

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	2
----------------------------	---

PREMIERE PARTIE : Etude Chimique des Huiles Essentielles de Coriandre, de Fenouil et de Persil

CHAPITRE 1 : Revue bibliographique sur les huiles essentielles

1. Introduction	5
2. Généralités sur les huiles essentielles	5
3. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	6
3.1. Distillation	7
3.1.1. Hydrodistillation	7
3.1.2. Entrainement à la vapeur d'eau	7
3.1.3. Distillation par les solvants organiques	7
3.2. Distillation assistée par micro-ondes ou ultrasons11, ...	8
3.2.1. Extraction par micro-ondes	8
3.2.2. Extraction par ultrasons	8
3.3. Enfleurage	8
3.4. Expression	9
3.5. Incision	9
4. Composition chimique des H.Es	9
4.1. Terpènes	9
4.2. Composés aromatiques	11
4.3. Composés d'origine variée	11
5. Biosynthèse des constituants des H.Es	12
5.1. Biosynthèse des terpènes	12
5.2. Biosynthèse des phénylpropanoïdes	16
6. Propriétés des huiles essentielles	17
6.1. Rôle des huiles essentielles chez les plantes	17
6.2. Propriétés biologiques	18
6.3. Propriétés médicinales	19
7. Toxicité des huiles essentielles.....	19
8. Principaux domaines d'application	19
8.1. Aromathérapie	20
8.2. Agro-alimentaire	20
8.3. Cosmétologie et parfumerie	20
8.4. Pharmacie	20
9. Conclusion	21

CHAPITRE 2 : Propriétés physico-chimiques de coriandre, de fenouil et de persil

1. Introduction.....	23
2. Etude botanique des plantes : Coriandre, Fenouil et Persil	23
2.1. Répartition géographique.....	23
2.2. Classification et systématique.....	24
2.3. Description botanique des plantes	24
2.3.1. La coriandre	24
2.3.2. Le fenouil	26
2.3.3. Le persil	27
3. Usages et propriétés thérapeutiques.....	27
4. Matériel végétal	30
5. Extraction par dispositif d'hydrodistillation	30
6. Détermination des indices physico-chimiques des H.Es extraites.....	31
6.1. Propriétés physiques	31
6.1.1. Caractéristiques organoleptiques	31
6.1.2. Détermination de pH.....	32
6.1.3. Densité relative	32
6.1.4. Pouvoir rotatoire	33
6.1.5. Indice de réfraction	33
6.1.6. Miscibilité à l'éthanol	34
6.2. Propriétés chimiques.....	34
6.2.1. Indice d'acide (Ia)	34
6.2.2. Indice d'ester (Ie).....	34
6.2.3. Indice de carbonyle (Ic)	35
6.2.4. Indice d'iode (Ii)	36
7. Résultats et discussion	37
7.1. Propriétés physiques	37
7.2. Propriétés chimiques.....	38
8. Conclusion	40

CHAPITRE 3 : Analyse chromatographique des huiles essentielles extraites

1. Introduction.....	42
2. Chromatographie en phase gazeuse CPG	42
3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masseCPG/MS	43
3.1. CPG/MS en mode impact électronique CPG/MS-IE.....	43
3.2. CPG/MS en mode ionisation chimique CPG/MS-IC.....	43
4. Résultats et discussion	45
4.1. Huile essentielle de coriandre	45
4.1.1. Essence des graines de coriandre	45
4.1.2. Essence de coriandre fraîche.....	58
4.1.3. Comparaison de la composition chimique de l'H.E de coriandre avec les essences étrangères	71
4.2. Huile essentielle de fenouil	74
4.2.1. Essence des graines de fenouil.....	74
4.2.2. Essence des bulbes de fenouil.....	80
4.2.3. Comparaison entre la composition chimique de l'H.E de fenouil avec les essences étrangères	83
4.3. Huile essentielle de persil	85
4.3.1. Essence des graines de persil	85
4.3.2. Essence de persil frais.....	94
4.3.3. Comparaison entre la composition chimique de l'H.E de persil avec les essences étrangères	102
4. Conclusion	104

**DEUXIEME PARTIE : Etude Biologique des Huiles Essentielles de Coriandre,
de Fenouil et de Persil**

CHAPITRE 1' : Activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites

1. Introduction.....	106
2. Généralités sur les souches testées.....	107
2.1. Les moisissures	107
2.1.1. Le genre Aspergillus	107
2.1.2. Le genre Fusarium	108
2.1.3. Le genre Penicillium	108
2.2. Les bactéries pathogènes étudiées	108
2.2.1. Bactéries à Gram négatif.....	108
2.2.1.1. Le genre Escherichia.....	108
2.2.1.2. Le genre Pseudomonas	109
2.2.2. Bactéries à Gram positif.....	109
3. Activité antimicrobienne.....	110
3.1. Mode d'action des huiles essentielles.....	110
3.2. Matériel et méthodes.....	111
3.2.1.Souches testées.....	111
3.2.2. Tests de confirmation des souches.....	111
3.2.3. AntibioGramme	112
3.2.4. Tests de l'activité antimicrobienne	113
3.2.4.1. Méthode de diffusion ou des chromatogrammes	113
3.2.4.2. Méthode des micro-atmosphères	114
3.2.4.3. AntibioGramme sur milieu liquide (micro-dilution)	115
4. Résultats et discussion	116
4.1. Résultats de l'AntibioGramme	116
4.2. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	117
4.3. Détermination de la CMI et la CMB en milieu liquide	121
4.4. Evaluation de l'activité antifongique	133
4.4.1. Méthode des disques	133
4.4.2. Sensibilité des souches fongiques aux composés volatils des H.Es	136
5. Conclusion	140

CHAPITRE 2' : Effet des huiles essentielles sur les bactéries lactiques

1. Introduction.....	142
2. Bactéries lactiques	142
2.1. Déroulement de la croissance des bactéries lactiques.....	143
2.1.1. Indicateurs de croissance	143
2.1.2. Phases de la cinétique de croissance.....	143
2.2. Utilisation des bactéries lactiques dans l'industrie	145
2.3. Effets des bactéries lactiques sur la santé	145
3. Matériel et méthodes.....	145
3.1. Etude de l'activité des H.Es de fenouil et de persil sur la cinétique de croissance de Lactobacillus bulgaricus et Streptococcus thermophilus.....	145
3.1.1. Souches lactiques utilisées.....	145
3.1.2. Préparation du ferment lactique	145
3.1.3. Isolement des souches lactiques.....	146
3.1.3.1. Isolement de Streptococcus thermophilus	146
3.1.3.2. Isolement de Lactobacillus bulgaricus.....	146
3.1.4. Identification des souches lactiques.....	146
3.1.5. Fixation de la dose d'huile essentielle	147
3.1.6. Détermination de l'effet des huiles essentielles.....	147
3.1.7. Dosages analytiques.....	147
3.1.7.1. Détermination du pH et de l'acidité.....	147
3.1.7.2. Dosage des sucres totaux par la méthode de Dubois	147
3.1.7.3. Dénombrement de Lactobacillus bulgaricus et Streptococcus	148
thermophilus	148
3.2. Etude de l'activité des H.Es des graines de fenouil et de persil sur la cinétique de production d'acide lactique par Lactobacillus rhamnosus.....	148
3.2.1. Microorganisme et milieu de culture	149
3.2.2. Méthodes et conditions de fermentation	149
3.2.3. Méthodes d'analyse	149
3.2.4. Calcul des paramètres cinétiques des fermentations.....	150
3.2.5. Rendements en biomasse et en acide lactique	150
3.3. Etude de l'activité des H.Es des graines de fenouil et de persil sur la.....	150
qualité du yaourt étuvé.....	150
3.3.1. Préparation du levain lactique.....	150
3.3.2. Préparation des échantillons de yaourt étuvé.....	150
3.3.3. Méthodes d'analyse physico-chimiques et biochimiques du yaourt.....	152
3.3.3.1. Mesure du pH et de l'acidité.....	152
3.3.3.2. Détermination de la matière sèche (Extrait Sec Total)	152
3.3.3.3. Détermination de la matière grasse par méthode acido-butyrométrique	152
3.3.3.4. Dosage des protéines par la méthode de formol-titration	152
3.3.3.5. Dosage des cendres par calcination	153
3.3.3.6. Dosage des sucres par la méthode de Dubois	153
3.3.3.7. Méthodes d'analyses microbiologiques du yaourt.....	153

3.3.3.7.1. Dénombrement des coliformes totaux et fécaux.....	153
3.3.3.7.2. Recherche des Streptocoques fécaux	154
3.3.3.7.3. Recherche des Staphylococcus aureus	155
3.3.3.7.4. Dénombrement des Clostridium sulfito-réducteurs	155
3.3.3.7.5. Dénombrement des levures et des moisissures	155
3.3.3.7.6. Recherche de Salmonelles	156
3.3.3.7.7. Dénombrement de la flore lactique.....	156
3.3.4. Analyses sensorielles	156
3.3.4.1. Formation du jury	157
3.3.4.2. Epreuve de notation	157
4. Résultats et discussion	157
4.1. Résultats de l'effet des H.Es des graines de fenouil et de persil sur les bactéries lactiques	157
4.1.1. Fixation de la dose de l'huile utilisée	157
4.1.2. Résultats de l'effet de l'ajout de 5µL des H.Es de persil et de fenouil sur les bactéries lactiques.....	159
4.2. Résultats de l'effet des H.Es des graines de fenouil et de persil sur la cinétique de production d'acide lactique par Lactobacillus rhamnosus	163
4.3. Résultats de l'effet des H.Es des graines de fenouil et de persil sur la qualité du yaourt étuvé.....	166
4.3.1. Résultats des analyses de la matière première	166
4.3.1.1. Poudre de lait	166
4.3.1.2. Lait pasteurisé	167
4.3.2. Résultats des analyses physico-chimiques et biochimiques du yaourt	167
4.3.2.1. Acidité titrable	167
4.3.2.2. pH.....	168
4.3.2.3. Extrait Sec Total (EST).....	169
4.3.2.4. Taux de protéines.....	170
4.3.2.5. Taux de cendres	170
4.3.2.6. Taux de sucres.....	171
4.3.2.7. Taux de matières grasses	172
4.3.3. Résultats des analyses microbiologiques	172
4.3.3.1. Résultats des analyses microbiologiques des matières premières	172
4.3.3.2. Résultats des analyses microbiologiques des yaourts étuvés.....	173
4.3.3.3. Résultats du dénombrement des ferments lactiques (Streptococcus thermophilus et Lactobacillus bulgaricus) au cours de la durée de stockage des yaourts étuvés	173
4.3.4. Résultats des analyses sensorielles	175
4.3.4.1. Epreuve de notation sur l'acidité	175
4.3.4.2. Epreuve de notation sur le goût	176
4.3.4.3. Epreuve de notation sur la texture	177
5. Conclusion	177

CHAPITRE 3' : Effet antioxydant des huiles essentielles extraites

1. Introduction.....	180
2. Etude bibliographique.....	180
2.1. Les Antioxydants	180
2.1.1. Historique.....	180
2.1.2. Définition.....	181
2.1.3. Caractéristiques des antioxydants	181
2.1.4. Principaux antioxydants et leurs caractéristiques	181
2.1.4.1. Antioxydants enzymatiques.....	182
2.1.4.2. Antioxydants non enzymatiques	182
2.1.4.3. Antioxydants naturels dans les fruits et légumes.....	182
2.1.4.4. Antioxydants de synthèse et antioxydants naturels	182
De nombreuses molécules naturelles ou de synthèse sont dotées de propriétés antioxydantes antiradicalaires ou préventives pour leur utilisation dans les produits alimentaires. Le choix se porte sur des produits présentant, les caractères suivants :	182
2.1.5. Additifs antioxydants	183
2.1.5.1. Les antioxydants de type I	184
2.1.5.2. Les antioxydants de type II	184
2.1.5.3. Les antioxydants de type III.....	184
2.1.5.4. Les agents synergiques	184
2.1.5.5. Autres types d'antioxydants.....	184
2.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	185
3.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	185
3.2. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH•.....	185
3.2.1. Principe	185
3.2.2. Mode opératoire	186
3.3. Détermination du pourcentage d'inhibition	186
4. Résultats et discussion	186
4.1. Effet antioxydant de l'acide ascorbique et des H.Es des feuilles et.....	186
des graines de coriandre.....	186
4.2. Effet antioxydant des H.Es des feuilles et des graines de persil.....	189
4.3. Effet antioxydant des huiles essentielles des graines de fenouil.....	191
4.4. Détermination de l'index IC50	192
5. Conclusion	193
CONCLUSION GENERALE.....	195
ANNEXE.....	198

ABREVIATIONS

Ac. Asc.	Acide ascorbique
AFNOR	Association Française de Normalisation
AL	acide lactique
ATB	antibiotiques
BHA	2-tert-butyl-p-méthoxyanisole
BHT	2,6-di-tert-butyl-p-hydroxytoluène
BN	bouillon Nutritif
°C	degré Celsius
Cf	feuilles de coriandre
Cg	graines de coriandre
CMB	concentration minimale bactéricide
CMI	concentration minimale inhibitrice
CN	céfalexine
CT	colistine
CZ	céfazoline
°D	degré Dornic
DO	densité optique
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazine
ERO	espèces réactives de l'oxygène
EST	extrait sec total
Fig.	figure
GN	gélose nutritive
H.E	huile essentielle
HEF	huile essentielle de fenouil
HEP	huile essentielle de persil
H.Es	huiles essentielles
I	inhibition
IAvap	Index Antifongique des composés volatils de l'H.E
IE	mode impact électronique
IC ₅₀	concentration nécessaire pour atteindre une disparition de 50% de DPPH•
ICP	ionisation chimique positive
Πp	vitesse spécifique de production d'acide lactique
Lb.	<i>Lactobacillus</i>
m	Masse
M	molarité
MG	matière grasse
MH	Mueller Hinton
MRS	Man, Rogosa et Sharpe
MS	matière sèche
μ	vitesse spécifique de croissance (nombre des cellules produites par heure)
μL	microlitre
nm	nanomètre
N.P.P.	nombre le plus probable
OGA	gélose à l'oxytétracycline
OX	oxacilline
P	pénicilline

PDA	potatoes Dextrose Agar
Pf	feuilles de persil
Pg	graines de persil
QAc	vitesse spécifique de production de l'acidité
Qs	vitesse spécifique de consommation des sucres
Rdt	rendement
rp'''	vitesse volumique de production d'acide lactique
rs'''	vitesse volumique de consommation des sucres
rx'''	vitesse volumique de croissance
S	taux de sucres
SFB	Selenite F Broth
TBHQ	tert-butyl-hydroquinone
TC	taux de cendres
Tg	temps de génération
TIA	toxi-infections alimentaires
Tr	temps de rétention
UFC	unité formant colonies
V	volume
VBL	bouillon lactosé bilié au vert brillant
VF	gélose Viande Foie
X	biomasse
X0	biomasse initiale au temps 0
Yp/s	rendement en produits
Yx/s	rendement en biomasse

Introduction Générale

Introduction Générale

Depuis l'aube de l'humanité, les plantes permettent à l'homme non seulement de se nourrir, se vêtir, se loger, se chauffer, se parfumer ...mais aussi de maintenir son équilibre, soulager ses souffrances, préserver et soigner les maladies qui nuisent à sa santé.

Par ailleurs, les plantes aromatiques et médicinales jouent un rôle économique considérable dans le secteur des industries de l'agroalimentaire, de la parfumerie, des cosmétiques, ...et de la pharmacie¹.

En effet, les plantes représentent une source inépuisable de remèdes traditionnels et efficaces grâce aux principes actifs qu'elles contiennent : alcaloïdes, flavonoïdes, hétérosides, saponosides, quinones, vitamines,...et huiles essentielles².

De nos jours, les huiles essentielles (H.Es) suscitent de plus en plus l'intérêt des chimistes, biologistes,... et médecins en raison de leurs utilisations dans le traitement de certaines maladies infectieuses pour lesquelles les antibiotiques de synthèse deviennent de moins en moins actifs ou dans la préservation des aliments contre l'oxydation comme alternatives aux produits chimiques de synthèse³.

En outre, l'acide lactique et ses dérivés représentent un large éventail d'applications dans les domaines industriels aussi variés que la chimie, la cosmétique, le textile, l'alimentaire, l'électronique, les plastiques... et la pharmacie⁴.

La famille des Apiaceae appelées anciennement ombellifères comprend des plantes alimentaires comme la carotte, le céleri, le fenouil,... et des plantes condimentaires comme le carvi, la coriandre, le cumin,...C'est une famille riche en huile essentielle.

¹ a) Bruneton, J. « *Pharmacognosie* », Plantes médicinales, Ed. Lavoisier, Techniques et Documentation, Paris **1999**, 405; b) Da Cruz-Cabral, L.; Fernandez-Pinto, V.; Patriarca, A. *Int J Food Microbiol.* **2013**, 166, 1-14.

² a) Lafon, J.P.; Thorand Prager, C. et Levy, G. « *Biochimie structurale* » Biologie des plantes cultivées. Tome 1. Lavoisier. TEC. & DOC. **1988**; b) Sallé, J.L. « *Le Totum en Phytothérapie* » Approche de phytothérapie. Ed Frison- Roche. Paris **1991**.

³ 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^{ème} Ed. Porphyre **2007**, 13.

⁴ a) Gupta, A. P.; Kumar, V. *European Polymer Journal* **2007**, 43, 4053-4074; b) Timbuntam, W.; Sriroth, K.; Tokiwa, Y. *Biotechnology Letters* **2006**, 28, 811-814.

Dans la continuité de l'axe de recherche relatif à la valorisation du potentiel aromatique et médicinal des plantes algériennes développé par notre laboratoire⁵, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et biologique des H.Es des graines de coriandre, de fenouil et de persil, ainsi que de la partie aérienne du coriandre et du persil, plantes appartenant à la famille des Apiaceae.

L'objectif de notre étude est d'évaluer les paramètres physico-chimiques des essences de coriandre, de fenouil et de persil extraites par hydro-distillation et de tenter d'identifier leurs principaux constituants chimiques par les méthodes chromatographiques et spectroscopiques. L'évaluation de leurs activités antimicrobiennes et anti-oxydante, ainsi que leurs effets sur les bactéries lactiques seront abordés, afin de justifier l'usage traditionnel de ces plantes par les populations locales.

Notre travail présenté dans ce manuscrit est réparti en deux parties :

La première partie est scindée en trois chapitres :

Le premier chapitre est réservé à une étude bibliographique sur les huiles essentielles. Dans le deuxième chapitre, il sera question de l'extraction des H.Es de coriandre, de fenouil et de persil ainsi que de la détermination de leurs propriétés physico-chimiques.

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

La deuxième partie relative à la valorisation des H.Es obtenues est subdivisée également en trois chapitres :

Le premier chapitre est consacré à la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des essences isolées. L'effet sur la production d'acide lactique par les H.Es de fenouil et de persil fera l'objet du deuxième chapitre. L'évaluation du pouvoir antioxydant des H.Es est traitée dans le troisième chapitre.

Enfin, les chromatogrammes et les spectres de masse des produits de référence ainsi que ceux de la co-injection des H.Es avec les échantillons de référence seront reproduits dans l'annexe.

⁵a) Kambouche, N.; El Abed, D. *J. Essent. oil Res.* Janvier/Février **2003**, 15, 39-4; b) Adamou, Y. *Mémoire de Magister*, Université d'Oran Es-Sénia **2011**.

PREMIERE PARTIE

*Etude Chimique des Huiles Essentielles
de Coriandre, de Fenouil et de Persil*

Chapitre 1

Revue bibliographique sur les huiles essentielles

8. 1. Introduction

Depuis les temps les plus reculés, le monde végétal offre les éléments nécessaires à la survie de l'espèce humaine. En effet, les plantes demeurent la principale source de principes actifs dont le rôle et l'utilisation sont très variés.

