Dabire, C.; Nebie, R.H.C.; Belanger, A.; Nacro, M. and Sib, F.S. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **2011**, 5, 1082–1095.
- <sup>24</sup> Klimankova, E.; Holadova, K.; Hajslova, J.; Cajka, T.; Poustka, J. and Koudela, M. *Food Chem.* **2008**, 107, 464–472.
- <sup>25</sup> Usman, L.A.; Ismaeel, R.O.; Zubair, M.F.; Saliu, B.K.; Olawore, N.O. and Elelu, N. *IJCBS* **2013**, 3, 47–52.
- <sup>26</sup> Ngom, S.; Faye, F.D.; Kornprobst, J.M.; Diop, M. and Samb, A. *Bull. Soc. R. Sci. Liege* **2012**, 81, 166–175.
- <sup>27</sup> Keita, S.M.; Vincent, C.; Schmit, J.P. and Belanger, A. *Flav. Fragr. J.* **2000**, 15, 339–341.
- <sup>28</sup> Lucchesie, M.E.; Chemat, F. and Smadja, J. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1043, 323–327.
- <sup>29</sup> Politeo, O.; Jukic, M. and Milos, M. *Food Chem.* **2007**, 101, 379–385.
- <sup>30</sup> Opalchenova, G. and Obreshkova, D. *J. Microbiol. Methods* **2003**, 54, 105–110.
- <sup>31</sup> Lee, S.J.; Umamo, K.; Shibamoto, T. and Lee, K.G. *Food Chem.* **2005**, 91, 131–137.
- <sup>32</sup> Kathirvel, P. and Ravi, S. *Nat. Prod. Res.* **2012**, 26, 1112–8.
- <sup>33</sup> Joshi, R.K. *India. Anc. Sci. Life* **2014**, 33, 151–156.
- <sup>34</sup> Benedec, D.; Oniga, I.; Oprean, R. and Tamas, M. *Farmacia* **2009**, 57, 625–629.
- <sup>35</sup> Hassanpouraghdam, M.B.; Gohari, G.R.; Tabatabaei, S.J. and Dadpour, M.R. *J. Serb. Chem. Soc.* **2010**, 75, 1361–1368.
- <sup>36</sup> Shirazi, M.T.; Gholami, H.; Kavooosi, G.; Rowshan, V. and Tafsiry, A. *Food Sci. Nutr.* **2014**, 2, 146–155.
- <sup>37</sup> Ramdriamiharisoa, R.; Gaydou, E.M.; Bianchini, J.P.; Ravelojaona, G. and Vernin, G. *Sci. Aliments* **1986**, 6, 221–231.
- <sup>38</sup> Raseetha Vani, S.; Cheng, S.F. and Chuah, C.H. *Am. J. Applied Sci.* **2009**, 6, 523–528.
- <sup>39</sup> Bunrathep, S.; Palanuvej, C. and Ruangrunsi, N. *J. Health Res.* **2007**, 21, 201–206.
- <sup>40</sup> Hussain, A.I.; Anwar, F.; Sherazi, S.T.H. and Przybylski, R. *Food Chem.* **2008**, 108, 986–995.
- <sup>41</sup> Chalchat, J.C. and Özcan, M.M. *Food Chem.* **2008**, 110, 501–503.

- <sup>42</sup> Özcan, M. and Chalchat, J.C. *Czech J. Food Sci.* **2002**, 20, 223–228.
- <sup>43</sup> Purkayastha, J. and Nath, S.C. *J. Essent. Oil Res.* **2006**, 18, 332–334.
- <sup>44</sup> Akono, N.P.; Belong, P.; Tchoumboungang, F.; Bakwo Fils, E.M. and Fankem, H. *J. Appl. Biosci.* **2012**, 59, 4340–4348.
- <sup>45</sup> Unnithan, C.R.; Dagnaw, W.; Undrala, S. and Subban. R. *Int. Res. J. Biological Sci.* **2013**, 2, 1–4.
- <sup>46</sup> Belkamel, A.; Bammi, J.; Janneot, V.; Belkamel, A.; Dehbi, Y et Douira, A. *Acta Bot. Gallica* **2008**, 155(4), 467–476.
- <sup>47</sup> Snoussi, M.; Dehmani, A.; Noumi, E.; Flamini, G.; Papetti, A. *Microb. Pathog.* **2016**, 90, 13–21.
- <sup>48</sup> Hadj-Khelifa, L.; Brada, M.; Brahmi, F.; Achour, D.; Fauconnier, M.L. and Lognay. G. *Topcls. J. Herbal Med.* **2012**, 1, 25–30.
- <sup>49</sup> Brada, M.; Hady Khelifa, L.; Achour, D.; Wathelet, J.P.; Lognay, G. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* **2011**, 14(6), 810–81.
- <sup>50</sup> Ismail, M. *Pharm. Biol.* **2006**, 44, 619–626.
- <sup>51</sup> Mahmoud, G.I. *J. Med. Plants Res.* **2013**, 7, 561–572.

***DEUXIEME PARTIE***

*Etude Biologique  
de l'Huile Essentielle de Basilic*



# *Chapitre I'*

## *Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de basilic*

## I'.1. Introduction

De par leur composition chimique complexe (nombre élevé de constituants avec une grande variabilité structurale), les HEs possèdent de nombreuses et multiples propriétés : anti-inflammatoires, toniques, digestives, cicatrisantes, antalgiques, antispasmodiques, antimicrobiennes, insectifuges, etc... Leur emploi par le biais de plantes à des fins thérapeutiques date depuis les temps les plus reculés. Actuellement, la médication par les plantes connaît un intérêt de plus en plus croissant auprès des populations.

En effet, près de 80% de la population africaine ont recours aux plantes pour se soigner et n'ont pas accès aux médicaments dits modernes. Plusieurs principes actifs isolés des plantes sont devenus des médicaments efficaces.

Afin de valider l'utilisation de la plante du basilic en médecine traditionnelle, nous nous sommes proposés d'évaluer *in vitro* le pouvoir antimicrobien de l'HE de basilic « *Ocimum basilicum* L. » extraite par deux méthodes, l'une classique (HD) et l'autre innovatrice (SFME) en vue d'effectuer une étude comparative entre ces deux techniques en terme d'activité antimicrobienne.

## I'.2. Mécanisme d'action des huiles essentielles sur les bactéries

Le mécanisme d'action des HEs sur les cellules bactériennes n'est pas explicitement interprété<sup>1,2</sup>. Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires. Les modes d'action des HEs et de leurs principaux constituants, décrits jusqu'à présent, semblent tous affecter la paroi ou la membrane cytoplasmique.

Une caractéristique importante des HEs et de leurs constituants est leur caractère *hydrophobe*, ce qui leur permet de s'insérer dans les couches lipidiques de la membrane cellulaire bactérienne et des mitochondries, perturbant les structures et les rendant plus perméables. La fuite des ions et des autres constituants de la cellule peut alors se produire<sup>3</sup>. Du fait de la variabilité quantitative et qualitative des composants des HEs, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire<sup>4,5</sup>. Les principales localisations des sites d'action des constituants des HEs au niveau cellulaire sont indiquées dans la figure I'.1 :

- |   |  |
|---|--|
| (1) Altération de la paroi cellulaire;        | (4) Fuite du contenu cellulaire;                     |
| (2) Dégradation de la membrane cytoplasmique; | (5) Coagulation du cytoplasme;                       |
| (3) Altération des protéines membranaires;    | (6) Epuisement de la force de mouvement des protons. |

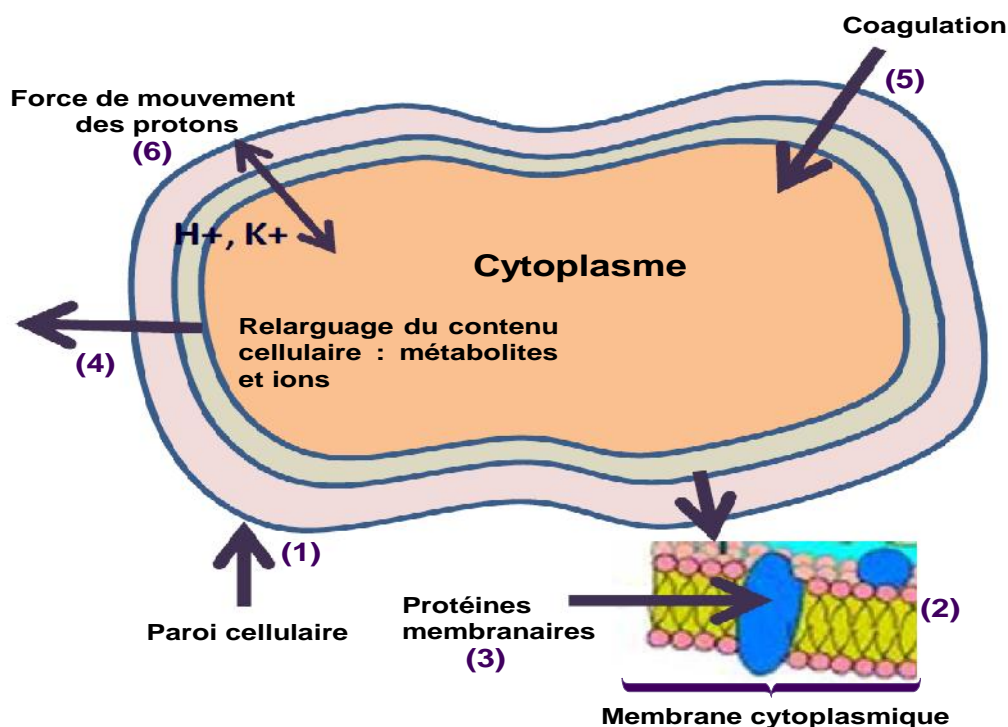
<sup>1</sup> Burt, S. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, 94, 223–253.

<sup>2</sup> Kalemba, D., Kunicka. A. *Curr. Med. Chem.*, **2003**, 10(10), 813–829.

<sup>3</sup> a) Goetz, P.; Ghedira, K. « *Phytothérapie anti-infectieuse* », Springer-Verlag, Paris **2012**, p. 394; b) Nazzaro, F.; Fratianni, F.; De Martino, L.; Coppola, R.; De Feo, V. *Pharmaceuticals* **2013**, 6, 1451–1474.

<sup>4</sup> Souza, E.L.; Guerr, N.B.; Stamford, T.L.M.; Lima, E.O. *Rev. Bras. Farm.* **2006**, 87(1), 22–25.

<sup>5</sup> Bajpai, V.K.; Kang, S.C. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2010**, 87, 327–336.



**Figure I'.1 :** Principales localisations des sites d'action des constituants des HEs d'après Nazzaro et al.<sup>3b</sup>.

L'action des HEs dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété *hydrophobe* qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions ( $K^+$ )<sup>6,7</sup>.

Certains composés phénoliques des HEs interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP<sup>8</sup>.

Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée par Wendakoon et al.<sup>9</sup>. Les HEs peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des polysaccharides<sup>10</sup>. D'autres auteurs pensent que l'activité inhibitrice de ces composés serait due à leur affinité avec les groupements SH impliqués dans la division cellulaire.

<sup>6</sup> Souza, E.L.; Stamford, T.L.M.; Lima, E.O. *Braz. J. Microbiol.* **2006**, 37, 527–532.

<sup>7</sup> Cox, S.D.; Mann, C.M.; Markham, J.L.; Bell, H.C.; Gustafson, J.E.; Warmington, J.R.; Wyllie, S.G. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, 88, 170–175.

<sup>8</sup> Pavel, M.; Risti, M.; Stevi, T. *J. Serb. Chem. Soc.* **2009**, 75(1), 27–34.

<sup>9</sup> Wendakoon, C.N.; Sakaguchi, M. *J. Food Protect.* **1995**, 58, 280–283.

<sup>10</sup> Malecky, M. « *Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins* », **2007**, Thèse de doctorat, INRA, UMR 791 Physiologie de la Nutrition et Alimentation, F-75231 Paris.

### I'.3. Matériel et méthodes

#### I'.3.1. Matériel

Pour la mise en évidence de l'activité microbienne, quatre (04) souches bactériennes et une (01) fongique ont été testées vis-à-vis de l'HE de basilic. Toutes les souches testées proviennent de l'institut Pasteur d'Alger. L'HE testée a été obtenue par HD et SFME à partir des feuilles brisées d'*O. basilicum* L.

##### I'.3.1.1. Principales caractéristiques des souches testées

###### I'.3.1.1.1. Souches bactériennes

###### ▪ Bactéries à Gram-négatif

###### *Escherichia coli* ATCC 25922

*Escherichia coli* est l'espèce bactérienne la plus connue de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce bacille à *Gram-négatif*, à mobilité péritriche, se développe en aéro-anaérobie et sur gélose ordinaire en 24 heures à 37°C, en donnant de colonies rondes, lisses, à bords réguliers, non pigmentées. Cette espèce est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire. *E. coli* est l'espèce la plus fréquemment responsable d'infections urinaires. Cette bactérie est aussi à l'origine de septicémies, de méningites chez le nourrisson ainsi que de manifestations intestinales telles que les diarrhées. Elle est également responsable d'infections communautaires et nosocomiales<sup>11,12</sup>.

###### *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14028

*Pseudomonas aeruginosa* fait partie du genre *Pseudomonas* le plus répandu et le plus pathogène de la famille des *Pseudomonadaceae*. Ce bacille à *Gram-négatif*, mobile, aérobie strict, est connu sous le nom de *bacille pyocyanique* en raison de l'une de ses principales caractéristiques, la production d'un pigment coloré diffusible de couleur bleu : la pyocyanine. Cette espèce bactérienne peut être cultivée facilement sur tous les milieux en aérobie (température de 37°C ou 30°C). *P. aeruginosa* est un germe qui vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux<sup>11</sup>.

Par ailleurs, cette bactérie peut vivre en commensale au niveau du tube digestif de l'homme et de divers animaux. Elle est responsable de redoutables infections hospitalières ou nosocomiales surtout chez les malades affaiblis aux défenses diminuées ou ayant une affection sévère (diabète, brûlures, arthrite...)<sup>13</sup>.

<sup>11</sup> Avril, J.L.; Dabernat, H.; Denis, F.; Monteil, H. « *Bactériologie Clinique* », 2<sup>ème</sup> Ed. Ellipses, Paris **1992**, p. 512.

<sup>12</sup> Avril, J.L.; Fauchère, J.L. « *Bactériologie générale et médicale* », Ed. Ellipses, Paris **2002**, p. 368.

<sup>13</sup> Keynes, S. A.; Due, S.L.; Paul, B. *Age Ageing* **2009**, 38(2), 245–246.

## ▪ Bactéries à Gram-positif

### Bacillus subtilis ATCC 6633

*Bacillus subtilis* est une espèce de bactéries du genre *Bacillus* et de la famille des *Bacillaceae*. C'est un bacille à *Gram-positif* groupé en chaînette, mobile, aérobic strict. L'habitat naturel de *B. subtilis* est le sol, mais il est répandu aussi dans de l'eau fraîche, les eaux côtières et les océans. Il se développe à des températures allant de 10 à 55 °C, avec des taux de croissance plus rapide d'environ 42°C. *B. subtilis* n'est pas considéré comme pathogène pour l'homme (seulement *B. anthracis* et *B. cereus* sont connues pour être pathogènes pour les humains), mais il peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer des intoxications alimentaires. Il est impliqué dans diverses infections cliniques comme la méningite, l'otite, l'infection urinaire, la pneumonie, l'endocardite, l'abcès de l'orbite, la panophtalmie<sup>14,15</sup>.

### Staphylococcus aureus ATCC 6538

Appartenant à la famille des *Micrococcaceae*, *Staphylococcus aureus* occupe une place très importante en pathologie humaine et animale. Cette bactérie de type coccus à *Gram-positif* est disposé en amas, en courte chaînette, à la façon d'une grappe de raisin. Elle se développe en aérobiose et croît abondamment sur milieu gélose en 18 à 24 heures à 37°C.

*S. aureus* est immobile, asporulé et parfois capsulé. Il s'agit de germe très répandu dans la nature (air, eau, sol). Cette espèce bactérienne fait partie de la flore normale de nombreux individus qui sont des « porteurs asymptomatiques ». Cette souche peut être à l'origine d'auto-infections ou contaminer d'autres individus. On peut estimer que 20 à 75 % des sujets sont porteurs de *S. aureus* : porteurs persistants, porteurs occasionnels, ou transitoires<sup>11</sup>.

*S. aureus* peut être trouvé chez 30 à 40% des individus particulièrement dans les fosses nasales antérieures et la gorge. Il est pathogène et responsable d'infections nosocomiales, cutanées, ostéomyélites, septicémies et pneumopathies<sup>16</sup>.

### I'3.1.1.2. Souche fongique : levure

### Candida albicans ATCC 10231

*Candida albicans*, cette espèce levuriforme la plus importante et la plus connue du genre *Candida*, appartient à la famille des *Saccharomycetaceae*. Les *Candida* poussent bien sur milieu Sabouraud ou sur gélose. La différenciation de *C. albicans* des autres espèces se fait par un test de filamentation à 37 °C dans du sérum, produisant un tube germinatif.

<sup>14</sup> Piggot, P.J. « *Bacillus subtilis* », In Schaechter, M.; Piggot, P.J. (Eds.), *Desk Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, San Diego, CA, USA **2009**, pp. 154–165.

<sup>15</sup> Devine, K. « *Bacillus subtilis*, genetics », In Schaechter, M. (Ed.), *Desk Encyclopedia of Microbiology*, Elsevier, San Diego, CA, USA **2004**, pp. 126–134.

<sup>16</sup> Nauciel, C.; Vildé, J.L. « *Bactériologie médicale* », Ed. Elsevier Masson **2005**, p.77.

Cette levure saprophyte est responsable d'infection superficielle ne survenant que chez des individus immunodéprimés<sup>17</sup>. Elle est retrouvée chez 83% de la population. Elle provoque alors des infections fongiques candidoses essentiellement au niveau des muqueuses buccale, digestive et gynécologique<sup>18,19</sup>.

### I'.3.1.2. Milieux de culture

Plusieurs milieux ont été choisis pour les cultures microbiennes :

- Bouillon nutritif
- Gélose de *Mueller-Hinton*
- Gélose nutritive

#### Bouillon nutritif (BN) :

- Peptone.....5g
- Extrait de viande.....3g
- NaCl.....5g
- Eau distillée.....1L
- Ajuster le pH à.....7

#### Gélose de Mueller Hinton (MH) :

- Bouillon de *Mueller-Hinton* .....1L
- Agar-agar.....20g
- Ajuster le pH à .....7,4

#### Gélose nutritive (GN) :

- Bouillon nutritif.....1L
- Agar-agar.....20g
- Ajuster le pH à .....7

*N. B* : Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 30 minutes.

<sup>17</sup> Hart, T.; Shears, P. « *Atlas de poche de microbiologie* », Ed. Médecine-Sciences, Paris **1997**, p. 240.

<sup>18</sup> Poulain, D. *Revue francophone des laboratoires* **2013**, 43(450), 37–46.

<sup>19</sup> Hanlon, G.; Hodges, N. « *Mycology: the study of fungi* », In *Essential Microbiology for Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 1st Edition. John Wiley & Sons, Oxford **2013**, pp. 33–42.

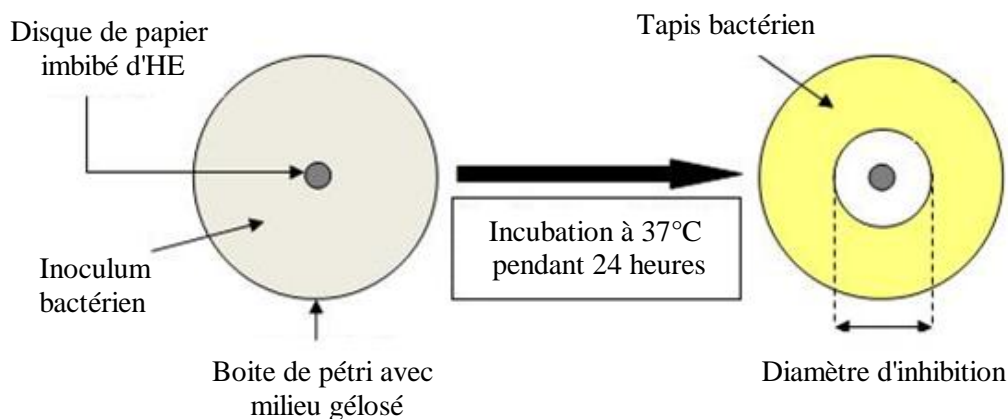
### I'.3.2. Méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne des HEs

#### I'.3.2.1. Méthode par diffusion sur milieu solide : Méthode des disques

Il s'agit d'une méthode qualitative permettant de tester la sensibilité ou la résistance des micro-organismes aux HEs par contact direct.

La méthode des aromatogrammes, est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne des HEs. Cette technique semblable à l'antibiogramme qui permet de tester les antibiotiques est appelée « méthode des disques ». Le principe de cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des HEs sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de pétri. La suspension microbienne est d'abord inoculée et ensemencée en surface sur milieu gélosé en boîte de pétri. Un disque de papier-filtre de 6 mm de diamètre imbibé d'HE (10  $\mu$ L) est placé sur la surface de la gélose ensemencée. Les boîtes de pétri sont alors incubées dans les conditions optimales de température et de temps du micro-organisme considéré.

Pendant l'incubation, les germes se développent sous forme de colonies visibles à l'œil nu. L'obtention d'un halo clair autour du disque indique l'inhibition du développement microbien. Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en millimètres, incluant le diamètre du disque (Figure I'.2). Un témoin positif sans HE et un témoin négatif contenant uniquement le milieu, sont préparés dans les mêmes conditions opératoires<sup>20</sup>.



**Figure I'.2 :** Principe de la méthode de diffusion sur disques.

#### I'.3.2.2. Méthode sur milieu liquide : Méthode des dilutions

En bactériologie médicale, chaque souche est caractérisée en termes de résistance ou de sensibilité aux antibiotiques au moyen de deux valeurs : le diamètre d'inhibition et la concentration minimale inhibitrice (CMI). *La CMI est la plus faible concentration requise pour l'inhibition complète de l'organisme testé en 24 ou 48 heures d'incubation*<sup>20</sup>. Il s'agit de la méthode en bouillon de culture dans une série de tubes à essai, appelée « méthode des dilutions », dont le but est de déterminer la concentration la plus faible de

<sup>20</sup> Chemat, F.; Fabiano-Tixier, A.S.; Hellal, A.; Boutekedjiret, C.; Fernandez, X. « Activités chimiques et biologiques des huiles essentielles », In Chemat, F. and Fernandez, X. (Eds.), *La chimie des huiles essentielles*, Ed. Vuibert, Paris **2012**, pp. 212–213.

l'antimicrobien qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la concentration minimale inhibitrice : CMI, est généralement exprimée en  $\mu\text{L/mL}$  ou  $\text{mg/L}$ ). Cette technique est appliquée aux micro-organismes considérés ayant présenté une sensibilité à l'HE par la méthode précédente.

La dilution en bouillon de culture est une technique dans laquelle une suspension microbienne est testée à des concentrations variables de l'agent antimicrobien dans un milieu de culture liquide. Une dilution en cascade de l'agent inhibiteur est effectuée directement dans le bouillon qui servira à la culture. La gamme de tubes est ensuite inoculée par le micro-organisme testé puis incubé. Un témoin positif sans HE et un témoin négatif contenant uniquement le milieu, sont réalisés dans les mêmes conditions opératoires.

### **I'.3.3. Tests de l'activité antimicrobienne de l'HE de basilic**

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de basilic est réalisée d'abord par la méthode de diffusion sur disques, en raison de sa simplicité et son efficacité pour tester la sensibilité des souches microbiennes. La méthode des dilutions effectuée a permis de déterminer la concentration minimale inhibitrice.

#### **I'.3.3.1. Tests de l'activité antimicrobienne par la méthode des disques**

À partir d'une pré-culture âgée de 24 heuresensemencée sur une gélose nutritive, nous avons prélevé 3 à 4 colonies bien isolées avec une anse et puis nous les avons émulsionnées dans un tube contenant 10 mL de bouillon nutritif.

Après 24 heures d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$ , nous avons comparé le tube de la suspension bactérienne avec le tube de l'étalon 0,5 Mac Farland ( $10^8$  UFC/mL soit  $10^8$  bactéries/mL) contre une fiche de papier blanc avec des lignes noires pour ajuster la turbidité de la suspension. La turbidité peut être diminuée en ajoutant plus de bouillon nutritif stérile, ou bien augmentée avec l'augmentation de la durée d'incubation.

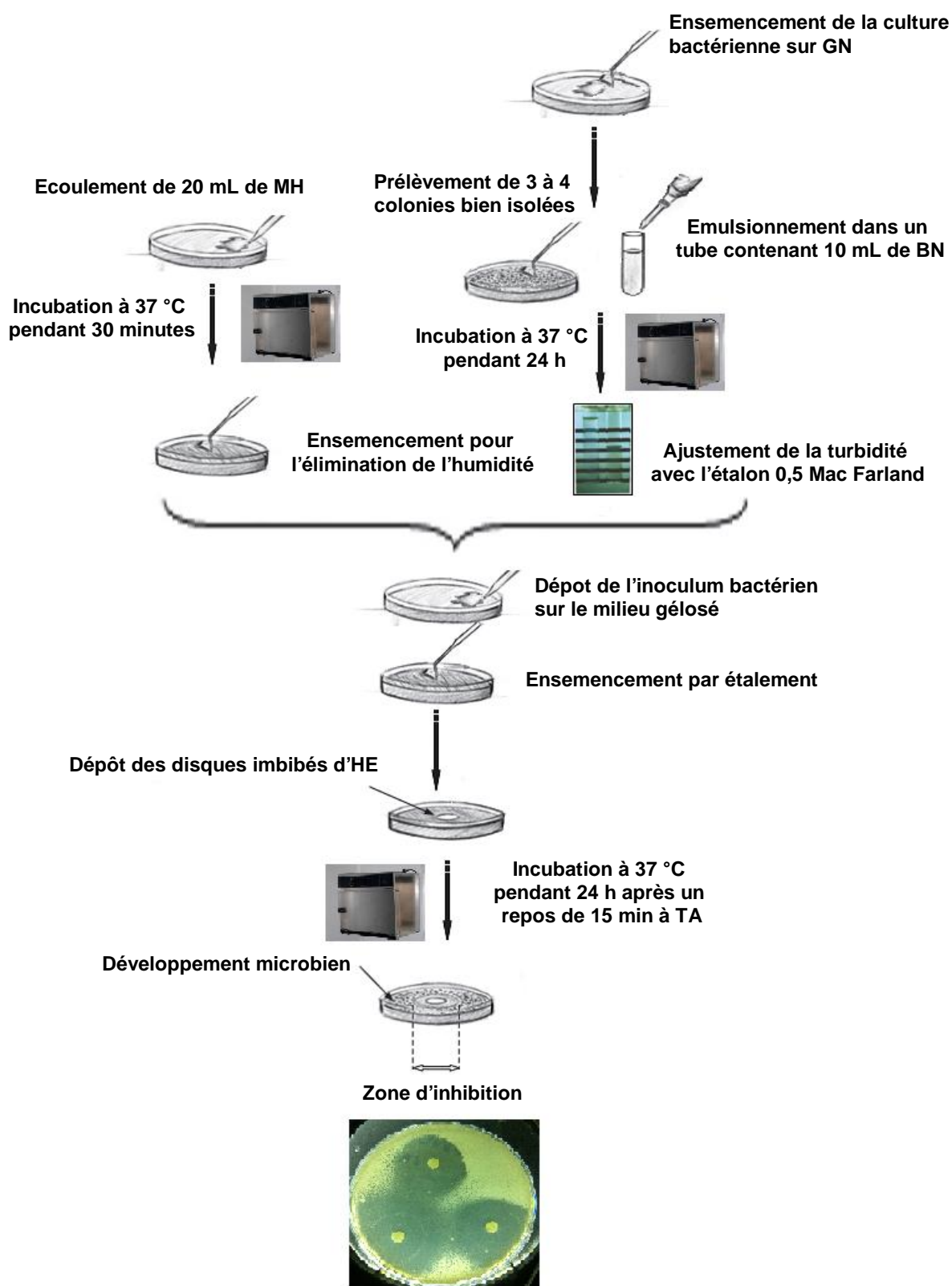
20 mL de gélose de Mueller-Hinton en surfusion ont été coulées dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre. Ensuite, les boîtes ont été introduites dans l'étuve à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 30 mn avant de les ensemenecer pour éliminer l'humidité.

1 mL d'inoculum microbien standardisé ( $10^8$  UFC/mL) a été aseptiquement déposé et étalé sur la surface du milieu à l'aide d'un étaloir, et le liquide en excès a été aspiré avec une pipette Pasteur stérile. Trois disques de 6 mm de diamètre ont été imprégnés de 10  $\mu\text{L}$  d'HE, à l'aide d'une pince stérile dans chaque boîte testée (03 boîtes pour chaque souche).

Pour une bonne diffusion du contenu des disques, les boîtes ont été laissées à la température ambiante 15 mn avant de les incuber à  $37^{\circ}\text{C}$  (Figure I'.3). Un témoin positif contenant seulement la culture microbienne et un témoin négatif contenant uniquement le milieu sont préparés dans les mêmes conditions opératoires.

*Trois répétitions sont réalisées pour chaque souche ainsi que pour les témoins.*





**Figure I'.3 :** Schéma du protocole de détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode des disques.

### I'.3.3.2. Tests de l'activité antimicrobienne par la méthode des dilutions : concentration minimale inhibitrice (CMI)

La Concentration Minimale Inhibitrice ou CMI est réalisée par la méthode des dilutions en milieu liquide. La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension microbienne (à une concentration optimale généralement équivalente au standard 0,5 de Mac Farland, soit  $10^8$  bactéries/mL) est testée à des concentrations variables de l'agent antimicrobien dans un milieu de culture liquide (Figure I'.4).