Les huiles essentielles, isolées à partir de plantes, constituent l'un des principes actifs des plus importants en raison de leurs multiples et diverses applications.

Avant d'entamer l'étude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil, il nous a paru nécessaire de présenter dans ce premier chapitre un rappel bibliographique sur les huiles essentielles⁶.

2. Généralités sur les huiles essentielles

Les huiles essentielles ou essences végétales sont des produits huileux, volatils, odorants et incolores ou légèrement teintés, obtenus par distillation à la vapeur d'eau, par expression, par incision ou par enfleurage du matériel végétal⁷.

Ces essences végétales sont largement distribuées dans le règne végétal et n'existent que chez les végétaux supérieurs. En effet, elles se trouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces réparties en 60 familles botaniques comme par exemple chez les Lamiacées (lavande, basilic, menthe,...), les Myrtacées (eucalyptus,...), les Lauracées (cannelle et sassafras),...et les Apiacées (coriandre, cumin, fenouil, persil,...)⁸. Les huiles essentielles se trouvent dans tous les organes de la plante : racines, fruits, graines, fleurs, feuilles, écorces, bois, etc... Elles se forment dans des cellules spécialisées, le plus souvent, regroupées en canaux ou en poches sécréteurs et elles sont ensuite transportées dans les différentes parties de la plante, lors de la croissance de cette dernière⁹.

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 passagères¹⁰. Elles se caractérisent par leurs propriétés organoleptiques (odeur, couleur et goût). A la température ambiante, elles sont généralement liquides de densité souvent inférieure à celle de l'eau. Elles sont incolores ou jaune pâle, sauf quelques exceptions comme les H.Es de la cannelle (orange), de l'absinthe (vert) ou de la camomille (bleu).

⁶El Abed, D. et Kambouche, N. « *Les Huiles essentielles* », Editions Dar El Gharb, **2003**.

⁷Budavari, S.; O'Neil, M. J.; Smith, A.; Heckelman, P.E.; Kinneary, J.F. The Merk Index-Twelfth edition, Whitehouse Station : Merk and Co, INC, **1996**, 2350.

⁸Richter, G. « *Métabolisme des végétaux* », Physiologie et Biochimie. Presses polytechniques et universitaires, Romandes, **1993**, 292.

⁹Bernard, T.; Perineau, F.; Bravo, P.; Delmas, M. et Gaset, A. « *Informations chimie* », Oct, **1988**, n° 298, 179.

¹⁰Sallé, J. L. « *Les huiles essentielles; Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie* », Edition Frison – Roche, Paris, **1991**, 21.

Leur indice de réfraction est élevé et le plus souvent elles sont douées de pouvoir rotatoire. On leur attribue différents indices chimiques (indice d'acide, d'ester, de carbonyle,...).

Elles sont peu solubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques (éther, alcool, hexane, pentane,...)¹. Elles dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels. En outre, elles s'oxydent et se polymérisent facilement. Pour éviter cela, il faut les conserver à l'abri de la lumière et de l'air.

3. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles de la matière végétale peut être réalisée au moyen de nombreux et divers procédés, basés sur des techniques anciennes :

Distillation, Expression, Enfleurage ou Incision ou plus récentes : extraction sous irradiation micro-ondes ou par ultra-sons¹¹.

La distillation reste la méthode la plus prisée du fait qu'elle est facile à mettre en œuvre. La figure I-1 regroupe les différentes voies d'extraction des huiles essentielles.

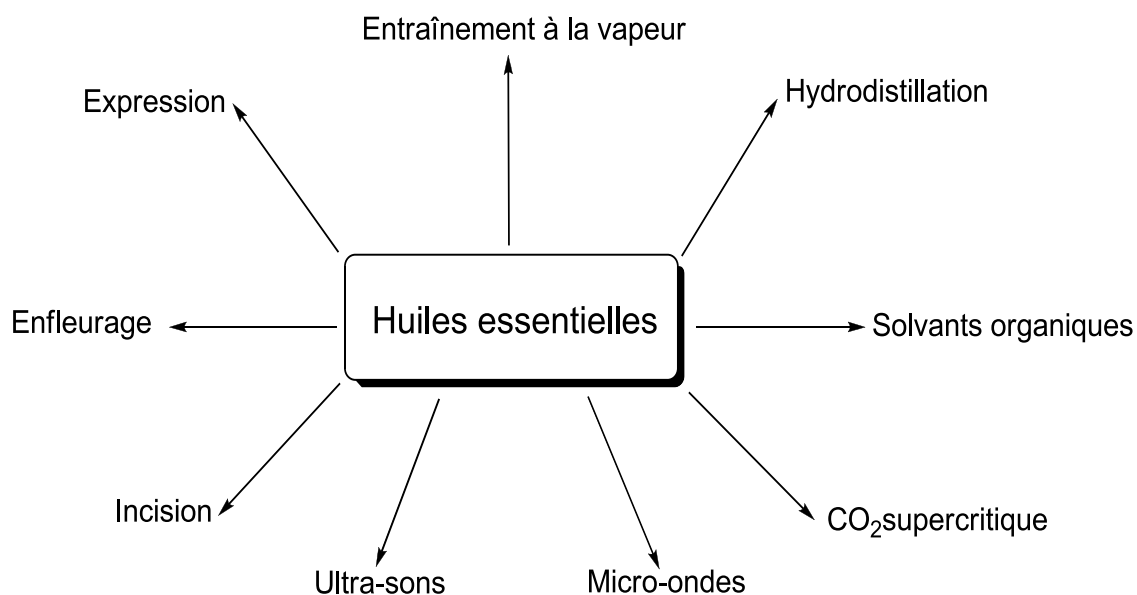


Figure I-1 : Modes d'extraction des huiles essentielles

¹¹Luque de Castro, M.D.; Jiménez-Carmona, M. M. et Ferández-Pérez, V. *Trends Anal. Chem.* **1999**, 18, 708.

3.1. Distillation

3.1.1. Hydrodistillation

C'est la technique la plus simple et la plus répandue. Elle consiste à immerger la matière première directement dans l'eau, puis l'ensemble est porté à ébullition. L'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. Les vapeurs formées sont condensées par un système de réfrigération par courant d'eau.

Lors de la distillation des H.Es, plusieurs phénomènes sont à la base d'échanges de matière entre les phases solide, liquide et vapeur, d'où l'influence d'un grand nombre de paramètres sur la qualité et le rendement de la production de ces essences végétales¹².

Les expérimentations conduites jusqu'à épuisement du substrat en essence montrent que la durée de la distillation est plus longue pour les organes de plantes ligneuses que pour les herbacées. Cette différence est fortement liée à la localisation des systèmes d'élaboration ou de stockage des H.Es qui sont soit à la surface ou à l'intérieur des tissus de la plante. De ce fait, ces structures ont une influence sur le déroulement de l'hydrodistillation, c'est-à-dire sur les mécanismes successifs mis en jeu, et par conséquent sur la durée de l'opération d'extraction.

Dans le cas où ces structures sont superficielles, la membrane externe ou la cuticule sont rapidement rompues lors de l'ébullition, les composés volatils sont immédiatement évaporés. Lorsque les H.Es sont sous-cutanées, elles doivent d'abord diffuser à travers l'épaisseur du tissu végétal avant d'entrer en contact avec l'eau ou sa vapeur pour qu'elles puissent s'évaporer comme dans les sécrétions superficielles.

3.1.2. Entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce type de distillation, la plante est traversée par un courant de vapeurs d'eau qui va tirer les substances volatiles hydrophobes. Après condensation, la séparation se fait par décantation. Cette méthode apporte une amélioration à la qualité de l'H.E en minimisant les altérations hydrolytiques.

3.1.3. Distillation par les solvants organiques

Certaines huiles essentielles ont une densité voisine de l'eau et le procédé par distillation à la vapeur d'eau ne peut être dans ce cas utilisé. Le principe consiste à faire macérer la plante dans le solvant afin de faire passer les substances odorantes dans le solvant.

❖ Solvants issus du pétrole

Ce moyen met en œuvre des solvants organiques comme le pentane, l'hexane, l'heptane,... Il est réservé aux H.Es ayant une densité voisine de celle de l'eau.

¹²Hajji, S.; Beliveau, J.; Simon, D. *Actes - Colloq. Int. Plant. Aromat. Med. Maroc*, **1985**, 229-230.

❖ Forane 113

Le forane 113 ($F_2CCl-CCl_2F$) permet d'extraire un mélange d'H.E et d'huile lipidique en même temps, ce qui permet de valoriser doublement la plante.

❖ Dioxyde de carbone¹³

Dans l'extraction par le dioxyde de carbone liquide ou supercritique, un courant de CO_2 à forte pression fait éclater les poches à essence. Cette méthode est meilleure que l'hydrodistillation en termes de coût, d'économie d'énergie, de rendement et de qualité du produit obtenu du fait que le dioxyde de carbone est incolore, inodore, ininflammable et non toxique.

3.2. Distillation assistée par micro-ondes ou ultrasons^{11,14}

Ces techniques récentes offrent plusieurs avantages significatifs par rapport aux techniques classiques. En effet, elles nécessitent un volume moindre de solvant et un temps de chauffage réduit ce qui évite la perte et la dégradation des composés volatils et thermosensibles. Ainsi, elles conduisent à des rendements plus élevés.

3.2.1. Extraction par micro-ondes¹⁵

L'extraction par micro-ondes consiste à chauffer l'extractant (eau ou solvant organique) mis en contact avec la plante sous l'énergie micro-ondes ce qui permet un chauffage homogène. Ce nouveau procédé d'extraction permet des gains de temps et d'énergie considérables.

3.2.2.Extraction par ultrasons¹⁶

Le matériel végétal mis en contact avec le solvant (eau ou solvant organique) est immergé dans un bain à sonication maintenu à une agitation constante.

3.3. Enfleurage

L'enfleurage est une technique assez difficile. Elle date de l'antiquité égyptienne et est basée sur la forte affinité des molécules odorantes pour les graisses. Elle est réservée principalement aux organes fragiles que sont les fleurs (violette, tubéreuse, jasmin,...). Celles-ci sont étalées délicatement sur des plaques de verre enduites d'une mince couche de graisse et l'on superpose ces plaques sur des châssis de bois. Les substances volatiles diffusent

¹³a) Pellerin, P. *Perfume, Flavor*, **1991**, 16, (07-08), 37; b) Richard, H. et Loo, A. «La fabrication des extraits : extraction par le dioxyde de carbone, in *Epices et Aromates* », (Richard, H., Coordonnateur), Tec. et Doc, Lavoisier, Paris, **1992**, 139; c) Illés, V.; Daoud, H.G.; Perneczki, S.; Sokonya, L. et Then, M. *Journal of Supercritical Fluids*, **2000**, 17, 177.

¹⁴a) Paré, J.R.J. **1992**, CA Pat. 2055 390; b) Camel, V. *Trends in Anal. Chem.* **2000**, Vol. 19, n°4, 229; b) Lucchesi, M. E.; Chemat, F.; Smadja, J. *Journal of Chromatography A* **2004**, 1043, 323-327.

¹⁵Ericsson, M. et Colmsjö, A. *Journal of chromatography A*, **2000**, 877, 141; b) Pourmortazavi, S. M.; Hajimirsadeghi, S.S. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1163, 2-24.

¹⁶Kimbaris, A.C.; Siatis, N.G.; Daferera, D.J.; Tarantilis, P.A.; Pappas, C.S.; Polissiou, M.G. *Ultrasonics Sonochem.* **2006**, 13, 54-60.

et sont absorbées par la couche de graisse. Ensuite ces graisses sont épuisées à l'alcool. Ce procédé a tendance à disparaître car il nécessite une forte main-d'œuvre¹⁷.

3.4. Expression

L'expression ou pression à froid est spécifique à l'extraction des huiles essentielles des agrumes : citrons, oranges, mandarines, etc... C'est une méthode assez simple qui consiste à briser mécaniquement par abrasion les poches à essence localisées au niveau de l'écorce ou du péricarpe du fruit pour en recueillir le contenu¹⁸.

3.5. Incision

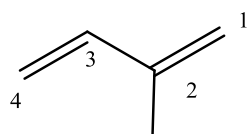
C'est une opération peu fréquente. Il suffit de fendre l'écorce des arbres pour en recueillir le suc comme par exemple le caoutchouc de l'arbre hévéa.

4. Composition chimique des H.Es

La composition chimique des essences est complexe et peut varier selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturales et le mode d'extraction¹⁹. Les H.Es sont un mélange de constituants qui appartiennent à trois catégories de composés : terpéniques, aromatiques et variés.

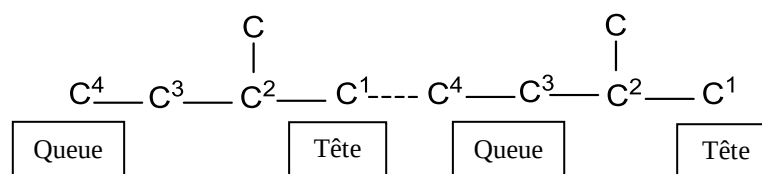
4.1. Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures formés par 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)

Selon le nombre d'unités associées, on distingue : les mono- en (C_{10}) ; les sesqui- en (C_{15}) ; les di- en (C_{20}) ; les tri- en (C_{30}) ; les tétraterpènes en (C_{40}) et les polyterpènes.



¹⁷Seu-Saberno, M.; Blakeway, J. « *La mouse de chêne, une base de la parfumerie* », Pour la science, Edition Française de Scientific American, **1984**, Mai, 83.

¹⁸Willem, J. P. « *Les huiles essentielles, médecine d'avenir* », Ed : Estem, Paris, **2004**, 318.

¹⁹Guignard, J. L. « *Biochimie végétale* », Masson, Paris, **2000**, 166.



Ces unités peuvent se lier entre elles par des liaisons dites irrégulières de type artémésyl, santolinyl, lavandulyl et chrysanthémyl²⁰.

Les huiles essentielles contiennent particulièrement des monoterpènes, des sesquiterpènes et peu souvent de diterpènes²¹.

Les terpènes sont de structures très diverses (acycliques, monocycliques, bicycliques,...) et contiennent la plupart des fonctions chimiques des matières organiques. A titre indicatif, quelques structures de monoterpènes et de sesquiterpènes sont représentées sur la figure I-2.

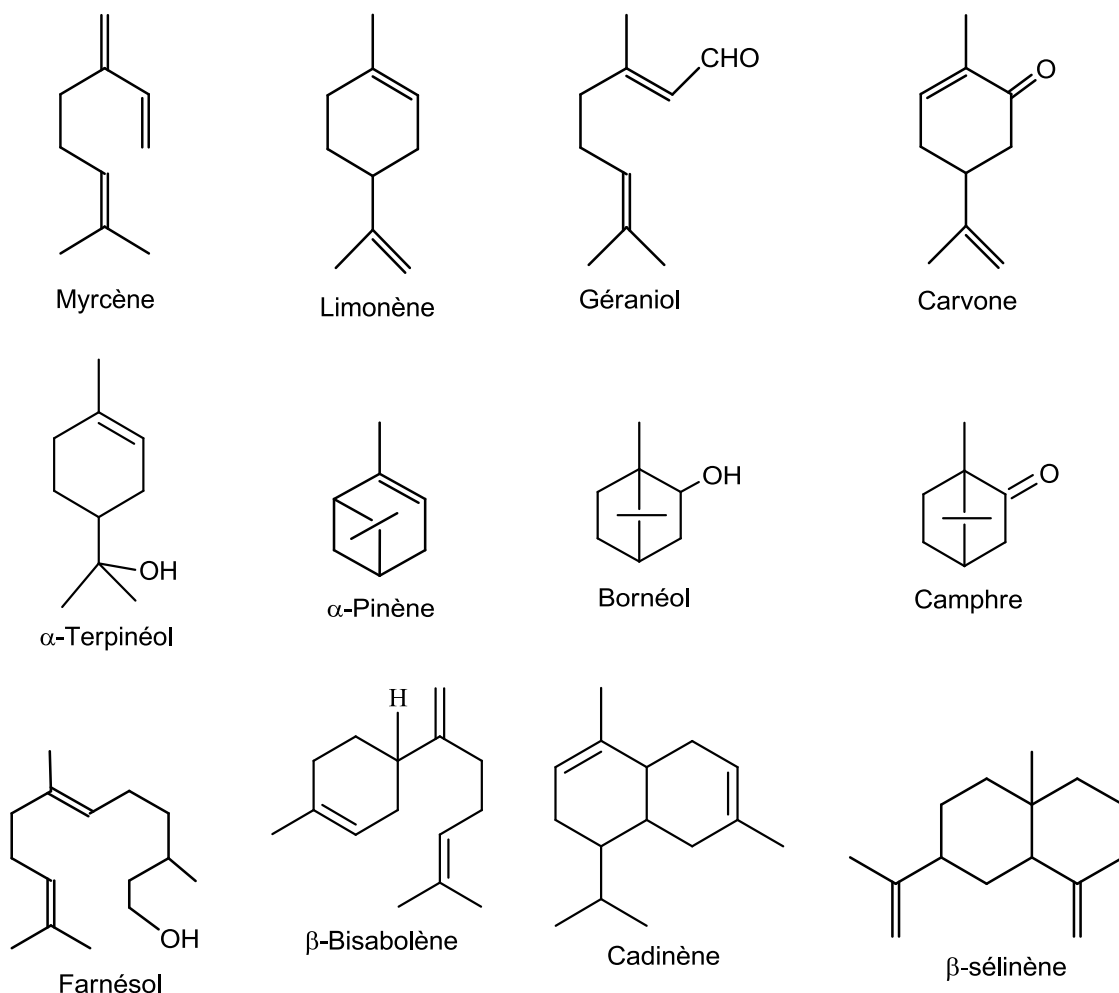


Figure I-2 : Exemples de structures de mono- et sesquiterpènes

Remarque : A noter que 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 citronellyle, l'acétate de géranyle, l'acétate de menthyle, ou d'α 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).

²⁰Dale Poulter, C.; Marscle, L.; Hughers, J.M. et Argyle, J.C. *J. Am. Soc.* **1977**, 99, 3823.

²¹Finar, I.L. « *Organic chemistry* », Ed. Longman Scientific et Technical **1994**, Vol. II, 354.

4.2. Composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivent du phénylpropane (C_6-C_3). Ils sont moins fréquents que les terpènes. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole,...(Figure I-3). Ils sont fréquemment rencontrés dans les H.Es d'Apiaceae (anis, fenouil, persil, etc...) et sont caractéristiques de celles de la vanille, de l'estragon, du basilic, du clou de girofle,...¹. 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...).