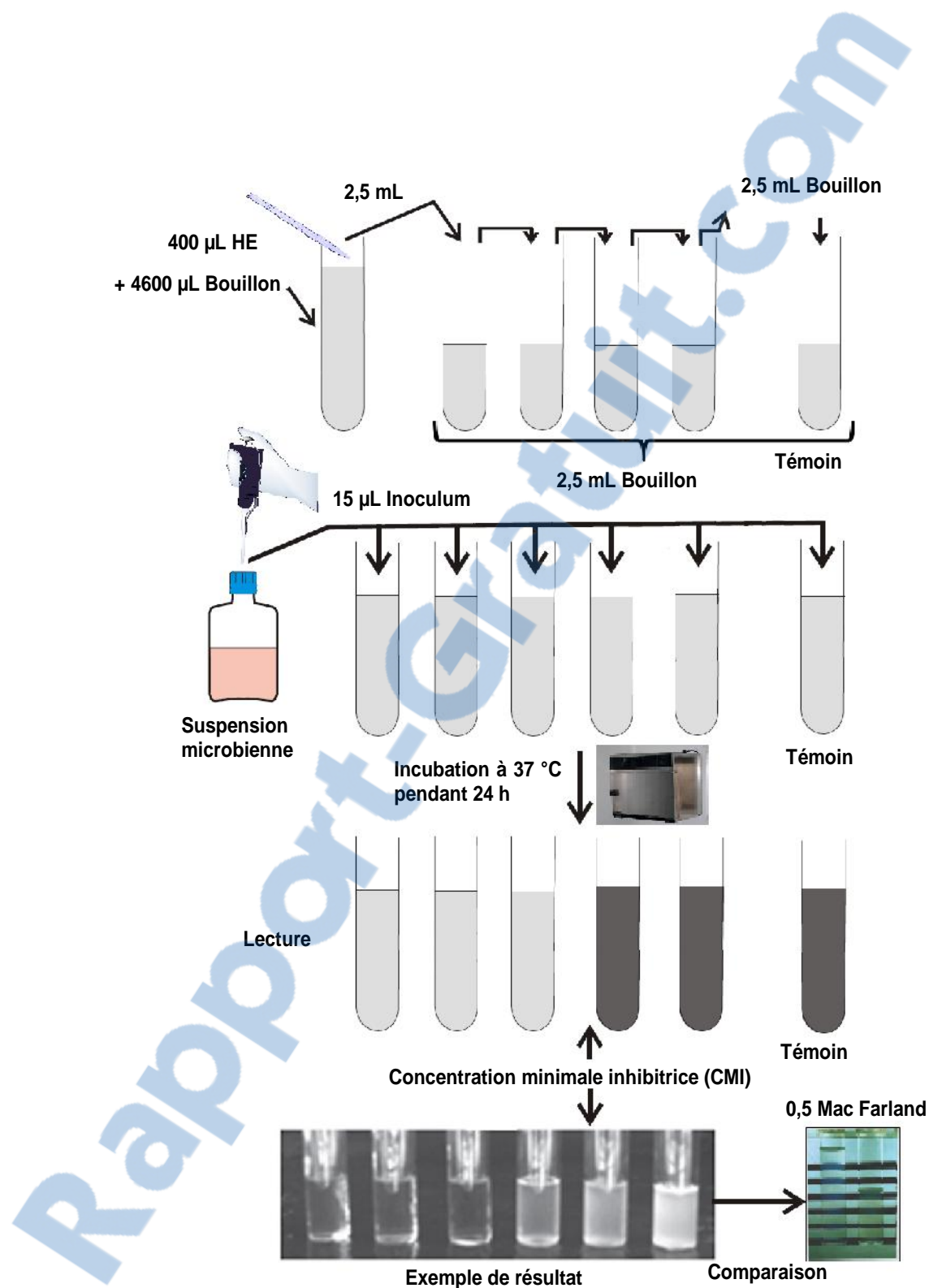
On prépare une série de tubes à hémolyse dans lesquels on répartit une même quantité de 2,5 mL de bouillon nutritif ensemencé (ce qui ne se traduit par aucune opacité appréciable à l'œil). Le premier tube (Solution mère) contient 400  $\mu$ L d'HE à tester (de concentration connue) dans un tube contenant 4,6 mL de bouillon de culture stérile.

Une dilution en cascade (selon une progression géométrique de raison 1/2) est effectuée en additionnant 2,5 mL de la solution mère à 2,5 mL de bouillon contenu dans le tube à essai. La dilution suivante est réalisée de la même manière à partir de cette dernière, de façon à obtenir une gamme de concentration décroissante. Un volume de 15  $\mu$ L de l'inoculum est ensuite introduit dans chacun des tubes de la gamme.

L'ensemble des tubes est incubé à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures. Un témoin positif contenant seulement la suspension microbienne et un témoin négatif contenant uniquement le milieu sont préparés.

*Trois répétitions sont réalisées pour chaque souche ainsi que pour les témoins.*

La croissance microbienne se traduit par un trouble comparé avec l'étalon 0,5 Mac Farland ( $10^6$  UFC/mL). La CMI de l'HE est déduite à partir du premier tube de la gamme dépourvue de croissance bactérienne.



**Figure I'.4 :** Protocole de détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode des dilutions (CMI).

#### I'.4. Résultats et discussion

La sensibilité des souches microbiennes testées est déterminée par la méthode de diffusion sur milieu solide (méthode des disques) en mesurant les diamètres des zones d'inhibition dans les deux sens perpendiculaires autour des disques.

La sensibilité à l'HE a été classée selon Ponce et *al.*<sup>21</sup> par le diamètre des halos d'inhibition :

- Souche extrêmement sensible (+ + +) : La dimension du diamètre de la zone d'inhibition est supérieure à 20 mm
- Souche très sensible (+ +) : La dimension du diamètre de la zone d'inhibition est comprise dans l'intervalle de 15–19 mm.
- Souche sensible (+) : La dimension du diamètre de la zone d'inhibition est comprise dans l'intervalle de 9–14mm.
- Souche non sensible (–) : La dimension du diamètre de la zone d'inhibition est inférieure à 8 mm.

Les résultats des tests de l'activité antimicrobienne de l'HE de basilic extraite par HD et SFME par la méthode des disques sont reproduits sur les *planches I à III* regroupant diverses figures **I'.5–9**.

---

<sup>21</sup> Ponce, A.G.; Fritz, R.; del Valle, C. ; Roura, S.I. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.* **2003**, 36, 679–684.

## PLANCHE I

Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de basilic extraite par HD et SFME

### Bactéries à Gram-négatif

**Figure I'.5 :** Résultats de l'influence de l'HE de basilic extraite par HD et SFME sur la croissance d'*Escherichia coli* (ATCC 25922), après 24h d'incubation à 37°C, sur milieu *Mueller-Hinton*.

**A :** boîte témoin.

**B :** boîte testée par HE-HD.

**C :** boîte testée par HE-SFME.

**Figure I'.6 :** Résultats de l'influence de l'HE de basilic extraite par HD et SFME sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14028), après 24h d'incubation à 37°C, sur milieu *Mueller-Hinton*.

**A :** boîte témoin.

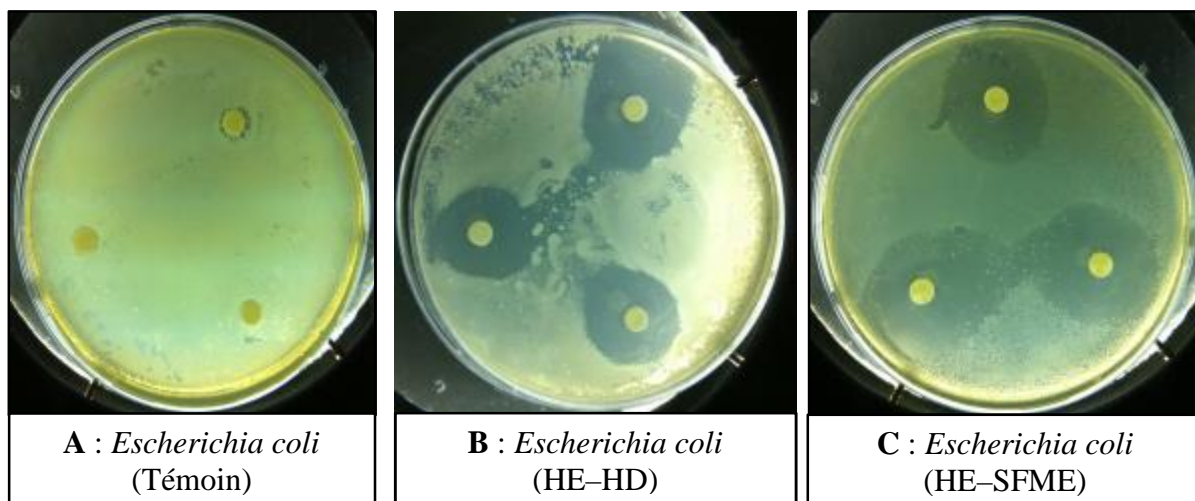
**B :** boîte testée par HE-HD.

**C :** boîte testée par HE-SFME.

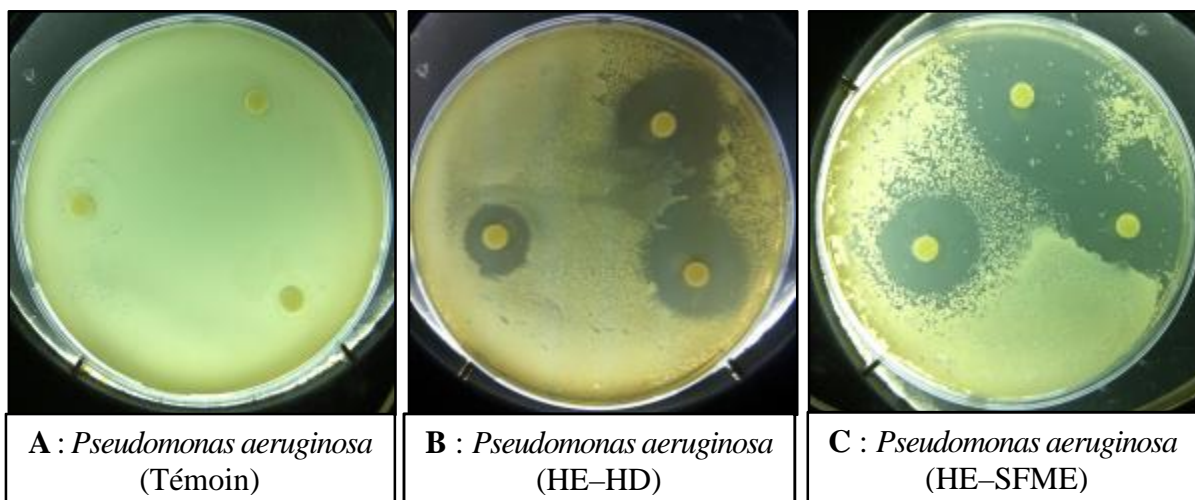
**PLANCHE I**

Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de basilic extraite par HD et SFME

**Bactéries à Gram-négatif**



**Figure I'.5 :** Effet de l'HE de basilic extraite par HD et SFME sur la croissance d'*Escherichia coli* (ATCC 25922).



**Figure I'.6 :** Effet de l'HE de basilic extraite par HD et SFME sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14028).

## PLANCHE II

Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de basilic extraite par HD et SFME

### Bactéries à Gram-positif

**Figure I'.7 :** Résultats de l'effet de l'HE de basilic extraite par HD et SFME sur la croissance de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), après 24h d'incubation à 37°C, sur milieu *Mueller-Hinton*

**A :** boîte témoin.

**B :** boîte testée par HE-HD.

**C :** boîte testée par HE-SFME.

**Figure I'.8 :** Résultats de l'effet de l'HE de basilic extraite par HD et SFME sur la croissance de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), après 24h d'incubation à 37°C, sur milieu *Mueller-Hinton*.

**A :** boîte témoin.

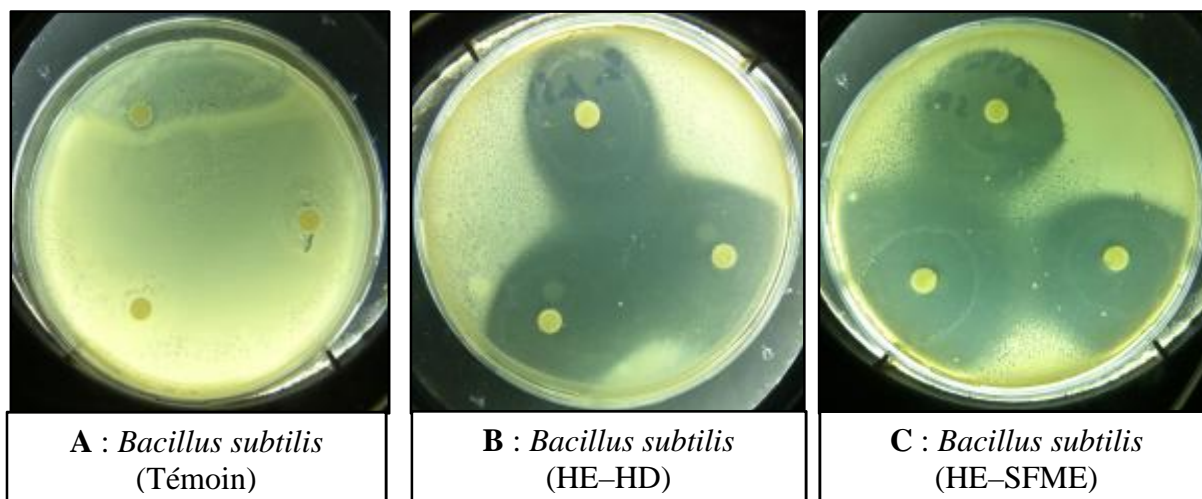
**B :** boîte testée par HE-HD.

**C :** boîte testée par HE-SFME.

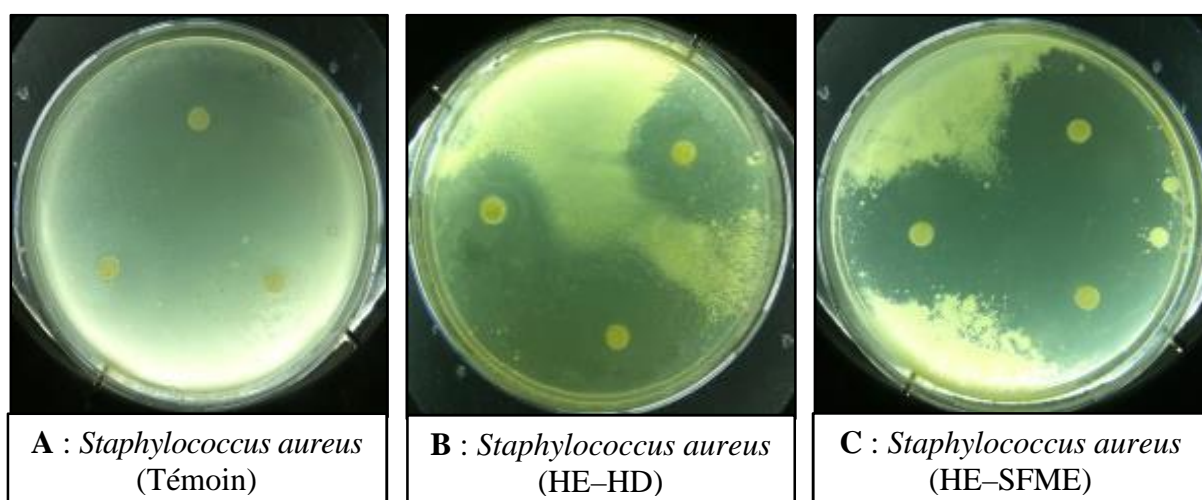
## PLANCHE II

Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de basilic extrait par HD et SFME

Bactéries à Gram-positif



**Figure I'.7 :** Effet de l'HE de basilic extraite par HD et SFME sur la croissance de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).



**Figure I'.8 :** Effet de l'HE de basilic extraite par HD et SFME sur la croissance de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).



**PLANCHE III**

Résultats de l'activité antifongique de l'HE de basilic extraite par HD et SFME

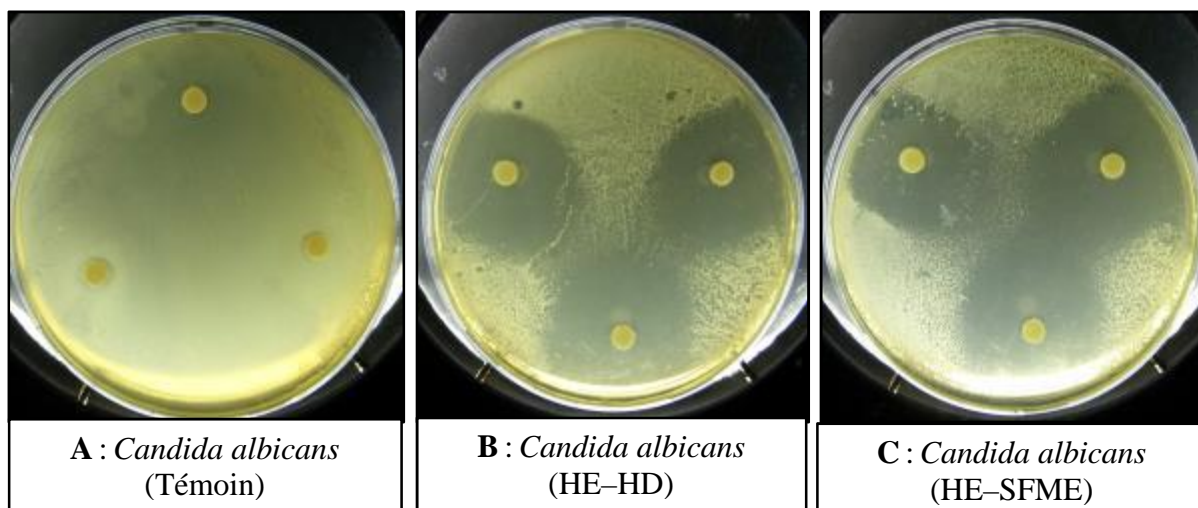
Champignon levuriforme

**Figure I'.9** : Résultats de l'effet de l'HE de basilic extraite par HD et SFME sur la croissance de *Candida albicans* (ATCC 10231), après 24h d'incubation à 37°C, sur milieu *Mueller-Hinton*.

A : boîte témoin.

B : boîte testée par HE-HD.

C : boîte testée par HE-SFME.



**Figure I'.9** : Effet de l'HE de basilic extraite par HD et SFME sur la croissance de *Candida albicans* (ATCC 10231).

Les résultats des tests de l'activité antimicrobienne de l'HE de basilic extraite par HD et SFME par la méthode des disques, exprimés par la mesure des diamètres des zones d'inhibition, sont regroupés dans le tableau I'.1.

**Tableau I'.1** : Diamètres des zones d'inhibition des micro-organismes testés vis-à-vis de l'HE de basilic extraite par HD et SFME.

Micro-organismes testés	Diamètres des zones d'inhibition (mm <sup>a</sup> ± SD <sup>b</sup> )	
	HE-HD	HE-SFME
<b>Bactéries à Gram-positif</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	33 ± 2,5	38 ± 1,5
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	34 ± 1,2	37 ± 2,9
<b>Bactéries à Gram-négatif</b>		
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	22 ± 2,0	26 ± 2,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 14028)	20 ± 3,2	29 ± 2,3
<b>Levure</b>		
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	31 ± 2,3	34 ± 2,3

<sup>a</sup> Diamètre du disque 6 mm est inclus dans les diamètres des zones d'inhibition.

<sup>b</sup> Chaque valeur est la moyenne ± Standard déviation de trois répétitions.

Les résultats des tests de l'activité antimicrobienne de l'HE de basilic extraite par HD et SFME par la méthode des dilutions (exprimés par les valeurs de la CMI) sont regroupés dans le tableau I'.2.

**Tableau I'.2 :** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'HE de basilic extraite par HD et SFME.

Micro-organismes testés	Concentration minimale inhibitrice CMI (µL/mL)	
	HE-HD	HE-SFME
<b>Bactéries à Gram-positif</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	25	18
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	25	18
<b>Bactéries à Gram-négatif</b>		
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	30	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 14028)	30	20
<b>Levure</b>		
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	40	30

L'HE d'*O. basilicum* présente une forte activité antimicrobienne contre les micro-organismes testés. Ces résultats montrent que les bactéries à *Gram-positif*, *S. aureus* et *B. subtilis* ont été les micro-organismes les plus sensibles avec des zones d'inhibition les plus grandes (33 mm pour HE-HD et 38 mm pour HE-SFME), (34 mm pour HE-HD et 37 mm pour HE-SFME), et des valeurs de la CMI plus faibles (25 µL/mL pour HE-HD et 18 µL/mL pour HE-SFME), respectivement.

La plus faible activité a été observée pour *E. coli* avec la plus faible zone d'inhibition (22 mm pour HE-HD et 26 mm pour HE-SFME) et la valeur de la CMI la plus élevée (30 µL/mL pour HE-HD et 25 µL/mL pour HE-SFME).

Par ailleurs, la plus grande inhibition est également observée pour *C. albicans* avec des zones d'inhibition (31 mm pour HE-HD et 34 mm pour HE-SFME) et la CMI (40 µL/mL pour HE-HD et 30 µL/mL pour HE-SFME).

Afin de visualiser l'action de l'HE de basilic sur les souches microbiennes testées, il nous a semblé plus approprié de représenter les résultats de nos expériences sous forme d'histogrammes (Figures I'.10-11).

Dans l'ensemble, l'HE d'*O. basilicum* exerce un pouvoir antibactérien beaucoup plus élevé contre les bactéries à *Gram-positif* par rapport aux bactéries à *Gram-négatif*.

La méthode de diffusion sur disques nous a permis aussi de déterminer le pouvoir antifongique de l'HE d'*O. basilicum* vis-à-vis de la levure *C. albicans*.

Les résultats obtenus par la méthode des dilutions (CMI), permettent de confirmer que l'HE d'*O. basilicum* possède la CMI la plus faible pour *S. aureus*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa*. Les différentes valeurs de la CMI obtenus nous permettent de constater que l'activité antimicrobienne dépend du type de micro-organismes.

Entre les deux extraits d'*O. basilicum*, l'HE-SFME a été relativement plus active que l'HE-HD. A noter que ces résultats sont en bon accord avec les données de la littérature<sup>22,23</sup>.

L'HE de basilic est connue pour avoir une bonne activité antimicrobienne contre un large spectre de micro-organismes<sup>24,25,26,27</sup>.

De nombreux auteurs ont associé l'effet antimicrobien du basilic à la présence d'une forte teneur en linalol. Ainsi, Hussain et al.<sup>28</sup> ont rapporté que l'HE d'*O. basilicum* et le linalol avaient une plus grande activité contre les souches bactériennes par rapport aux souches fongiques.

En outre, Hanif et al.<sup>29</sup> ont indiqué que l'HE de basilic d'Oman riche en linalol présente une forte activité antibactérienne contre toutes les souches bactériennes testées, excepté *P. putida* et *P. aeruginosa*.

Ouibrahim et al.<sup>30</sup> ont étudié l'activité antibactérienne de l'HE de basilic d'Algérie, qui est riche en linalol, contre un large spectre des bactéries à *Gram-négatif* et à *Gram-positif*. Ils ont constaté que cette huile est efficace contre toutes les souches bactériennes testées à l'exception de *P. aeruginosa*.

Sienkiewicz et al.<sup>31</sup> ont démontré que les huiles de basilic contenant principalement le méthylchavicol (86,4%) peuvent être largement utilisées pour éliminer les souches cliniques d'*E. coli* trouvées dans différentes conditions cliniques.

Moghaddam et al.<sup>32</sup> ont révélé que l'HE contenant principalement le méthylchavicol (87,6%) présente une activité antibactérienne contre toutes les bactéries testées.

<sup>22</sup> Shafique, M.; Khan S.J. and Khan, N.H. *Pharmacologyonline* **2011**, 1, 105–111.

<sup>23</sup> Bozin, B.; Mimica-Dukic, N.; Simin, N.; Anackovj, G. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 1822–1828.

<sup>24</sup> Lee, S.J.; Umamo, K.; Shibamoto, T.; Lee, K.G. *Food Chem.* **2005**, 91, 131–137.

<sup>25</sup> Shirazi, M.T.; Gholami, H.; Kavooosi, G.; Rowshan, V.; Tafsiry, A. *Food Sci. Nutr.* **2014**, 2, 146–155.

<sup>26</sup> Suppakul, P.; Miltz, J.; Sonneveld, K.; Bigger, S.W. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 3197–3207.

<sup>27</sup> Zhang, J.W.; Li, S.K.; Wu, W.J. *Molecules* **2009**, 14, 273–278.

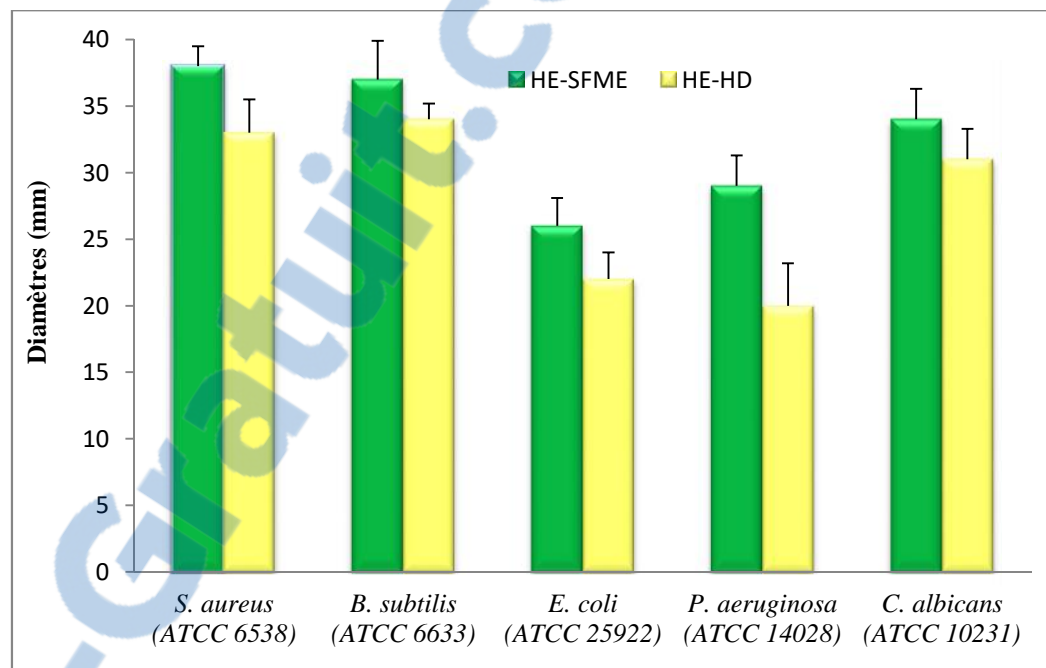
<sup>28</sup> Hussain, A.I.; Anwar, F.; Sherazi, S.T.H.; Przybylski, R. *Food Chem.* **2008**, 108, 986–995.

<sup>29</sup> Hanif, M.A.; Al-Maskari, M.Y.; Al-Maskari, A.; Al-Shukaili, A.; Al-Maskari, A.Y. and Al-Sabahi, J.N. *J. Med. Plants Res.* **2012**, 5, 751–757.

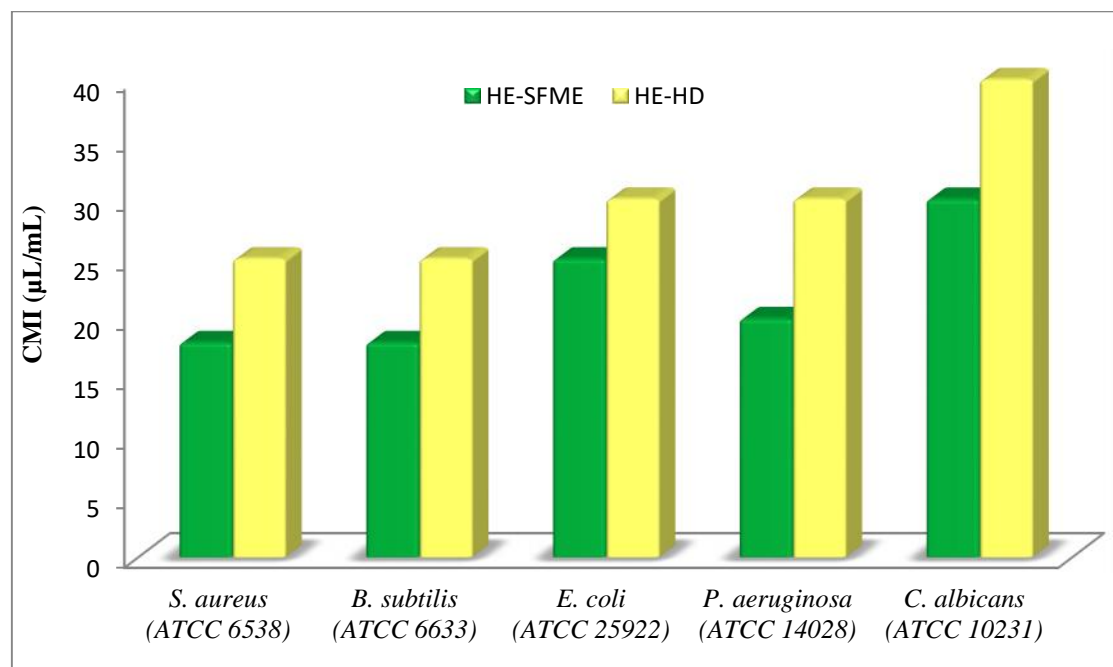
<sup>30</sup> Ouibrahim, A.; Tlili-Ait-kaki, Y.; Bennadja, S.; Amrouni, S.; Djahoudi, A.G.; Djebbar, M.R. *Afr. J. Microbiol. Res* **2013**, 7: 4968–4973.

<sup>31</sup> Sienkiewicz, M.; Lysakowska, M.; Pastuszka, M.; Bienias, W.; Kowalczyk, E. *Molecules* **2013**, 18, 9334–9351.

<sup>32</sup> Moghaddam, M.; Alymanesh, M.R.; Mehdizadeh, L.; Mirzaei, H.; Pirbalouti, A.G. *Ind. Crops Prod.* **2014**, 59, 144–148.



**Figure I'.10 :** Diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes testées vis-à-vis de l'HE de basilic extraite par HD et SFME.



**Figure I'.11 :** Concentration minimale inhibitrice (CMI) des souches microbiennes testées vis-à-vis de l'HE de basilic extraite par HD et SFME.

Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Lopez et al.<sup>33</sup> qui ont rapporté que le méthylchavicol contenu dans l'HE de basilic testée n'a aucun effet antimicrobien.

Par comparaison avec les résultats d'autres travaux, il est possible de noter que pour l'HE de basilic testée, aucune association significative entre l'activité antimicrobienne et la proportion des composés majoritaires n'a été trouvée. La différence d'activité antimicrobienne présentée par les HEs, peut être expliquée par la synergie des différents composés de l'huile ou par la présence d'autres composés mineurs qui peuvent être actifs même en faible concentration<sup>34,35,36</sup>.

L'activité antimicrobienne de l'HE d'*O. basilicum* peut être attribuée en partie, à la présence d'une teneur élevée en linalol et en méthylchavicol comme composés majoritaires. Toutefois, entre les deux extraits de basilic, l'HE-SFME a été relativement plus actif que l'HE-HD, ce qui pourrait être attribué à des teneurs élevées en (*E*)-cinnamate de méthyle, méthyleugénol, eugénol, et d'autres composés oxygénés dans l'HE-SFME.

## I'.5. Conclusion

L'activité antimicrobienne de l'HE d'*O. basilicum* a été effectuée *in vitro* par la méthode de diffusion sur disques et la méthode des dilutions (CMI).

Les tests antimicrobiens réalisés par les deux méthodes montrent clairement que l'HE de basilic extraite par HD et SFME présente une activité importante vis-à-vis de toutes les souches microbiennes testées. Les bactéries à *Gram-positif*, *S. aureus* et *B. subtilis* ont été les micro-organismes les plus sensibles, et la plus faible activité a été observée pour *E. coli*.

Ces résultats montrent également que les bactéries à *Gram-positif* ont été les plus sensibles à cette essence par rapport aux bactéries à *Gram-négatif*.

Toutefois, l'huile extraite par SFME a été relativement plus active que celle isolée par HD. La mise en évidence de l'activité antioxydante des HEs extraites par HD et SFME fera l'objet du chapitre suivant.

<sup>33</sup> Lopez, P.; Sanchez, C.; Batlle, R.; Nerin, C. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6939–6946.

<sup>34</sup> Bassole, I.H.N.; Lamien-Meda, A.; Bayala, B.; Tirogo, S.; Franz, C.; Novak, J.; Nebié, R.C.; Dicko, M.H. *Molecules* **2010**, *15*, 7825–7839.

<sup>35</sup> Lachowicz, K.J.; Jones, G.P.; Briggs, D.R.; Bienvenu, F.E.; Wan, J.; Wilcock, A.; Coventry, M.J. *Lett. Appl. Microbiol.* **1998**, *26*, 209–214.

<sup>36</sup> Bassole, I.H.N.; Juliani, H.R. *Molecules* **2012**, *17*, 3989–4006.

## Références

- <sup>1</sup> Burt, S. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, 94, 223–253.
- <sup>2</sup> Kalembe, D., Kunicka. A. *Curr. Med. Chem.*, **2003**, 10(10), 813–829.
- <sup>3</sup> a) Goetz, P.; Ghedira, K. « *Phytothérapie anti-infectieuse* », Springer-Verlag, Paris **2012**, p. 394; b) Nazzaro, F.; Fratianni, F.; De Martino, L.; Coppola, R.; De Feo, V. *Pharmaceuticals* **2013**, 6, 1451–1474.
- <sup>4</sup> Souza, E.L.; Guerr, N.B.; Stamford, T.L.M.; Lima, E.O. *Rev. Bras. Farm.* **2006**, 87(1), 22–25.
- <sup>5</sup> Bajpai, V.K.; Kang, S.C. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2010**, 87, 327–336.
- <sup>6</sup> Souza, E.L.; Stamford, T.L.M.; Lima, E.O. *Braz. J. Microbiol.* **2006**, 37, 527–532.
- <sup>7</sup> Cox, S.D.; Mann, C.M.; Markham, J.L.; Bell, H.C.; Gustafson, J.E.; Warmington, J.R.; Wyllie, S.G. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, 88, 170–175.
- <sup>8</sup> Pavel, M.; Risti, M.; Stevi, T. *J. Serb. Chem. Soc.* **2009**, 75(1), 27–34.
- <sup>9</sup> Wendakoon, C.N.; Sakaguchi, M. *J. Food Protect.* **1995**, 58, 280–283.
- <sup>10</sup> Malecky, M. « *Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins* », Thèse de doctorat, INRA, UMR 791 Physiologie de la Nutrition et Alimentation, F-75231 Paris **2007**.
- <sup>11</sup> Avril, J.L.; Dabernat, H.; Denis, F.; Monteil, H. « *Bactériologie Clinique* », 2<sup>ème</sup> Ed. Ellipses, Paris **1992**, p. 512.
- <sup>12</sup> Avril, J.L.; Fauchère, J.L. « *Bactériologie générale et médicale* », Ed. Ellipses, Paris **2002**, p. 368.
- <sup>13</sup> Keynes, S. A.; Due, S.L.; Paul, B. *Age Ageing* **2009**, 38(2), 245–246.
- <sup>14</sup> Piggot, P.J. « *Bacillus subtilis* », In Schaechter, M.; Piggot, P.J. (Eds.), *Desk Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, San Diego, CA, USA **2009**, pp. 154–165.
- <sup>15</sup> Devine, K. « *Bacillus subtilis*, genetics », In Schaechter, M. (Ed.), *Desk Encyclopedia of Microbiology*, Elsevier, San Diego, CA, USA **2004**, pp. 126–134.
- <sup>16</sup> Nauciel, C.; Vildé, J.L. « *Bactériologie médicale* », Ed. Elsevier Masson **2005**, p.77.
- <sup>17</sup> Hart, T.; Shears, P. « *Atlas de poche de microbiologie* », Ed. Médecine-Sciences, Paris **1997**, p. 240.
- <sup>18</sup> Poulain, D. *Revue francophone des laboratoires* **2013**, 43(450), 37–46.
- <sup>19</sup> Hanlon, G.; Hodges, N. « *Mycology: the study of fungi* », In *Essential Microbiology for Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 1st Edition. John Wiley & Sons, Oxford **2013**, pp. 33–42.
- <sup>20</sup> Chemat, F.; Fabiano-Tixier, A.S.; Hellal, A.; Boutekedjiret, C.; Fernandez, X. « *Activités chimiques et biologiques des huiles essentielles* », In Chemat, F. and Fernandez, X. (Eds.), *La chimie des huiles essentielles*, Ed. Vuibert, Paris **2012**, pp. 212–213.
- <sup>21</sup> Ponce, A.G.; Fritz, R.; del Valle, C. ; Roura, S.I. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.* **2003**, 36, 679–684.
- <sup>22</sup> Shafique, M.; Khan S.J. and Khan, N.H. *Pharmacologyonline* **2011**, 1, 105–111.



- <sup>23</sup> Bozin, B.; Mimica-Dukic, N.; Simin, N.; Anackovj, G. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1822–1828.
- <sup>24</sup> Lee, S.J.; Umamo, K.; Shibamoto, T.; Lee, K.G. *Food Chem.* **2005**, *91*, 131–137.
- <sup>25</sup> Shirazi, M.T.; Gholami, H.; Kavosi, G.; Rowshan, V.; Tafsiry, A. *Food Sci. Nutr.* **2014**, *2*, 146–155.
- <sup>26</sup> Suppakul, P.; Miltz, J.; Sonneveld, K.; Bigger, S.W. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3197–3207.
- <sup>27</sup> Zhang, J.W.; Li, S.K.; Wu, W.J. *Molecules* **2009**, *14*, 273–278.
- <sup>28</sup> Hussain, A.I.; Anwar, F.; Sherazi, S.T.H.; Przybylski, R. *Food Chem.* **2008**, *108*, 986–995.
- <sup>29</sup> Hanif, M.A.; Al-Maskari, M.Y.; Al-Maskari, A.; Al-Shukaili, A.; Al-Maskari, A.Y. and Al-Sabahi, J.N. *J. Med. Plants Res.* **2012**, *5*, 751–757.
- <sup>30</sup> Ouibrahim, A.; Tlili-Ait-kaki, Y.; Bennadja, S.; Amrouni, S.; Djahoudi, A.G.; Djebar, M.R. *Afr. J. Microbiol. Res* **2013**, *7*: 4968–4973.
- <sup>31</sup> Sienkiewicz, M.; Lysakowska, M.; Pastuszka, M.; Bienias, W.; Kowalczyk, E. *Molecules* **2013**, *18*, 9334–9351.
- <sup>32</sup> Moghaddam, M.; Alymanesh, M.R.; Mehdizadeh, L.; Mirzaei, H.; Pirbalouti, A.G. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *59*, 144–148.
- <sup>33</sup> Lopez, P.; Sanchez, C.; Batlle, R.; Nerin, C. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6939–6946.
- <sup>34</sup> Bassole, I.H.N.; Lamien-Meda, A.; Bayala, B.; Tirogo, S.; Franz, C.; Novak, J.; Nebié, R.C.; Dicko, M.H. *Molecules* **2010**, *15*, 7825–7839.
- <sup>35</sup> Lachowicz, K.J.; Jones, G.P.; Briggs, D.R.; Bienvenu, F.E.; Wan, J.; Wilcock, A.; Coventry, M.J. *Lett. Appl. Microbiol.* **1998**, *26*, 209–214.
- <sup>36</sup> Bassole, I.H.N.; Juliani, H.R. *Molecules* **2012**, *17*, 3989–4006.

## *Chapitre II'*

### *Activité antioxydante de l'huile essentielle de basilic*

## II'.1. Introduction

Au cours de ces dernières années, avec l'expansion d'une grande partie du commerce de produits alimentaires, les industries alimentaires ont de plus en plus recours à l'ajout d'importants additifs aux aliments.

Cependant, plusieurs additifs synthétiques ont été interdits à la consommation, du fait que ces derniers ont été suspectés de provoquer des manifestations allergiques, ou même de favoriser la formation de cellules cancéreuses. De ce fait, les industriels ont envisagé l'incorporation de molécules naturelles dans le but de présenter des produits conformes aux exigences des consommateurs, sans effet sur les propriétés sensorielles et nutritionnelles du produit alimentaire. Certains additifs sont devenus indispensables en industrie pour améliorer la conservation des aliments comme conservateurs et antioxydants<sup>1,2</sup>.

Les antioxydants sont des composés susceptibles de retarder considérablement ou d'inhiber l'oxydation des lipides ou d'autres molécules. L'origine des antioxydants remonte à l'antiquité. Les anciens Egyptiens détiennent une connaissance de technique remarquable en préservant les cadavres avec des plantes dont les extraits sont riches en composés phénoliques<sup>3</sup>.

Les extraits de plantes aromatiques à HEs riches en composés phénoliques sont généralement utilisés en tant qu'arômes alimentaires. Actuellement, les HEs constituent une source potentielle de substances naturelles bioactives, et font l'objet de nombreuses études concernant leurs éventuelles utilisations en tant qu'antioxydants<sup>4</sup>.

Afin d'utiliser les HEs en tant qu'antioxydants alimentaires, il convient d'évaluer leur efficacité antioxydante. Dans ce contexte, nous nous sommes donc intéressés à l'étude de l'activité antioxydante de l'HE de basilic extraite par HD et SFME par le test au radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle), et de l'effet du chauffage par la détermination des matériaux polaires totaux (TPM).

## II'.2. Tests d'évaluation de l'activité antioxydante

Les aliments contiennent des lipides, des protéines, des saccharides, et des vitamines qui peuvent être attaqués par les radicaux libres provoquant leur oxydation<sup>3</sup>.

Les lipides sont très vulnérables à l'action de l'oxydation lipidique et à l'altération autolytique (enzymatique et microbienne). *Les réactions d'oxydation lipidique peuvent*

---

<sup>1</sup> Chemat, F.; Fabiano-Tixier, A.S.; Hellal, A.; Boutekedjiret, C.; Fernandez, X. « Activités chimiques et biologiques des huiles essentielles », In Chemat, F. and Fernandez, X. (Eds.), *La chimie des huiles essentielles*. Ed. Vuibert, Paris **2012**, pp. 212–248.

<sup>2</sup> André, M.L. « *Les Additifs alimentaires : un danger méconnu* », Editions Jouvence, France **2013**, pp.19–40.

<sup>3</sup> Škrovánková, S.; Mišurcová, L.; Mach, L. « Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants », In Henry, J. (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research*, Elsevier Inc, USA **2012**, 67, p. 75–139.

<sup>4</sup> Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. and Idaomar, M. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46, 446–475.

être accélérées par plusieurs paramètres, comme la présence de radicaux libres oxygénés, une température élevée, la présence de la lumière solaire ou bien encore la trace de métaux de transition.

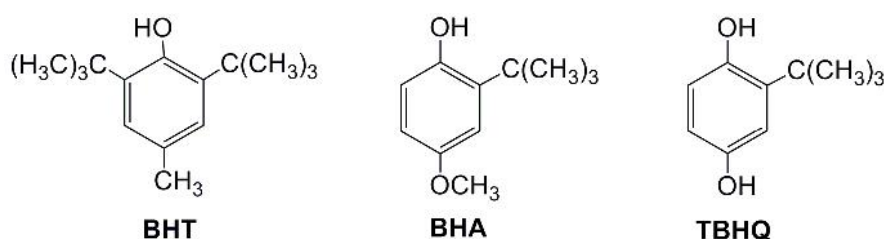
Ces réactions d'oxydation, survenant notamment dans les lipides et les aliments contenant des lipides, entraîne généralement la détérioration de la qualité nutritionnelle et sensorielle des aliments<sup>1</sup>.

Ces réactions d'oxydation conduisent aussi à des produits de dégradation qui sont responsables des modifications de goût, d'odeur et de couleur au cours des processus de fabrication et de stockage, ce qui conduit par conséquent à la perte de la qualité et de la sécurité des aliments.

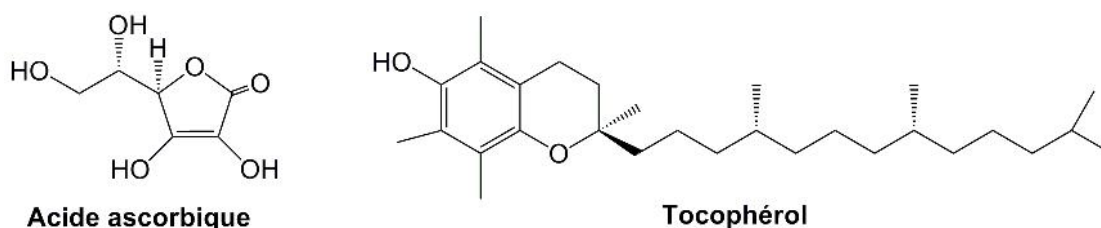
L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à protéger efficacement une cible donnée contre l'oxydation, tout en étant utilisé en un rapport molaire très faible antioxydant / cible, à savoir inférieure à 1%<sup>5</sup>.

Parmi les antioxydants, on peut citer :

Les produits de synthèse comme par exemple : le BHA, le BHT et la TBHQ.



Les produits d'origine naturelle ou existant normalement dans certains aliments, mais souvent produits par synthèse comme les tocophérols, l'acide ascorbique et son dérivé le palmitate d'ascorbyle, et l'acide citrique.



Il convient de noter que la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que : les radicaux hydroxyles ( $OH$ ), les radicaux superoxydes ( $O$ ) et les radicaux stable colorés ABTS, DPPH<sup>5,6</sup>.

<sup>5</sup> Li, Y.; Fabiano-Tixier, A.S.; Chemat, F. « *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry* », SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability, New York **2014**, p.78.

<sup>6</sup> Popovici, C.; Saykova, I.; Tylkowski, B. *Revue de génie industriel* **2009**, 4, 25–39.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de différents radicaux, comme les peroxydes ROO par les tests de blanchissement du  $\beta$ -carotène, ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter); ou les radicaux ABTS<sup>•</sup> (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) par la méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH<sup>•</sup> (diphényl-picrylhydrazyle) (Figure II'.1).



**Figure II'.1 :** Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante par piégeage de différents radicaux.

#### ❖ Test de $\beta$ -carotène

Dans le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène, la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du  $\beta$ -carotène (décoloration) par les radicaux peroxydes issus de l'acide linoléique<sup>7</sup>.

L'addition d'un antioxydant dans ce système retarde la décoloration du  $\beta$ -carotène. L'auto-oxydation de l'acide linoléique n'étant pas toujours reproductible, une amélioration est apportée en utilisant l'AAPH (2,2'-azobis(2amidinopropane)dihydrochloride) comme amorceur de peroxydation lipidique.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à une longueur d'onde de 470 nm pendant des intervalles de temps réguliers<sup>1</sup>.

<sup>7</sup> Hambaba, L.; Boudjellal, K.; Abdeddaim, M.; Aberkane M.C.; Boudiaf, K. *Phytothérapie* **2012**, 10, 350–356.

❖ Test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

La méthode ORAC (capacité d'absorption des radicaux oxygénés) est basée sur la décroissance de la fluorescence en présence d'un oxydant chimique l'AAPH (2,2'-azobis(2amidinopropane)dihydrochloride).

Les radicaux peroxy ROO produits par la décomposition de l'AAPH à 37°C réagissent avec une sonde fluorescente (fluorescéine) à pH 7,0 pour former un produit non fluorescent. Le pouvoir antioxydant du produit à tester est représenté par la capacité de protéger la fluorescéine et de la préserver ainsi de l'oxydation induite par le radical peroxy.

La méthode est réalisée en mesurant, en parallèle, le déclin de la fluorescéine au cours du temps en présence de concentrations croissantes de Trolox, et d'échantillons à tester, eux-mêmes à différentes concentrations.

Les données sont calculées en aire sous une courbe et standardisées par rapport à des concentrations connues de Trolox. Les valeurs ORAC sont habituellement rapportées en TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) et permettent d'obtenir une mesure globale de la capacité antioxydante<sup>1,8</sup>.

❖ Test TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter)

La méthode TRAP est l'une des premières techniques utilisées pour déterminer le pouvoir antioxydant du plasma ou du sérum sanguin. Cette méthode est basée sur la mesure d'oxygène consommé lors d'une réaction de peroxydation lipidique.

Les espèces impliquées dans le test TRAP sont les radicaux peroxyes générés par la thermolyse du 2,2'-azobis(2amidinopropane)dihydrochloride (AAPH) et les matières peroxydables contenues dans le plasma ou d'autres fluides biologiques.

Dans ce test, l'AAPH est solubilisé en milieu aqueux avec l'antioxydant et un indicateur qui devient luminescent lorsqu'il est oxydé à 37°C. La capacité des antioxydants à bloquer l'oxydation de l'indicateur est comparée à celle du standard, le Trolox donnant une valeur TRAP. La valeur TRAP est définie comme étant le nombre de moles de radicaux peroxyes piégés par litre de milieu étudié.

La méthode TRAP se base sur l'accroissement de la chimiluminescence induite par la réaction des radicaux peroxyes avec le luminol<sup>1,9</sup>.

❖ Test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

La méthode FRAP (capacité de réduction des ions ferriques) est basée sur l'étude du pouvoir réducteur des composés. Cette technique mesure la capacité antioxydante en étudiant

<sup>8</sup> Nenadis, N. and Tsimidou, M.Z. « Assessing the activity of natural food antioxidants », *In* Decker, E.A.; Elias, R.J. and McClements, D.J. (Eds.), *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*. Woodhead Publishing, Cambridge **2010**, pp. 332–367.

<sup>9</sup> Litescu, S.C.; Eremia, S and Radu, G.L. « Methods for the Determination of Antioxidant Capacity in Food and Raw Materials », *In* Giardi, M.T.; Rea, G. and Berra, B. (Eds.), *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*. Landes Bioscience and Springer Science, **2010**, pp. 241–249.

la réduction du complexe tripyridyltriazine ferrique (TPTZ-Fe<sup>3+</sup>) à pH faible et à 37°C. La réduction des ions ferriques (Fe<sup>3+</sup>) en ions ferreux (Fe<sup>2+</sup>), conduit à un complexe tripyridyltriazine ferreux (TPTZ-Fe<sup>2+</sup>) de couleur bleue intense, dont la formation peut être suivie par spectrophotométrie à 593 nm.

Ainsi, la formation de ce complexe indiquera un pouvoir réducteur et déterminera la capacité d'un composé à se comporter comme un antioxydant. Les valeurs sont obtenues en comparant à 593 nm l'absorbance d'un mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester, à celle d'un mélange réactionnel contenant une concentration connue en ion ferreux<sup>9,10</sup>.

❖ Test TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

La méthode TEAC mesure la capacité antioxydante en étudiant l'évolution de la capacité d'absorption spécifique du cation radical ABTS<sup>+</sup> (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)<sup>9</sup>. Il s'agit d'un radical relativement stable de coloration bleu vert possédant une forte absorption dans l'intervalle 600–750 nm, ce qui permet un suivi relativement simple par spectrophotométrie.

Par transfert d'électrons, un antioxydant réagit avec l'ABTS (en excès) pour redonner l'ABTS incolore<sup>1</sup>. Les résultats sont exprimés en équivalents Trolox, correspondant à la concentration de la solution Trolox avec une capacité antioxydante équivalente à celle observée pour 1 mM du composé testé<sup>8</sup>. Ainsi, plus la valeur TEAC est élevée, plus l'antioxydant est efficace.

❖ Test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)

Le test au DPPH permet de mesurer les propriétés antioxydantes des composés en fonction de leur capacité à piéger le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Le DPPH est un radical libre très stable, capable d'accepter un électron ou un atome d'hydrogène formant ainsi la forme non radicalaire 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (DPPH-H).

Ce radical de couleur violette présente une bande d'absorption à 515 nm dans le méthanol, mais lorsqu'il est mélangé avec une solution protique, sa forme réduite sera générée par le virement de la couleur violette en couleur jaune (Figure II'.2)<sup>9</sup>.

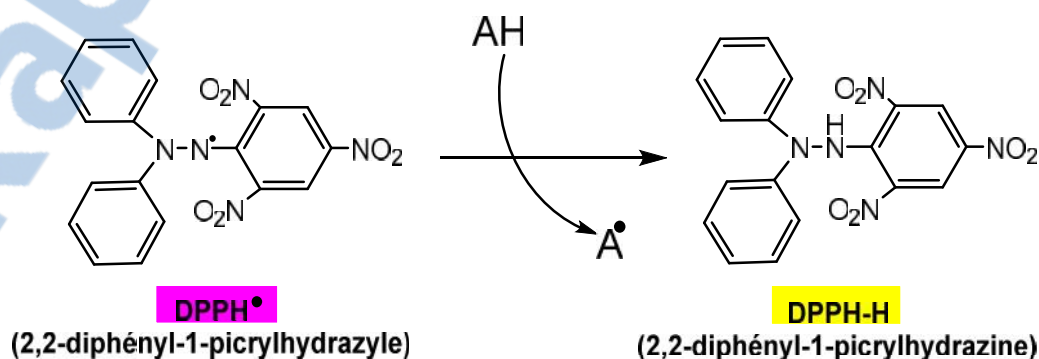


Figure II'.2 : Forme libre et réduite du DPPH.

<sup>10</sup> Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. *Anal. Biochem.* **1996**, 239, 70 –76.

Donc, en présence d'un antioxydant, la réduction du DPPH s'accompagne de la diminution de la coloration qui peut être suivie par spectrométrie. Le potentiel donneur d'un atome d'hydrogène d'un échantillon est le plus souvent exprimé par le paramètre  $EC_{50}$ , qui correspond à la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire de 50% la concentration initiale de DPPH. Plus l' $EC_{50}$  est petite, plus la molécule est antioxydante<sup>1</sup>.

Le test au radical libre DPPH s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles.

### II'.3. Matériaux polaires totaux (TPM)

Au cours du processus de chauffage, l'huile de friture est soumise en continu ou de façon répétée à des températures élevées en présence d'air et d'humidité. Trois réactions de dégradation essentielles se développent durant ces conditions<sup>11</sup>:

- Hydrolyse causée par le taux d'humidité des aliments frités; cette réaction produit les acides gras libres (AGL), mono-et diglycérides.
- Oxydation causée par contact avec l'oxygène; les produits de réaction sont l'oxyde monomérique, dimères et oligomères triglycérides et les matières volatiles tels que les aldéhydes et les cétones.
- Polymérisation causée par ces deux réactions, et des températures élevées; cette réaction produit des triglycérides dimères et des polymères cycliques.

Du fait des réactions de dégradation mentionnées précédemment, un certain nombre de changements physiques et chimiques se produisent dans les huiles de friture, y compris l'augmentation de la viscosité, la densité, la teneur en AGL, la teneur en matériaux polaires totaux (TPM = Total Polar Materials), triglycérides polymérisés, la diminution de point de fumée, et le nombre de doubles liaisons, etc...

Si le processus de friture se poursuit, ces matériaux seront soumis davantage en dégradation et l'huile de friture devient impropre à la consommation. Puisque tous les produits de dégradation sont de caractère polaire, la teneur en matériaux polaires totaux (TPM) d'huile de friture est un bon indicateur de son niveau de détérioration.

En conséquence, dans de nombreux pays, le contenu TPM d'huile de friture a été légalement accepté comme la valeur limite pour décider de son altération ou non. Par exemple, en France, la teneur en TPM dans l'huile de friture ne doit pas dépasser le maximum

<sup>11</sup> Sanli, H.; Canakci, M.; Alptekin, E. « Characterization of waste frying oils obtained from different facilities », In *Proceedings of the World Renewable Energy Congress*, Linköping, Sweden, 8–13 May 2011; Bioenergy Technology: Linköping, Sweden **2011**, pp. 479–485.



de 25% à 180°C selon l'article 3-3 du décret n°86-857 du 18/07/86<sup>12,13</sup>. Ainsi, ces propriétés peuvent également être utilisées pour suivre la qualité de l'huile de friture.

#### II'.4. Matériel et méthodes

Pour notre part, nous avons utilisé deux tests pour évaluer l'activité antioxydante de l'HE de basilic :

- Le test de DPPH qui permet de mettre en évidence de façon relativement simple le pouvoir anti-radicalaire d'un antioxydant ou d'un extrait antioxydant;
- L'effet du chauffage de l'huile d'olive enrichie à l'HE de basilic par la détermination de la teneur en TPM (Matériaux polaires totaux).

##### II'.4.1. Matériel

Le méthanol fourni par Fisher Scientific (Royaume-Uni), le DPPH et l'  $\alpha$ -tocophérol fournis par Sigma Aldrich (Allemagne) ont été utilisés pour la mise en évidence de l'activité antioxydante.

Pour le test de friture, l'huile d'olive (HO) provient d'un supermarché local. L'HE testée a été obtenue par HD et SFME à partir des feuilles brisées d'*O. basilicum*.

##### II'.4.2. Méthodes

###### II'.4.2.1. Détermination de l'activité antioxydante de l'HE de basilic par le test au DPPH

L'activité antioxydante de l'HE de basilic a été évaluée par le test au DPPH suivant la méthode modifiée d'Achat et *al.*<sup>14</sup>.

L'HE obtenu par HD et SFME à partir des feuilles brisées d'*Ocimum basilicum* a été soumise à des dilutions en série dans le méthanol-UV à différentes concentrations (2 – 20 mg/mL). 50  $\mu$ L de chaque solution ont été ajoutés à 2 mL de solution de DPPH ( $2.10^{-4}$  mol/L dans le méthanol-UV) et le mélange a été laissé dans l'obscurité après agitation au vortex à température ambiante pendant 30 min.

La capacité de chaque antioxydant a été comparée au standard  $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) en utilisant la même méthode pour différentes concentrations (0,2 – 5 mg/mL).

<sup>12</sup> Aladedunye, F.A.; Przybylski, R. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **2009**, *111*, 893–901.

<sup>13</sup> Knothe, G.; Steidly, K.R. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*(23), 5796–5801.

<sup>14</sup> Achat, S.; Tomao, V.; Madani, K.; Chibane, M.; Elmaataoui, M.; Dangles, O. *Ultrason. Sonochem.* **2012**, *19*, 777–786.



Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en utilisant la formule suivante :

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

I : pourcentage d'inhibition des radicaux libres;

A<sub>0</sub> : absorbance de la solution DPPH sans antioxydant;

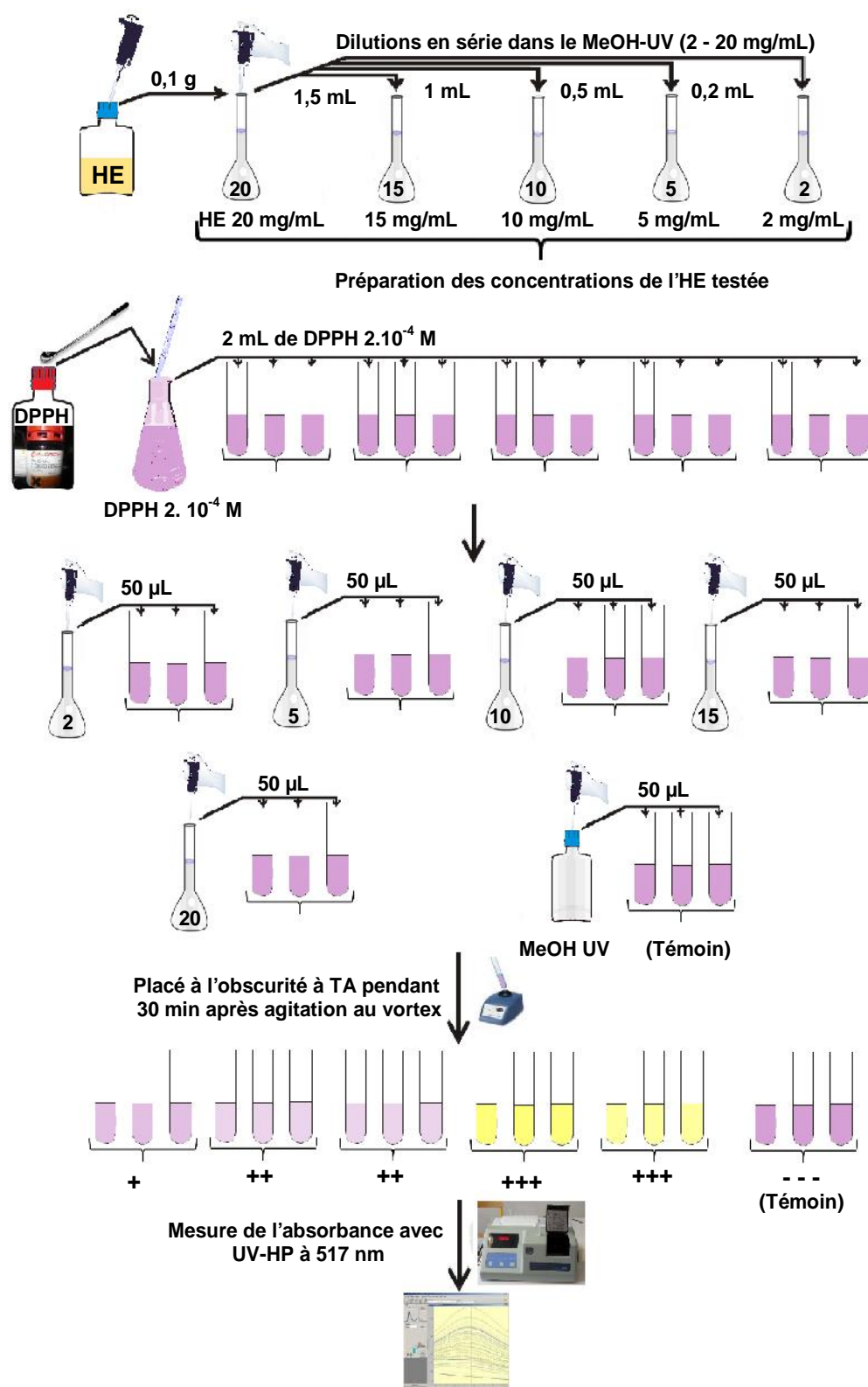
A<sub>i</sub> : absorbance de la solution DPPH après réaction avec HE.

*L'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.*

#### Spectrophotomètre-UV

Un Hewlett-Packard 8453 spectromètre UV-visible, équipé d'un détecteur à barrette de diodes 1024-élément, a été utilisé pour enregistrer les spectres d'absorption sur une gamme d'onde de 190 à 1100 nm. Un bain thermostaté à eau a été employé pour contrôler la température de la cellule avec une précision de  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . Les mesures spectroscopiques ont été réalisées avec une cuve en quartz de 1 cm de trajet optique à 517 nm.

Le protocole de l'évaluation de l'activité antioxydante par le test au DPPH de l'HE de basilic obtenue par HD et SFME est schématisé dans la figure **II'.3**.



**Figure II'.3 :** Schéma du protocole de détermination de l'activité antioxydante par le test au DPPH.

### II'.4.2.2. Détermination de l'activité antioxydante de l'HE de basilic par le test de l'huile de friture

La méthode de test de friture permet d'évaluer la valeur des matériaux polaires totaux (TPM), ce qui permet de se prononcer sur le vieillissement des huiles de friture sous l'effet du chauffage. Pour cela, la teneur des TPM en huile de friture ne doit pas dépasser le maximum de 25% à 180°C parce qu'au-delà, l'huile devient impropre à la consommation.

Deux cents grammes d'huile olive (HO) contenant 200 µL d'HEs d'*O. basilicum* (HO, HO-HE-HD et HO-HE-SFME) ont été chauffés dans des conditions de friture domestique, soit  $180 \pm 5^\circ\text{C}$  pendant plusieurs heures. La température est contrôlée par un thermomètre inséré directement dans l'huile de friture. Tous les échantillons ont été évalués avant les premières sessions du chauffage, à un intervalle de 1 h de chauffage jusqu'à ce que le maximum de 25% des TPM de l'huile soit atteint<sup>15</sup>.

La valeur des TPM est généralement évaluée dans les restaurants et l'industrie agro-alimentaire par des tests commerciaux rapides (principalement basés sur des lectures colorimétriques), qui se sont avérés être bien corrélés avec les valeurs obtenues par les normes officielles. Dans notre cas, les valeurs des TPM ont été évaluées à l'aide du testeur d'huile de friture « testo 270 » (Figure II'.4). Le schéma du protocole du test de friture est rapporté dans la figure II'.5.



**Figure II'.4 :** Photo et représentation schématique du testeur d'huile de friture « testo 270 ».

<sup>15</sup> Casal, S.; Malheiro, R.; Sendas, A.; Oliveira, B.P.P.; Pereira, J.A. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, 48, 2972–2979.

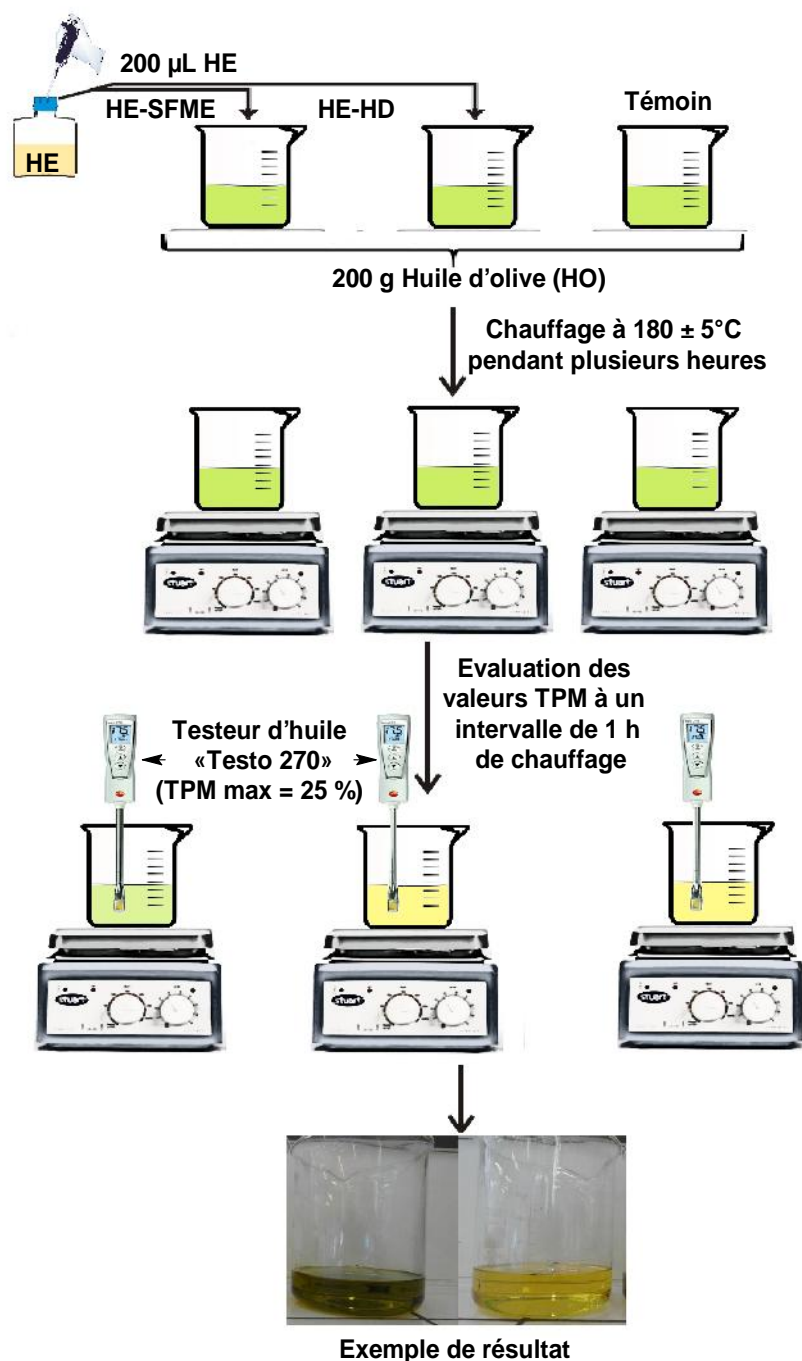


Figure II'.5 : Schéma du protocole de test de friture de l'HE de basilic.

## II'.5. Résultats et discussion

### II'.5.1. Activité antioxydante de l'HE de basilic

Les profils cinétiques obtenus révèlent une activité anti-radicalaire importante de l'extrait d'HE de basilic : le radical DPPH est presque totalement consommé à l'intervalle de concentration [10 – 20 mg/mL]. La figure II'.6 illustre les différentes concentrations appropriées de l'HE pour piéger le radical DPPH en fonction des pourcentages d'inhibition.

La capacité d'HE d'agir comme un donneur d'atomes d'hydrogène ou d'électrons dans la transformation de DPPH (couleur pourpre) dans sa forme réduite DPPH-H (couleur jaune) a été mesurée avec un pourcentage de  $76,13 \pm 2,6$  % pour l'HE-HD et  $86,13 \pm 2,8$  % pour l'HE-SFME à une concentration de 20 mg/mL.

L'activité antioxydante du standard  $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) a été mesurée avec un pourcentage de  $90,74 \pm 0,2$  % à une concentration de 5 mg/mL.

L' $EC_{50}$  définie comme étant la concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50% la concentration initiale de DPPH a été déterminée graphiquement par régressions linéaires du graphe tracé (pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des deux HEs testées). La comparaison entre l'activité antioxydante de l'HE de basilic extraite par HD ( $EC_{50} = 8,1$  mg/mL) et par SFME ( $EC_{50} = 3,6$  mg/mL) avec celle exprimée par le standard l'  $\alpha$ -tocophérol ( $EC_{50} = 0,8$  mg/mL), montre que l'HE présente un effet antioxydant plus faible que l'  $\alpha$ -tocophérol (vitamine E).

Par conséquent, l'effet antioxydant de l'HE est inférieur d'environ 10 fois pour HE-HD et 4 fois pour HE-SFME que celui du standard.

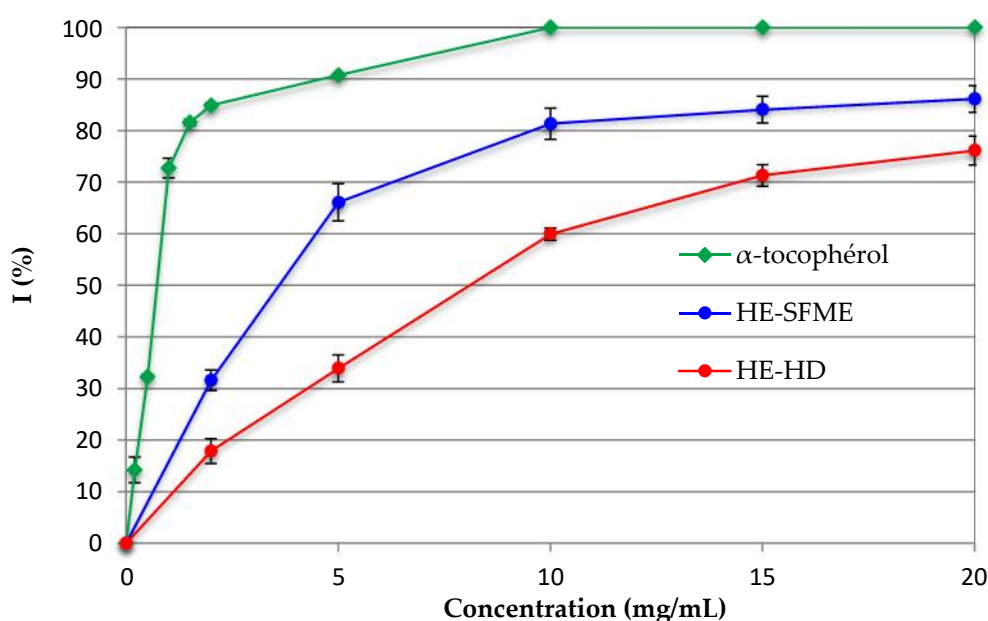


Figure II'.6 : Evaluation de l'activité antioxydante de l'HE de basilic extraite par HD et SFME.

Plusieurs travaux antérieurs ont montré que l'HE d'*O. basilicum* possède des propriétés anti-oxydantes remarquables<sup>16,17</sup>. Nos résultats sont en bon accord avec ceux trouvés par Hadj-Khelifa et al.<sup>18</sup>, qui ont rapporté que l'HE d'*O. basilicum* contenant le linalol comme composé majoritaire présentait des effets antioxydants inférieurs ( $EC_{50} = 83,4$  mg/mL) à ceux de la vitamine E ( $EC_{50} = 22,0$  mg/mL).

Hussain et al.<sup>19</sup> ont montré que l'HE de basilic riche en linalol offre une activité antioxydante comparable à l'antioxydant synthétique BHT (Hydroxytoluène butylé).

Cependant, Bozin et al.<sup>20</sup> ont constaté que l'HE de basilic contenant le méthylchavicol (45,8%) et le linalol (24,2%) en tant que composés majoritaires, exerce une très grande inhibition ( $EC_{50} = 0,4$  µg/mL), et ont indiqué que le monoterpène phénolique oxygéné (méthylchavicol) et le mélange d'hydrocarbures mono et sesquiterpéniques sont les composés responsables de l'oxydation.

Toutefois, une situation différente a été observée par Mahmoud et al.<sup>21</sup>, qui ont révélé que le principal constituant, le méthylchavicol présente une activité antioxydante modérée.

Aussi, Dawidowicz et al.<sup>22</sup> ont démontré que le méthylchavicol ne présente pas de propriétés antioxydantes. L'effet antioxydant de l'HE de basilic (I% environ  $46,1 \pm 1,3\%$ ) résulte des propriétés des autres composés, notamment le méthyleugénol qui a été considéré comme le principal contributeur de l'activité antioxydante de l'HE de *Myrtus communis* L.<sup>49</sup>.

Politeo et al.<sup>23</sup> suggèrent clairement que la capacité antioxydante ( $EC_{50} = 1,4$  g/L) de l'HE de basilic est due principalement à la présence de l'eugénol (5,9%) dans sa composition chimique tandis que les autres constituants n'ont aucun effet significatif par rapport à la capacité de l'eugénol. L'activité antioxydante de l'eugénol a été signalée plusieurs fois et testée sur divers systèmes<sup>24,25,26</sup>.

De même, Pripdeevech et al.<sup>27</sup> ont rapporté que l'HE d'*O. basilicum* de Thaïlande (chémotype à linalol/eugénol) présentait une grande capacité de piégeage du radical DPPH

<sup>16</sup> a) Hanif, M.A.; Al-Maskari, M.Y.; Al-Maskari, A.; Al-Shukaili, A.; Al-Maskari, A.Y and Al-Sabahi, J.N. *J. Med. Plants Res.* **2012**, 5, 751–757; b) Taie, H.A.A.; Salama, Z.A.R.; Radwan, S. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* **2010**, 38, 119–127 ; c) Bassole, I.H.N.; Lamien-Meda, A.; Bayala, B.; Tirogo, S.; Franz, C.; Novak, J.; Nebié, R.C.; Dicko, M.H. *Molecules* **2010**, 15, 7825–7839.

<sup>17</sup> a) Shafique, M.; Khan, S.J. and Khan, N.H. *Pharmacologyonline* **2011**, 1, 105–111 ; b) Vlase, L.; Benedec, D.; Daniela Hanganu, D.; Damian, G.; Sevastre, B.; Mot, A.C.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Ioan Csillag, I.; Tilea, I. *Molecules* **2014**, 19, 5490–5507 ; c) Bayala, B.; Bassole, I.H.N.; Gnoula, C.; Nebie, R.; Yonli, A. *PLoS ONE* **2014**, 9, e92122.

<sup>18</sup> Hadj Khelifa, L.; Brada, M.; Brahmi, F.; Achour, D.; Fauconnier, M.L. and Lognay, G. *Topclass J. Herb. Med.* **2012**, 1, 25–30.

<sup>19</sup> Hussain, A.I.; Anwar, F.; Sherazi, S.T.H.; Przybylski, R. *Food Chem.* **2008**, 108, 986–995.

<sup>20</sup> Bozin, B.; Mimica-Dukic, N.; Simin, N.; Anackovj, G. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 1822–1828.

<sup>21</sup> Mahmoud, G.I. *J. Med. Plants Res.* **2013**, 7, 561–572.

<sup>22</sup> Dawidowicz, A.L.; Olszowy, M. *Nat. Prod. Res.* **2014**, 28, 1952–1963.

<sup>23</sup> Politeo, O.; Jukic, M.; Milos, M. *Food Chem.* **2007**, 101, 379–385.

<sup>24</sup> Nagababu, E.; Lakshmaiah, N. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, 43, 2393–2400.

<sup>25</sup> Jaganathan, S.K.; Supriyanto, E. *Molecules* **2012**, 17, 6290–6304.

<sup>26</sup> Ali, S.; Prasad, R.; Mahmood, A.; Routray, I.; Shinkafi, T.S.; Sahin, K.; Kucuk, O. *J. Cancer Prev.* **2014**, 19, 288–300.

<sup>27</sup> Pripdeevech, P.; Chumpolsri, W.; Suttiarporn, P.; Wongpornchai, S. *J. Serbian Chem. Soc* **2010**, 75, 1503–1513.



( $EC_{50} = 26,53 \pm 0,94 \mu\text{g/mL}$ ). Le même résultat a été rapporté par Dabire et *al.*<sup>28</sup>, qui ont révélé que la diminution du taux d'eugénol dans l'HE d'*O. basilicum* provoque une diminution de son pouvoir antioxydant.

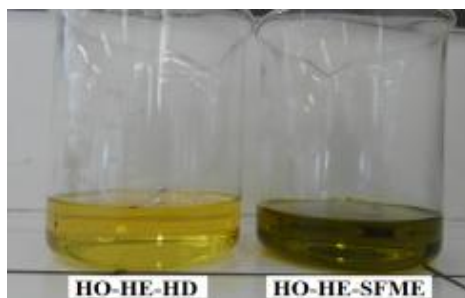
Lee et *al.*<sup>29</sup> ont également trouvé que l'eugénol (0,896 mg/g) était le principal contributeur de l'activité antioxydante de l'extrait volatil de basilic comparé aux composés majoritaires.

Par conséquent, les composés majoritaires ne déterminent pas toujours l'activité antioxydante de l'HE étudiée. Il est possible que les composés minoritaires présents à des concentrations plus faibles puissent être impliqués par un effet de synergie avec d'autres composés actifs.

Notre étude révèle que l'activité antioxydante de l'HE-SFME a été relativement plus active que l'HE-HD. En conséquence, l'activité antioxydante de l'HE d'*O. basilicum* peut être attribuée à la forte teneur en composés oxygénés (linalol, méthyleugénol et l'eugénol) et d'autres composés minoritaires dans sa composition chimique.

#### II'.5.2. Effet du chauffage et d'enrichissement de l'huile d'olive par l'HE de basilic

Au cours du chauffage, la détérioration de l'huile d'olive (HO) peut être observée par le changement de la couleur et si le chauffage se poursuit, l'huile d'olive sera soumise davantage en dégradation et sa couleur vire du vert au jaune (Figure II'.7).



**Figure II'.7 :** Evaluation de la couleur d'huile d'olive imprégnée d'HE de basilic (HD et SFME) au cours du chauffage à 180°C.

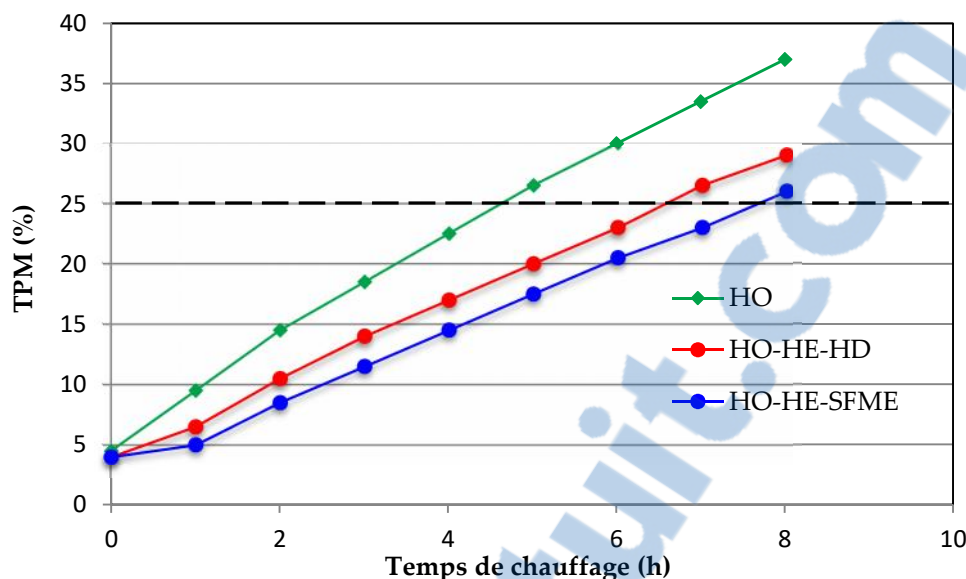
Toutes les huiles d'olive testées ont affiché des valeurs de TPM très proches avant le chauffage (Figure II'.8), mais le temps de chauffage total requis pour atteindre la valeur des TPM limite de 25% étaient totalement différent :

- $4,7 \pm 0,1$  h pour HO;
- $6,6 \pm 0,1$  h pour HO-HE-HD;
- $7,8 \pm 0,1$  h pour HO-HE-SFME.

<sup>28</sup> Dabire, C.; Roger, H.C.; Nebie, R.H.C.; Belanger, A.; Nacro, M.; Sib, F.S. *Int. J. Bio. Chem. Sci.* **2011**, 5, 1082–1095.

<sup>29</sup> Lee, S.J.; Umamo, K.; Shibamoto, T.; Lee, K.G. *Food Chem.* **2005**, 91, 131–137.





**Figure II'.8 :** Evaluation des valeurs des TPM au cours du chauffage à 180°C de l'HO et de l'HO avec l'HE de basilic extraite par HD et SFME.

Par conséquent, l'HE-SFME additionnée à l'HO est d'une grande efficacité puisqu'elle a permis une prolongation significative de la durée de vie de l'HO de 3h et plus de 72 min par rapport à l'HE-HD. Cet effet d'enrichissement résulte d'un pouvoir antioxydant plus élevé conféré à l'HE, principalement par les composés oxygénés contenus dans l'essence de basilic.

Il convient de noter qu'il n'y a pas eu de travaux menés sur l'huile de friture enrichie par l'HE de basilic. Néanmoins nos résultats sont en bon accord avec les données de la littérature sur l'enrichissement avec d'autres HEs issues de différentes plantes qui précisent que l'effet antioxydant pourrait être attribué aux composés phénoliques présents dans la composition de l'HE<sup>14,15,30</sup>.

## II'.6. Conclusion

L'estimation de l'activité antioxydante *in vitro* de l'HE de basilic extraite par HD et SFME a été mesurée par le test du DPPH. Cette méthode a réduit le radical DPPH avec une EC<sub>50</sub> de 8,1 mg/mL pour HE-HD, 3,6 mg/mL pour HE-SFME et 0,8 mg/mL pour HO.

L'effet du chauffage d'huile d'olive enrichie en HE de basilic a été évalué par la détermination de la teneur des matériaux polaires totaux : 4,7 h pour HO, 6,6 h pour HO-HE-HD et 7,8 h pour HO-HE-SFME. L'ensemble des résultats obtenus par les deux HEs de basilic a révélé une activité antioxydante moyenne par rapport à l' $\alpha$ -tocophérol et une stabilité appréciable de l'HO additionnée aux HEs de basilic.

Le chapitre suivant sera consacré à l'évaluation de l'activité insecticide de l'HE de basilic encapsulée par lyophilisation (Freeze-drying).

<sup>30</sup> Mnayer, D.; Fabiano-Tixier, A.S.; Petitcolas, E.; Hamieh, T.; Nehme, N.; Ferrant, C.; Fernandez, X.; Chemat, F. *Molecules* **2014**, *19*, 20034–20053.

## Références

- <sup>1</sup> Chemat, F.; Fabiano-Tixier, A.S.; Hellal, A.; Boutekedjiret, C.; Fernandez, X. « Activités chimiques et biologiques des huiles essentielles », In Chemat, F. and Fernandez, X. (Eds.), *La chimie des huiles essentielles*. Ed. Vuibert, Paris **2012**, pp. 212–248.
- <sup>2</sup> André, M.L. « *Les Additifs alimentaires : un danger méconnu* », Editions Jouvence, France **2013**, pp.19–40.
- <sup>3</sup> Škrovánková, S.; Mišurcová, L.; Mach, L. « Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants », In Henry, J. (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research*, Elsevier Inc, USA **2012**, 67, p. 75–139.
- <sup>4</sup> Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. and Idaomar, M. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46, 446–475.
- <sup>5</sup> Li, Y.; Fabiano-Tixier, A.S.; Chemat, F. « *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry* », SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability, New York **2014**, p.78.
- <sup>6</sup> Popovici, C.; Saykova, I.; Tylkowski, B. *Revue de génie industriel* **2009**, 4, 25–39.
- <sup>7</sup> Hambaba, L.; Boudjellal, K.; Abdeddaim, M.; Aberkane M.C.; Boudiaf, K. *Phytothérapie* **2012**, 10, 350–356.
- <sup>8</sup> Nenadis, N. and Tsimidou, M.Z. « Assessing the activity of natural food antioxidants », In Decker, E.A.; Elias, R.J. and McClements, D.J. (Eds.), *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*. Woodhead Publishing, Cambridge **2010**, pp. 332–367.
- <sup>9</sup> Litescu, S.C.; Eremia, S and Radu, G.L. « Methods for the Determination of Antioxidant Capacity in Food and Raw Materials », In Giardi, M.T.; Rea, G. and Berra, B. (Eds.), *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*. Landes Bioscience and Springer Science, **2010**, pp. 241–249.
- <sup>10</sup> Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. *Anal. Biochem.* **1996**, 239, 70–76.
- <sup>11</sup> Sanli, H.; Canakci, M.; Alptekin, E. « Characterization of waste frying oils obtained from different facilities». In *Proceedings of the World Renewable Energy Congress*, Linköping, Sweden, 8–13 May 2011; Bioenergy Technology: Linköping, Sweden **2011**, pp. 479–485.
- <sup>12</sup> Aladedunye, F.A.; Przybylski, R. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **2009**, 111, 893–901.
- <sup>13</sup> Knothe, G.; Steidly, K.R. *Bioresour. Technol.* **2009**, 100(23), 5796–5801.
- <sup>14</sup> Achat, S.; Tomao, V.; Madani, K.; Chibane, M.; Elmaataoui, M.; Dangles, O. *Ultrason. Sonochem.* **2012**, 19, 777–786.
- <sup>15</sup> Casal, S.; Malheiro, R.; Sendas, A.; Oliveira, B.P.P.; Pereira, J.A. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, 48, 2972–2979.
- <sup>16</sup> a) Hanif, M.A.; Al-Maskari, M.Y.; Al-Maskari, A.; Al-Shukaili, A.; Al-Maskari, A.Y and Al-Sabahi, J.N. *J. Med. Plants Res.* **2012**, 5, 751–757; b) Taie, H.A.A.; Salama, Z.A.R.; Radwan, S. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* **2010**, 38, 119–127 ; c) Bassole, I.H.N.; Lamien-Meda, A.; Bayala, B.; Tirogo, S.; Franz, C.; Novak, J.; Nebié, R.C.; Dicko, M.H. *Molecules* **2010**, 15, 7825–7839.
- <sup>17</sup> Shafique, M.; Khan, S.J. and Khan, N.H. *Pharmacologyonline* **2011**, 1, 105–111 ; b) Vlase, L.; Benedec, D.; Daniela Hanganu, D.; Damian, G.; Sevastre, B.; Mot, A.C.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Ioan Csillag, I.; Tilea, I. *Molecules* **2014**, 19, 5490–5507 ; c) Bayala, B.; Bassole, I.H.N.; Gnoula, C.; Nebie, R.; Yonli, A. *PLoS ONE* **2014**, 9, e92122.