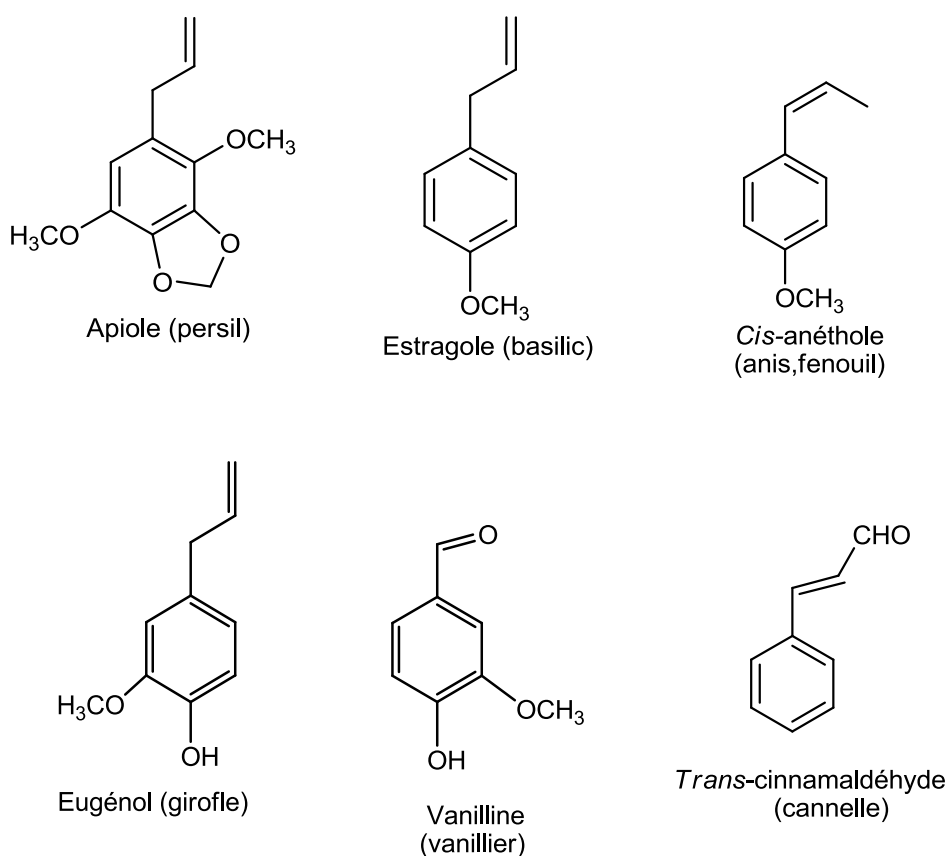


Figure I-3 : Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane

4.3. Composés d'origine variée

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

- ❖ L'heptane et la paraffine dans l'essence de camomille;
- ❖ Des acides en C_3 et C_{10} ;

- ❖ Des esters acycliques présents surtout dans les fruits : acétate de butyle (pomme), acétate d'isoamyle (banane);
- ❖ Des aldéhydes comme l'octanal et le décanal des Citrus;
- ❖ Des alcools comme le 1-octène-3-ol de l'essence de lavande,...

Remarque : Il convient de souligner que de nombreux et multiples facteurs influent sur le rendement et la composition chimique d'une H.E comme l'origine géographique et botanique, les facteurs climatiques, la nature du sol, la localisation des sites producteurs, ... les pratiques culturales, le mode et les conditions d'extraction¹⁹ ainsi que la conservation (séchage et stockage)¹⁷.

5. Biosynthèse des constituants des H.Es

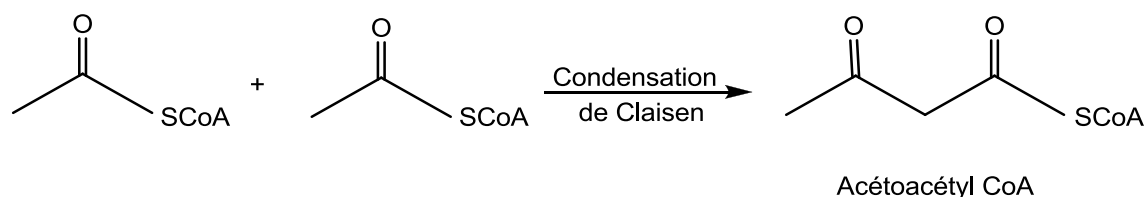
La biosynthèse des constituants des huiles essentielles emprunte deux voies utilisant comme intermédiaires soit **l'acide mévalonique**, soit **l'acide shikimique** respectivement pour les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes²².

5.1. Biosynthèse des terpènes²³

L'unité de base de la biosynthèse des terpènes est en réalité *l'isopentényl-diphosphate* (pyrophosphate d'isopentén-3yle) : **PPI₃** et son isomère *le diméthylallyl-diphosphate* (pyrophosphate de diméthylallyle) : **PPI₂**. Deux voies de biosynthèse conduisent à ces unités de base à 5 atomes de carbone.

La première est la **voie du mévalonate**. Elle prend son origine au niveau de l'acétyl coenzyme A (CH₃COSCoA), produit de la glycolyse (catabolisme des sucres). Elle débute par la condensation de trois unités d'acétylCoA, passe par un composé en C₆ (le mévalonate) et conduit au **PPI₃**.

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

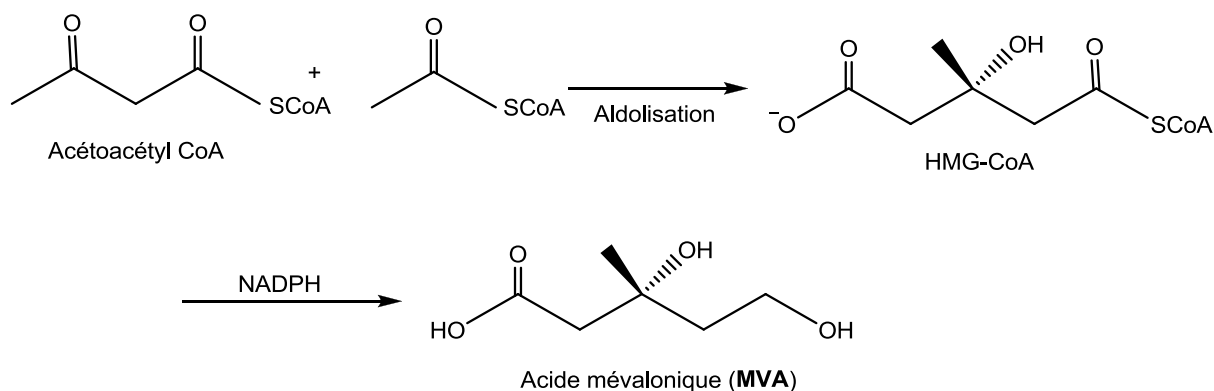


²²a) Singh, N.; Luthra, T.; Sangwan, R.S.; Thakur, R.S. *Curr. Res. Med. Aromat. Plants* **1990**, 11, 174-196;

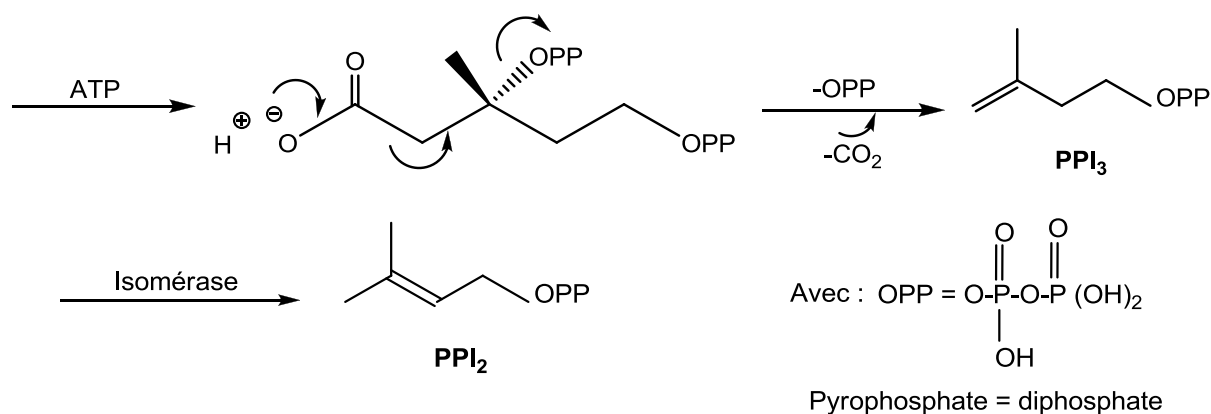
b) Lamarti, A.; Badoc, A.; Deffieux, G.; Cadre, J-P. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **1994**, 133, 79-99.

²³Duval, D. «Cours de chimie organique », Université de Nice-Sophia Antipolis, **2007**, à consulter sur : http://www.unice.fr/chim-org/data/terpenes_def.pdf

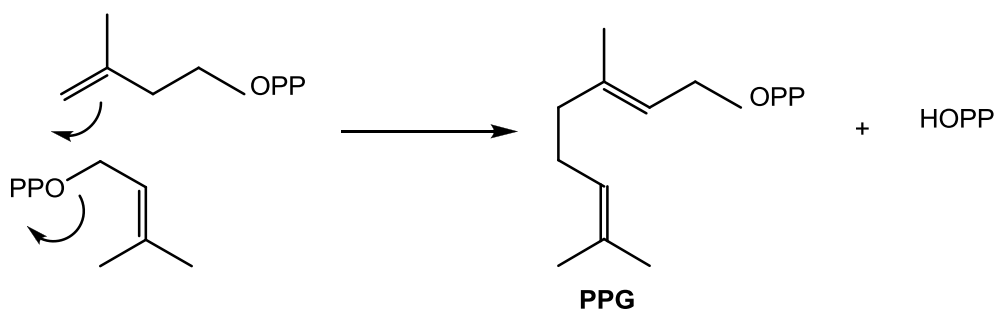
La deuxième étape est une réaction d'aldolisation entre une 3^{ème} molécule d'acétylCoA et l'acétoacétylCoA. Après hydrolyse et réduction par le NADPH (Nicotine Adénine Dinucléotide Phosphate), l'acide mévalonique se forme.



La déshydratation et la décarboxylation de l'acide mévalonique (**MVA**) par une élimination concertée après sa pyrophosphorylation par l'ATP (Adénosine triphosphate), permettent d'aboutir aux deux intermédiaires en C₅, bio-précurseurs des terpènes : le pyrophosphate d'isopentén-3-yle (**PPI₃**) en équilibre, par simple transfert de proton, avec le pyrophosphate de diméthylallyle (**PPI₂**).



Les deux intermédiaires **PPI₃** et **PPI₂** réagissent entre eux pour générer le pyrophosphate de géranyle (**PPG**) point de départ de tous les monoterpénoïdes.



La condensation d'une autre unité de **PPI**₃ sur le pyrophosphate de géranyle donne le pyrophosphate de farnésyle, précurseur de tous les sesquiterpènes. Selon ce processus, le squalène (triterpène) est obtenu, ainsi que les autres terpénoïdes. La figure **I-4** représente la biosynthèse des terpénoïdes.

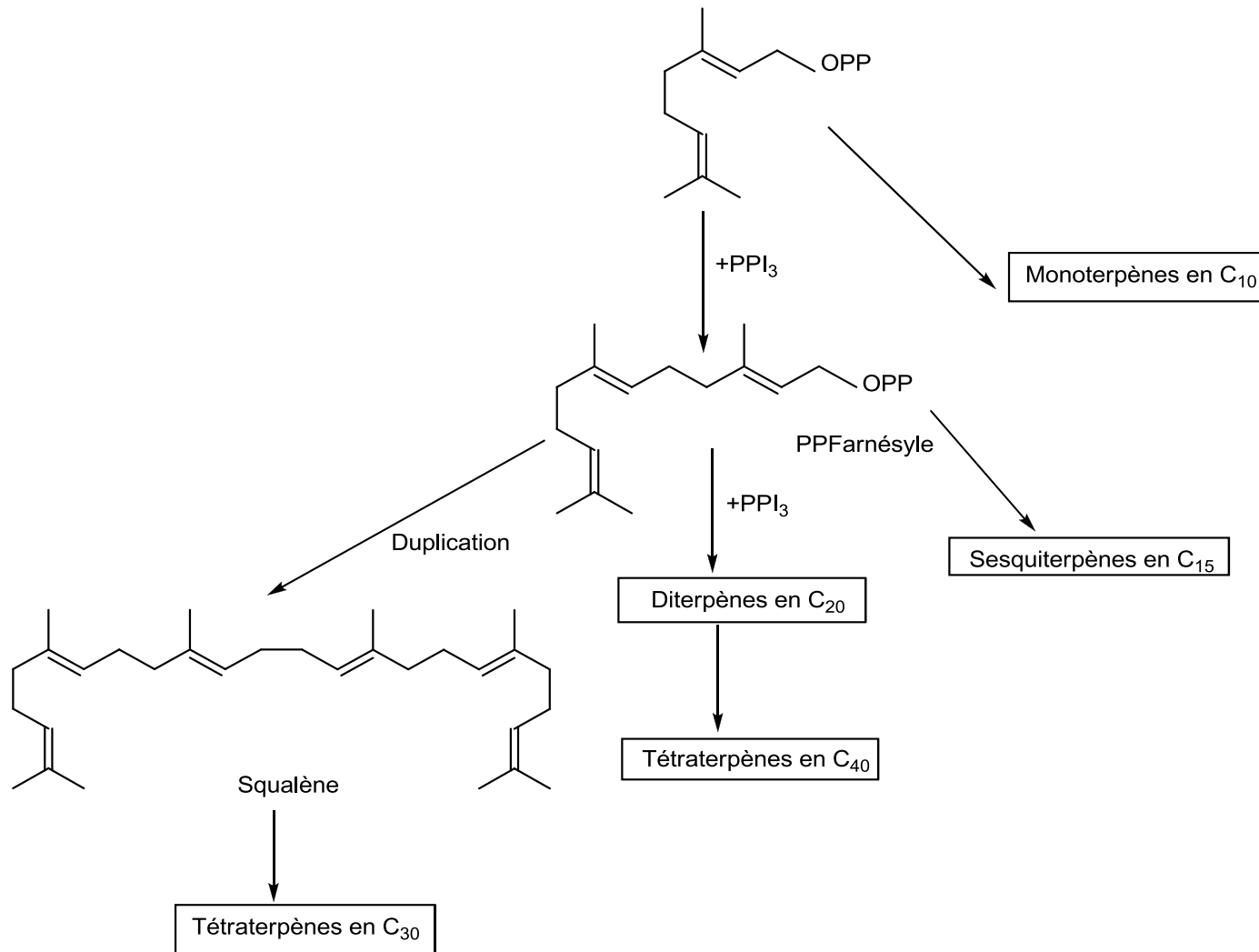


Figure I-4 : Schéma global de la biosynthèse des terpènes par voie de l'acide mévalonique

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_3) avec une unité de glycéraldéhyde 3-phosphate (C_3) et conduit au méthylérythritol phosphate, un composé intermédiaire en C_5 .

Plusieurs étapes enzymatiques conduisent ensuite à la synthèse de **PPI₃**. 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-5).

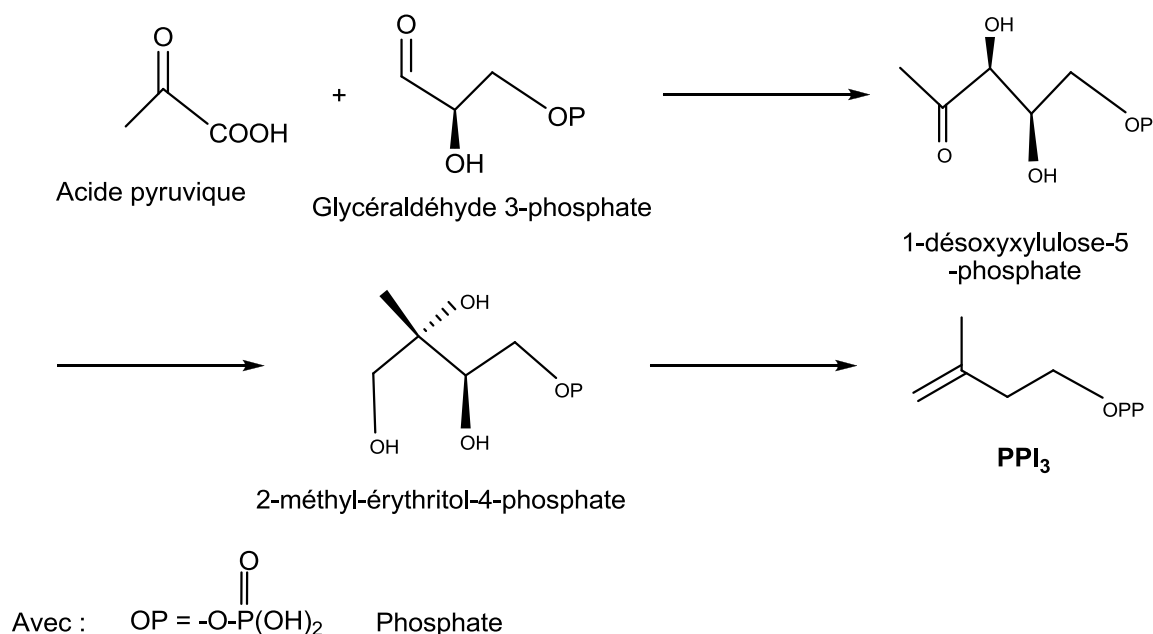


Figure I-5 : Schéma global de la biosynthèse des terpènes par voie du méthylérythritol phosphate

5.2. 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 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-6 illustre les principales étapes de la formation des dérivés aromatiques : Exemple de l'acide cinnamique²⁴.

²⁴Hahlbrock, K.; Scheel, D. « *Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism* », *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* **1989**, 40, 347-369.

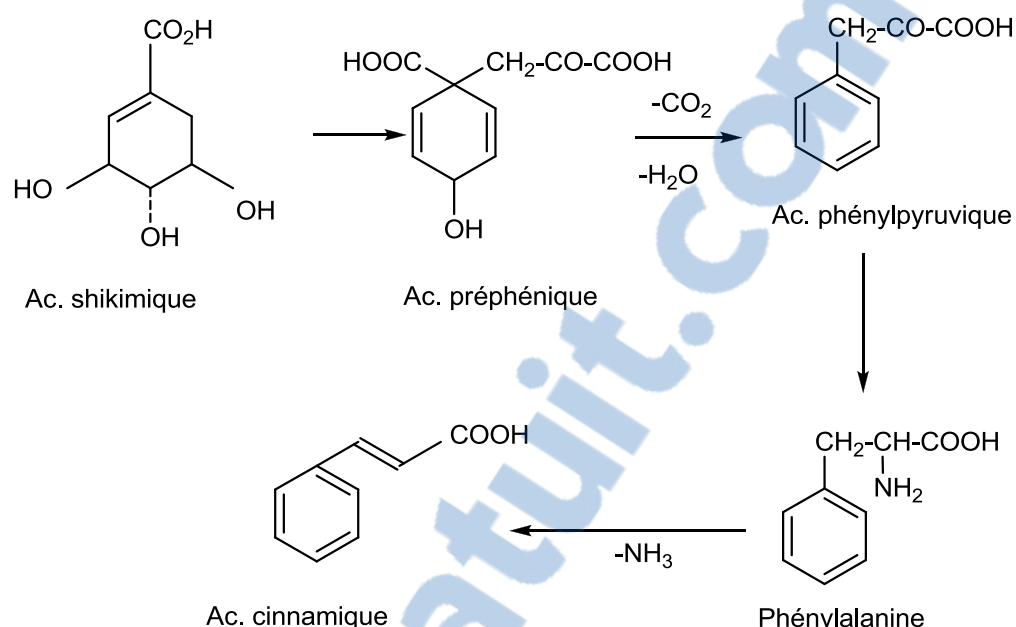


Figure I-6 : Exemple de biosynthèse des dérivés du phénylpropane

6. Propriétés des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont employées depuis les temps les plus reculés pour leurs effets thérapeutiques les plus diversifiés. La diversité moléculaire des composants qu'elles contiennent, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés²⁵.

En effet, les hydrocarbures monoterpéniques présentent des propriétés antalgiques en usage percutané, vermifuge, emménagogue, antiseptique atmosphérique, antiparasitaire,... Les hydrocarbures sesquiterpéniques présentent des effets anti-inflammatoires, calmants, hypotenseurs²⁶...

Les pouvoirs offerts par les H.Es sont innombrables et variés. Il serait impossible de les mentionner tous. La mise en évidence de leur activité biologique a fait l'objet de nombreuses études²⁷.