- <sup>18</sup> Hadj Khelifa, L.; Brada, M.; Brahmi, F.; Achour, D.; Fauconnier, M.L. and Lognay, G. *Topclass J. Herb. Med.* **2012**, *1*, 25–30.
- <sup>19</sup> Hussain, A.I.; Anwar, F.; Sherazi, S.T.H.; Przybylski, R. *Food Chem.* **2008**, *108*, 986–995.
- <sup>20</sup> Bozin, B.; Mimica-Dukic, N.; Simin, N.; Anackovj, G. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1822–1828.
- <sup>21</sup> Mahmoud, G.I. *J. Med. Plants Res.* **2013**, *7*, 561–572.
- <sup>22</sup> Dawidowicz, A.L.; Olszowy, M. *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 1952–1963.
- <sup>23</sup> Politeo, O.; Jukic, M.; Milos, M. *Food Chem.* **2007**, *101*, 379–385.
- <sup>24</sup> Nagababu, E.; Lakshmaiah, N. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 2393–2400.
- <sup>25</sup> Jaganathan, S.K.; Supriyanto, E. *Molecules* **2012**, *17*, 6290–6304.
- <sup>26</sup> Ali, S.; Prasad, R.; Mahmood, A.; Routray, I.; Shinkafi, T.S.; Sahin, K.; Kucuk, O. *J. Cancer Prev.* **2014**, *19*, 288–300.
- <sup>27</sup> Pripdeevech, P.; Chumpolsri, W.; Suttiarporn, P.; Wongpornchai, S. *J. Serbian Chem. Soc* **2010**, *75*, 1503–1513.
- <sup>28</sup> Dabire, C.; Roger, H.C.; Nebie, R.H.C.; Belanger, A.; Nacro, M.; Sib, F.S. *Int. J. Bio. Chem. Sci.* **2011**, *5*, 1082–1095.
- <sup>29</sup> Lee, S.J.; Umamo, K.; Shibamoto, T.; Lee, K.G. *Food Chem.* **2005**, *91*, 131–137.
- <sup>30</sup> Mnayer, D.; Fabiano-Tixier, A.S.; Petitcolas, E.; Hamieh, T.; Nehme, N.; Ferrant, C.; Fernandez, X.; Chemat, F. *Molecules* **2014**, *19*, 20034–20053.

## *Chapitre III'*

*Activité insecticide de l'huile  
essentielle de basilic encapsulée*

### III'.1. Introduction

Depuis l'antiquité, l'homme a toujours stocké les denrées alimentaires pour prolonger leur durée de vie afin de garantir sa vitalité, mais ces denrées subissent plusieurs détériorations pendant leur stockage. Plusieurs agents de détérioration d'origine biologique sont responsables de ces pertes, les plus importants sont *les rongeurs, les micro-organismes et les insectes*.

Les insectes constituent le principal danger des denrées stockées, soit par la consommation directe des réserves alimentaires stockées, soit par la dégradation de leur qualité nutritive. De nombreuses solutions techniques ont été développées par la recherche pour améliorer l'efficacité de la gestion des insectes ravageurs des cultures et des denrées stockées (*lutte chimique, lutte physique et mécanique, lutte biologique*) mais leur appropriation est restée limitée. La lutte chimique atteint par ailleurs certaines limites avec son impact significatif sur l'environnement<sup>1</sup>.

Pour réduire les pertes des réserves tout en préservant l'environnement, plusieurs travaux sont orientés à présent vers la mise au point d'insecticides naturels à base de plantes aromatiques. Il s'agit précisément des huiles essentielles (HEs) extraites de ces plantes et qui peuvent être appliquées directement.

En effet, les HEs constituent une véritable banque de substances naturelles biologiquement actives. Ce sont des métabolites secondaires produits par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages<sup>2</sup>.

Par ailleurs, afin de prolonger les applications des produits volatils (HEs), il est nécessaire de réduire leur volatilité de manière à obtenir une longue durée de conservation de ces composés. En abaissant la volatilité, on peut aussi imaginer une possibilité de mieux tester les effets biologiques de ces produits.

En effet, l'encapsulation fait référence aux technologies permettant de transformer les produits liquides (HEs) en poudre afin de résoudre les problèmes liés au stockage, à la conservation, à la commodité d'emploi et au contrôle de la libération des substances actives<sup>3</sup>.

L'encapsulation des HEs de basilic par lyophilisation en combinaison avec les maltodextrines et la gomme d'acacia n'a jamais été signalée à ce jour, ce qui nous a semblé fort intéressant de l'appliquer aux HEs de basilic extraites par HD et SFME.

Par conséquent, nous avons entrepris d'encapsuler les HEs d'*O. basilicum* en poudre par lyophilisation « freeze-drying » pour évaluer leurs effets insecticides contre les trois

<sup>1</sup> Toumnou, A.L.; Seck, D.; S. Namkosserena, S.; N. Cisse, N.; Kandiora, N. et Sembene, M. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **2012**, 6(3), 1040–1050.

<sup>2</sup> Chiasson, H. et Beloin, N. *Bull. Soc. Entomol. Québec* **2007**, 14(1), 3–6.

<sup>3</sup> Karlsen, J. « Encapsulation and Other Programmed Release Techniques for Essential Oils and Volatile Terpenes », In Baser, K.C.H.; Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA **2010**, pp. 855–861.

principaux ravageurs des denrées stockées, à savoir *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus oryzae* et *Tribolium castaneum*, par effet de toxicité de contact direct et par effet d'ingestion.

Notre objectif est de valider l'utilisation de l'HE de basilic extraite par HD et SFME et encapsulée en poudre par lyophilisation, comme un moyen de lutte fiable pour la protection des denrées stockées.

### III'.2. Techniques d'encapsulation<sup>4,5</sup>

Les HEs sont des molécules instables et sensibles dont l'utilisation directe est difficile en aromatisation. Une étape de formulation est souvent nécessaire : l'encapsulation, qui utilise des propriétés émulsifiantes pour piéger ou enrober des composés sensibles dans une microcapsule, est une technologie de plus en plus utilisée qui répond mieux aux besoins actuels des chercheurs.

L'encapsulation regroupe l'ensemble des technologies permettant la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant un principe actif.

L'objectif principal de l'encapsulation est d'établir une protection de la substance active contre son milieu environnant : *l'oxygène, l'humidité de l'air, la chaleur et la lumière*.

L'encapsulation des arômes en poudre joue un rôle important dans les industries de l'imprimerie, de la pharmacie, des cosmétiques,...et de l'agroalimentaire dans laquelle elle améliore non seulement la stabilité chimique des arômes alimentaires mais également elle permet de contrôler la diffusion des constituants volatils.

L'encapsulation des arômes peut être réalisée par une diversité de méthodes. Les procédés chimiques et mécaniques d'encapsulation des composés aromatiques sont regroupés dans le tableau III'1.

#### III'.2.1. Procédés chimiques

##### III'.2.1.1. Coacervation

Le principe de la coacervation repose sur la désolvatation ménagée d'un polymère dissous dans un solvant organique contenant un principe actif, induite par ajustement du pH. L'ajout d'un durcisseur permet la formation d'un film continu de polymère autour du principe actif<sup>6</sup>.

<sup>4</sup> Madene, A.; Jacquot, M.; Scher, J.; Desobry, S. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2006**, *41*, 1–21.

<sup>5</sup> Madene, A. « *Etude des Transferts d'Arômes Encapsules dans une Matrice Alimentaire type Génoise* », Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, France **2006**.

<sup>6</sup> Benoit, J.P.; Richard, J.; Fournier, E.; Liu, S. *Brevet Internationale*, WO. 2001/015799 A1, **2001**.

### III'.2.1.2. Co-cristallisation

Ce procédé consiste à introduire l'arôme dans un sirop de saccharose en solution saturée. La cristallisation spontanée du sirop de saccharose sursaturé est réalisée à hautes températures et à faible taux d'humidité.

**Tableau III'.1** : Différents procédés d'encapsulation des composés aromatiques.

	Techniques d'encapsulation	Type de capsule
<b>Procédés chimiques</b>	Coacervation	Pâte; poudre; capsule
	Co-cristallisation	Granulé
	Inclusion moléculaire	Poudre
	Polymérisation interfaciale	Poudre
<b>Procédés mécaniques</b>	Atomisation (Spray-drying)	Poudre
	Séchage en lit fluidisé	Poudre; granulé
	Lyophilisation (Freeze-drying)	Poudre
	Atomisation à froid	Poudre
	Extrusion	Poudre; granulé

### III'.2.1.3. Inclusion moléculaire

Cette technique repose sur les cyclodextrines. Ces matériaux d'encapsulation comportent une cavité centrale hydrophobe dans laquelle peuvent se loger des molécules aromatiques en fonction de leur polarité et de leur encombrement stérique conduisant à la formation de complexes d'inclusion. L'affinité du principe actif pour les cavités des diverses cyclodextrines dépend de la stéréochimie et des forces d'interaction des molécules impliquées.

### III'.2.1.4. Polymérisation interfaciale

Cette méthode consiste à préparer des capsules en mettant en contact une phase dispersée contenant le principe actif et un ou plusieurs monomères ( $\alpha$ ) avec une autre phase non miscible à la première contenant un ou plusieurs autres monomères ( $\beta$ ) susceptibles de réagir avec les premiers monomères ( $\alpha$ ) pour donner un polymère. Lors de la mise en contact des deux phases, les monomères réagissent et polymérisent à l'interface des phases pour créer une membrane polymérique autour du principe actif liquide<sup>7</sup>.

<sup>7</sup> Montasser, I.; Fessi, H.; Briançon, S.; Lieto, J. *Brevet Internationale*, WO. 2001/068235 A1, **2001**.

### III'.2.2. Procédés mécaniques

#### III'.2.2.1. Atomisation "Spray-drying"

Cette technique comporte la dispersion de la substance active dans un matériau d'enrobage, suivi de la pulvérisation du mélange dans une chambre de dessiccation. La pulvérisation s'effectue soit par passage à travers une buse d'atomisation, soit par un système de type disque tournant ou buse rotative. Les capsules produites sont collectées à la base de la chambre de dessiccation après séparation du flux d'air par passage dans un cyclone.

#### III'.2.2.2. Séchage en lit fluidisé

Ce procédé permet de pulvériser la matière d'enrobage directement dans le lit de particules d'arôme. Les particules à enrober sont fluidisées dans l'atmosphère chaude de la chambre cylindrique verticale d'un lit fluidisé. Ensuite, le matériau d'enrobage est pulvérisé par une buse sur les particules du principe actif et la formation du film commence par une succession de mouillage et d'étapes de séchage.

#### III'.2.2.3. Atomisation à froid

Ce système consiste en la dispersion des composés aromatiques dans des matériaux d'encapsulation à l'état fondu, suivie d'une pulvérisation à travers des buses dans une chambre à la température ambiante (Spray-cooling) ou aux températures de réfrigération (Spray-chilling), et les gouttelettes ainsi formées se solidifient plus tard sous forme de poudre.

#### III'.2.2.4. Extrusion

Cette procédure consiste en la dispersion de l'arôme dans une substance matricielle puis en son extrusion dans un milieu où la matrice se gélifie.

#### III'.2.2.5. Lyophilisation "Freeze-drying"

La lyophilisation est l'une des méthodes les plus utiles pour l'encapsulation des molécules bioactives sensibles à la chaleur et instables dans les solutions aqueuses. Ce procédé de séchage à froid est connu en anglais sous le nom de « freeze-drying ».

Cette technique est connue par sa capacité à conserver la qualité des aliments en minimisant les pertes de saveur et d'arôme des composés ainsi que les ingrédients bioactifs. Elle a été utilisée dans la production des produits de haute valeur nutritionnelle et de commercialisation<sup>8</sup>.

C'est une opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer par sublimation, la majeure partie de l'eau contenue dans un produit initialement congelé. Ainsi, l'eau incluse dans le produit passe directement de l'état solide à l'état gazeux. Cette technique de séchage est utilisée en industrie pharmaceutique et en bio-industrie. Deux phases peuvent être identifiées lors de la lyophilisation :

<sup>8</sup> Antal, T.; Chong, C.H.; Law, C.L.; Sikolya L. *Int. Food Res. J.* **2014**, 21(1), 387–394.



- Une phase de sublimation ou de dessiccation primaire qui permet l'élimination de 85 à 90 % de l'eau d'un produit;

- Une phase de désorption ou dessiccation secondaire qui permet l'élimination des 10 % d'eau liée restants et, en fin de processus, l'obtention d'un produit faible en teneur en eau.

Actuellement, le procédé d'encapsulation le plus couramment utilisé dans l'industrie est l'atomisation (Spray drying), mais cette technique utilise des températures de séchage très élevées, ce qui se traduit généralement par une diminution de la qualité du produit.

Par conséquent, la technique de séchage appropriée qui doit être utilisée afin d'éviter une dégradation de la qualité du produit est la lyophilisation car c'est une méthode de déshydratation à basse température.

En raison de ses particularités, la lyophilisation occupe une place originale au regard des techniques de séchage. Elle permet une bonne conservation des capsules contre l'oxydation<sup>9</sup>. Aussi, elle permet une conservation à long terme grâce à l'abaissement de l'activité de l'eau du produit et une obtention des produits finaux de haute qualité.

La forme et l'aspect des produits sont bien conservés, leur qualité aromatique est bien supérieure à celle des produits séchés par d'autres technologies. Un autre avantage technologique majeur de cette méthode repose sur la capacité du produit lyophilisé à se réhydrater instantanément.

### III'.3. Huiles essentielles comme bio-insecticides

Depuis que l'homme a découvert l'agriculture, il a pensé à protéger ses denrées stockées. Cette protection a connu d'énormes progrès au cours du siècle dernier, et s'est améliorée considérablement avec la découverte et l'utilisation des insecticides chimiques.

Les insecticides chimiques constituent à l'heure actuelle la méthode la plus pratique pour lutter contre les insectes nuisibles, en raison de leur efficacité et de leur application facile. Cependant, l'emploi intensif et inconsidéré de ces insecticides a malheureusement engendré des effets néfastes scientifiquement démontrés, sur la santé humaine et environnementale.

Ces dangers ont orienté les scientifiques vers la mise au point d'insecticides à base de plantes aromatiques, avec un minimum d'effets sur l'homme et l'environnement, il s'agit précisément des HEs extraites des plantes ayant des propriétés insecticides<sup>10</sup>.

<sup>9</sup> Heinzelmann, K.; Franke, K. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, 12, 223–229.

<sup>10</sup> Benayad, N. « *Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées* », Projet de recherche. Rapport d'activité MAB et UNESCO. Faculté des Sciences-Rabat, Maroc **2008**, p. 61.

Diverses HEs se sont avérées efficaces contre plusieurs insectes nuisibles de denrées alimentaires stockées<sup>11,12</sup>. Cependant, l'utilisation de l'HE seule n'est pas recommandable pour une protection à longue durée de denrées stockées, d'où la nécessité de la mise au point d'une méthode de stabilisation des HEs en vue d'accroître leur efficacité, ce qui nous a conduit à transformer l'HE en poudre par encapsulation (lyophilisation) afin d'assurer une meilleure performance de l'HE pour l'évaluation de l'activité insecticide.

### III'.4. Matériel et méthodes

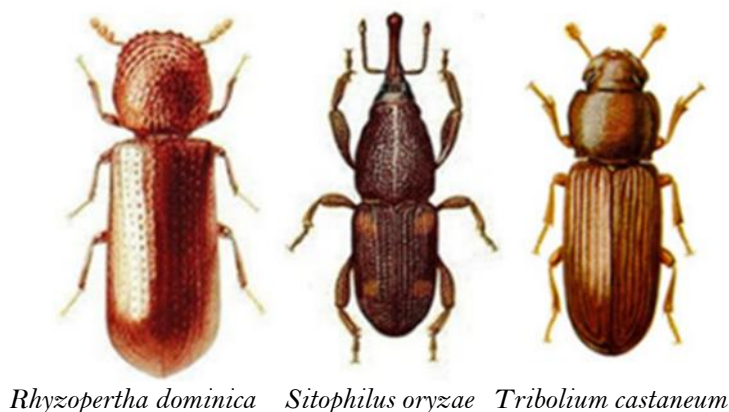
#### III'.4.1. Matériel

##### III'.4.1.1. Provenance

Pour l'encapsulation des HEs, la gomme acacia (Acacia Sénégal) de CNI (Rouen, France) et les maltodextrines (Glucidex DE 18) de Roquette (Lestrem, France) ont été utilisées. Les HEs encapsulées sont obtenues par HD et SFME à partir des feuilles brisures d'*Ocimum basilicum*. Les espèces ravageuses des denrées stockées appartenant aux Coléoptères testées ont été récoltées dans les denrées de stockage, CCLS Oran (Coopérative de Céréales et de Légumes Secs d'Oran).

##### III'.4.1.2. Description des trois principaux insectes ciblés<sup>10,13,14</sup>

*Sitophilus oryzae* (Linné.), *Rhyzopertha dominica* (Fabricius.) et *Tribolium castaneum* (Herbst.) appelés en Algérie « kooze » sont les principaux ravageurs des denrées stockées (Figure III'.1). Ces trois espèces appartiennent aux Coléoptères.



**Figure III'.1 :** Trois principales espèces ravageuses des denrées stockées appartenant aux Coléoptères. [www.integracionquimica.com.ar/web/images/stories/insectos.jpg](http://www.integracionquimica.com.ar/web/images/stories/insectos.jpg).

<sup>11</sup> a) Aslan, I.; Özbek, H.; Çalmasur, Ö.; Sahin, F. *Ind. Crops Prod.* **2004**, 19, 167–173; b) Jbilou, R.; Ennabili, A.; Sayah, F. *Afr. J. Biotechnol.* **2006**, 5(10), 936–940; c) Digilio, M.C.; Mancini, E.; Voto, E. & De Feo, V. *J. Plant Interact.* **2008**, 3(1), 17–23.

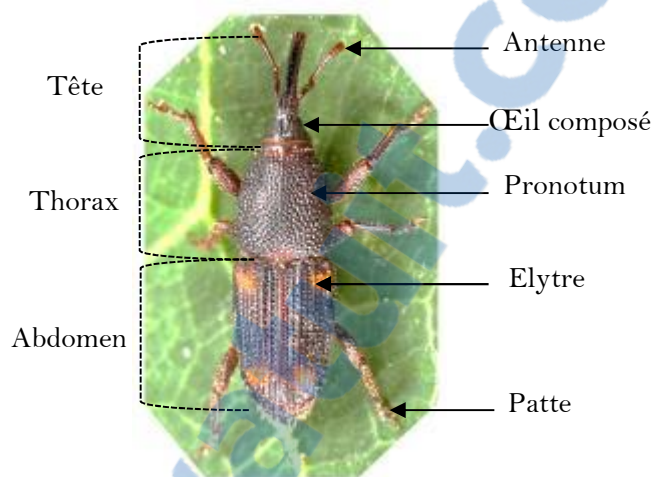
<sup>12</sup> a) Ayvaz, A.; Sagdic, O.; Karaborklu, S.; Ozturk, I. *J. Insect Sci.* **2010**, 10(21), 1–13; b) Mishra, B.B.; Tripathi S.P. and Tripathi, C.P.M. *J. Nat. Sci.* **2012**, 10(2), 50–54; c) Nguentchouin, M.G.M.; Ngassoum, M.B.; Chaliier, P.; Kamga, R.; Ngamo, L.S.T.; Cretin, M. *J. Stored Prod. Res.* **2013**, 52, 57–62.

<sup>13</sup> Seck, D. *Revue Sénégalaise des Recherches Agricoles et Halieutiques* **1989**, 2, 11–20.

<sup>14</sup> Delobel, A. et Tran, M. « Les Coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes », Ed. Orstom, Paris **1993**, p. 442.

Les Coléoptères constituent l'ordre des insectes le plus riche en espèces. Actuellement leur nombre est estimé à environ 350 000. C'est parmi les Coléoptères que l'on rencontre la plus grande variété d'insectes des produits emmagasinés.

Les formes de nombreuses espèces Coléoptères sont voisines et les critères morphologiques permettent de différencier entre les espèces (Figure III'.2).



**Figure III'.2 : Morphologie des Coléoptères.**

Les Coléoptères ravageurs des stocks, ayant une importance économique mondiale, sont peu nombreux. Ces quelques espèces sont pourtant responsables de l'essentiel des pertes dans les silos des pays industrialisés. Par conséquent, ce sont les mieux connues parce qu'elles mobilisent les efforts de la recherche publique et de l'industrie chimique.

▪ *Tribolium castaneum* (Herbst.) : (*T. castaneum*)

*T. castaneum* est un insecte cosmopolite, qui affectionne les farines dans lesquelles il creuse des galeries. Il leur communique une teinte brunâtre et une odeur âcre et rend la panification difficile. Sur les graines d'arachide, il provoque un accroissement notable de la teneur en acides gras libres dans l'huile qui en est extraite et s'attaque au riz, blé, son et farine de riz et de blé, maïs, poivre, gingembre, etc...

*T. castaneum* ou tribolium rouge de la farine est un petit Coléoptère appartenant à la famille des *Tenebrionidae*. L'adulte mesure de 3 à 4 mm, de couleur uniformément brun rougeâtre. Il est étroit, allongé, à bords parallèles, à pronotum presque aussi large que les élytres et non rebordé antérieurement. Les 3 derniers articles des antennes sont nettement plus gros que le reste.

Classification classique de *Tribolium castaneum* (Hbst.) :

- Règne : Animalia
- Embranchement : Arthropoda
- Classe : Insecta
- Ordre : Coleoptera
- Famille : *Tenebrionidae*
- Genre : *Tribolium*
- Espèce : *castaneum*



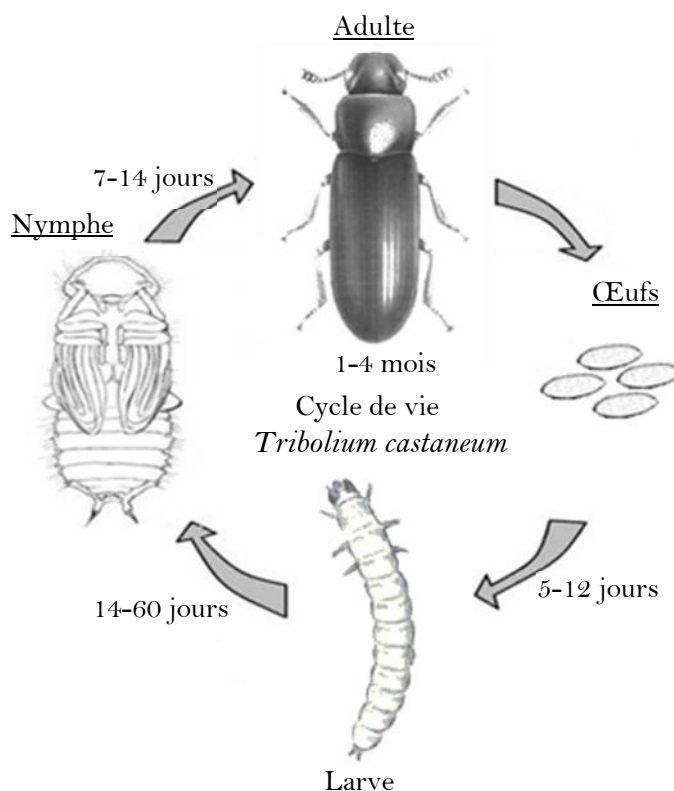
*Tribolium castaneum* (Hbst.)  
(*Tribolium* rouge de la farine)

La femelle, dès l'âge de trois jours pond quotidiennement une dizaine d'œufs qui éclosent au bout de cinq jours vers 30°C. Les œufs sont déposés en vrac sur les graines et sont difficiles à déceler. Le total des œufs déposés varie de 500 à 800 sur une période de plusieurs mois.

La larve mesure 6 mm, environ 8 fois plus longue que large, d'un jaune très pâle à maturité, avec latéralement quelques courtes soies jaunes. La capsule céphalique et la face dorsale sont légèrement rougeâtres. Les larves circulent librement dans les denrées infestées et s'y nymphosent sans cocon. À 30°C, la vie larvaire dure à peu près trois semaines et l'adulte émerge de la nymphe six jours après sa formation.

Les conditions optimales de développement de la larve sont de 32 à 33°C et 70% d'humidité relative et la durée du cycle complet est environ un mois. Selon le régime alimentaire, la durée du cycle peut atteindre 120 jours à des températures comprises entre 35 et 38°C. La durée moyenne de développement de l'œuf à l'adulte sur millet est de 37 jours à 25°C, de 26 jours à 28°C, de 23 jours à 35°C et de 21 jours à 38°C pour une humidité relative de 70% (Figure III'.3).

La longévité moyenne est de 250 jours à 25°C, 200 jours à 30°C, 2 à 3 mois à 35°C sur grains de blé, plus d'une année sur farine (maximum observé 4 ans) et son développement cesse au-dessous de 22°C.



**Figure III'.3 :** Cycle de vie de *Tribolium castaneum* (Hbst).

Adultes et larves sont capables de cannibalisme, en se nourrissant de leurs propres œufs et nymphes; elles consomment également toutes sortes de proies immobiles (œufs et nymphes de divers Coléoptères) ou peu mobiles (larves). Ils peuvent aussi se nourrir de champignons qui pourraient envahir le stock et d'une infinie variété de matières végétales sèches et sont toujours présents dans les stocks.

▪ *Sitophilus oryzae* (Linné.) : (*S. oryzae*)

C'est l'un des insectes qui attaque et déprécie plus les grains du stockage et de la conservation. Il est considéré comme l'une des espèces les plus nuisibles des stocks. Il vit dans les pays chauds. C'est le premier ravageur mondial par sa fréquence dans les échantillons et par ses dégâts occasionnés sur les céréales. De taille plus petite, il s'alimente et se multiplie au dépend de nombreuses céréales : blé, riz, maïs etc...

*S. oryzae* communément appelé charançon du riz est un petit Coléoptère appartenant au genre *Sitophilus* et à la famille des *Curculionidae*. L'adulte mesure 2,5 à 4,5 mm, de couleur brun à brun noirâtre avec quatre grosses taches orangées sur les élytres qui sont ponctuées et striées. Il possède des ailes bien développées et peut de ce fait voler, donc se disséminer dans les champs.

Classification classique de *Sitophilus oryzae* L. :

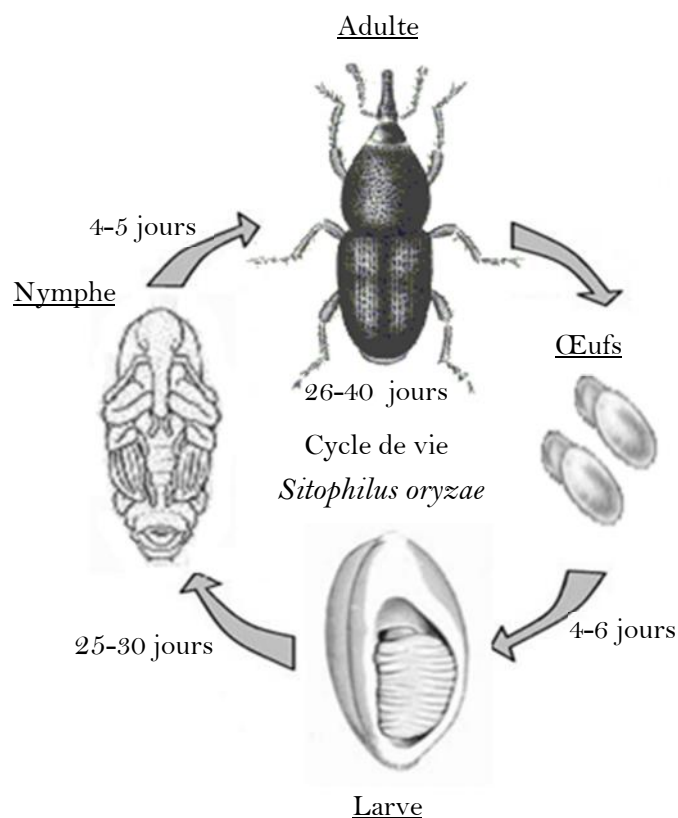
- Règne : Animalia
- Embranchement : Arthropoda
- Classe : Insecta
- Ordre : Coleoptera
- Famille : *Curculionidae*
- Genre : *Sitophilus*
- Espèce : *oryzae*



*Sitophilus oryzae* L.  
(Charançon du riz)

Ses œufs sont piriformes de couleur blanche brillante, mesurant 0,5 à 0,8 mm de longueur et 0,2 à 0,3 mm de largeur. Dans les conditions optimales 100 à 150 œufs sont déposés en 3 semaines après l'émergence de l'adulte. Chaque œuf est déposé sur un petit trou créé dans le grain par la femelle. L'œuf est collé au grain par une sécrétion. La larve s'installe dans le grain et se nourrit et éventuellement passe à l'état de nymphe. Quand la métamorphose est complète, l'adulte creuse son chemin et sort laissant un trou net.

Les adultes comme les larves se nourrissent et leur développement n'est possible que dans des grains ayant une teneur en eau comprise entre 8 à 16%, ce qui explique également que *S. oryzae* ne soit que rarement rencontré au champ. Les conditions optimales de développement pour *S. oryzae* sont de 26 à 31°C et 70% d'humidité relative et la durée du cycle complet est environ un mois (Figure III'.4).



**Figure III'.4 :** Cycle de vie de *Sitophilus oryzae* L.

La durée de l'œuf-adulte est de 26 jours à 30° sur blé, 30 jours sur sorgho, 37 jours à 27°C, et 40 jours à 25°C. L'adulte peut vivre de 7 à 8 mois jusqu'à deux ans, et le seuil de l'activité des adultes de cette espèce est de 10°C.

▪ *Rhyzopertha dominica* (Fabricius.) : (*R. dominica*)

*R. dominica* est considéré comme le plus ennemi des grains après *S. oryzae*. Ce sont les adultes qui causent le plus de dégâts. Ils attaquent directement les grains à l'aide de leurs mandibules et arrivent à les vider complètement de leur contenu.

*R. dominica* fréquemment appelé capucin des grains est un petit Coléoptère appartenant à la famille des *Bostrichidae*. L'adulte mesure 2,2 à 3 mm, de couleur brun plus ou moins rougeâtre avec un prothorax qui couvre entièrement la tête d'où le nom du « capucin des grains » et il se reconnaît par sa forme cylindrique avec des côtés nettement parallèles, caractéristiques des *Bostrichidae*. Cet insecte présente des antennes en massues de 3 articles. Le pronotum se termine par une rangée de dents régulières. Les élytres sont bien développés et ponctués en longueur.



Classification classique de *Rhyzopertha dominica* (Fab.) :

- Règne : Animalia
- Embranchement : Arthropoda
- Classe : Insecta
- Ordre : Coleoptera
- Famille : *Bostrichidae*
- Genre : *Rhyzopertha*
- Espèce : *dominica*



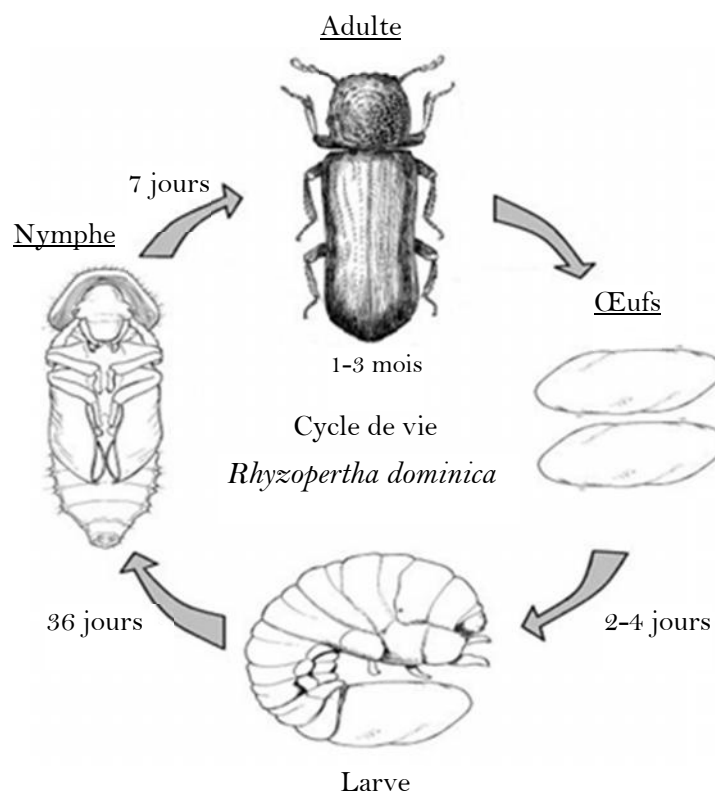
*Rhyzopertha dominica* (Fab.)  
(Capucin des grains)

Les adultes peuvent voler ce qui facilite les infestations. Les œufs sont piriformes, de couleur blanc et rose. Ils peuvent atteindre 0,6 mm de longueur sur 0,2 mm de largeur. Les larves possèdent des pattes bien développées ce qui les rendent très agiles. Elles sont cylindriques avec de longues soies, puis incurvées et duvetées à la fin de leur développement.

Les adultes s'accouplent et pondent à plusieurs reprises. Le total des œufs déposés varie de 300 à 400. Les œufs sont pondus, soit isolément, soit en petits amas à l'intérieur des grains attaqués ou à leur surface, parfois parmi les débris qui gisent entre eux.

Son développement est possible entre 18 et 39°C pour des teneurs en eau de 9 à plus de 44%. Les conditions optimales de développement pour *R. dominica* sont de 28 à 30°C et 70% d'humidité relative et la durée du cycle complet est environ un mois. La durée de l'œuf à l'adulte à 34°C est de 28 jours sur millet, 29 jours sur blé, 30 jours sur paddy, 33 sur sorgho, environ 40 jours sur maïs et 50 jours sur cossettes de manioc (Figure III'.5).





**Figure III'.5 :** Cycle de vie de *Rhyzopertha dominica* (Fab.).

Il est particulièrement sensible aux chocs et aux mouvements de la masse du grain et ne se développe bien que si le milieu n'est pas perturbé.

Sa longévité moyenne est de 120 à 140 jours, pouvant dépasser 10 mois. L'insecte est capable de se maintenir durant de longues périodes à des niveaux de population très faibles. Il est plus sensible au froid, une température de 21°C arrête son développement.

### III'.4.2. Méthodes

#### III'.4.2.1. Description expérimentale de la lyophilisation de l'HE de basilic

L'encapsulation de l'HE d'*O. basilicum* a été réalisée par la technique de lyophilisation « freeze-drying ».

La fabrication des capsules est obtenue en 2 étapes (émulsification et lyophilisation) :

##### ❖ Emulsification

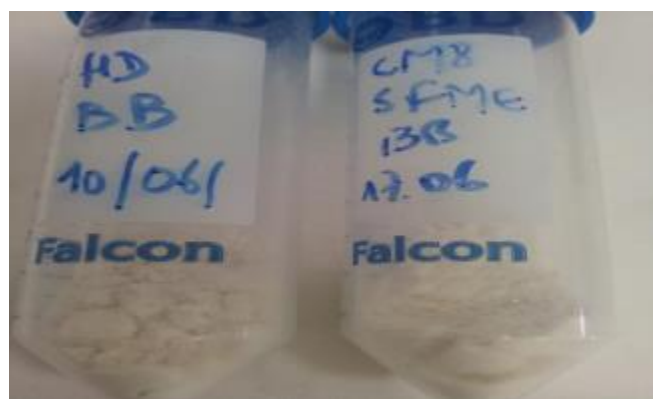
L'émulsion a été préparée avec de l'eau (50% m/m), maltodextrines / gomme acacia (ratio 1/1) comme support (45%) et l'HE d'*O. basilicum* (5%).

Les matériaux d'encapsulation (ratio gomme acacia – maltodextrines 1/1) sont dissous dans de l'eau distillée et portés à 60°C pendant 45 min. Ces solutions sont ensuite couvertes et laissées pendant 24 h à température ambiante. La formulation aromatique (HE–HD et HE–SFME) à encapsuler est mélangée à ces solutions contenant de la gomme acacia et

maltodextrines. Les mélanges sont introduits dans des ballons en verre. L'émulsification est établie à l'aide d'un homogénéisateur Ultra-Turrax T-25 (IKA Janke & Kunke modèle Bioblock Scientific, Illirch, France), à une vitesse de 13500 tr/min pendant 5 min. Les émulsions sont ensuite congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 20 heures.

#### ❖ Lyophilisation

Les échantillons congelés sont lyophilisés dans un lyophilisateur (Christ, alpha 1-2 Ltd) pendant 48 heures à une pression  $< 0,1$  mbar, à  $-60^{\circ}\text{C}$ . Les lyophilisats obtenus sont broyés avec un broyeur à disque (Retsch ZM200, USA), à une vitesse de 8000 tr/min, puis conservés dans des tubes Falcon à  $14^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation (figure III'.6).



**Figure III'.6 :** Echantillons de l'HE d'*O. basilicum* extraite par HD et SFME en poudre après lyophilisation.

#### III'.4.2.2. Description de la méthode d'analyse "Diffraction des Rayons X"

La diffraction des rayons X (DRX) est une technique d'analyse qui permet d'avoir accès à des informations physiques sur les cristaux, notamment leurs tailles et leurs orientations. Elle permet aussi d'identifier les différentes phases cristallines présentes dans un solide.

Les échantillons d'HEs ont été analysés auprès du laboratoire de Chimie des polymères, Université d'Oran 1 Ahmed BenBella à l'aide d'un diffractomètre en réflexion Philips, équipé d'un générateur des Rayons X de type PW 1732/10 et d'un tube de radiation du type K du Cuivre ( $\lambda = 0,154$  nm). L'analyse qualitative des échantillons a été effectuée par la méthode de poudre et les résultats ont été exploités à l'aide d'un logiciel X'Pert Plus.

#### III'.4.2.3. Méthodes d'évaluation de l'activité insecticide des HEs<sup>15</sup>

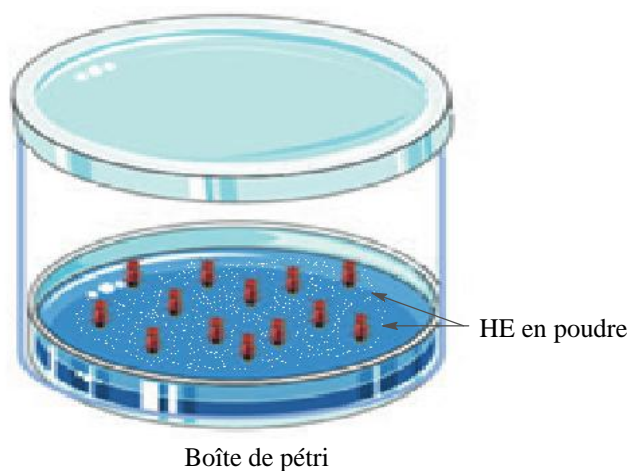
La technique de détermination de l'activité insecticide d'un extrait naturel a une grande influence sur les résultats. Afin d'évaluer l'HE de basilic encapsulée en tant qu'insecticides,

<sup>15</sup> Chemat, F.; Fabiano-Tixier, A.S.; Hellal, A.; Boutekedjiret, C.; Fernandez, X. « Activités chimiques et biologiques des huiles essentielles », In Chemat, F. and Fernandez, X. (Eds.), *La chimie des huiles essentielles*, Ed. Vuibert, Paris **2012**, pp. 212–213.

nous avons utilisé deux techniques : *toxicité par effet de contact direct et celle par effet d'ingestion*.

#### II'.4.2.3.1. Toxicité par contact direct

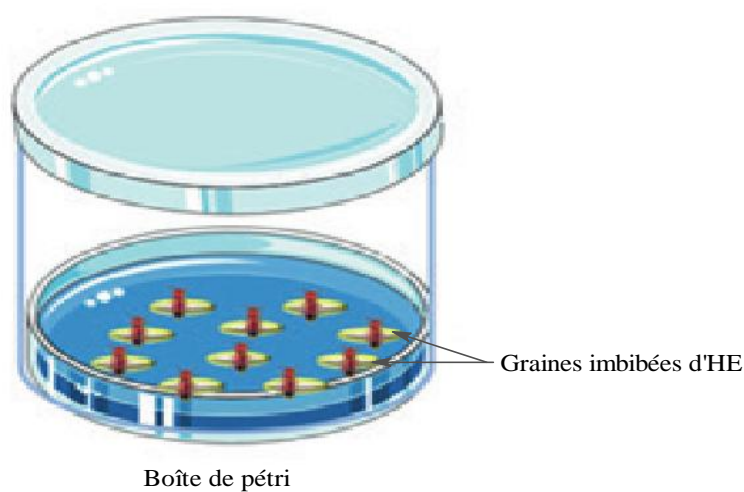
La technique par effet de contact direct consiste à mettre en présence l'HE et les insectes, puis à observer le comportement de ces derniers. L'HE peut être pulvérisée sur les insectes, ou alors les insectes sont placés dans une boîte de pétri imprégnée d'extrait ou sur du papier-filtre imprégné d'extrait déposé dans la boîte de pétri (Figure III'.7).



**Figure III'.7 :** Étude de l'activité insecticide par la technique de toxicité par effet de contact direct.

#### II'.4.2.3.2. Toxicité par ingestion

Dans ce cas, les insectes sont mis en contact avec des graines imprégnées d'extrait (Figure III'.8).



**Figure III'.8 :** Étude de l'activité insecticide par la technique de toxicité par effet d'ingestion.

Quelle que soit la technique utilisée, la lecture porte sur le nombre d'insectes morts après un temps bien déterminé d'exposition à l'extrait.

### III'.4.3. Calcul de la mortalité

Le nombre d'insectes morts dans une population traitée par un toxique n'est pas le nombre réel d'insectes tués par ce toxique. Dans toute population, il existe une mortalité naturelle qui vient s'ajouter à la mortalité provoquée par ce toxique et dont il faut tenir compte. Les pourcentages de mortalité sont donc corrigés en utilisant la formule de Schneider-Orelli<sup>16</sup> :

$$M_c(\%) = \left( \frac{M - M_t}{100 - M_t} \right) \times 100$$

$M_c$  : pourcentage de mortalité corrigé;

$M$  : mortalité dans la population traitée;

$M_t$  : mortalité dans la population témoin.

### III'.4.4. Efficacité d'un produit toxique

La détermination de la mortalité causée par un extrait ne suffit pas pour évaluer son activité insecticide. Celle-ci peut être quantifiée en déterminant son efficacité. Une méthode peut être utilisée, qui consiste à déterminer la mortalité  $Y$  après un temps constant en fonction des doses croissantes du toxique  $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$ . Ce qui conduit à établir une courbe expérimentale représentative de la fonction  $Y = f(X)$ , à partir de laquelle on *calculera la  $DL_{50}$  ou  $CL_{50}$ , définie comme étant la dose ou la concentration létale qui provoque 50% de mortalité*<sup>15</sup>.

### III'.4.5. Tests d'activité insecticide de l'HE de basilic<sup>17</sup>

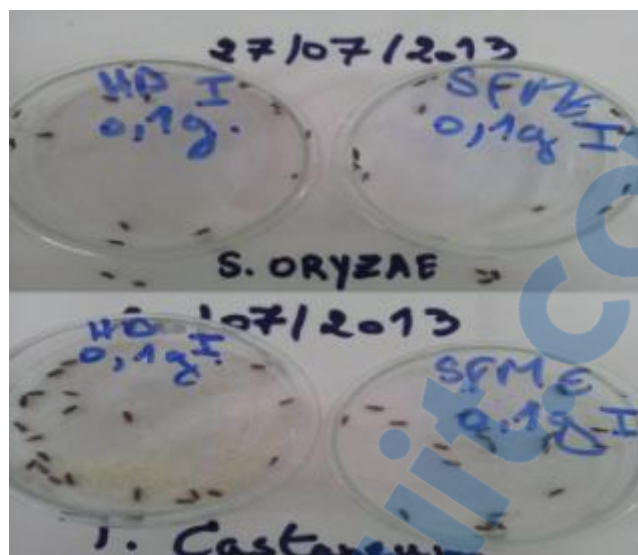
Les insectes récoltés ont été conservés dans notre laboratoire avec leurs milieux de culture (semoule pour le *Tribolium* et les graines de blé pour le *charançon du riz* et le *capucin des graines*) dans l'obscurité à l'intérieur de l'étuve à 33°C et 70% d'humidité relative.

#### III'.4.5.1. Toxicité par contact direct

Des quantités appropriées d'HEs encapsulées en poudre (0,01; 0,1 et 1 g) ont été déposées directement sur la surface des boîtes de pétri (diamètre 6,0 cm; 1,5 cm). Dans chaque boîte de pétri 20 insectes ont été enfermés à l'intérieur et placés dans l'étuve à 33°C et 70% d'humidité relative (Figure III'.9).

<sup>16</sup> Saidj, F.; Rezzoug, S.A.; Bentahar, F.; Boutekedjiret, C. *J. Essent. Oil. Bear. Pl.* **2008**, 11(4), 397–405.

<sup>17</sup> Khalfi, O.; Sahraoui, N.; Bentahar, F. and Boutekedjiret, C. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, 88, 1562–1566.



**Figure III'.9 :** *Traitement des insectes par la technique de toxicité par contact direct avec l'HE encapsulée.*

Les insectes exposés 24 heures au traitement de la poudre d'HE sont ensuite transférés dans leurs milieux de culture non traités et conservés dans leur étuve respective. Cinq répétitions sont réalisées pour chaque concentration de même que pour le témoin. La mortalité des insectes est déterminée 6 jours après traitement.

#### III'.4.5.2. Toxicité par ingestion

Des quantités appropriées d'HEs encapsulées en poudre (0,001; 0,01 et 0,1g) mélangées avec 100 g de milieu de culture (semoule et grains de blé) ont été déposées directement sur la surface dans des boîtes de pétri (diamètre 10 cm; 8 cm).

Dans chaque boîte de pétri 20 insectes ont été enfermés à l'intérieur et placés dans l'étuve à 33°C et 70% d'humidité relative (Figure II'.10).



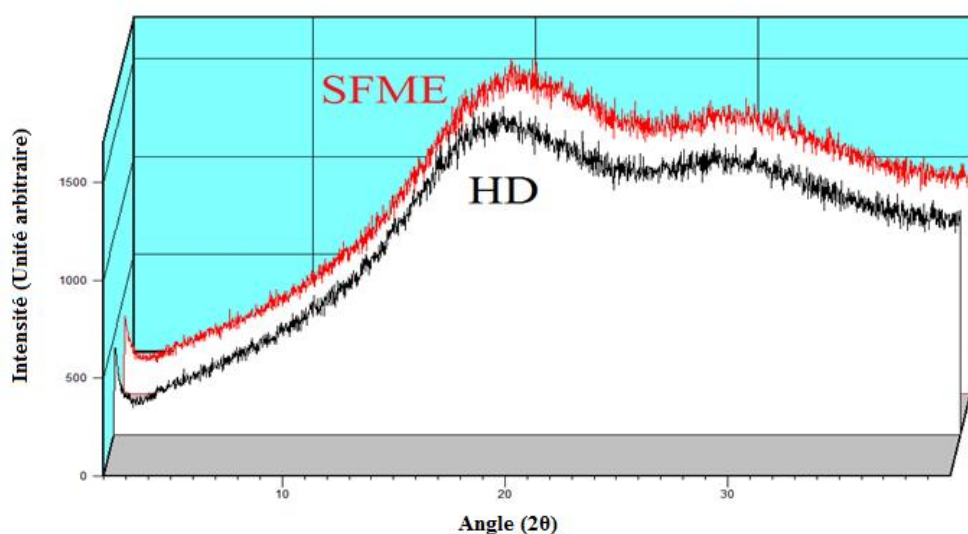
**Figure III'.10 :** *Traitement des insectes par la technique de toxicité par ingestion des graines imbibées par l'HE encapsulée.*

Les insectes exposés 24 heures au traitement du mélange sont ensuite transférés dans leurs milieux de culture non traités et conservés dans leur étuve respective. Cinq répétitions sont réalisées pour chaque concentration de même que pour le témoin. La mortalité des insectes est déterminée 6 jours après traitement.

### III'.6. Résultats et discussion

#### III'.6.1. Analyse par DRX des capsules de l'HE d'*O. basilicum*

Le diffractogramme de rayon X de l'HE de basilic encapsulée en poudre (HE-HD et HE-SFME) montrent une structure amorphe (Figure III'.11).



**Figure III'.11 :** Caractérisation par diffraction des rayons X de l'HE de basilic encapsulée (HE-HD et HE-SFME).

Cette observation montre bien que la technique de lyophilisation produit des capsules amorphes. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Sutaphanit et Chitprasert<sup>18</sup>, qui ont trouvé que la poudre de gélatine de l'HE de basilic a donné un diffractogramme de rayon X caractéristique d'un matériau amorphe.

Les données sur les différentes méthodes d'encapsulation, particulièrement ceux rapportées par Madene et *al.*<sup>4</sup> ont indiqué que les techniques de séchage produisent des capsules amorphes avec des propriétés physiques et des comportements thermiques différentes. Cette structure amorphe démontre bien que les constituants de l'HE sont dispersés dans la matrice de gomme arabique.

#### III'.6.2. Résultats de l'activité insecticide de l'HE de basilic

L'HE d'*O. basilicum* a été encapsulée par le processus de séchage à froid, technique de lyophilisation « freeze-drying » utilisant le mélange de maltodextrine et de gomme arabique

<sup>18</sup> Sutaphanit, P.; Chitprasert, P. *Food Chem.* **2014**, *150*, 313–320.



pour étudier la toxicité contre les insectes des céréales stockées *R. dominica*, *S. oryzae* et *T. castaneum*.

Les résultats des tests d'activité insecticide observés après 24 h d'exposition sont rassemblés dans les tableaux III'.2 et III'.3.

**Tableau III'.2 :** Toxicité par effet contact direct de l'HE de basilic encapsulée (HE-HD et HE-SFME).

Toxicité par effet contact direct	Dose (g)	Mortalité corrigé : Mc (% ± Ecart-type)		
		<i>T. castaneum</i>	<i>S. oryzae</i>	<i>R. dominica</i>
HE-HD	0,01	0 ± 0,0	2,00 ± 2,7	6,32 ± 2,4
	0,1	0 ± 0,0	15,00 ± 5,0	42,11 ± 5,3
	1,0	0 ± 0,0	36,00 ± 4,2	89,47 ± 3,7
HE-SFME	0,01	0 ± 0,0	3,33 ± 2,7	8,77 ± 2,9
	0,1	0 ± 0,0	17,00 ± 4,5	44,21 ± 2,9
	1,0	0 ± 0,0	44,00 ± 4,2	93,68 ± 4,4

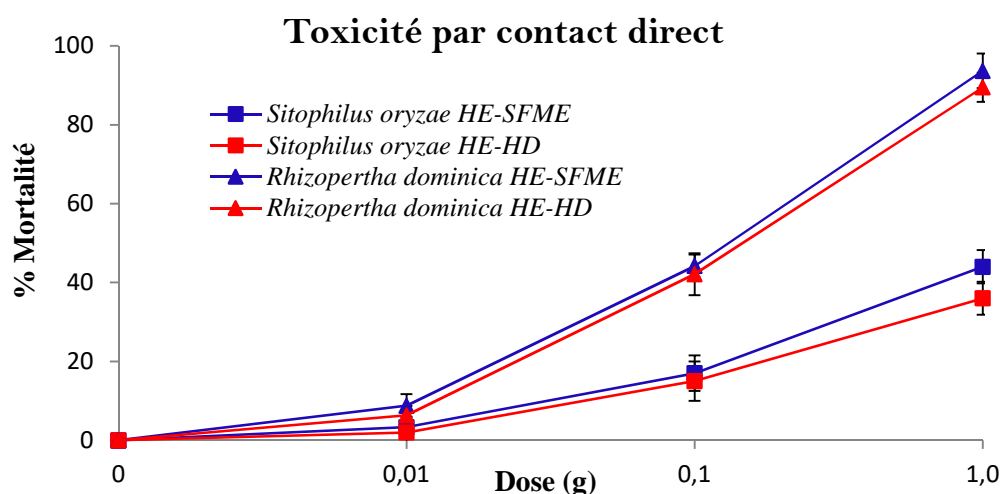
Il ressort du tableau III'.2 que la mortalité enregistrée est faible pour une dose inférieure ou égale à 0,1 g pour les deux extraits et on remarque que l'HE-SFME provoque une toxicité plus importante par rapport à l'HE-HD (44,21% par HE-SFME et 42,11% par HE-HD) et (17,00% par HE-SFME et 15,00% par HE-HD) contre *R. dominica* et *S. oryzae*, respectivement. La mortalité maximale est obtenue contre *R. dominica* (93,68% par HE-SFME et 89,47% par HE-HD) avec une dose de 1,0 g.

**Tableau III'.3 :** Toxicité par effet ingestion de l'HE de basilic encapsulée (HE-HD et HE-SFME).

Toxicité par effet Ingestion	Dose (g/kg)	Mortalité corrigé : Mc (% ± Ecart-type)		
		<i>T. castaneum</i>	<i>S. oryzae</i>	<i>R. dominica</i>
HE-HD	0,01	0 ± 0,0	1,00 ± 2,2	4,21 ± 4,4
	0,1	0 ± 0,0	11,00 ± 2,2	35,79 ± 4,4
	1,0	0 ± 0,0	29,00 ± 4,2	83,16 ± 4,4
HE-SFME	0,01	0 ± 0,0	2,00 ± 2,7	5,26 ± 3,7
	0,1	0 ± 0,0	13,00 ± 2,7	40,00 ± 4,7
	1,0	0 ± 0,0	33,00 ± 2,7	85,26 ± 4,4

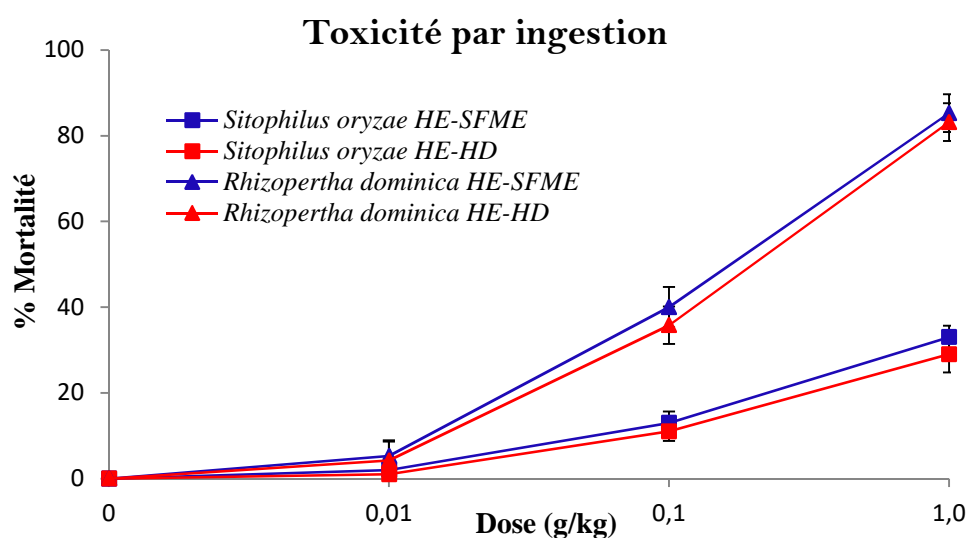
Les résultats de l'activité insecticide par effet ingestion mentionnés sur le tableau III'.3 montre que la mortalité est faible par rapport à celle obtenue par contact direct; mais l'HE-SFME provoque une mortalité plus importante par rapport à l'HE-HD. À plus forte dose de 1,0 g, l'HE d'*O. basilicum* encapsulée montre une forte toxicité de (85,26% par HE-SFME, 83,16% par HE-HD) et (33,00% par HE-SFME, 29,00% par HE-HD) contre *R. dominica* et *S. oryzae*, respectivement.

Ces résultats montrent une augmentation de la mortalité des insectes par effet contact direct aussi bien que par effet ingestion avec l'augmentation des doses de l'HE d'*O. basilicum* encapsulée (HE-HD et HE-SFME) contre *S. oryzae* et *R. dominica* sauf *T. castaneum* qui s'est avéré très résistante (Figure III'.12 et III'.13).



**Figure III'.12 :** Evaluation de l'activité insecticide de l'HE de basilic encapsulée (HE-HD et HE-SFME) par effet de contact direct.

La  $DL_{50}$  de toxicité par effet contact direct contre les insectes adultes de *R. dominica* varie entre  $DL_{50} = 0,20$  g par HE-SFME et  $DL_{50} = 0,25$  g par HE-HD).

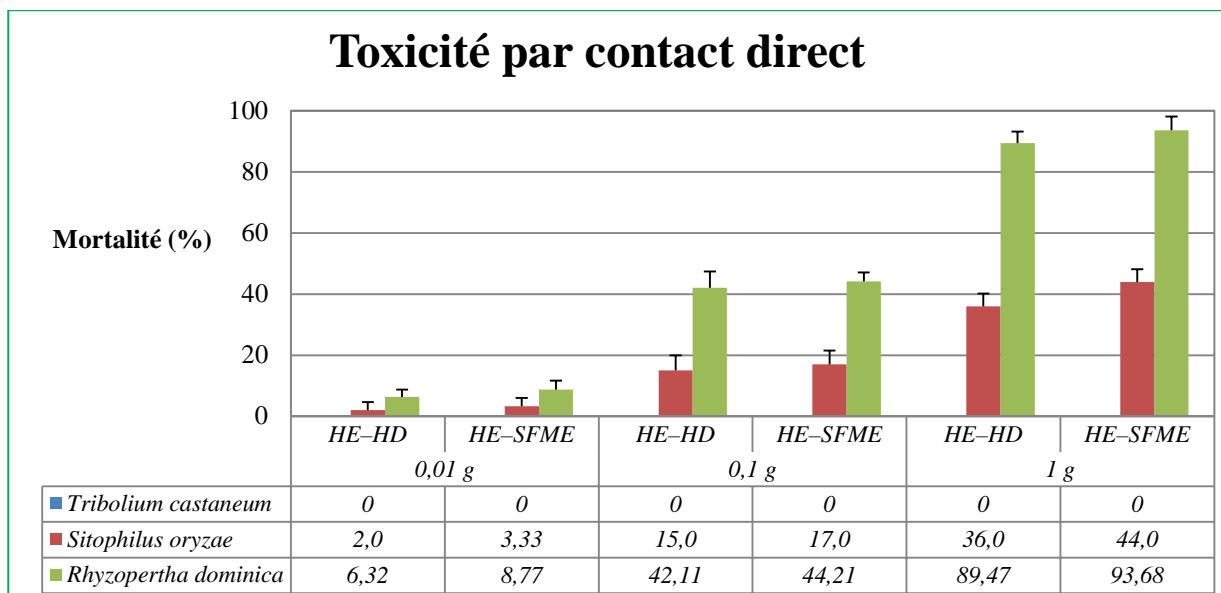


**Figure III'.13 :** Evaluation de l'activité insecticide de l'HE de basilic encapsulée HE-HD et HE-SFME) par effet d'ingestion.

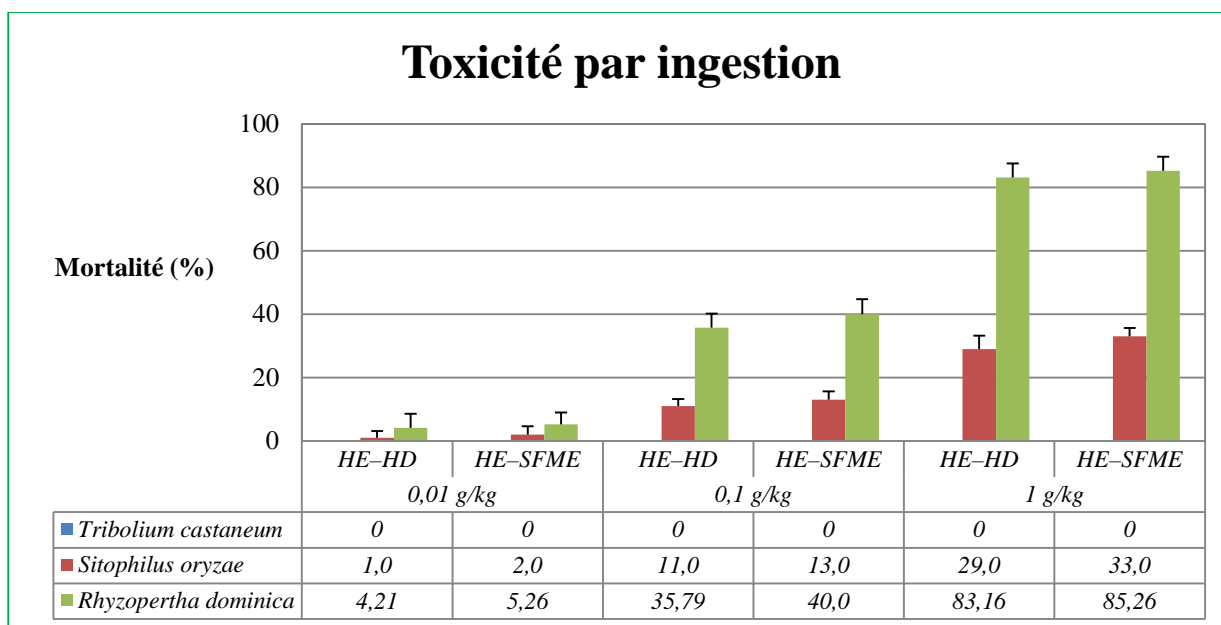


La DL<sub>50</sub> de toxicité par effet ingestion contre les insectes adultes de *R. dominica* varie entre DL<sub>50</sub>= 0,32 g/kg par HE-SFME et DL<sub>50</sub>= 0,37 g/kg pour HE-HD.