6.1. Rôle des huiles essentielles chez les plantes

Le rôle biologique des H.Es dans l'écologie est évident. Par leur odeur, elles interviennent dans la pollinisation. Ainsi, elles jouent un rôle attractif ou répulsif vis-à-vis des

²⁵Valnet, J. « Aromathérapie : traitement des maladies par les essences des plantes », Ed. Maloine. S.A, n°10, **1984**.

²⁶Amor, M. « Les Huiles essentielles », Phytos Pathos **2006**.

²⁷Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, 46, 446-475.

prédateurs (herbivores, insectes...) ¹⁹. Elles peuvent paralyser les muscles masticateurs des agresseurs par les propriétés toxiques et inappétentes des substances qu'elles contiennent ²⁸.

Elles protègent les cultures en inhibant la multiplication des bactéries et des champignons. Elles empêchent la dessiccation de la plante (perte d'eau) par évaporation excessive et protègent la plante contre la lumière soit par diminution ou concentration.

Par ailleurs leurs composés interviennent dans les réactions d'oxydo-réduction, comme donneurs d'hydrogène. Par exemple l'isoprène réagit rapidement avec l'ozone et les radicaux hydroxyles. Aussi, elles émettent l'excès de carbone et d'énergie ²⁹.

6.2. Propriétés biologiques

Le spectre d'action des H.Es est très étendu, car elles agissent vis-à-vis d'un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques.

En outre, certaines essences douées d'une activité antifongique s'opposent au développement des champignons, des moisissures en les détruisant ³⁰. Ces activités sont par ailleurs variables d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche à l'autre ³¹.

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire ³² sauf quelques exceptions, comme par exemple *Aeromonas hydrophila* et *Campylobacter jejuni* qui ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles ³³. Néanmoins *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie à Gram négatif, reste la moins active vis-à-vis des essences végétales.

Les molécules aromatiques telles que les phénols suivis par les aldéhydes puis les cétones viennent ensuite les alcools puis les éthers possèdent le coefficient antibactérien le plus élevé. En général l'action de l'essence se déroule en trois étapes distinctes :

- ❖ Augmentation de la perméabilité suivie par la perte des constituants cellulaires par attaque de l'huile essentielle sur la paroi bactérienne;
- ❖ Blocage de la production de l'énergie cellulaire et de la synthèse des composants de structure par acidification de l'intérieur de la cellule;
- ❖ Mort de la bactérie par destruction de son matériel génétique.

²⁸Capo, M.; Couilleau, V.; Valnet, C. « Chimie des couleurs et des odeurs ; cultures et techniques », **1990**, 204.

²⁹Sharkay, T. D. et Sunsun, Y. *Ann. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol.* **2001**, 52, 407-436.

³⁰Latloui, N. et Tantaoui-Elaraki, A. *J. Essent. oil Res.* **1994**, 165.

³¹Kalemba, D.; Kunicka, A. *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10: 813-829.

³²Burt, S. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, 94: 223-253.

³³a) Wan, J.; Wilcock, A.; Coventry, M. J. *J. Appl. Microbiol.* **1998**, 84: 152-158; b) Wannissorn, B.; Jarikasem S.; Siriwangchai, T.; Thubthimthed, S. *Fitoterapia* **2005**, 76: 233-236; c) Dorman, H.J.; Deans, S.G. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, 88: 308-316.

6.3. Propriétés médicinales

Les huiles essentielles ont des propriétés médicinales nombreuses et variées. La plupart des constituants des huiles essentielles ont un pouvoir antimicrobien d'où leur usage comme antiseptiques³⁴. D'autres possèdent des propriétés digestives ou des propriétés antispasmodiques, sédatives, cicatrisantes, etc... Ces activités sont dues surtout à leurs constituants terpéniques.

En outre, de nombreuses H.Es présentent une activité contre tous les différents types de douleurs et sont très utilisées pour traiter les troubles articulaires inflammatoires. Elles ont la propriété de renforcer et de relancer les défenses immunitaires de l'individu³⁵. C'est dans ce sens que l'on a pu dire que les essences aromatiques étaient cytophylactiques (protectrices des cellules vivantes).

Par ailleurs, certaines H.Es présentent des activités anti-tumorales et sont adoptées dans le traitement préventif de certains types de cancers (Nigelle, Mélisse officinale)³⁶.

7. Toxicité des huiles essentielles

Les H.Es sont des substances puissantes et très actives. Elles représentent une source inépuisable de remèdes naturels. Néanmoins, il est important 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, coma, épilepsie, etc...) principalement chez les populations sensibles (enfants, femmes enceintes et allaitantes, personnes âgées ou allergiques)³⁷.

L'accumulation des essences dans l'organisme par des prises répétées peut conduire à des nausées, des céphalées, ... L'ingestion de plus de 10 mL d'huile essentielle est neurotoxique et épiléptogène par inhibition de l'apport d'oxygène au niveau des tissus encéphaliques³⁸.

8. Principaux domaines d'application

En raison de leurs diverses propriétés, les H.Es sont devenues une matière d'importance économique considérable avec un marché en constante croissance. En effet, elles sont commercialisées et présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels comme en pharmacie par leurs pouvoirs antiseptique, analgésique, antispasmodique, apéritif,

³⁴a) Zambonelli, A.; Zechini, A.; D'aulerio, A.; Bianchi, A.; Albasni, A. *J. Phytopathology* **1996**, 144, 491-494; b) Wilson, C.L.; Solar, J. L.; El Ghouth, A.; Wisniewski, M.E. *Plant Disease* **1997**, 81, 2, 204-210.

³⁵a) Wei, A.; Shibamoto T. J. *Agric. Food Chem.* 2007, 55, 1737-1742; b) Katiyar, S.K.; Agarwal, R.; Mukhtar, H. *Cancer Res.* **1996**, 56, 1023-1030.

³⁶a) Mbarek, L.A.; Mouse, H.A.; Elabbadi, N.; Bensalah M.; Gamouh, A.; Aboufatima, R.; Benharref, A.; Chait A.; Kamal, M.; Dalal, A.; Zyad, A. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2007**, 40: 839-847; b) De Sousa, A.C.; Alviano, D.S.; Blank, A.F.; Alves, P.B.; Alviano, C.S.; Gattass, C. R. *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, 56:677-681.

³⁷Degryse, A.C.; Delpla, I.; Voinier, M.A. « Atelier Santé Environnement, Risques et bénéfices des huiles essentielles », IGS. EHESP. **2008**.

³⁸Baudoux, D. « *Aroma News* », Lettre d'information de N.A.R.D. *Natural Aromatherapy Research and Development*, Belgique, **1997**.



antidiabétique..., en alimentation par leur activité anti-oxydante et leur effet aromatisant, en parfumerie et en cosmétique par leur propriété odoriférante.

8.1. Aromathérapie

L'aromathérapie est une forme de médecine alternative dans laquelle les H.Es ont une grande importance car elles induisent de nombreux effets curatifs. Ainsi elles s'utilisent de plus en plus dans diverses spécialités médicales telles que : la podologie, l'acupuncture, la masso-kinésithérapie, l'ostéopathie, la rhumatologie ainsi que dans l'esthétique¹⁰.

8.2. Agro-alimentaire

En vertu de leurs propriétés antiseptiques et aromatisantes, les H.Es sont employées quotidiennement dans les préparations culinaires (ail, laurier, thym,...). Elles sont également très prisées en liquoristerie (boissons anisées, kümmel) et en confiserie (bonbons, chocolat,...). Leur pouvoir antioxydant leur permet de conserver les aliments en évitant les moisissures, conservation du *smen* par exemple par le thym et le romarin³⁹.

8.3. Cosmétologie et parfumerie

Les H.Es sont recherchées dans l'industrie des parfums et des cosmétiques en raison de leurs propriétés odoriférantes. L'industrie de la parfumerie consomme d'importants tonnages d'essences (60%) en particulier celles de rose, de jasmin, de violette, de verveine,... Les H.Es sont aussi consommées en cosmétologie pour parfumer les produits cosmétiques : les dentifrices, les shampoings, les crèmes solaires, les rouges à lèvres, les savons, etc¹⁷...

Les produits d'hygiène, détergents et lessives par exemple, consomment eux aussi beaucoup d'H.Es pour masquer les odeurs (souvent peu agréables) des produits purs.

Pharmacie

Les essences issues des plantes sont utilisées en grande partie dans la préparation d'infusion (menthe, verveine, thym,...) et sous la forme de préparations galéniques^{2b}. Plus de 40% de médicaments sont à base de composants actifs de plantes, par exemple *gastralgine* est un digestif anti-acide qui se compose d'H.E de carvi⁴⁰.

De même, elles permettent par leurs propriétés aromatisantes de masquer l'odeur désagréable de médicaments absorbés par voie orale. Aussi beaucoup de médicaments vendus en pharmacie sont à base d'H.Es comme par exemple les collyres, les crèmes, les élixirs,...⁴¹

³⁹a) Teissedre, P.L.; Waterhouse, A. L. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 3801-3805; b) Ismaili Alaoui, M. et Bendjilali, B. *1^{er} Séminaire Magrebin sur les plantes aromatiques*, Tlemcen le 29-31 Mai, **1990**; c) Latloui, N. et Tantaoui-Elaraki, A. *J. Essent. oil Res.* **1994**, 165.

⁴⁰Pharmacopée Européenne, 3^{ième} Ed. **1999**, 103-130.

⁴¹Richard, J. A. *Toxicology Brief* **1999**.

9. Conclusion

Les huiles essentielles, mélanges complexes de composés organiques, sont extraites à partir des différents organes de la plante (feuilles, fruits, fleurs, graines,...etc.) par divers procédés.

De par leur composition chimique (terpénoïdes, phénylpropanoïdes,...), elles sont dotées d'innombrables vertus curatives des plus diversifiées.

Aussi, elles représentent un intérêt économique considérable par leurs applications dans les industries pharmaceutique, agro-alimentaire, cosmétologique...

L'extraction des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil sera présentée dans le chapitre suivant.

Chapitre 2

*Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles
de Coriandre, de Fenouil et de Persil*

1. Introduction

Depuis la plus haute antiquité, les huiles essentielles isolées à partir des plantes ont été utilisées d'une manière empirique pour embaumer les défunts en Egypte, pour se parfumer en Grèce, pour prévenir et traiter les maladies, et pour conserver les aliments, etc...

Actuellement, elles font l'objet d'importantes transactions commerciales partout dans le monde (Afrique, Asie,...et Europe).

En effet, elles constituent une matière première destinée à des secteurs d'activités industrielles diverses et multiples comme : la parfumerie, les cosmétiques, l'agroalimentaire et la pharmacie.

La variabilité de ces essences végétales due à différents facteurs comme l'origine géographique, le mode d'extraction, les caractéristiques physico-chimiques,...et les fraudes éventuelles ont conduit les utilisateurs particulièrement les industriels à établir des normes internationales qui permettent d'une manière adéquate d'évaluer les preuves de l'identité, de même l'innocuité et l'efficacité d'une huile essentielle.

Afin d'estimer la valeur marchande des H.Es de coriandre, de fenouil et de persil, plantes du Nord-ouest algérien et pour répondre aux normes prescrites, nous les avons d'abord extrait par hydrodistillation pour déterminer ensuite leurs caractéristiques physico-chimiques.

Avant d'aborder l'extraction et la détermination des propriétés physico-chimiques des H.Es étudiées, il est indispensable de donner succinctement leur étude botanique.

2. Etude botanique des plantes : Coriandre, Fenouil et Persil

La famille des Apiacées ou Ombellifères est très abondante. Elle comprend plus de 3000 espèces. Ces dernières sont employées par l'homme soit comme légumes (carotte, céleri, fenouil,...) soit comme condiments (anis, carvi, fenouil, persil,...) soit comme poison (ciguë)⁴². La coriandre, le fenouil et le persil font partie de cette famille.

2.1. Répartition géographique

La coriandre et le fenouil sont des plantes originaires de la méditerranée et sont cultivées depuis longtemps en Europe, en Asie, dans certains pays d'Afrique et en Amérique⁴³. Le persil est une plante alimentaire originaire de la région méditerranéenne, cultivée un peu partout, en Amérique du nord et du sud, en Inde, au Japon, en Australie et en Afrique.

⁴²Caratini, R. « *La vie des plantes* », Bordas Encyclopédie, **1983**, 589.

⁴³a) Boskabady, M. H.; Ramazani-Assari, M.; Elsevier *Journal of Ethnopharmacology***2001**, n°74, 83-88; b) NamavarJahromi, B.; Tartifzadeh, A.; Khabnadideh, S. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* **2002**, Vol. 80, n°2, 153-157.

Les principaux exportateurs de la coriandre sont la Turquie, l’Egypte, la Tunisie et le Maroc. Ceux du fenouil sont la Chine, l’Egypte, la Bulgarie, la Hongrie et la Roumanie⁴⁴.

2.2. Classification et systématique

Le tableau II-1 représente la classification des plantes de notre étude d’après Quezel et Santa⁴⁵, Guignard⁴⁶ et Sallé^{2b}.

Tableau II-1 : Classification et systématique des plantes étudiées

Plantes	Coriandre	Fenouil	Persil
Embranchement	Spermaphyte (phanérogame)		
Sous embranchement	Angiosperme		
Classe	Dicotylédone		
Sous classe	Rosidae		
Ordre	Apiale (ombellale)		
Famille	Apiacée (Ombellifère)		
Genre	<i>Coriandrum</i>	<i>Foeniculum</i>	<i>Petroselinum</i>
Espèce	<i>Sativum</i>	<i>Vulgare</i>	<i>Crispum</i>

2.3. Description botanique des plantes

La coriandre, le fenouil et le persil, plantes aromatiques originaires de la région méditerranéenne, sont très cultivées en Algérie.

2.3.1. La coriandre



⁴⁴Wichtel, M. et Auton, R. « *Plantes thérapeutiques* », Ed. Tec. & Doc. **1999**, 405-409;35-37; 187-190.

⁴⁵Quezel, P.; Santa, S. « *Nouvelle flore d’Algérie et des régions désertiques et méridionales* », Tome II. **1963**, 657, 671, 678.

⁴⁶Crété, P.; Guignard, J. L. « *Précis de botanique, Morphologie des plantes vasculaires reproduction et systématique des bryophytes, des ptéridophytes et des gymnospermes* », Tome I. 2^eédition, Masson & C^{ie}, éditeur, Paris, **1968**, 8-10.



Nom scientifique : *Coriandrum sativum* L.

Synonymes : Punaise mâle, mari de la punaise, persil Arabe, persil chinois, coriander (Ang)⁴⁷.

Noms vernaculaires : Kesbour, Quezbar ou kesbar, Bahûrej-jenûn (fumigation pour les génies, Maroc); h'chich m'qetfa, h'chich.

Le nom coriandre dérive du grec "*Koris*" signifiant punaise, à cause de l'odeur forte de ses feuilles⁴⁸ et "*andros*", mâle. Il faut souligner que la coriandre fraîche est connue aussi sous le nom de Cilantro (terme d'origine espagnole) ou persil chinois⁴⁹.

La coriandre est une plante annuelle. Elle est petite et peut atteindre 30 à 60 cm de haut. Les feuilles inférieures peu nombreuses ressemblent à celle de l'anis et du persil. Les feuilles supérieures découpées en lanières étroites font rappeler celles du carvi.

Les fleurs d'un blanc rosé sont disposées en ombelles composées de 3 à 8 rayons.

Seuls parmi toute la famille des ombellifères, les fruits de la coriandre possèdent une forme sphérique très régulière de 2 à 5 mm de diamètre et sont d'une couleur jaune à brun clair. Ils sont également composés de 2 méricarpes adhérents. Chaque méricarpe représente 5 côtes primaires peu saillantes et 6 côtes secondaires plus accentuées qui ne deviennent apparentes qu'au cours du séchage, ainsi que deux poches sécrétrices sur la face commissurale.

Au début, ils ont une odeur fétide de punaise, qui disparaît pour faire place à une odeur aromatique qui rappelle celle de l'écorce d'orange légèrement brûlée.

⁴⁷Baba Aïssa, F. «Encyclopédie des plantes utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb », **1999**, 17.

⁴⁸Avry, M.P.; Galloïun, F. « Epices, aromates et condiments », Ed. Bellin, Paris, **2003**, 12-13, 99-102, 185-188, 305.

⁴⁹Polachic, D. «Small-farm-today », (USA), Aug. **1996**, 13 (4), 55.

2.3.2. Le fenouil



Nom scientifique : *Foeniculum Vulgare* Mill.

Synonymes : Anis doux, fenouil commun.

Nom vernaculaire : Besbas.

Etymologie : Le nom générique est dû à la finesse des segments des feuilles rappelant le foin (latin : fenum)⁵⁰.

Le fenouil est une plante bisannuelle à tiges dressées, ramifiées pouvant atteindre 2 m de hauteur. Ses Feuilles très divisées sont en lanières filiformes. Les supérieures réduites dépourvues d'involucre et d'involucelle ne comportent que quelques lanières.

Ses fleurs petites et jaunes sont disposées en ombelles de 6-20 rayons sans involucre avec une corolle à 5 pétales et 5 étamines^{45,51}.

Les fruits vert jaunâtre à jaune brun sont petits et formés de deux akènes côtelés, de forme ovoïde.

⁵⁰Beniston, N.T. et Beniston, W.S. « *Fleurs d'Algérie* », E. N. L. Alger **1975**, 134.

⁵¹Claude, J.; Lamontagne, M. « *Les plantes médicinales* », Guide Vert, Solar éditeur à Paris, pour la traduction française **1982**, 133.

2.3.3. Le persil



Nom scientifique : *Petroselinum crispum* mill.

Synonymes : Persil des jardins, persil odorant.

Noms vernaculaires : Maâdnous, imzi.

Très souvent confondu avec la ciguë, quand elle est jeune, le persil est une plante bisannuelle fragile, à racine pivotante. Ses tiges sont cylindriques finement striées dans le sens de la longueur et très divisées. Les inférieures pétiolées sont bi- ou tri-pennatiséquées, à bords dentelés et entiers.

Ses fleurs blanc verdâtre sont réunies en ombelles à 2-12 rayons. Son fruit, gris verdâtre à gris brun est un diakène côtelé⁴⁵.

3. Usages et propriétés thérapeutiques

Depuis l'antiquité la coriandre, le fenouil et le persil sont considérés comme des plantes aromatiques et médicinales. Elles sont employées comme aromates dans les préparations culinaires, servant principalement comme correcteur de goût dans l'industrie agro-alimentaire :

- ❖ Les graines de coriandre sont largement utilisées comme agent d'assaisonnement dans les liqueurs, tisanes, soupes, sauces, produits de viande et dans la préparation du curry⁵².
- ❖ Le fenouil est très usité dans les confiseries, les pains et les boissons (pastis, ...) ^{44, 53}.
- ❖ Le persil sert à aromatiser les viandes, les sauces, les salades, les poissons et les fromages, ... ⁴⁴.

⁵²Illès V.; Daoud H.G.; Perneczki S.; Szokonya, L.; Then M. *Journal of Supercritical Fluids* **2000**, 17, 177-186.

⁵³Tonira, M. O. M.; Sahah, A. H.; Mohsin, A.; Ageel, A. M.; Quereshehi, S. *Phyto other. Res.* **1996**, 10, 33-36.

La coriandre est employée en médecine traditionnelle comme carminative, spasmolytique, digestive, diurétique et galactagogue⁵⁴. L'extrait des graines est antimicrobien et est utilisé dans les lotions et les shampoings. Additionné avec l'huile de ricin, il est efficace pour les problèmes de rhumatisme⁵⁵. L'H.E de coriandre possède des propriétés antioxydante, antidiabétique et anticancéreuse⁵⁶.