L'ensemble des résultats expérimentaux de la mise en évidence de l'activité insecticide de l'HE du basilic obtenue par HD et SFME sont reproduits dans les figures III'.14 et III'.15 sous forme d'histogrammes.



**Figure III'.14 :** Effet de toxicité de l'HE de basilic encapsulée (HE-HD et HE-SFME) par contact direct.



**Figure III'.15 :** Effet de toxicité de l'HE de basilic encapsulée (HE-HD et HE-SFME) par ingestion.

Les figures III'.14 et III'.15 montrent que la mortalité des insectes obtenue par l'HE-HD est plus faible que celle obtenue par l'HE-SFME, aussi bien par effet de contact direct que par effet d'ingestion.

Ces résultats pourraient être expliqués par la teneur des principaux composés de l'HE d'*O. basilicum* encapsulée : linalool, méthylchavicol et d'autres composés oxygénés.

### III'.6.3. Discussion des résultats de l'activité insecticide de l'HE de basilic

Les résultats de l'activité insecticide de l'HE de basilic que nous avons obtenus sont en concordance avec plusieurs auteurs, qui ont étudié le potentiel insecticide des HEs d'*O. basilicum* contre les ravageurs des denrées stockées. Ces travaux ont révélé que les effets toxiques observés sont dus aux composés majoritaires, de l'essence de basilic : linalol, méthylchavicol,... et méthyleugénol (Tableau III'.4)<sup>19,20,21</sup>.

**Tableau III'.4 :** Activité insecticide des composés actifs de l'HE d'*O. basilicum*.

Composés actifs	Insectes	Référence
Méthylchavicol, eugénol, linalol	<i>Callosobruchus maculatus</i>	[20]
Méthylchavicol, linalol	<i>Sitophilus oryzae</i>	[21]
Méthylchavicol	<i>Callosobruchus maculatus</i> <i>Sitophilus oryzae</i>	[22]
Linalol, méthylchavicol	<i>Rhyzopertha dominica</i> <i>Cryptolestes pusillus</i>	[23]
Linalol, méthylchavicol, méthyleugénol, cinnamate de méthyle, eugénol, (E)-anéthol	<i>Sitophilus oryzae</i> <i>Rhyzopertha dominica</i> <i>Cryptolestes pusillus</i>	[24]
Linalol, méthylchavicol	<i>Rhyzopertha dominica</i>	[25]

Pascual-Villalobos<sup>22</sup> a montré que l'HE de basilic riche en méthylchavicol, était toxique contre *C. maculatus* et *S. oryzae*. Pascual-Villalobos *et al.*<sup>23</sup> ont également constaté que le basilic à chémotype linalol-méthylchavicol exerce une plus grande toxicité contre *R. dominica* et *C. pusillus*.

<sup>19</sup> a) Regnault-Roger, C. *Integrated Pest Manag. Rev.* **1997**, 2, 25–34 ; b) Zoubiri, S.; Baaliouamer, A. *J. Saudi. Chem. Soc.* **2014**, 18(6), 925–938.

<sup>20</sup> Pascual-Villalobos, M.J.; Ballesta-Acosta, M.C. *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, 31, 673–679.

<sup>21</sup> Follett, P.A.; Rivera-Leong, K.; Myers, R. *J. Asia. Pac. Entomol.* **2014**, 17, 119–121.

<sup>22</sup> Pascual-Villalobos, M.J. « Volatile activity of plant essential oils against stored product beetle pests », In Credland, P.F.; Armitage, D.M.; Bell, C.H.; Cogan, P.M.; Highley, E. (Eds.), *Advances in Stored Product Protection, Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored Product Protection*; 2002 Jul 22-26, CAB International, Wallingford **2003**, pp. 648–650.

<sup>23</sup> Pascual-Villalobos, M.J.; Ballesta-Acosta, M.C.; Soler, A. *Bol. Sanid. Veg. Plagas* **2004**, 30, 279–286.

Aussi, Lopez *et al.*<sup>24</sup> ont démontré l'efficacité des principaux composés (linalol, méthylchavicol et méthyleugénol) des variétés d'*O. basilicum* contre les insectes (*S. oryzae*, *R. dominica* et *C. pusillus*) lorsqu'ils sont appliqués presque pur, tandis que le méthylchavicol, le méthyleugénol, le cinnamate de méthyle, l'eugénol, le (*E*)-anéthol et le linalol ont une plus grande activité lorsqu'ils sont appliqués en mélange.

Ottai *et al.*<sup>25</sup> ont révélé que l'HE de basilic français à méthylchavicol semble avoir des effets plus forts que ceux de la variété du basilic égyptien à linalol et méthylchavicol. Il a été constaté que 4% d'HE de basilic français a causé une mortalité de 100% pour les adultes de *R. dominica* après 24 h d'application.

Il convient de signaler que l'activité insecticide des HEs encapsulées de différentes plantes aromatiques a fait l'objet de quelques travaux, néanmoins aucun rapport n'a été publié sur l'activité insecticide de l'HE d'*O. basilicum* encapsulée (Tableau III'.5)<sup>26,27,28</sup>.

**Tableau III'.5 : Activité insecticide des HEs des plantes aromatiques encapsulées.**

Noms /Plantes	Famille	Techniques d'encapsulation	Insectes	Réf.
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae	Coacervation	<i>Limantria dispar</i> L.	[28]
<i>Thymus herba-barona</i> <i>Loisel</i>	Lamiaceae	Coacervation	<i>Limantria dispar</i> L.	[28]
<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	Coacervation- Lyophilisation	<i>Plodia interpunctella</i>	[29]
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae	Coacervation- Lyophilisation	<i>Plodia interpunctella</i>	[29]
<i>Cuminum cyminum</i>	Apiaceae	Polymérisation	<i>Tribolium castaneum</i>	[30]
<i>Lippia sidoides</i>	Verbenaceae	Atomisation	<i>Aedes aegypti</i> ,	[31]
<i>Schinus molle</i> Rev L.	Anacardiaceae	Atomisation	<i>Haematobia irritans</i>	[32]

Sanna Passino *et al.*<sup>29</sup> ont montré l'efficacité des huiles de *thymus* et *Rosmarinus* contre les larves de *Plodia interpunctella* à faible concentration (0,1%) avec une mortalité de plus de 50% pouvant atteindre des valeurs allant jusqu'à 80% par augmentation de la concentration des microcapsules.

<sup>24</sup> Lopez, M.D.; Jordan, M.J.; Pascual-Villalobos, M.J. *J. Stored Prod. Res.* **2008**, *44*, 273–278.

<sup>25</sup> Ottai, M.E.S.; Sayeda, S.A.; Mona, M.E.D. *Aust. J. Basic. Appl. Sci.* **2012**, *6*(3), 185–192.

<sup>26</sup> Ragaei, M.; Sabry, A.H. *Int. J. Sci. Environ. Tech.* **2014**, *3*(2), 528–545.

<sup>27</sup> Bakry, A.M.; Abbas, S.; Ali, B.; Majeed, H.; Abouelwafa, M.Y.; Mousa, A.; Liang, L. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15*(1), 143–182.

<sup>28</sup> Moretti, M.D.L.; Sanna-Passino, G.; Demontis, S.; Bazzoni, E. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2002**, *3*(2), 1–11.

<sup>29</sup> Sanna-Passino, G.; Bazzoni, E.; Moretti, M.D.L. *Bol. San. Veg. Plagas* **2004**, *30*, 125–132.

Negahban *et al.*<sup>30</sup> ont rapporté que l'effet de toxicité par fumigation des nanocapsules de *Cuminum cyminum* contre *T. castaneum* (CL<sub>50</sub> = 16,25 ppm) sont extrêmement efficaces par rapport à l'HE pure (CL<sub>50</sub> = 32,12 ppm), après 7 jours d'exposition.

Aussi, Abreu *et al.*<sup>31</sup> ont révélé que les nanoparticules de l'HE de romarin poivré (*Lippia sidoides*) présentent une activité larvicide efficace contre les larves d'*Aedes aegypti*, avec un taux de mortalité de 75% après 48 h, et atteignent la mortalité de plus de 90% après 72 h.

En outre, Lopez *et al.*<sup>32</sup> ont démontré le potentiel insecticide de l'HE des feuilles de faux-poivrier (*Schinus molle* Rev L.) encapsulée contre *Haematobia irritans*. Ils ont observé qu'à 100 mg/mL, la mortalité des mouches atteint 32 à 73% après 2 à 4 h d'exposition, respectivement.

Par ailleurs, l'activité insecticide du genre *Ocimum* vis-à-vis de différents insectes a fait l'objet de plusieurs travaux<sup>33,34</sup>. L'ensemble des résultats de cette étude sont reportés dans le tableau III'.6.

**Tableau III'.6 :** Activité insecticide des HEs des plantes appartenant au genre *Ocimum*.

Plantes	Composés actifs	Insectes	Réf.
<i>O. kenyense</i>	1,8-cinéole, β-sélinène, méthylchavicol, iso-eugénol	<i>Sitophilus granarius</i> <i>Sitophilus zeamais</i> <i>Tribolium castaneum</i> <i>Prostephanus truncatus</i>	[33]
<i>O. kilimandscharicum</i>	Camphre	<i>Sitophilus granarius</i> <i>Sitophilus zeamais</i> <i>Tribolium castaneum</i> <i>Prostephanus truncatus</i>	[34]
<i>O. gratissimum</i>	-(Z)-ocimène	<i>Rhyzopertha dominica</i> <i>Oryzaephilus surinamensis</i> <i>Callosobruchus chinensis</i>	[35]
<i>O. basilicum</i>	—	<i>Callosobruchus maculatus</i>	[36]
<i>O. gratissimum</i>	—	<i>Callosobruchus maculatus</i>	[36]

<sup>30</sup> Negahban, M.; Moharramipour, S.; Zandi, M.; Hashemi, S.A.; Ziayee, F. « Nano-insecticidal activity of essential oil from *Cuminum cyminum* on *Tribolium castaneum* », In Navarro, S.; Banks, H.J.; Jayas, D.S.; Bell, C.H.; Noyes, R.T.; Ferizli, A.G.; Emekci, M.; Isikber, A.A.; Alagusundaram, K. (Eds.), *9th Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*; 2012 Oct 15-19; ARBER Professional Congress Services; Antalya, Turquie **2012**, p. 63–68.

<sup>31</sup> Abreu, F.O.M.S.; Oliveira, E.F.; Paula, H.C.B.; De Paula, R.C.M. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 89, 1277–1282.

<sup>32</sup> Lopez, A.; Castro, S.; Andina, M.J.; Ures, X.; Munguía, B.; Llabot, J.M.; Dellacassa, E.; Palma, S.; Domínguez, L. *Ind. Crops Prod.* **2014**, 53, 209–216.

<sup>33</sup> Obeng-Ofori, D.; Reichmuth, C.; Bekele, A.J.; Hassanali, A. *J. Appl. Entomol.* **1997**, 121, 237–243.

<sup>34</sup> Obeng-Ofori, D.; Reichmuth, C.; Bekele, A.J.; Hassanali, A. *Int. J. Pest Manage.* **1998**, 44, 203–209.

Ogendo *et al.*<sup>35</sup> ont révélé qu'à 1 mL/L d'air, l'HE d'*O. gratissimum* exerce un taux de mortalité de 98%, 99% et 100% sur *R. dominica*, *O. surinamensis* et *C. chinensis* respectivement. Après 24 h de traitement, l'eugénol provoque 61%, 79% et 100% de mortalité pour les mêmes insectes. La toxicité du -(Z)-ocimène s'avère faible car elle provoque seulement 8%, 11% et 59% de la mortalité pour *R. dominica*, *O. surinamensis* et *C. chinensis* respectivement. *T. castaneum* n'est pas affecté par l'HE d'*O. gratissimum* L. et ses composants.

Keita *et al.*<sup>36</sup> ont également étudié la toxicité des HEs d'*O. basilicum* et *O. gratissimum* sur *C. maculatus* par fumigation. Ils ont montré qu'après 12 h d'exposition à une concentration de 25 µL, l'HE d'*O. basilicum* est responsable de 80% de la mortalité alors que l'HE d'*O. gratissimum* a exercé un taux de mortalité de 70%. Une différence significative est observée dans la réponse des mâles et les femelles, avec une sensibilité plus marquée pour les mâles.

D'autre part, il a été observé dans d'autres travaux que la toxicité des HEs contre les insectes est liée à leurs composés majoritaires. Le linalol, la carvone, l'estragole et le méthyleugénol contenus dans les HEs de coriandre, de cumin ou de basilic sont des exemples de composés actifs contre les trois ravageurs du riz stockés (*S. oryzae*, *R. dominica* et *C. pusillus*).

Le camphre, l'acétate de géranyle et (*E*)-anéthole ont montré une toxicité à la fois contre *R. dominica* et *C. pusillus*, tandis que la limonène, la fenchone, l'γ-terpinène, l'acide myristique, le géraniol, l'eucalyptol et le chavicol présentent une activité contre *C. pusillus*.

La carvone a été très efficace contre les insectes lorsqu'elle est appliquée à peu près pur, tandis que l'estragole, le méthyleugénol, le cinnamate de méthyle, l'eugénol, le (*E*)-anéthole et le linalol exercent une plus grande activité lorsqu'ils sont appliqués en mélange<sup>24</sup>.

D'autres résultats ont révélé que l'effet de toxicité des huiles n'est pas systématique car des réponses différentes peuvent être enregistrées selon l'espèce d'insecte, la composition de l'HE et sa concentration ainsi que le temps de traitement<sup>11a,20,37</sup>.

Rozman *et al.*<sup>38</sup> ont montré que le 1,8-cinéole, le camphre, l'eugénol, le linalol, le carvacrol, le thymol, le bornéol, l'acétate de bornyle et l'acétate de linalyle sont naturellement présents dans les HEs des plantes aromatiques *Lavandula angustifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis*. L'activité insecticide de ces composés a été évaluée par fumigation contre les adultes de *S. oryzae*, *R. dominica* et *T. castaneum*. Les résultats ont révélé que l'espèce *S. oryzae* est la plus sensible, suivi par *R. dominica*. *T. castaneum* s'est avéré hautement résistante vis-à-vis des composés testés avec une mortalité inférieure à 20% après une exposition de 24 h. Le 1,8-cinéole, le bornéol et le thymol sont très

<sup>35</sup> Ogendo, J.O.; Kostyukovsky, M.; Ravid, U.; Matasyoh, J.C.; Deng, A.L.; Omolo, E.O.; Kariuki, S.T.; Shaaya, E. *J. Stored Prod. Res.* **2008**, 44(4), 328–334.

<sup>36</sup> Keita, S.M.; Vincent, C.; Schmit, J.P.; Arnason, J.T.; Belanger, A. *J. Stored Prod. Res.* **2001**, 37, 339–349.

<sup>37</sup> Maurya, P.; Sharma, P.; Mohan, L.; Batabyal, L.; Srivastava, C.N. *J. Asia. Pac. Entomol.* **2009**, 12, 113–115.

<sup>38</sup> Rozman, V.; Kalinovic, I.; Korunic, Z. *J. Stored Prod. Res.* **2007**, 43, 349–355.

efficaces contre *S. oryzae* lorsqu'ils sont appliqués pendant 24 h à la dose la plus faible (0,1 mL/720 volume mL). Pour *R. dominica*, le camphre et le linalol sont très actifs avec une mortalité de 100% dans les mêmes conditions.

Shaaya *et al.*<sup>39</sup> ont également montré l'effet répulsif de l'HE de l'espèce des Labiées sur les adultes de plusieurs insectes. *Tribolium castaneum* (Herbst.) a été la plus résistante par rapport à *S. oryzae*, *R. dominica* et *O. surinamensis*.

Une concentration de 1,4 à 4,5 µL/L d'air et 24 h d'exposition a été suffisante pour obtenir 90% de mortalité de tous les insectes testés. Dans les colonnes remplies à 70% avec du blé, une concentration de 50 µL/L et 7 jours d'exposition ont été nécessaires pour obtenir des taux de mortalité de 94 à 100%.

### III'.7. Conclusion

Les résultats de l'activité insecticide de l'HE d'*O. basilicum* encapsulée par lyophilisation indiquent que cette essence présente une toxicité plus efficace contre *R. dominica* que *S. oryzae*, sauf pour *T. castaneum* qui a manifesté une grande résistance.

Cette activité insecticide observée dépend de différents facteurs telles que la méthode d'extraction par HD ou SFME, la composition chimique, la technique d'encapsulation et les méthodes d'application par effet contact direct ou par effet ingestion.

L'encapsulation par lyophilisation semble être une bonne alternative pour conserver la qualité et la durabilité des composés actifs et augmenter la toxicité de l'HE.

Aussi, les HEs d'*O. basilicum* encapsulées, dotées d'un potentiel insecticide peuvent être utilisées dans la gestion durable des insectes.

---

<sup>39</sup> Shaaya, E.; Kostjukovski, M.; Eilberg, J and Sukprakarn, C. *J. Stored Prod. Res.* **1997**, 33, 7–15.

## Références

- <sup>1</sup> Toumnou, A.L.; Seck, D.; S. Namkossere, S.; N. Cisse, N.; Kandiora, N. et Sembene, M. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **2012**, 6(3), 1040–1050.
- <sup>2</sup> Chiasson, H. et Beloin, N. *Bull. Soc. Entomol. Québec* **2007**, 14(1), 3–6.
- <sup>3</sup> Karlsen, J. « Encapsulation and Other Programmed Release Techniques for Essential Oils and Volatile Terpenes », In Baser, K.C.H.; Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA **2010**, pp. 855–861.
- <sup>4</sup> Madene, A.; Jacquot, M.; Scher, J.; Desobry, S. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2006**, 41, 1–21.
- <sup>5</sup> Madene, A. « *Etude des Transferts d'Arômes Encapsulés dans une Matrice Alimentaire type Génoise* », Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, France **2006**.
- <sup>6</sup> Benoit, J.P.; Richard, J.; Fournier, E.; Liu, S. *Brevet Internationale*, WO. 2001/015799 A1, **2001**.
- <sup>7</sup> Montasser, I.; Fessi, H.; Briançon, S.; Lieto, J. *Brevet Internationale*, WO. 2001/068235 A1, **2001**.
- <sup>8</sup> Antal, T.; Chong, C.H.; Law, C.L.; Sikolya L. *Int. Food Res. J.* **2014**, 21(1), 387–394.
- <sup>9</sup> Heinzelmann, K.; Franke, K. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, 12, 223–229.
- <sup>10</sup> Benayad, N. « *Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées* », Projet de recherche. Rapport d'activité MAB et UNESCO. Faculté des Sciences-Rabat, Maroc **2008**, p. 61.
- <sup>11</sup> a) Aslan, I.; Özbek, H.; Çalmasur, Ö.; Sahin, F. *Ind. Crops Prod.* **2004**, 19, 167–173; b) Jbilou, R.; Ennabili, A.; Sayah, F. *Afr. J. Biotechnol.* **2006**, 5(10), 936–940; c) Digilio, M.C.; Mancini, E.; Voto, E. & De Feo, V. *J. Plant Interact.* **2008**, 3(1), 17–23.
- <sup>12</sup> a) Ayvaz, A.; Sagdic, O.; Karaborklu, S.; Ozturk, I. *J. Insect Sci.* **2010**, 10(21), 1–13; b) Mishra, B.B.; Tripathi S.P and Tripathi, C.P.M. *J. Nat. Sci.* **2012**, 10(2), 50–54; c) Nguemtchouin, M.G.M.; Ngassoum, M.B.; Chaliar, P.; Kamga, R.; Ngamo, L.S.T.; Cretin, M. *J. Stored Prod. Res.* **2013**, 52, 57–62.
- <sup>13</sup> Seck, D. *Revue Sénégalaise des Recherches Agricoles et Halieutiques* **1989**, 2, 11–20.
- <sup>14</sup> Delobel, A. et Tran, M. « *Les Coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes* », Ed. Orstom, Paris **1993**, p. 442.
- <sup>15</sup> Chemat, F.; Fabiano-Tixier, A.S.; Hellal, A.; Boutekedjiret, C.; Fernandez, X. « Activités chimiques et biologiques des huiles essentielles », In Chemat, F. and Fernandez, X. (Eds.), *La chimie des huiles essentielles*, Ed. Vuibert, Paris **2012**, pp. 212–213.
- <sup>16</sup> Saidj, F.; Rezzoug, S.A.; Bentahar, F.; Boutekedjiret, C. *J. Essent. Oil. Bear. Pl.* **2008**, 11(4), 397–405.
- <sup>17</sup> Khalfi, O.; Sahraoui, N.; Bentahar, F. and Boutekedjiret, C. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, 88, 1562–1566.
- <sup>18</sup> Sutaphanit, P.; Chitprasert, P. *Food Chem.* **2014**, 150, 313–320.
- <sup>19</sup> a) Regnault-Roger, C. *Integrated Pest Manag. Rev.* **1997**, 2, 25–34 ; b) Zoubiri, S.; Baaliouamer, A. *J. Saudi. Chem. Soc.* **2014**, 18(6), 925–938.

- <sup>20</sup> Pascual-Villalobos, M.J.; Ballesta-Acosta, M.C. *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, *31*, 673–679.
- <sup>21</sup> Follett, P.A.; Rivera-Leong, K.; Myers, R. *J. Asia. Pac. Entomol.* **2014**, *17*, 119–121.
- <sup>22</sup> Pascual-Villalobos, M.J. « Volatile activity of plant essential oils against stored product beetle pests », In Credland, P.F.; Armitage, D.M.; Bell, C.H.; Cogan, P.M.; Highley, E. (Eds.), *Advances in Stored Product Protection, Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored Product Protection*; 2002 Jul 22-26, CAB International, Wallingford **2003**, pp. 648–650.
- <sup>23</sup> Pascual-Villalobos, M.J.; Ballesta-Acosta, M.C.; Soler, A. *Bol. Sanid. Veg. Plagas* **2004**, *30*, 279–286.
- <sup>24</sup> Lopez, M.D.; Jordan, M.J.; Pascual-Villalobos, M.J. *J. Stored Prod. Res.* **2008**, *44*, 273–278.
- <sup>25</sup> Ottai, M.E.S.; Sayeda, S.A.; Mona, M.E.D. *Aust. J. Basic. Appl. Sci.* **2012**, *6*(3), 185–192.
- <sup>26</sup> Ragaei, M.; Sabry, A.H. *Int. J. Sci. Environ. Tech.* **2014**, *3*(2), 528–545.
- <sup>27</sup> Bakry, A.M.; Abbas, S.; Ali, B.; Majeed, H.; Abouelwafa, M.Y.; Mousa, A.; Liang, L. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15*(1), 143–182.
- <sup>28</sup> Moretti, M.D.L.; Sanna-Passino, G.; Demontis, S.; Bazzoni, E. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2002**, *3*(2), 1–11.
- <sup>29</sup> Sanna-Passino, G.; Bazzoni, E.; Moretti, M.D.L. *Bol. San. Veg. Plagas* **2004**, *30*, 125–132.
- <sup>30</sup> Negahban, M.; Moharramipour, S.; Zandi, M.; Hashemi, S.A.; Ziaee, F. « Nano-insecticidal activity of essential oil from *Cuminum cyminum* on *Tribolium castaneum* », In Navarro, S.; Banks, H.J.; Jayas, D.S.; Bell, C.H.; Noyes, R.T.; Ferizli, A.G.; Emekci, M.; Isikber, A.A.; Alagusundaram, K. (Eds.), *9th Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*; 2012 Oct 15-19; ARBER Professional Congress Services; Antalya, Turquie **2012**, p. 63–68.
- <sup>31</sup> Abreu, F.O.M.S.; Oliveira, E.F.; Paula, H.C.B.; De Paula, R.C.M. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *89*, 1277–1282.
- <sup>32</sup> Lopez, A.; Castro, S.; Andina, M.J.; Ures, X.; Munguía, B.; Llabot, J.M.; Dellacassa, E.; Palma, S.; Domínguez, L. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *53*, 209–216.
- <sup>33</sup> Obeng-Ofori, D.; Reichmuth, C.; Bekele, A.J.; Hassanali, A. *J. Appl. Entomol.* **1997**, *121*, 237–243.
- <sup>34</sup> Obeng-Ofori, D.; Reichmuth, C.; Bekele, A.J.; Hassanali, A. *Int. J. Pest Manage.* **1998**, *44*, 203–209.
- <sup>35</sup> Ogendo, J.O.; Kostyukovsky, M.; Ravid, U.; Matasyoh, J.C.; Deng, A.L.; Omolo, E.O.; Kariuki, S.T.; Shaaya, E. *J. Stored Prod. Res.* **2008**, *44*(4), 328–334.
- <sup>36</sup> Keita, S.M.; Vincent, C.; Schmit, J.P.; Arnason, J.T.; Belanger, A. *J. Stored Prod. Res.* **2001**, *37*, 339–349.
- <sup>37</sup> Maurya, P.; Sharma, P.; Mohan, L.; Batabyal, L.; Srivastava, C.N. *J. Asia. Pac. Entomol.* **2009**, *12*, 113–115.
- <sup>38</sup> Rozman, V.; Kalinovic, I.; Korunic, Z. *J. Stored Prod. Res.* **2007**, *43*, 349–355.
- <sup>39</sup> Shaaya, E.; Kostjukovski, M.; Eilberg, J and Sukprakarn, C. *J. Stored Prod. Res.* **1997**, *33*, 7–15.



## *Conclusion Générale*

## Conclusion Générale

Le travail que nous avons entrepris porte sur l'étude chimique et biologique de l'huile essentielle de basilic « *Ocimum basilicum* L. » d'Egypte extraite par hydro-distillation et micro-ondes. Le but visé est d'effectuer une comparaison en termes de cinétique d'extraction, de rendement, de propriétés physico-chimiques, de composition chimique,...et d'activité biologique de l'HE des feuilles brisées du basilic isolée par hydro-distillation (HD) et par extraction sans solvant assistée par micro-ondes « Solvent Free Microwave Extraction (SFME) ».

De la synthèse bibliographique exposée, il ressort que les HEs, métabolites secondaires des végétaux supérieurs, peuvent être obtenues à partir des différentes parties de la plante (feuilles, fleurs, fruits,...et plante entière) par diverses et multiples procédés d'une part classiques et récentes, d'autre part. Les techniques d'extraction innovantes assistées par micro-ondes s'avèrent plus performantes et plus économiques que les traditionnelles.

Le bilan de nos expériences sur les rendements en HE de basilic recueillie par SFME a permis l'obtention des HEs avec des rendements similaires à ceux obtenus par HD (0,48%). Ces résultats sont rentables du fait que la durée d'une SFME n'excède pas 30 minutes alors que l'hydro-distillation nécessite deux fois plus de temps, soit une heure pour épuiser la plante en HE et atteindre le même rendement.

La détermination des propriétés physico-chimiques (densité, indice de réfraction et solubilité) et organoleptiques des deux essences issues des deux méthodes d'extraction HD et SFME a fourni des valeurs conformes aux normes de commercialisation des HEs établies par les différentes pharmacopées et proches des données de la littérature. Aussi, aucune divergence des caractéristiques des deux huiles obtenues par les deux méthodes n'a été observée. Cependant les deux méthodes d'extraction ont fourni une essence de couleur et d'odeur différente. En effet, la SFME a donné lieu à une essence de couleur plus légère et d'odeur agréable par rapport à celle obtenue par HD.

La composition chimique des essences isolées, a été établie à l'aide des méthodes chromatographiques et spectroscopiques CG/DIF et CG/SM. L'HE de basilic qu'elle soit extraite par HD ou SFME est constituée par un nombre de composés aromatiques identiques (65 composés). Le linalol et le méthylchavicol sont les composés majoritaires des HEs quel que soit la méthode d'extraction HD ou SFME. Toutefois, leur proportion varie en fonction du type d'extraction utilisée. Le linalol est présent à hauteur de 48,4% dans l'HE obtenue par HD et à hauteur de 43,5% dans celle obtenue par SFME. Le méthylchavicol est également largement présent dans les deux huiles de basilic à hauteur de 14,3% pour HD et 13,3% pour SFME.

Les tests d'activité antimicrobienne réalisés *in vitro* ont permis d'évaluer l'activité des essences des feuilles du basilic sur quatre souches bactériennes et une levure par la méthode

de diffusion sur milieu solide et la méthode des dilutions. Les résultats, obtenus par la technique des disques, ont montré que cette essence présente une grande activité vis-à-vis de toutes les souches microbiennes testées : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus* et *C. albicans*. L'activité antimicrobienne de l'HE d'*O. basilicum* peut être attribuée à la présence d'une teneur élevée en linalol et en méthylchavicol. Cependant l'huile extraite par micro-ondes est beaucoup plus active que celle isolée par hydro-distillation, ce qui pourrait être attribué à des teneurs élevées en (*E*)-Cinnamate de méthyle, méthyleugénol, eugénol, et d'autres composés oxygénés présents dans l'HE-SFME. Ceux de la technique des dilutions ont permis de déterminer les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'HE de basilic extraite par HD et SFME.