En médecine traditionnelle le fenouil sert comme emménagogue, lactagogue. Il facilite l'accouchement^{45,57}. En outre, le fenouil est un ophtalmique. Il est utilisé, par voie externe, lors des fatigues oculaires et des troubles de la vision. Il est employé également comme un diurétique⁵⁸.

Quant au persil, il est employé pour son effet diurétique, spasmolytique, ocytocique et apéritif. C'est un remède populaire dans les troubles digestifs, menstruels. Il s'utilise également contre les poux et les taches de rousseurs en usage externe^{57,47}.

La coriandre et le fenouil possèdent des effets carminatifs, sédatifs, apéritifs, stomachiques, antispasmodiques, etc... Il a été effectivement prouvé que l'H.E des graines de fenouil administrée aux patients montre des effets antispasmodiques⁵⁹.

En plus de leurs utilisations populaires, la coriandre, le fenouil et le persil possèdent des effets thérapeutiques multiples et variés.

Ainsi, des expériences réalisées sur le porc ont montré que l'H.E des feuilles de coriandre a un effet désodorisant remarquable sur la mauvaise odeur émise par le gros intestin du porc qui est une ressource alimentaire précieuse en Asie du Sud et en Chine⁶⁰.

Une autre étude a été effectuée sur l'existence de l'effet antibactérien synergique entre l'H.E de coriandre et six antibactériens (le chloramphénicol, la ciprofloxacine, la gentamicine, la tétracycline, la pipéracilline ou la céfopérazone). Il a été prouvé que l'H.E peut agir comme un agent potentiel améliorant des antibiotiques contre *Acinetobacter baumannii* qui est un agent pathogène important et difficile à traiter⁶¹.

L'H.E de coriandre est active contre les trois ravageurs (*Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica* et *Crotalus pusillus*) du riz stocké⁶².

⁵⁴ Aruna, G.; Baskaran, V. *Food Chemistry* **2010**, 123, 404–409.

⁵⁵ Nazrul Islam Bhuiyan, Md.; Begum J.; Sultana, M. *Bangladesh J. Pharmacol.* **2009**, 4, 150-153.

⁵⁶ a) Chithra, V.; Leelamma, S. *Journal of Ethnopharmacology* **2000**, 71(3), 457-463; b) Gallaghe, A.M.; Flatt P.R.; Duffy, G.; Addel-Wahab, Y.H.A. *Nutrition Research* **2003**, 23(3), 413-424; c) Mhemdi, H.; Rodier, E.; Kechaou, N.; Fages, J. *Journal of Food Engineering* **2011**, 105, 609-616.

⁵⁷ a) Duke, J. A. « *Hand book of medical herb* », CRC Press, Inc. **1995**, 198-199; b) Pârvu, D.; Ravis, A.; Costescu, C.; Trasca, T. « *Proceedings of International Symposium Integrated Systems for Agrofood Production* », Sipa'05, Timisoara-Opportunities of Integrated Systems for Agrofood Production, Ed. Orizonturi universitare, Timisoara **2005**.

⁵⁸ Valnet, J. « *Phytothérapie: traitement des maladies par les plantes* », 5^e édition, **1983**, 780-871.

⁵⁹ Hassan Amjad, MD ; HA.; Jafara, MD.; Beckley, W.V.; A.J.G. *Abstracts* **2000**, n°273, 2491.

⁶⁰ Kaori, K.; Reiko, K.; Hiroshi, K.; Koji, S.; Yasuyoshi, H. *Food Sci. Technol. Res.* **2006**, 12(1), 38-42.

⁶¹ Duarte, A.; Ferreira, S.; Silva, F.; Domingues, F.C. *Phytomedicine* **2012**, 19, 236-238.

⁶² Lopez, M.D.; Jordan, M.J.; Pascual-Villalobos, M.J. *Journal of Stored Products Research* **2008**, 44, 273-278.

Pour valider l'utilisation de la coriandre par la population marocaine pour le traitement et la gestion du diabète, des études ont montré que l'extrait aqueux de la coriandre pourrait diminuer l'hyperglycémie et prévenir ou réduire les complications cardio-vasculaires causés par la dyslipidémie / hyperlipidémie dans des pathologies telles que le pré-diabète, le diabète de type 2 et le syndrome métabolique⁶³.

Khabnadideh et al. ont démontré que le traitement de femmes, atteintes de dysménorrhée primaire, par l'H.E de fenouil à 2% était efficace. Un soulagement des douleurs des menstruations est observé avec diminution des nausées, des migraines,... Ceci est probablement expliqué par la présence de coumarines dans l'extrait de fenouil utilisé^{43b}.

Ageelb et al. ont constaté que l'extrait éthanolique de fenouil possède une action spermatoxique sur les souris mâles⁶⁴.

Des études ont montré que l'extrait méthanolique de fenouil peut être utilisé comme insecticide par fumigation⁶⁵.

De même, l'H.E de fenouil exerce une activité larvicide significative contre deux espèces de moustiques en Thaïlande (*Anopheles dirus* et *Aedes aegypti*) après un temps d'exposition de 24h⁶⁶.

La coriandre, le fenouil et le persil font partie des sept plantes aromatiques avec l'anis, le basilic,...qui ont été employés comme un engrais vert pour la suppression du panic pied-de-coq (panic des marais) et certaines mauvaises herbes à feuilles larges dans le maïs et, de ce fait permettent de réduire au minimum l'usage des herbicides⁶⁷.

Le persil est employé pour ses propriétés diurétiques, sédatives, stimulantes. Les populations marocaines l'utilisent contre l'hypertension et le diabète⁶⁸.

En effet, Il a été conclu que, probablement en raison de ses propriétés antioxydantes, l'extrait du persil a un effet protecteur comparable à la Glibornuride (anti-diabétique) contre l'hépatotoxicité causée par le diabète⁶⁹. Karabulut- Bulan et al. ont montré que les rats diabétiques traités avec du persil présentent des niveaux inférieurs de glucose dans le sang; ce qui signifie que le persil exerce un effet hépatoprotecteur important chez les rats diabétiques⁷⁰.

⁶³ Aissaoui, A.; Zizi, S.; Israili, Z.H.; Lyoussi, B. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, 137, 652-661.

⁶⁴ Shaha, A.H.; Quersehi, S.; Ageelb, A.M.; *Journal of Ethnopharmacology* **1991**, 34,167-172.

⁶⁵ Soon-Il, K.; Jung-Yeon, R.; Do-Hyoung, K.; Han-Seung, L.; Young-Joon, A. *Journal of Stored Products Research* **2003**, 39, 293-303.

⁶⁶ Pitasawat, B.; Champakaew, D.; Choochote, W.; Jitpakdi, A.; Chaithong, U.; Kanjanapoth, D.; Rattanachanpichai, E.; Tippawangkosol, P. *Fitoterapia* **2007**, 78, 205-20.

⁶⁷ Dhima, K.V.; Vasilakoglou, I.B.; Gatsis, Th.D.; Panou-Philotheou, E.; Eleftherohorinos, I.G. *Field Crops Research* **2009**, 110,235-241.

⁶⁸ a) Ziyyat, A.; Legssyer, A.; Mekhfi, H.; Dassouli, A.; Serhrouchni, M.; Benjelloun, W. *Journal of Ethnopharmacology* **1997**, 58, 45-54; b) Kreydiyyeh, S. I.; Usta, J. *Journal of Ethnopharmacology* **2002**, 79,353-357.

⁶⁹ Ozsoy-Sacan, O.; Yanardag, R.; Orak, H.; Ozgey, Y.; Yarat, A.; Tunali, T. *Journal of Ethnopharmacology* **2006**, 104, 175-181.

⁷⁰ Bolkent, S.; Yanardag, R.; Ozsoy-Sacan, O.; Karabulut- Bulan, O. *Phytother. Res.* **2004**, 18, 996-999.



De nombreuses maladies cardio-vasculaires tels que l'hypertension artérielle sont associées à une augmentation de l'activité des plaquettes sanguines. L'extrait du persil inhibe *in vitro* et *ex-vivo* l'agrégation plaquettaire, et prolonge le temps de saignement chez le rat *in vivo* après le traitement par voie orale; ce qui représente une approche prometteuse pour la prévention nutritionnelle des complications cardio-vasculaires⁷¹.

Remarque : Il est à noter qu'une drogue prise avec des doses élevées peut provoquer des effets secondaires.

Ainsi, à dose usuelle, la consommation de la coriandre comme condiment ne présente, à notre connaissance, aucun risque de toxicité ni aiguë, ni chronique. Le potentiel de sensibilisation de la drogue est faible⁷².

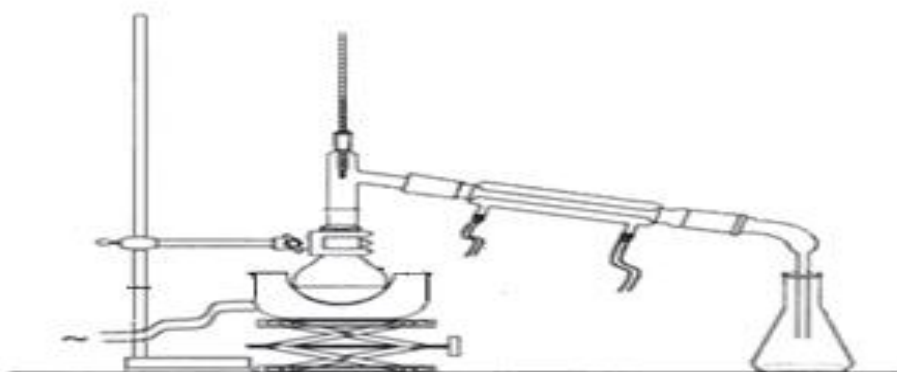
Cependant le fenouil peut entraîner des allergies de peaux et des affections au niveau des voies respiratoires⁴⁴. Aussi, l'H.E de persil, à dose élevée, engendre des effets nuisibles au niveau des reins et de l'intestin⁷².

4. Matériel végétal

Notre étude porte sur les graines de coriandre, de fenouil et de persil ainsi que sur la partie aérienne de la coriandre et du persil provenant de la ville de Mascara.

5. Extraction par dispositif d'hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. Les composés volatils et semi-volatils sont entraînés par la vapeur d'eau, qui est ensuite condensée. Le schéma suivant représente le dispositif d'hydrodistillation que nous avons utilisé pour extraire les H.Es étudiées.



Dispositif d'hydrodistillation utilisé

⁷¹Gad, D.; Bnouham, M.; Aziz, M.; Ziyat, A.; Legssyer, A.; Legrand, C.; Lafave, F.F.; Mekhfi, H. *Journal of Ethnopharmacology* **2009**,125, 170-174.

⁷²Eberhard, T.; Robert, A.; Annelise, L. « *Plantes aromatiques* », **2005**, 199-201.

Protocole expérimental :

150g de matière végétale ont été introduits dans un ballon de 2L contenant 1L d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 3 heures. Le distillat ainsi recueilli est introduit dans une ampoule à décanter afin de séparer l'eau de l'H.E qui la surnage.

Afin de récupérer le maximum d'H.E, nous avons utilisé le dichlorométhane, l'éther diéthylique, l'éther de pétrole et le pentane comme solvants dans lesquels l'H.E est soluble.

La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et l'essence obtenue après évaporation du solvant est conservée dans des flacons bien clos à l'abri de la lumière et à basse température pour éviter toute dégradation de l'essence.

6. Détermination des indices physico-chimiques des H.Es extraites

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

Nous avons évalué les propriétés physico-chimiques des H.Es de coriandre, de fenouil et de persil suivant la pharmacopée Européenne⁷³ et la commission française de normalisation⁷⁴.

6.1. Propriétés physiques

Les résultats de calcul des rendements obtenus lors de nos extractions par hydrodistillation, durant trois (3) heures sont reportés dans le tableau II-2.

Tableau II-2 : Rendements des H.Es obtenues par hydrodistillation

H.Es	Graines de coriandre	Coriandre fraîche	Graines de fenouil	Graines de persil	Persil frais
Rdt%	0,44-0,70	0,48	1,00	0,61	0,14

6.1.1. Caractéristiques organoleptiques

Les propriétés organoleptiques (l'aspect, la couleur et l'odeur) des essences de coriandre, de fenouil et de persil sont regroupées dans le tableau II-3.

⁷³Pharmacopée Européenne, 3^{ème} édition, **1997**, Tome 1, 57-62.

⁷⁴Didier, D. «Huiles Essentielles», Monographie relative aux huiles essentielles (A à G), 6^{ème} Ed, AFNOR **2000**, Tome 2, Vol. 1, 180-219.

Tableau II-3 : Caractéristiques organoleptiques des essences étudiées

	Caractéristiques organoleptiques	Aspect	Odeur	Couleur
H.Es	Graines de coriandre	Liquide huileux		Jaune
	Coriandre fraîche	Liquide huileux	Caractéristique de la coriandre	Jaune
	Graines de fenouil	Liquide huileux	Anisée	Limpide
	Graines de Persil	Liquide huileux	Caractéristique du fruit écrasé, mais différente de celle de la partie verte de la plante	Jaune
	Persil frais	Floconneux	Caractéristique du persil	Orange- marron

6.1.2. Détermination de pH

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

Ainsi, les H.E extraites ont été caractérisées par leur pH.

6.1.3. Densité relative

La densité de l'H.E est déterminée par le rapport entre la masse d'un certain volume de l'essence et la masse du même volume d'eau distillée pris à la même température.

Protocole expérimental :

La détermination de la densité des essences des plantes étudiées est réalisée à l'aide d'une seringue hamiltonienne d'une capacité de 1mL au lieu du pycnomètre. Le volume prélevé est de 0,20 mL pour chaque huile, ainsi que pour l'eau.

La densité de chaque essence a été calculée à partir de la relation suivante :

$$d_{20} = \frac{m_1 - m_0}{m - m_0}$$

Dans laquelle :

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

m_0 : Masse en g de la seringue vide.

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

6.1.4. Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_{\lambda}^t$ est la propriété que présentent certaines substances chimiques de dévier le plan de polarisation de la lumière polarisée, ce qui signifie la présence d'un atome asymétrique.

Le pouvoir rotatoire spécifique est exprimé par la loi de Biot :

$$[\alpha]_{\text{D}}^t = \frac{\alpha}{L \cdot c}$$

Dans laquelle :

α : Valeur de l'angle de déviation de la lumière polarisée lue sur le polarimètre.

L : Longueur de la cellule exprimée en dcm.

c : Concentration de la solution à examiner en g/100 mL.

Protocole expérimental :

Afin d'évaluer les angles de rotation de nos essences, nous avons utilisé un polarimètre de marque : KARL KOLB, muni d'une cellule de 1 dcm de longueur remplie d'une solution éthanolique d'H.E à raison de 0,20g pour chaque échantillon dans 100 mL de solvant.

L'angle de rotation observé est lu directement sur l'appareil permettant la détermination de la valeur du pouvoir rotatoire de nos essences.

6.1.5. Indice de réfraction

L'indice de réfraction n_{λ}^t se définit comme étant le rapport entre le sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré.

Cet indice est mesuré à 20°C et rapporté à la raie D du sodium ($\lambda = 589\text{nm}$).

Protocole expérimental :

La mesure de l'indice de réfraction de nos H.Es a été effectuée à l'aide d'un réfractomètre de marque Atagopolystat 5A.

Nous avons opéré comme suit :

- Etalonner l'appareil à l'aide d'une substance d'indice de réfraction connu à la température fixée à 20°C;
- Nettoyer les prismes et déposer quelques gouttes d'H.E entre les deux faces des prismes;
- Regarder dans l'oculaire et tourner le bouton de réglage de l'indice de réfraction pour amener les zones sombres et éclairées au centre du réticule;
- Noter la valeur de l'indice par l'échelle de lecture.

6.1.6. Miscibilité à l'éthanol

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

Protocole expérimental :

VmL d'éthanol par fractions de 0,5 mL ont été ajoutés, à l'aide d'une burette, à 0,5mL d'H.E. Après chaque ajout, le mélange est agité. Quand la solution devient limpide, on note le volume d'éthanol additionné.

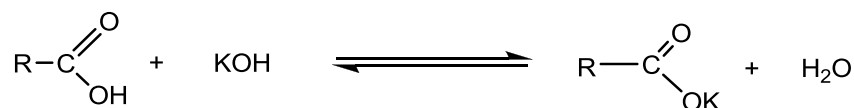
Nous avons employé de l'éthanol absolu pour nos essences.

6.2. Propriétés chimiques

6.2.1. Indice d'acide (I_a)

L'indice d'acide exprime le nombre de mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1g d'H.E.

L'hydroxyde de potassium réagit avec l'acide selon la réaction suivante :



Protocole expérimental :

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

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

$$I_a = V \cdot c \cdot \frac{56,11}{m}$$

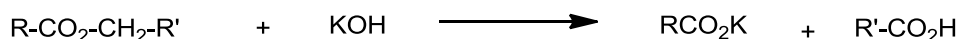
V : Volume en mL de la solution de KOH utilisé pour le titrage.

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

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

6.2.2. Indice d'ester (I_e)

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



Protocole expérimental :

On introduit dans un ballon de 100 mL, 1g d'H.E et 25mL d'une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium (KOH) 0,5 M à l'aide d'une burette, ainsi que quelques pierres ponce.

L'ensemble est porté au reflux pendant 1h. Après refroidissement de la solution, on ajoute 20 mL d'eau distillée et 5 gouttes de phénolphthaléine.

L'excès de KOH est titré avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 0,5N jusqu'à la disparition de la couleur rose.

Une opération à blanc est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment.

L'indice d'ester (I_e) est calculé à l'aide de la relation suivante :

$$I_e = \frac{28,05}{m} (V_0 - V_1) - I_a$$

V_0 : Volume en mL de la solution d'HCl (0,1N) mesuré pour l'essai à blanc.

V_1 : Volume en mL de la solution d'HCl (0,1N) mesuré pour le calcul de I_e .

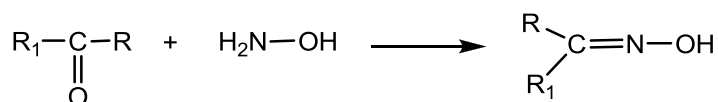
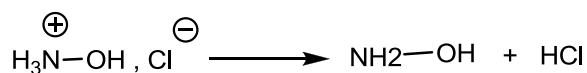
m : Masse en g de la prise d'essai.

I_a : Valeur d'indice d'acide.

L'indice de saponification (I_s) est déterminé à partir de I_e et I_a

6.2.3. Indice de carbonyle (I_c)

L'indice de carbonyle est défini comme le nombre de mg d'hydroxyle de potassium nécessaire pour la neutralisation de l'acide chlorhydrique livré dans la réaction d'oximation avec le chlorure d'hydroxylammonium :

Protocole expérimental :

1g d'H.E en présence de 20 mL d'une solution de chlorure d'hydroxyl-ammonium est introduit dans un flacon. Après l'ajout de 10mL d'une solution de KOH 0,5M, le mélange est laissé au repos pendant 24h.

Après la durée prescrite, on ajoute 5 gouttes environ de bleu de bromophénol : la solution vire au bleu.

Ensuite, l'excès de KOH est titré par une solution d'HCl 0,5M jusqu'au virage au jaune verdâtre.

Parallèlement, un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions.

La détermination de l'indice de carbonyle se fait par la relation suivante :

$$I_c = 56,1. c . \frac{(V_0 - V_1)}{m}$$

Dans laquelle :

c : Concentration de la solution d'HCl.

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

V₀ : Volume en mL de la solution d'HCl utilisée pour l'essai à blanc.

V₁ : Volume en mL de la solution d'HCl utilisée pour la détermination de I_c.