En outre, l'évaluation de l'activité antioxydante par le test de piégeage du radical libre DPPH, et de l'effet de chauffage par la détermination des matériaux polaires totaux (TPM) a montré que les deux essences de basilic extraite par HD et SFME ont un pouvoir antioxydant modéré et un impact sur la durée de vie de l'huile d'olive (HO). Cependant la SFME a indiqué une meilleure activité antioxydante et a offert une stabilité améliorée à l'HO. Cette activité antioxydante de l'HE d'*O. basilicum* peut être due à la forte teneur en composés oxygénés (linalol, méthyleugénol et eugénol) et d'autres composés minoritaires dans sa composition chimique.

Par ailleurs, les tests de l'activité insecticide ont permis d'évaluer le potentiel toxique des essences des feuilles d'*O. basilicum* encapsulées par lyophilisation « freeze-drying » contre trois principaux ravageurs des denrées stockées par effet contact direct et par effet ingestion. Les capsules des deux HEs extraites par HD et SFME se sont montrées plus efficaces vis-à-vis de *R. dominica* que sur *S. oryzae*, excepté *T. castaneum* qui s'est révélé très résistante. Néanmoins, il convient de signaler que l'HE-SFME provoque une mortalité plus importante par rapport à l'HE-HD. Ce résultat peut s'expliquer par la grande proportion des principaux composés de l'HE d'*O. basilicum* encapsulée (linalol et méthylchavicol) et d'autres composés oxygénés. A noter que l'encapsulation par lyophilisation constitue un réel potentiel pour la conservation de la qualité et de la durabilité de l'HE et pour l'augmentation de sa toxicité contre les insectes.

Enfin, l'étude que nous avons réalisée montre que la technique SFME constitue une technologie verte qui offre des avantages significatifs par rapport à l'hydro-distillation traditionnelle : économique, écologique et rentable. Ainsi, ce procédé innovant constitue une approche respectueuse de l'environnement et semble être une bonne alternative pour l'extraction de l'HE de basilic qui peut être considérée comme un agent conservateur très prometteur pour l'industrie alimentaire capable d'empêcher l'oxydation des aliments et de réduire la croissance mycélienne responsable de l'altération des aliments.

En perspectives, il serait intéressant d'étendre l'activité antimicrobienne à d'autres souches bactériennes et fongiques, de mettre en évidence l'activité antioxydante avec d'autres méthodes et d'évaluer l'activité insecticide contre d'autres insectes ravageurs des denrées alimentaires stockées.

# *Annexes*

*Annexe 1 : Notions fondamentales de l'extraction des substances bioactives par micro-ondes*

*Annexe 2 : Liste des structures des constituants identifiés dans l'essence de basilic étudiée*

*Annexe 3 : Glossaire*

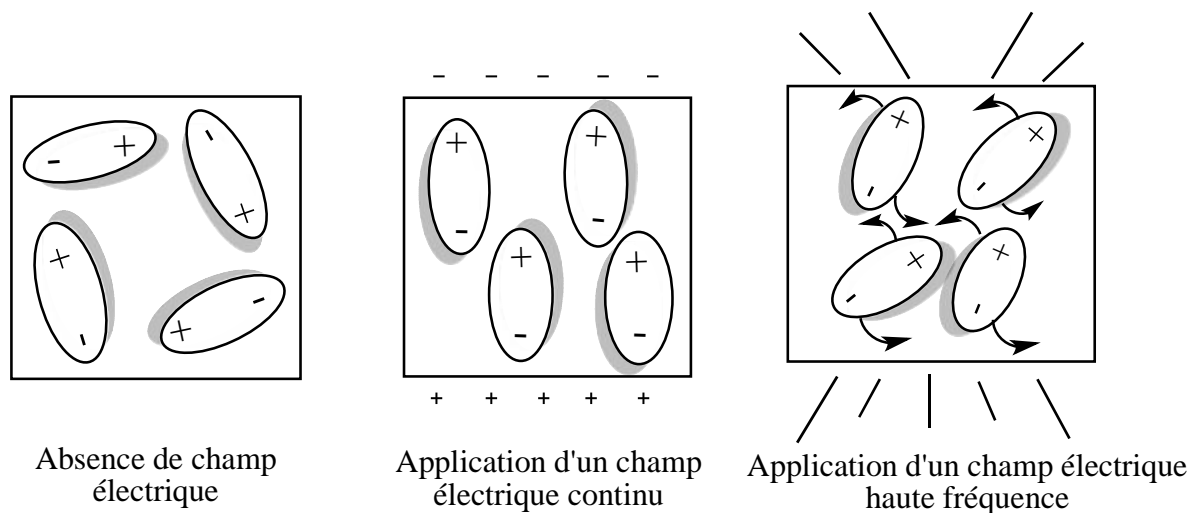
## **Annexe 1** : *Notions fondamentales de l'extraction des substances bioactives par micro-ondes<sup>1,2</sup>*

Les micro-ondes ou hyperfréquences sont des ondes électromagnétiques qui occupent une bande de fréquence de trois décades de 300 GHz à 300 MHz. La fréquence la plus utilisée est 2450 MHz, ce qui correspond à une longueur d'onde dans l'air à 12,2 cm.

### **Interaction onde – matière**

Le chauffage par micro-ondes résulte de la dégradation en chaleur de l'énergie d'une onde électromagnétique au sein du matériau, contrairement au chauffage des techniques classiques qui utilisent la convection ou la conduction pour amener l'énergie dans un matériau. Un matériau sensible aux micro-ondes est un matériau diélectrique absorbant ou atténuant les ondes électromagnétiques.

Le mécanisme du chauffage micro-ondes repose sur le fait que les molécules polaires, telle que l'eau, ont des extrémités négatives et positives : ce sont des dipôles. En l'absence de champ électrique, les dipôles d'un milieu diélectrique se trouvent orientés au hasard sous l'effet de l'agitation thermique du milieu. Sous l'effet d'un champ électrique continu, les molécules tendent à s'orienter dans la direction du champ électrique. Sous l'effet d'un champ électrique alternatif de fréquence, les dipôles s'orientent dans la direction du champ sur une demi-alternance, se désorientent lorsque le champ s'annule et se réorientent dans l'autre sens pendant la seconde demi alternance : c'est la rotation dipolaire (Figure 1).



**Figure 1** : *Distribution des dipôles sous l'effet du champ électrique.*

L'énergie électrique est convertie en énergie cinétique par la rotation des dipôles. L'énergie cinétique est transformée partiellement en chaleur : l'alignement des dipôles par rapport au champ électrique est contrarié par les forces d'interaction entre molécules (les

<sup>1</sup> Chemat, F.; Marie E. Lucchesi, M.E. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.* **2005**, 20, 77–99.

<sup>2</sup> Farhat, A. « *Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application* », Thèse de doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès, Avignon, France **2010**.

forces de liaison par pont hydrogène et les forces de liaisons de Van der Waals). Ces forces peuvent être assimilées à des forces de frottement internes qui existent dans les contacts solide-solide. Elles s'opposent ainsi à la libre rotation des molécules. De la friction produite, naît le dégagement de chaleur. La dissipation d'énergie par le produit peut être maximale si la fréquence du champ électrique est égale à la fréquence de relaxation. Le phénomène de relaxation correspond à l'apparition d'un déphasage entre l'oscillation du champ électrique et celui des dipôles. Les fréquences micro-ondes étant imposées, l'échauffement d'un produit avec une efficacité maximale est exceptionnel. Dans ce cas, une grande partie des molécules soumises à l'action du champ micro-ondes ne tourne pas avec le changement alternatif du champ mais frissonne.

#### **Four à micro-ondes**

Un four à micro-ondes est constitué de trois éléments principaux :

- Le générateur micro-ondes, qui produit des ondes électromagnétique;
- Le guide d'onde, dont le rôle est d'amener les ondes électromagnétiques depuis le générateur vers l'enceinte d'application;
- La cavité micro-ondes ou l'applicateur dans lequel est placé le produit à traiter.

##### **• Générateur**

Le magnétron est le type de générateurs d'ondes le plus répandu pour la production des ondes électromagnétiques. Il peut se voir comme le véritable « cœur » du four à micro-ondes. Il s'agit en effet du moyen de production par excellence de ces ondes. Le magnétron est un tube à vide circulaire qui est constitué d'une cathode centrale, chauffée par un filament, et d'une anode concentrique composée de cavités résonnantes de formes différentes selon le magnétron. Le magnétron fait intervenir deux types « d'influence » : celle du champ magnétique, produit par les aimants, et celle du champ électrique, entre l'anode et la cathode. Sous l'influence conjuguée des champs électrique et magnétique, les électrons émis par la cathode s'éloignent de la cathode (portée à un potentiel négatif élevé) en suivant un parcours incurvé en direction de l'anode. Les électrons ainsi accélérés rayonnent de l'énergie sous la forme d'ondes électromagnétiques.

##### **• Guide d'onde**

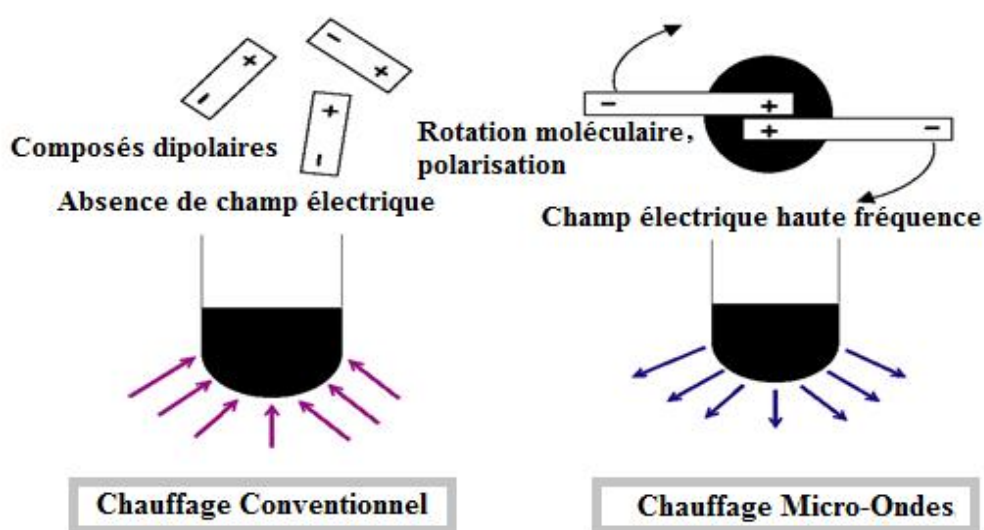
Le guide d'onde est une pièce métallique qui conduit les ondes depuis le générateur jusqu'à l'applicateur. Le guide est généralement un tube métallique ou un conducteur cylindrique de dimensions bien précises dans lequel se trouvent des ondes progressives. Ces dimensions conditionnent le mode de propagation des ondes électromagnétiques. Deux modes de propagation peuvent exister : le mode transverse électrique (TE) et le mode transverse magnétique (TM). Dans le cas d'un guide de mode TE, le champ électrique n'existe pas dans la direction de propagation de l'onde ( $E_z=0$ ), de même pour le guide de mode TM, le champ magnétique n'existe pas dans la direction de propagation de l'onde ( $H_z=0$ ).

- **Applicateur**

L'applicateur est une cavité fermée qui doit assurer le transfert de l'énergie électromagnétique depuis la sortie du guide jusqu'au produit à traiter. Deux grandes catégories d'applicateurs existent : les applicateurs *monomodes* et les applicateurs *multi-modes*. Un applicateur est dit *monomode* lorsque ses dimensions géométriques sont choisies de telle sorte qu'à la fréquence de travail, il n'existe qu'une configuration de champ. L'énergie électromagnétique emprisonnée se réfléchit sur les parois et donne lieu à des ondes stationnaires. Ce type d'applicateur permet ainsi le contrôle précis du champ électrique, il est cependant réservé aux matériaux de petit volume. L'applicateur *multi-mode* consiste en une cavité suffisamment grande afin qu'il existe plusieurs types de configuration de champ. Le champ électrique n'y est pas stable comme dans une cavité *monomode* et sa distribution varie. Il est préférable donc d'utiliser des applicateurs *multi-modes* pour le traitement des volumes importants, et des matériaux dont les paramètres électriques et magnétiques varient peu.

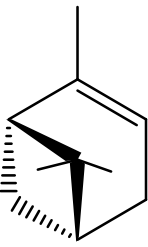
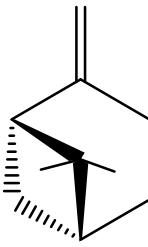
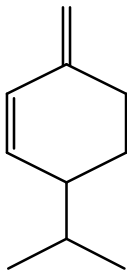
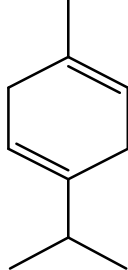
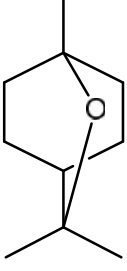
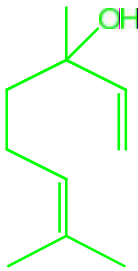
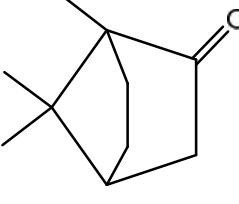
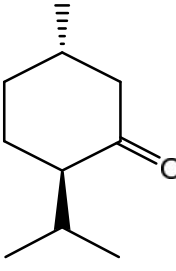
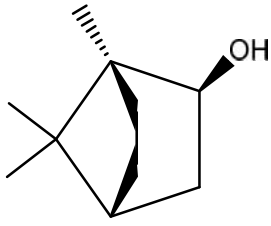
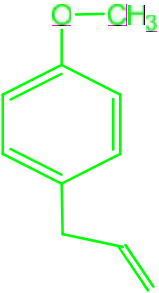
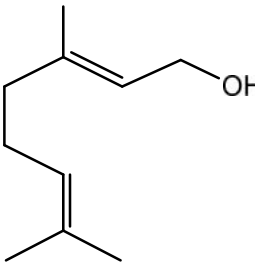
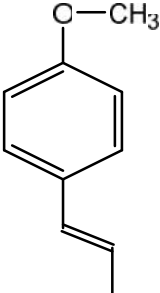
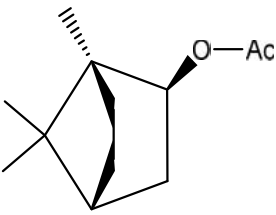
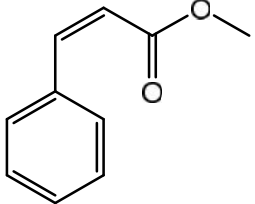
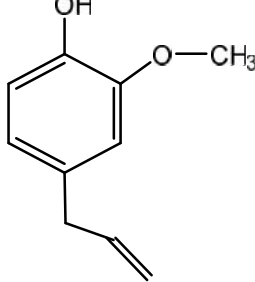
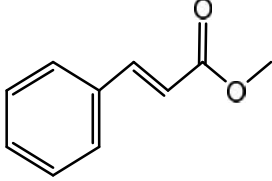
### Spécificité du chauffage micro-onde

Le mode de chauffage par micro-ondes est complètement inversé par rapport au chauffage conventionnel. Le transfert de chaleur classique se transmet de l'extérieur vers l'intérieur du récipient. Sous chauffage micro-ondes, on parle de dégagement de la chaleur de l'intérieur vers l'extérieur du récipient et le volume traité devient lui-même source de chaleur. Compte-tenu de la particularité des micro-ondes, les parties les plus froides se trouveront en surface et en paroi du réacteur, contrairement à ce que l'on peut observer par les techniques de chauffage classique pour lesquelles les parois constituent les zones de températures les plus élevées. C'est un mode de chauffage instantané en volume et non en surface. Les phénomènes thermiques de conduction et de convection ne jouent plus qu'un rôle secondaire d'équilibrage de la température. La figure 2 illustre les deux modes de chauffage.

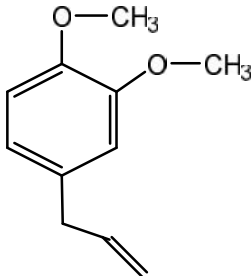
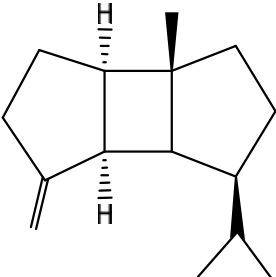
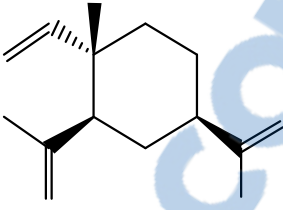
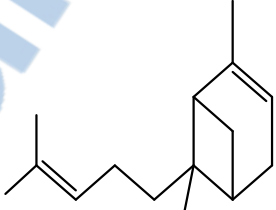
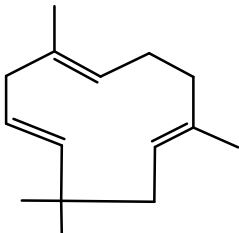
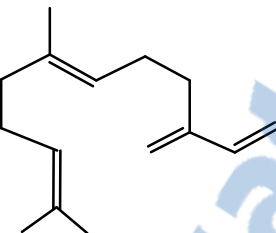
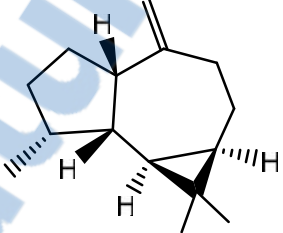
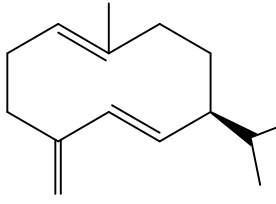
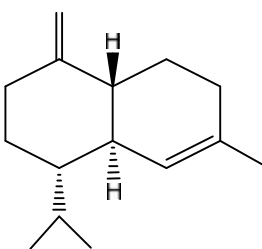
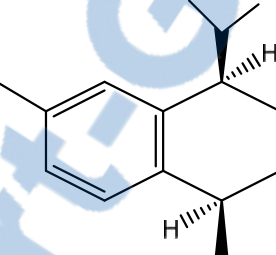
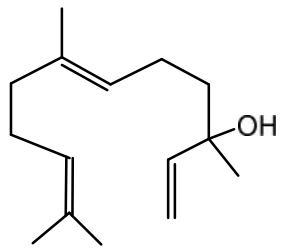
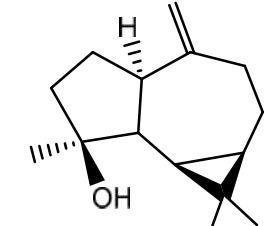
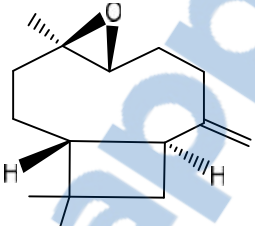
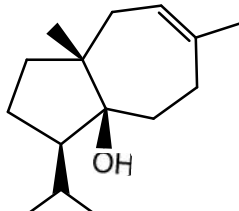
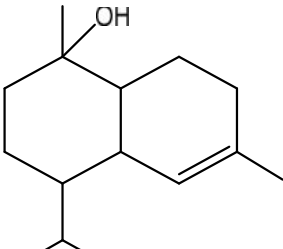
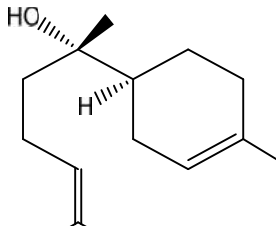


**Figure 2 :** Transfert de chaleur sous chauffage classique et sous chauffage par micro-onde.

**Annexe 2** : Liste des structures des constituants identifiés dans l'essence de basilic étudiée

			
$\alpha$ -Pinène	$\beta$ -Pinène	$\beta$ -phellandrène	$\gamma$ -Terpinène
<b>Composé N° 3</b>	<b>Composé N° 6</b>	<b>Composé N° 7</b>	<b>Composé N° 9</b>
			
1,8-Cinéole	Linalol	Camphre	Menthone
<b>Composé N° 11</b>	<b>Composé N° 12</b>	<b>Composé N° 13</b>	<b>Composé N° 14</b>
			
Bornéol	Méthylchavicol	Géraniol	Anéthol
<b>Composé N° 15</b>	<b>Composé N° 16</b>	<b>Composé N° 23</b>	<b>Composé N° 25</b>
			
Acétate de bornyle	(Z)-Cinnamate de méthyle	Eugénol	(E)-Cinnamate de méthyle
<b>Composé N° 26</b>	<b>Composé N° 27</b>	<b>Composé N° 29</b>	<b>Composé N° 30</b>



 <p>Méthyleugénol</p> <p><b>Composé N° 31</b></p>	 <p>β-Bourbonène</p> <p><b>Composé N° 33</b></p>	 <p>β-Elémène</p> <p><b>Composé N° 34</b></p>	 <p>α-Bergamotène</p> <p><b>Composé N° 39</b></p>
 <p>α-Humulène</p> <p><b>Composé N° 40</b></p>	 <p>β-Farnésène</p> <p><b>Composé N° 42</b></p>	 <p>Alloaromadendrene</p> <p><b>Composé N° 45</b></p>	 <p>Germacrène D</p> <p><b>Composé N° 46</b></p>
 <p>γ-Cadinène</p> <p><b>Composé N° 48</b></p>	 <p>Calaménène</p> <p><b>Composé N° 49</b></p>	 <p>Nérolidol</p> <p><b>Composé N° 51</b></p>	 <p>Spathuléol</p> <p><b>Composé N° 52</b></p>
 <p>Oxyde de Caryophyllène</p> <p><b>Composé N° 53</b></p>	 <p>Carotol</p> <p><b>Composé N° 54</b></p>	 <p>Cadinol</p> <p><b>Composé N° 55</b></p>	 <p>α-Bisabolol</p> <p><b>Composé N° 58</b></p>

### **Annexe 3 : Glossaire**

Abiotique : où la vie est impossible.

Aérobies : se dit de micro-organismes qui se multiplient en présence d'oxygène. Un organisme aérobie strict a besoin d'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) pour vivre et se développer.

Aérobiose : condition de vie des micro-organismes dont le métabolisme dépend de la présence de l'air ou de l'oxygène.

Akène : fruit sec au péricarpe non soudé à la graine.

Anaérobie : se dit des micro-organismes qui peuvent vivre sans oxygène.

Analgésique : supprime la douleur.

Androcée : étamines d'une fleur.

Anti-allergique : protège contre les allergies.

Antibactérien : inhibe et détruit les bactéries.

Antidiabétique : protège contre le diabète.

Antifongique : actif contre les champignons et les levures parasites.

Anti-inflammatoire : qui combat les inflammations.

Antioxydant : permet aux aliments de résister à l'oxydation et à une détérioration graduelle.

Antiseptique : détruit les microbes et empêche leur développement.

Antispasmodique : lutte contre les spasmes.

Antiviral : toute substance active contre les virus.

Apéritif : boisson le plus souvent alcoolisée prise avant le repas.

Aromate : tout parfum d'origine végétale utilisé en médecine, en parfumerie ou en cuisine.

Arthrite : inflammation d'une articulation.

Arthropoda : arthropodes — du grec arthron « articulation » et podos « pied », aussi appelés « articulés » — sont un embranchement d'animaux dépourvus de colonne vertébrale.

ATPases : ATPases membranaires sont une classe d'enzymes liées au métabolisme énergétique.

Bractée : petite feuille qui recouvre la fleur avant son développement.

Calice : enveloppe extérieure des fleurs.

Carminatif : qui a la propriété d'expulser les gaz intestinaux.

Carpelle : chacune des parties dont l'ensemble constitue une fleur.

Cloisons : membranes qui divisent l'intérieur des fruits et qui forment des loges où sont renfermées les graines.

Cohobage : recyclage de l'eau de distillation à l'aide d'un siphon.

Coléoptère : ordre d'insectes broyeurs dont les ailes supérieures sont cornées.

Condiment : substance dont le parfum prononcé sert à relever la saveur des aliments.

Contraceptif : qui prévient la possibilité de fécondation

Corolle : ensemble des pétales d'une fleur.

Cotylédon : feuille primordiale constitutive de la graine.

Cuticule : membrane qui protège les jeunes pousses et les feuilles des plantes.

Cyme : mode d'inflorescence constitué par axe principal à l'extrémité duquel se trouve une fleur, et qui porte également un ou plusieurs axes latéraux se ramifiant de la même manière.

Dicotylédone : plante munie de deux cotylédons.

Dysenterie : maladie aigüe ou chronique du gros intestin des humains.

Electrophorétique : relatif à l'électrophorèse, qui est une technique de séparation et de caractérisation des molécules, en présence d'un champ électrique ou de particules chargées.

Elytres : ailes supérieures cornées des insectes Coléoptères.

Etamines : organe mâle de la reproduction chez les végétaux.

Flatulence : gaz intestinaux.

Gamopétale : se dit d'une fleur à pétales soudés.

Glomérule : mode d'inflorescence où les fleurs sont très rapprochées l'une de l'autre.

Gynécée : ensemble des organes reproducteurs femelles de la fleur.

Inoculation : introduction d'un micro-organisme dans un milieu de culture.

Insecticide : détruit les insectes nuisibles.

Lancéolée : se dit d'une feuille qui a la forme de fer de lance.

Larve : premier état des insectes.

Larvicide : produit destiné à détruire les larves des insectes.

Magnoliophyta : aussi connu sous le nom des Angiospermes, représente la division des plantes qui comprend des plantes à fleurs, et les végétaux qui portent des fruits.

Magnoliopsida : un nom botanique pour une classe de plantes à fleurs.

Mandibule : pièces mobiles de la bouche des insectes qui servent à la mastication.

Nymphe : insecte qui a quitté l'état de larve mais n'est pas encore à l'état parfait.

Oblongue : plus long que large.

Paddy : riz non décortiqué.

Pédoncule : queue d'une fleur ou d'un fruit.

Péritriche : qui a des flagelles tout autour de la cellule.

Phanérogame : plante à fleurs.

Phytophage : nourriture constituée de matière végétale.

Piriforme : forme d'une poire.

Pronotum : partie dorsal du prothorax de certains insectes.

Saprophyte : organisme capable de se nourrir de matière organique non vivante par l'intermédiaire d'une membrane, suite à une réaction enzymatique libérant les nutriments présents dans la matière à ingérer.

Sépales : éléments en forme de feuille, généralement verts, dont la réunion compose le calice et supporte la corolle de la fleur.

Septicémie : infection généralisée de l'organisme, due à des micro-organismes pathogènes de type bactérien.

Spermaphyte : plante qui se reproduit par des graines.

Stigmate : extrémité supérieure du pistil d'une fleur.

Stomachique : lutte contre les maux d'estomac.

Tonique : donne de la force, de l'énergie.

Vermifuge : remède qui a la propriété d'expulser les vers intestinaux.

Verticille : groupe de fleurs ou de feuilles attachées au même niveau que la tige.

Les préoccupations écologiques et économiques actuelles ont incité les scientifiques à concevoir et à mettre au point des techniques innovantes, répondant aux critères de chimie verte et de développement durable, pour l'extraction des produits bioactifs.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME) et l'hydro-distillation (HD) pour extraire l'huile essentielle (HE) des feuilles brisées du basilic d'Egypte "*Ocimum basilicum* L."

Les deux huiles isolées soit par le procédé innovant SFME ou la technique classique HD ont fait l'objet d'une étude comparative, en termes de cinétique d'extraction, de rendement, de propriétés physico-chimiques, de composition chimique,... et d'activités antimicrobienne, antioxydante et insecticide.

La SFME s'est avérée très efficace, permettant une réduction considérable du temps d'extraction (30 min pour SFME contre 60 min pour HD), en fournissant une huile avec des rendements similaires (0,48%) à ceux de la conventionnelle HD.

Les propriétés physico-chimiques des deux essences, conformes à ceux de la littérature, ne présentent pas de grandes différences.

L'application de la chromatographie couplée à la masse (CG/SM) a indiqué qu'il n'y avait pas un écart significatif entre les constituants d'HE-HD et ceux HE-SFME. Le linalol et le méthylchavicol représentent les composés majoritaires des deux essences avec un pourcentage de (48,4% par HD; 43,5% par SFME) et (14,3% par HD; 13,3% par SFME) respectivement.

Les tests effectués *in vitro* sur quelques espèces bactériennes à *Gram-positif* et à *Gram-négatif* et une levure, par la méthode de diffusion sur disque et la méthode des dilutions, révèlent que les HEs de basilic obtenues par HD ou SFME présentent une forte activité antimicrobienne.

L'activité antioxydante déterminée par le test de piégeage du radical libre DPPH a montré que les deux HEs de basilic ont un pouvoir antioxydant modéré. Aussi, la mesure de la teneur en matériaux polaires totaux (TPM) par la méthode du test de friture a révélé que l'HE de basilic isolée par SFME a offert à l'huile d'olive une grande stabilité.

En outre, les tests de l'activité insecticide évaluée par effet de toxicité par contact direct et par ingestion, confirment que les HEs de basilic encapsulées en poudre par la technique de lyophilisation sont plus efficaces contre *R. dominica* que *S. oryzae*, à l'exception de *T. castaneum* qui s'est montré très résistante.

Ainsi la SFME, technologie verte, s'avère une meilleure alternative pour l'extraction de l'HE de basilic qui peut être considérée comme une source d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens pour la conservation des aliments.

Mots clés : Basilic (*Ocimum basilicum* L.), micro-ondes, hydro-distillation, huiles essentielles, analyse CG/SM, composition chimique, activité antioxydante, matériaux polaires totaux (TPM), activité antimicrobienne, lyophilisation, activité insecticide.