Le pourcentage des constituants carbonylés (aldéhyde ou cétone) présent dans l'H.E est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ constituants carbonylés} = c . M_r \frac{(V_0 - V_1)}{10 m}$$

Dans laquelle :

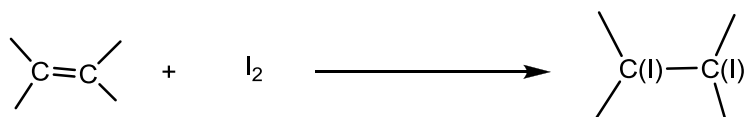
c, m, v₀, v₁ ont la même signification que précédemment.

M_r : Masse moléculaire relative au dérivé carbonylé majoritaire.

N.B : Seule l'H.E de Fenouil a fait l'objet de cette expérience afin de rechercher la fenchone dans l'essence.

6.2.4. Indice d'iode (I_i)

L'indice d'iode est la quantité d'iode susceptible d'être fixée par 100g de substance, par la rupture de la double liaison. Les deux atomes d'iode se fixent sur les deux carbones voisins.



Protocole expérimental :

1g d'H.E, 20mL de tétrachlorure de carbone (CCl₄) et 25mL d'une solution d'iode (1N) sont mis dans un erlenmeyer. Ensuite, le mélange est laissé à l'abri de la lumière pendant 2h. Au terme de cette durée, 20 mL d'une solution d'iodure de potassium (KI) à 50% et 20mL d'eau distillée sont ajoutés.

L'excès d'iode est titré par une solution de thiosulfate de sodium (Na₂S₂O₃) 0,1 N, en présence d'empois d'amidon.

Dans les mêmes conditions que précédemment, un essai à blanc est réalisé.

L'indice d'iode est calculé selon la relation ci-dessous :

$$I_i = N_T \frac{(V_0 - V_1)}{m}$$

Dans laquelle :

N_T : Normalité de la solution de thiosulfate de sodium.

V_0 : Volume en mL de la solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utilisée pour l'essai à blanc.

V_1 : Volume en mL de la solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utilisée pour la détermination de I_i .

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

7. Résultats et discussion

7.1. Propriétés physiques

Les résultats de la détermination des propriétés physiques des essences obtenues par hydrodistillation sont consignés dans le tableau II-4.

Tableau II-4 : Caractéristiques physiques des H.Es extraites

	Propriétés physiques	pH	d_{20}^{20}	$[\alpha]_D^{20}$	n_D^{20}	Miscibilité à l'éthanol
H.Es	Graines de coriandre	4,54-4,23	0,607	+ 13,5°	1,468	1V/ 8 V d'EtOH
	Coriandre fraîche	-	0,536	+ 12,5°	1,364	1V/ 11 V d'EtOH 70 %
	Graines de fenouil	-	0,923	+2,5°	1,533	1V/ 16,8Vd'EtOH
	Graines de Persil	5,39	0,974	-3,5°	1,508	1V/ 6,4Vd'EtOH
	Persil frais	-	1,173	+2°	1,322	1V/ 18Vd'EtOH

D'après les résultats mentionnés dans le tableau II-4, on constate que :

- ❖ Les huiles essentielles de coriandre et de persil sont acides ($\text{pH} < 7$). Il convient de souligner que le pH joue un rôle déterminant au cours des réactions chimiques et biochimiques et peut influencer les propriétés stabilisatrices d'une huile essentielle (effets antioxydant et antimicrobien). Par conséquent, ce résultat peut amener à un bon caractère stabilisateur contre les microorganismes; ce qui permettra à ces H.Es de jouer le rôle de conservateurs dans les produits alimentaires.

- ❖ Contrairement à la coriandre et au fenouil, la densité de l'H.E de persil est supérieure à celle de l'eau.
- ❖ Les trois essences dévient la lumière polarisée. En effet, elles ont un pouvoir rotatoire positif à l'exception de l'essence de persil extraite à partir des graines.
- ❖ Une variation croissante de l'indice de réfraction est observée pour les H.Es extraites à partir des graines de la coriandre, du persil du fenouil. Par contre, celui de l'H.E de la partie aérienne du persil et de la coriandre possèdent des indices presque identiques.
- ❖ Dans le cas de leur miscibilité dans l'éthanol, l'H.E des graines du persil est plus soluble que celles de la coriandre et du fenouil.

Nous avons rassemblé les constantes physiques des essences de coriandre, de fenouil et de persil retrouvées dans la littérature dans le tableau II-5 afin de les comparer avec ceux de nos résultats expérimentaux.

Tableau II-5 : Caractéristiques physiques des H.Es puisées dans la littérature

	Propriétés physiques	d_{20}^{20}	$[\alpha]_D^{20}$	n_D^{20}	Miscibilité à l'éthanol
H.Es	Coriandre	0,862-0,878 ⁴²	+7°- +13°	1,462-1,470	8V ⁴²
		0,837 ⁴²	+5-+13 ⁴²	1,46-1,470 ⁴²	
	Fenouil	0,960-0,970 ⁷⁵ 0,900 à 0,920 ^{10,76}	+11° à +24° ⁴³	1,528 à 1,539 ⁴³	5V/ROH à 90°
	Persil	0,974 ^{74,77}	-11° à -4° ⁴²	1,508-1,522 ⁴²	5V ⁴²

En étudiant la littérature nous avons été amenés à faire les remarques suivantes :

Les valeurs de l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire à l'exception du fenouil (un écart est observé), la miscibilité et la densité sont plus ou moins du même ordre de grandeur que ceux retrouvés dans la littérature.

7.2. Propriétés chimiques

Nous avons de même regroupé les propriétés chimiques des H.Es de coriandre, de fenouil et de persil évaluées expérimentalement dans le tableau II-6.

⁷⁵Pharmacopée Européenne, «Huile essentielle d'Anis», 3^{ème} Ed, **2001**, 461.

⁷⁶Guide de chimie internationale, Rhône-Poulenc **1996**, 97.

⁷⁷Garnero J. «Huiles essentielles», Recueil de normes françaises, 2^{ème} Ed., AFNOR, Paris **1986**.

Tableau II-6 : Propriétés chimiques des essences étudiées

	Propriétés chimiques	I _a	I _e	I _s *	I _c	I _i
H.Es	Graines de coriandre	2,87	165,43	168,30	—	70,22
	Coriandre fraîche	1,12	155,96	157,08	—	12,75
	Graines de fenouil	4,48	23,57	28,05	66,98	1,27
	Graines de persil	5,61	13,04	18,65	42,07	1,77
	Persil frais	11,22	54,78	66,00	—	2,03

*L'indice de saponification a été calculé à partir de la relation suivante : $I_s = I_e + I_a$

D'après ces résultats, on remarque que :

❖ Indice d'acide

L'indice d'acide indique le comportement et la quantité des acides libres présents dans notre huile. Il peut aussi nous renseigner sur la susceptibilité de l'huile à subir des altérations, notamment l'oxydation.

D'après nos résultats, l'huile essentielle de persil présente un indice d'acide plus élevé par rapport à celui du fenouil et de la coriandre. L'indice d'acide élevé enregistré concorde avec la faible valeur du pH de ces essences.

Un indice d'acide élevé pour les H.Es peut être bénéfique si ces essences ont été ajoutées à un produit alimentaire possédant des matières grasses et des acides gras libres oxydables. Cet effet stabilisateur se manifeste dans la mesure où l'oxydation affecte plutôt les acides libres de l'essence utilisée comme conservateur et protège ou limite donc l'oxydation des acides gras libres insaturés des produits alimentaires ce qui améliore à la fois la qualité nutritionnelle et organoleptique de ces produits.

❖ Indice d'ester

L'indice d'ester de l'H.E de coriandre est le plus significatif par rapport à celui du fenouil et du persil frais, alors que l'H.E des graines de persil possède l'indice le plus faible.

❖ Indice de carbonyle

L'indice de carbonyle de l'essence de fenouil est plus élevé comparé à celui de l'H.E des graines de persil. On peut déduire que cette indication change en fonction de la quantité des composants carbonylés présents dans les essences qui se transforment en oximes par la réaction d'oximation.

❖ **Indice d'iode**

L'indice d'iode est lié à l'état d'insaturation des chaînes carbonées dans nos H.Es. L'indice d'iode de l'H.E de coriandre est supérieur à celui de l'H.E de persil. Celle de fenouil accuse l'indice le plus bas.

Les propriétés chimiques des essences de coriandre, de fenouil et de persil puisées de la littérature sont données dans le tableau **II-7**.

Tableau II-7 : Caractéristiques chimiques des huiles essentielles des graines de coriandre, de fenouil et de persil d'après la littérature^{74, 77,78}

	Propriétés chimiques	I _a	I _e	I _i
H.Es	Coriandre	3	22	76-101
	Fenouil	0,90	77,95	-
	Persil	6	11	-

En comparant nos résultats expérimentaux avec ceux de la littérature, nous avons constaté que les caractéristiques physico-chimiques varient avec la plante utilisée, l'organe de la plante (feuilles, tiges, fleurs ou graines), le stade reproducteur (avant ou après la floraison), le lieu de culture, la méthode et les conditions d'extraction. Tous ces facteurs affectent la composition chimique des H.Es.

8. Conclusion

Les huiles essentielles des graines de coriandre, de fenouil et de persil et de la partie aérienne de la coriandre et du persil ainsi que les bulbes de fenouil sont obtenues au bout d'une durée de 3h par hydrodistillation.

Pour récupérer une grande proportion en H.E, nous avons utilisé différents solvants : pentane, dichlorométhane,...et éther diéthylique. Avec ce dernier nous avons obtenu les meilleurs rendements : 0,7; 1,00; 0,61; 0,48 et 0,14% respectivement pour les graines de coriandre, de fenouil, de persil et de la partie aérienne de la coriandre et du persil.

Dans le but d'évaluer le degré de pureté et la qualité commerciale de nos essences, nous avons déterminé leurs caractéristiques physico-chimiques qui sont en grande partie du même ordre que celles retrouvées dans la littérature.

Les caractéristiques physico-chimiques ainsi évaluées, restent insuffisantes pour l'identité des H.Es. Il est nécessaire de les analyser par les méthodes chromatographiques afin d'en déduire leur composition chimique; ce qui fera l'objet du chapitre suivant.

⁷⁸Lazouni, H.A.; Benmansour, A.; Taleb-Bendiab, S.A.; Chabane Sari, D. *Sciences & Technologie C*- N° 25, **2007**, 7-12.

Chapitre 3

Analyse chromatographique des huiles essentielles extraites

1. Introduction

Une parfaite connaissance de la composition chimique des huiles essentielles est nécessaire afin de les caractériser, de mettre en évidence une éventuelle spécificité locale et d'en évaluer la qualité en vue d'une bonne commercialisation.

En effet, les essences végétales présentent un grand intérêt en pharmacie, en alimentation, en parfumerie et en cosmétique. Pour cela, l'analyse des H.Es reste une étape importante nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques.

Dans le but d'identifier les principaux constituants des H.Es de coriandre, de fenouil et de persil, nous avons eu recours aux méthodes chromatographiques (CPG et CG/MS).

2. Chromatographie en phase gazeuse CPG

La chromatographie en phase gazeuse CPG est une méthode d'analyse qui s'applique aux composés susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition⁷⁹. C'est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des H.Es, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillon de l'ordre du milligramme voire du microgramme.

Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs (FID) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des H.Es.

Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcanes ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (*indice de Kovats*) ou en programmation de température (*indice de rétention*). Les temps de rétention, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre.

Le produit à analyser est introduit dans l'injecteur. Il est volatilisé et entraîné par un gaz vecteur (N₂, H₂, He ou un mélange de H₂ /N₂). Le mélange traverse une colonne où s'effectue une opération entre les différents constituants. A la suite, ils sont captés par un détecteur.

Une gamme de pics caractérisés par leurs temps de rétention et leurs surfaces, permettent ainsi de déterminer l'identité et le pourcentage de chaque constituant. Les substances séparées sont affichées sur le chromatogramme.

⁷⁹ Arpino, P.; Prévôt, A.; Serpinet, J.; Tranchant, J.; Vergnol, A.; Witier, P. « *Manuel pratique de Chromatographie en phase gazeuse* », Masson, Paris 1995.

Protocole expérimental :

L'analyse par CPG des essences de coriandre, de fenouil et de persil a été effectuée à l'aide d'une colonne sur un appareil de marque : Type Thermo Electron Focus GC n°20054070 AI 3000 à détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire apolaire de type polydiméthylsiloxane. Les conditions d'analyse sont les suivantes : Débit du gaz vecteur (He) : 1mL/mn, température de l'injection : 250°C, température de détection : 300°C, programmation de température : de 80°C / mn à raison de 20°C /mn jusqu'à 280°C /mn et volume injecté : 1µL en mode split.

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

Le couplage CPG/MS permet une approche plus précise de nombreuses applications dans le secteur de l'agroalimentaire et la technique de référence dans le domaine des H.Es⁸⁰. Il permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse de différents constituants d'un mélange complexe. Il existe deux modes d'ionisation : l'ionisation par impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC).

3.1. CPG/MS en mode impact électronique CPG/MS-IE

En mode impact électronique, le bombardement de substances par un faisceau d'électrons de l'ordre de 70eV provoque leur ionisation et leur fragmentation. Les fragments ioniques positifs forment alors le spectre de masse caractéristique du composé. Les spectres de masse ainsi obtenus sont comparés avec ceux des produits de référence contenus dans la banque de données.

3.2. CPG/MS en mode ionisation chimique CPG/MS-IC

L'ionisation chimique correspond à des réactions ions-molécules entre les molécules de l'échantillon en phase gazeuse et les ions d'un plasma obtenus à partir d'un gaz réactif. On distingue l'ionisation chimique positive (ICP) et l'ionisation chimique négative (ICN).

La méthode d'ICP consiste à ioniser le gaz réactif X par impact électronique en premier temps. Ensuite, le gaz réactif ionisé X⁺ réagit avec les molécules de gaz réactif au moyen de collisions ions-molécules produisant le gaz réactif plasma XH⁺. Ces ions réagissent avec la substance M étudiée provoquant une fragmentation douce. Il est à signaler que l'échantillon à analyser est introduit dans la source d'ions en même temps que le gaz réactif ionisé présent en excès⁸¹.

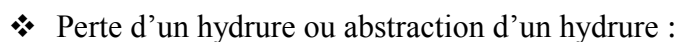
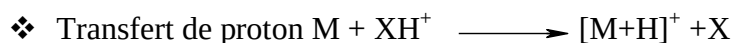
La réaction plasma (XH⁺)-molécule(M) est un échange protonique :



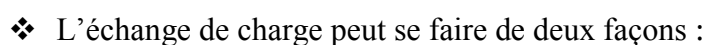
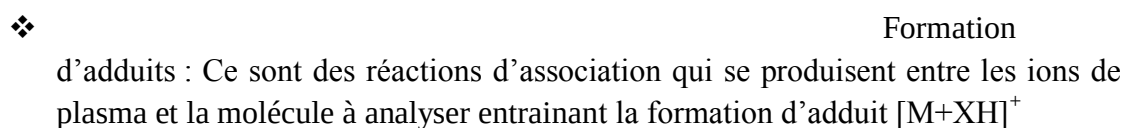
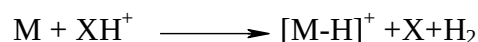
⁸⁰Constantin, E. «Spectrométrie de masse», Lavoisier Tec & Doc, Paris **1996**, 1-14.

⁸¹Harrison, A.G. «Chemical ionisation mass spectrometry», 2nd Ed CRC Press, Boca Raton, Florida **1992**.

En ICP les principaux types de réactions sont^{81,82} :



La molécule analysée cède un ion hydrure au gaz réactif « plasma » induisant la formation de l'ion $[M-H]^+$



Ces réactions peuvent être utilisées pour obtenir des informations sur la masse moléculaire, les ions caractéristiques de masses moléculaires sont appelés ions quasi-moléculaire ou pseudo-moléculaire indépendamment de leur nature exacte : $[M+H]^+$, $[M-H]^+$.

Parmi les gaz employés en ICP (méthane, isobutane), on a l'ammoniac :

Le radical cation $NH_3^{+\cdot}$ formé par impact électronique réagit avec une molécule d'ammoniac pour former l'ion ammonium et le radical $NH_2^\cdot$



Dans le plasma, on observe un ion de masse 35u provenant de l'association d'un ion ammonium et d'une molécule d'ammoniac :



Avec ce gaz réactif, le mode d'ionisation dépend de la nature de l'échantillon. Les molécules basiques s'ionisent par transfert de proton. Les molécules polaires (et celles susceptibles de former des liaisons hydrogène) peu ou pas basiques, forment un adduit et, dans certains cas, on observe simultanément les ions $[M+H]^+$ et $[M+NH_4]^+$.⁸³

⁸²Munson, B. «Chemical ionization mass spectrometry: ten years later», *Anal. Chem.* **1977**, 49, 772A-778A.

⁸³De Hoffmann, E.; Charrette, J.; Stroobant, V. «Spectrométrie de masse», 2^{ème} édition, Librairie Dunod, Paris, **1999**.

Protocole expérimental :

Les H.Es de coriandre, de fenouil et de persil ont été analysées au moyen d'un CG/MS équipé d'une colonne capillaire apolaire TR-1MS de type polydiméthylsiloxane.

La Programmation de température du four : de 80°C / mn à raison de 20°C /mn jusqu'à 280°C /mn. La température de l'injection : 250°C et celle de la détection : 300°C.

Débit du gaz vecteur (He) : 1mL/mn. Le volume injecté : 0,5µL en mode split.

❖ **Mode impact électronique CPG/MS-IE**

Acquisition Start après l'élution du solvant : 2,5 mn

Nombre de scan par seconde : 3,0

Gamme de Masse est déterminée 29-369 uma

❖ **Mode ionisation chimique positive (ICP)**

Le gaz utilisé est l'ammoniac.

4. Résultats et discussion

L'identification des produits contenus dans les essences a été réalisée par co-injection des étalons de référence : le linalol, l' α -pinène, le géraniol, le camphre, l'estragole, la carvone et l'anéthole et par comparaison des temps de rétention de ces derniers avec ceux des différents pics affichés sur le chromatogramme.

Les tableaux **III-1, 2, 3, 6, 7, et 9, 10** donnent le temps de rétention, le pourcentage de chaque pic, ainsi que le composé identifié pour chaque essence.

N.B : Les chromatogrammes de co-injection de chaque essence avec les étalons sont reportés en annexe.

4.1. Huile essentielle de coriandre

4.1.1. Essence des graines de coriandre

Le chromatogramme de l'H.E des graines de coriandre (Figure **III-1**) révèle 15 pics dont les majoritaires sont mentionnés dans le Tableau **III-1**

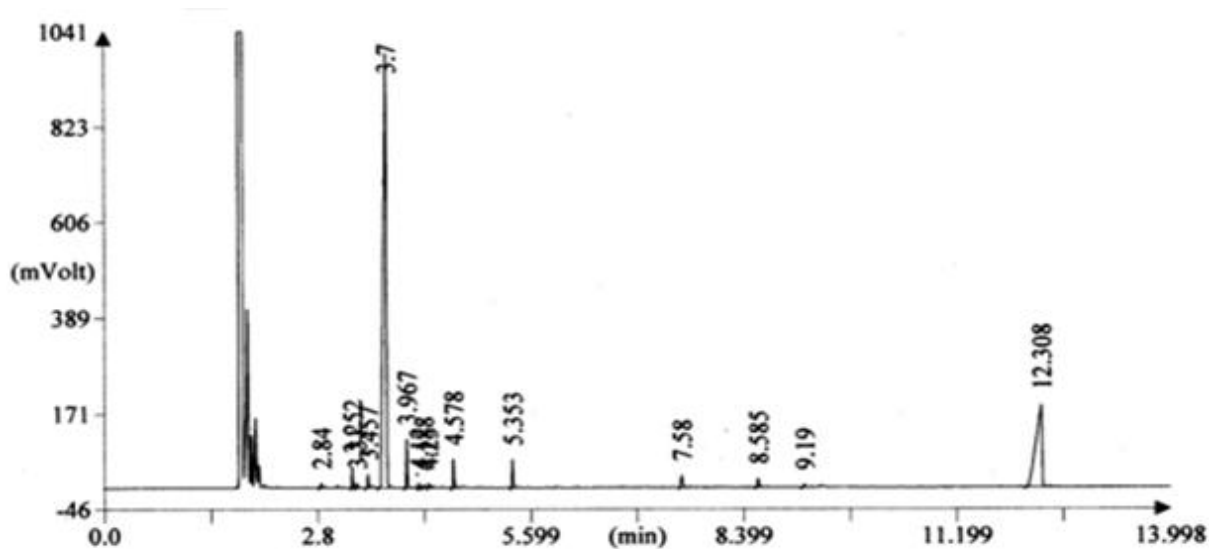


Figure III-1 : Chromatogramme analytique de l'H.E des graines de coriandre

Tableau III-1 : Analyse par CPG de l'H.E de graines de coriandre

N°de pic	Tr	%	Composés identifiés
1	2,84	0,26	α - pinène
2	3,25	1,11	-
3	3,31	0,29	Limonène
4	3,46	0,75	-
5	3,70	63,50	Linalol
6	3,97	2,69	Camphre
9	4,25	0,49	-
10	4,58	1,79	Géraniol
11	5,35	1,72	-
12	7,58	1,11	-
15	12,31	24,61	-

Les résultats de l'analyse par CPG montrent que le produit majoritaire de l'H.E des graines de coriandre est le linalol avec un pourcentage de 63,5%.

Par co-injection de l'essence de coriandre avec les produits de références (l' α -pinène, le limonène, le linalol, le camphre, la carvone et le géraniol), les composés suivants ont pu être identifiés :

- ❖ L' α - pinène, par une augmentation de la hauteur du pic n°1 de 0,26 à 10,37%;
- ❖ Le limonène relatif au pic n°5 varie de 0,29 à 2,85%;
- ❖ Le linalol, par l'augmentation du pourcentage du pic n°4 de **63,5%** à 68,15%;
- ❖ Le géraniol relatif au pic n°10 varie de 1,79 à 13,33%;
- ❖ Le camphre par augmentation du pic n°6 de 2,69 à 3,87%.

L'H.E a été diluée dans l'éther diéthylique et analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS).

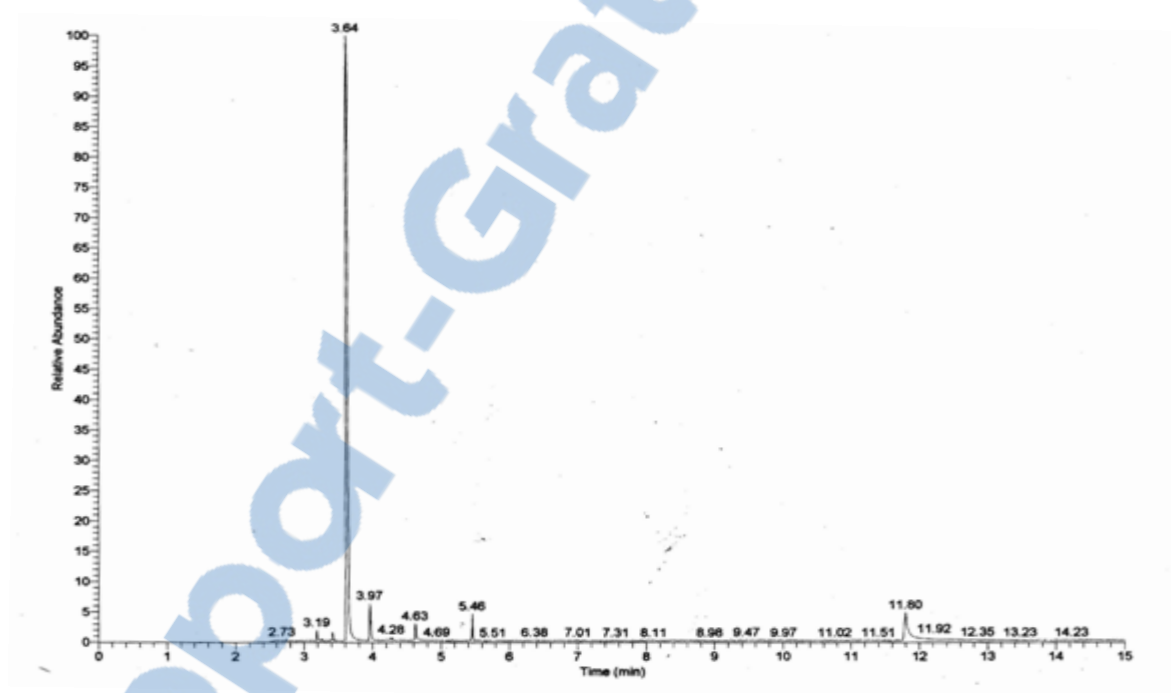


Figure III-2 : Chromatogramme en impact électronique (IE+) de l'H.E des graines de coriandre

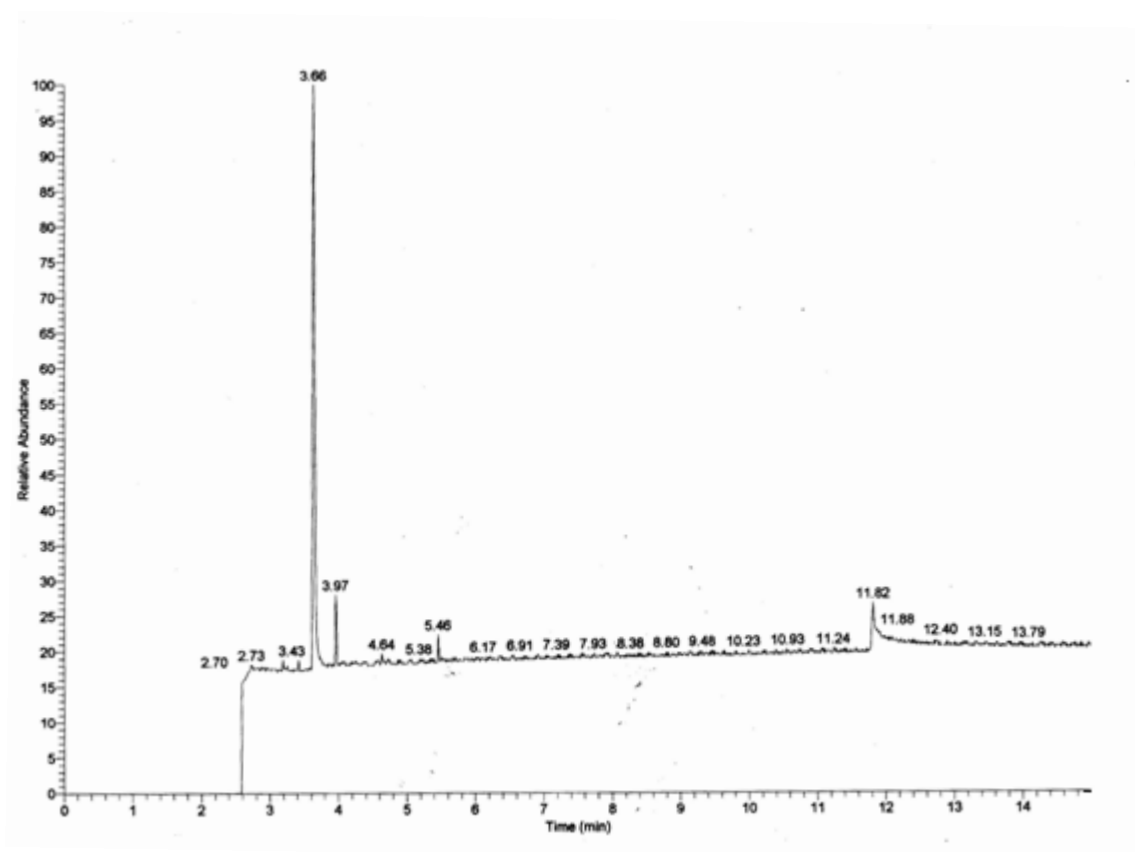
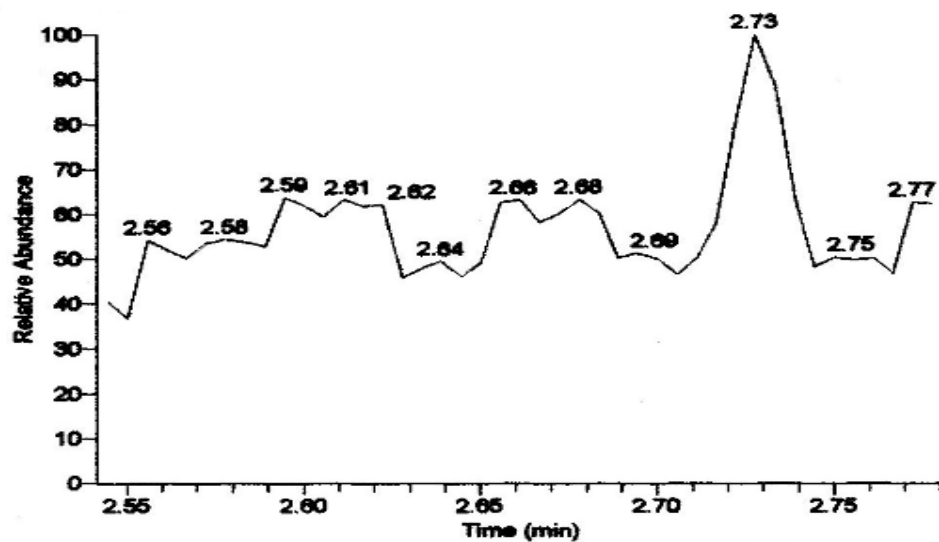
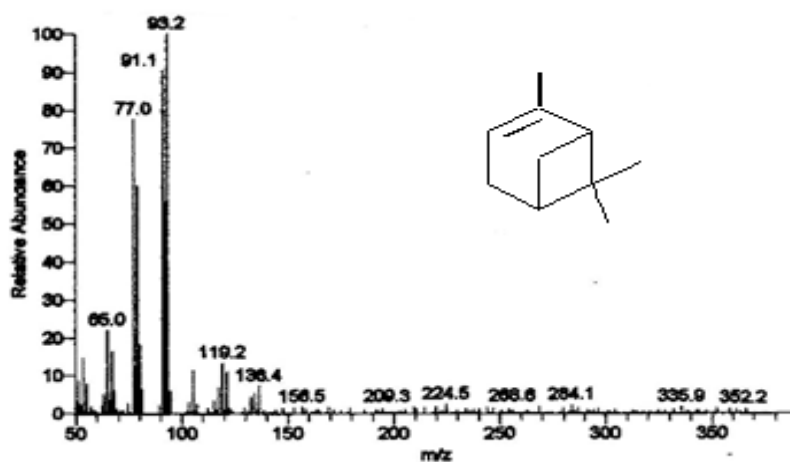


Figure III-3 : Chromatogramme en ionisation chimique (ICP) de l'H.E des graines de coriandre

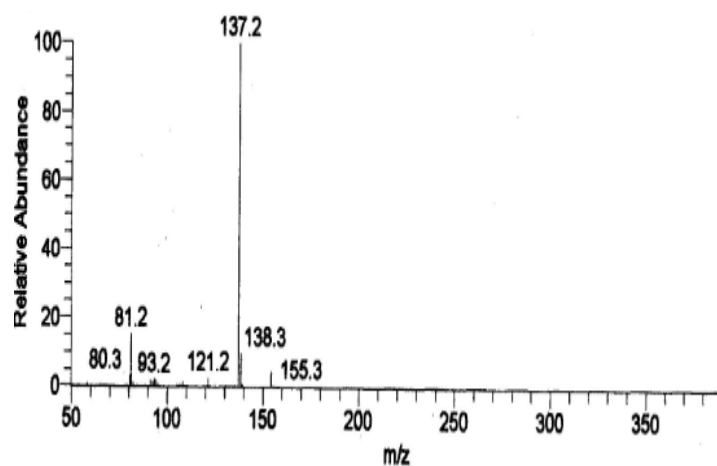
En utilisant la CG/MS-ICP et IE⁺, les constituants suivants ont été identifiés :

- ❖ Tr = 2,73 correspond à l' α -pinène





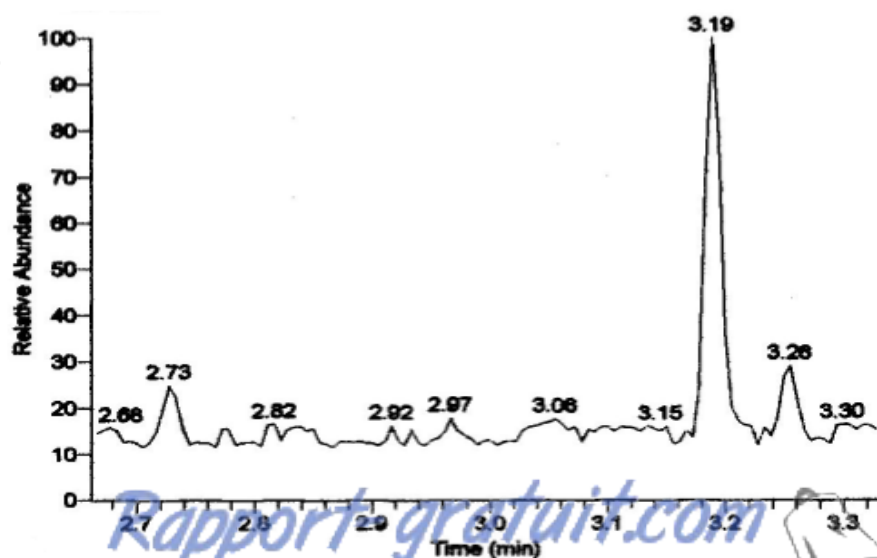
(IE+)



(ICP)

Figure III-4 : Chromatogramme en impact électronique et spectre de masse correspondant au $T_r = 2,73\text{min}$ de l'H.E de coriandre

❖ $T_r = 2,97$ correspond au β -pinène



LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

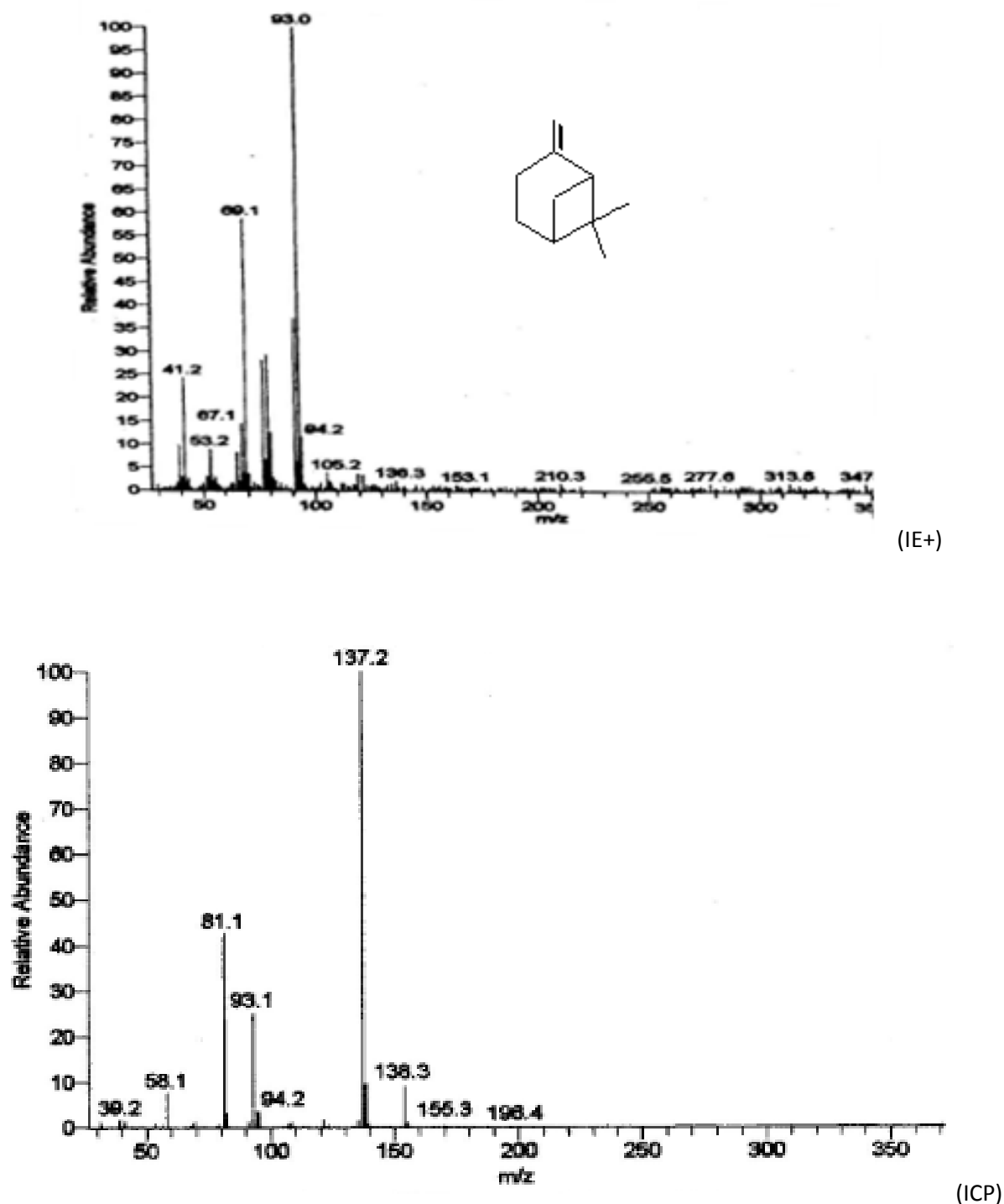


Figure III-5 : Chromatogramme et spectres de masse en (IE+) et (ICP) correspondant au $T_r = 2,97$ min de l'H.E de coriandre

❖ Tr = 3,19 correspond au *p*-cymène

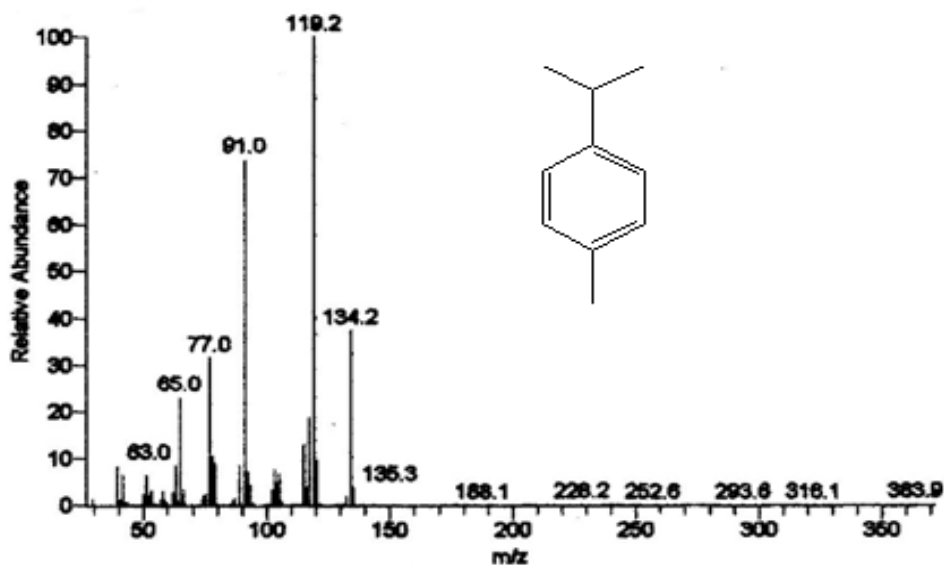


Figure III-6 : Spectre de masse correspondant au Tr = 3,19 min.

❖ Tr = 3,26 correspond au limonène

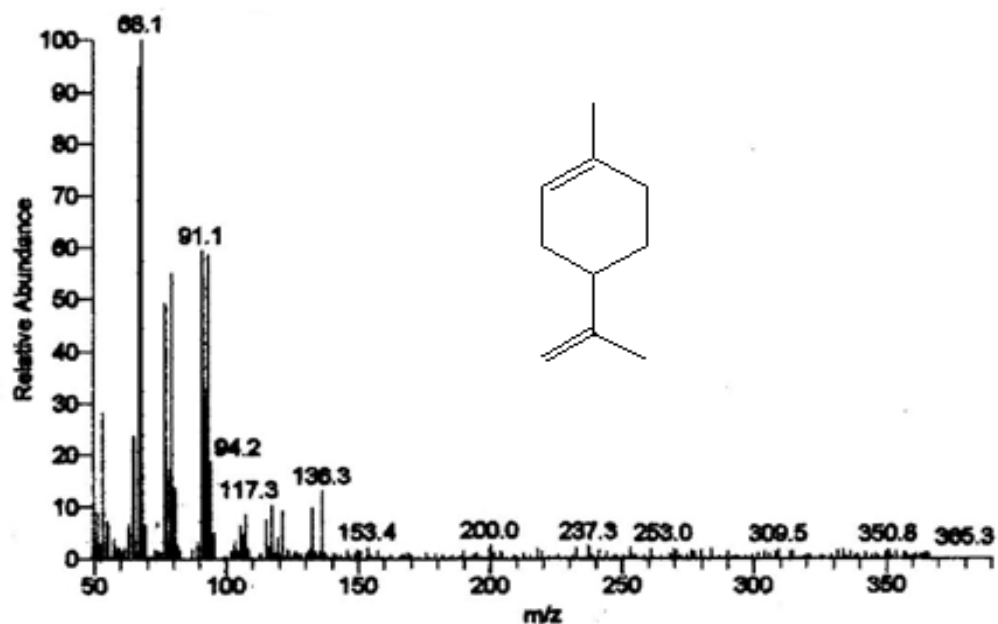


Figure III-7 : Spectre de masse en IE+ correspondant au Tr = 3,26 min.

❖ Tr = 3,42 correspond au γ -terpinène

La figure **III-8** regroupe le chromatogramme relatif au Tr = 3,42 et les spectres de masse en IE⁺ et en ICP

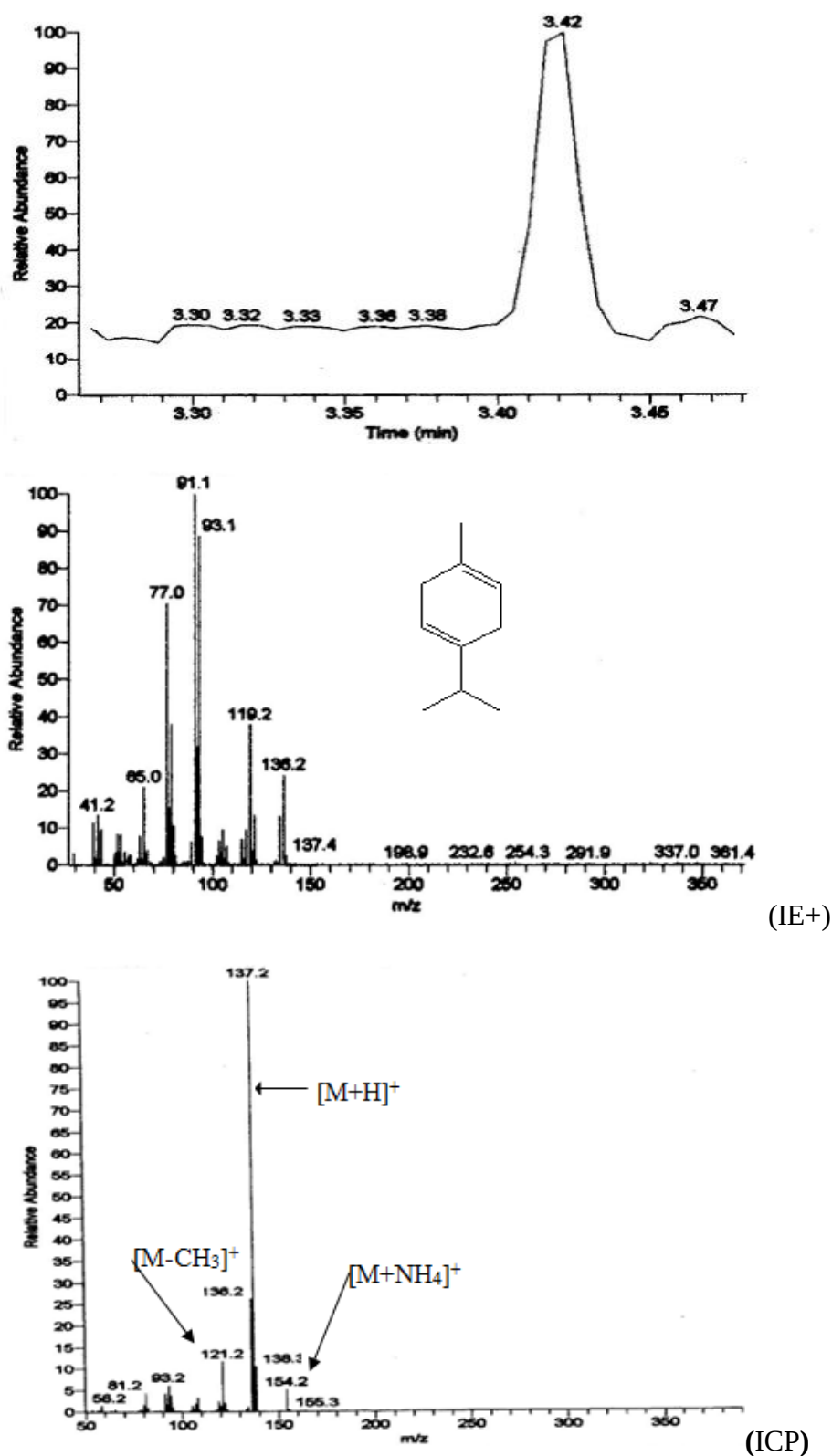


Figure III-8 : Chromatogramme relatif au Tr = 3,42 et aux spectres de masse en IE⁺ et en ICP

❖ Tr = 3,64 correspond au linalol

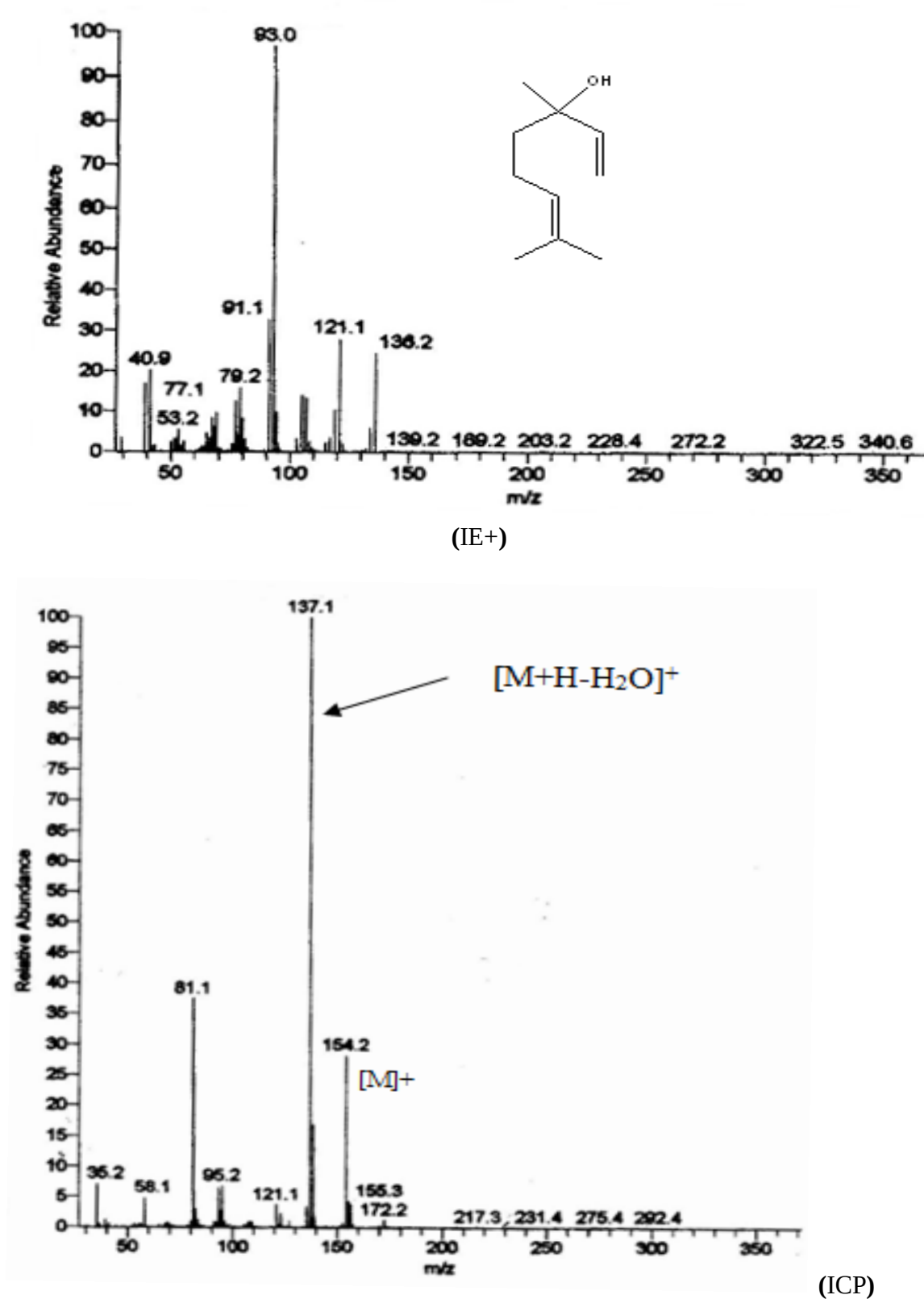
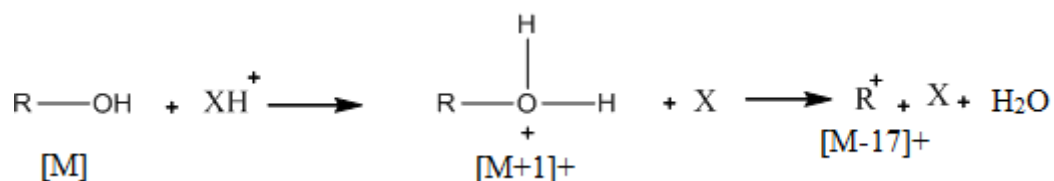


Figure III-9 : Spectres de masse en IE+ et en ICP relatif au Tr =3,64min.

En CG/MS-ICP, le pic de base correspond à l'ion $[M+H-H_2O]^+$ formé par la perte d'une molécule d'eau à partir de molécule protonée :



En IE+, le pic moléculaire est absent mais par comparaison avec le spectre du produit de référence et par CG/MS-ICP le linalol a pu être identifié dans cette essence.

Dans ce qui suit nous présentons une hypothèse de fragmentation du linalol :

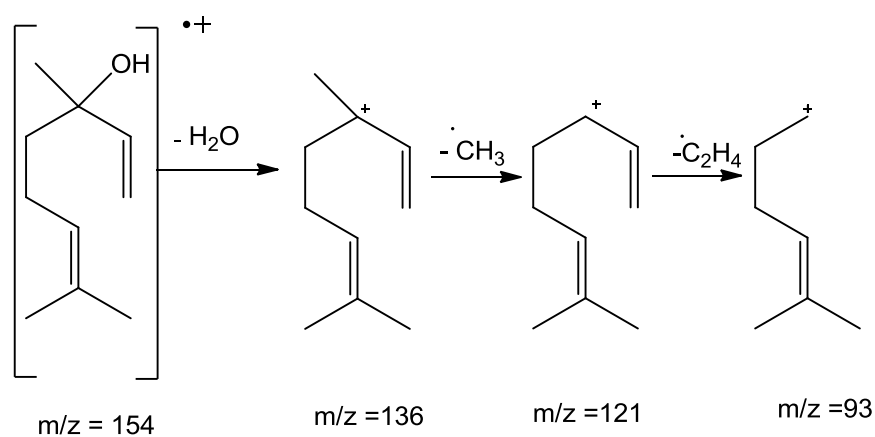
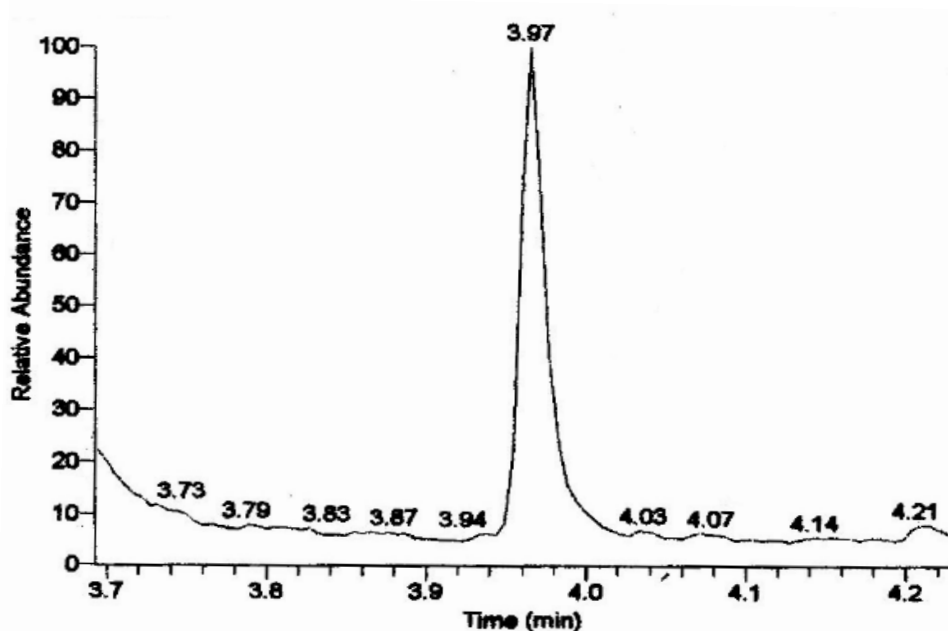


Figure III-10 : Hypothèse de fragmentation du linalol

❖ Tr = 3,97 correspond au camphre



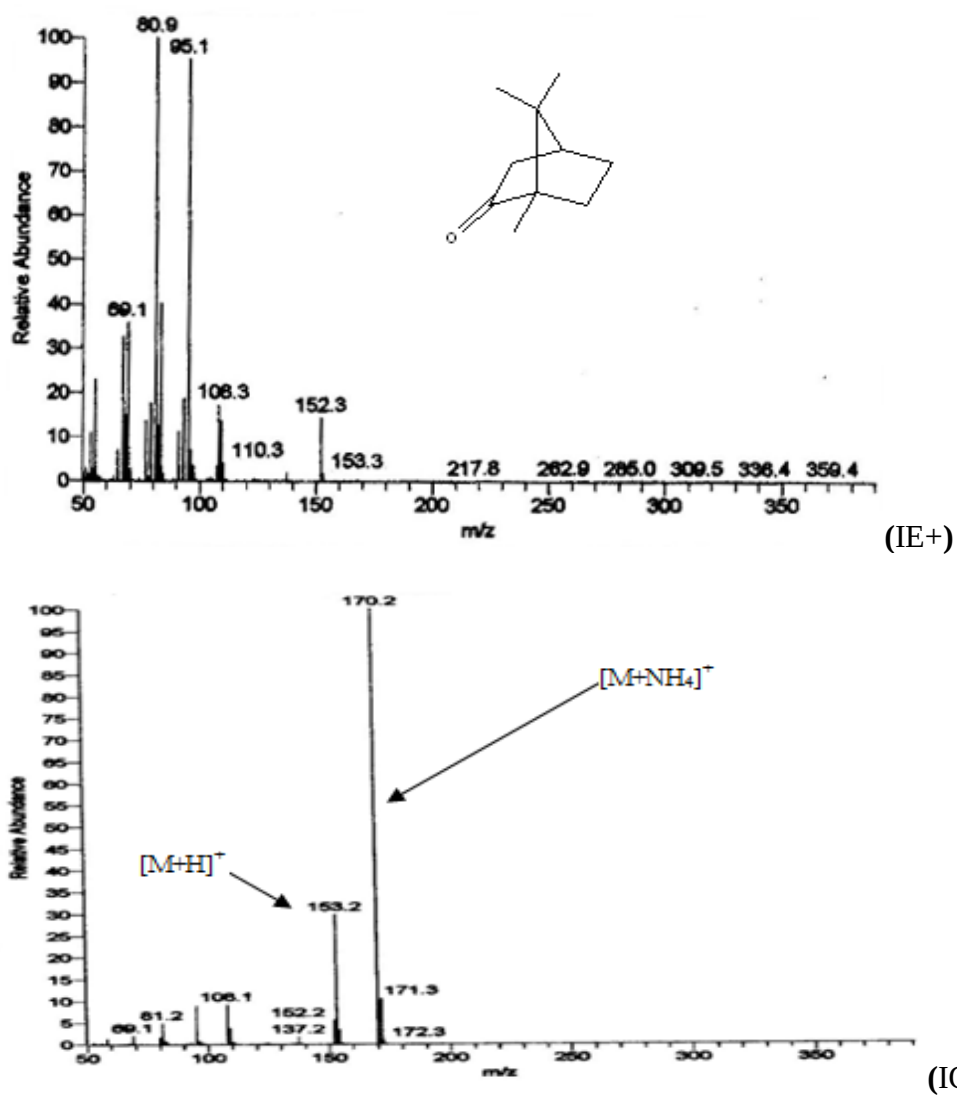
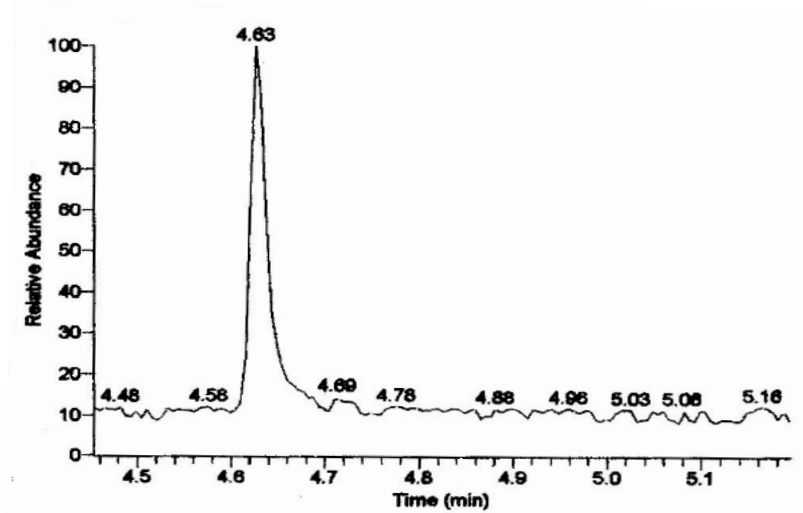


Figure III-11 : Chromatogramme et spectres de masse en IE+ et en ICP relatif au Tr = 3,97min.

❖ Tr = 4,63 correspond au géraniol



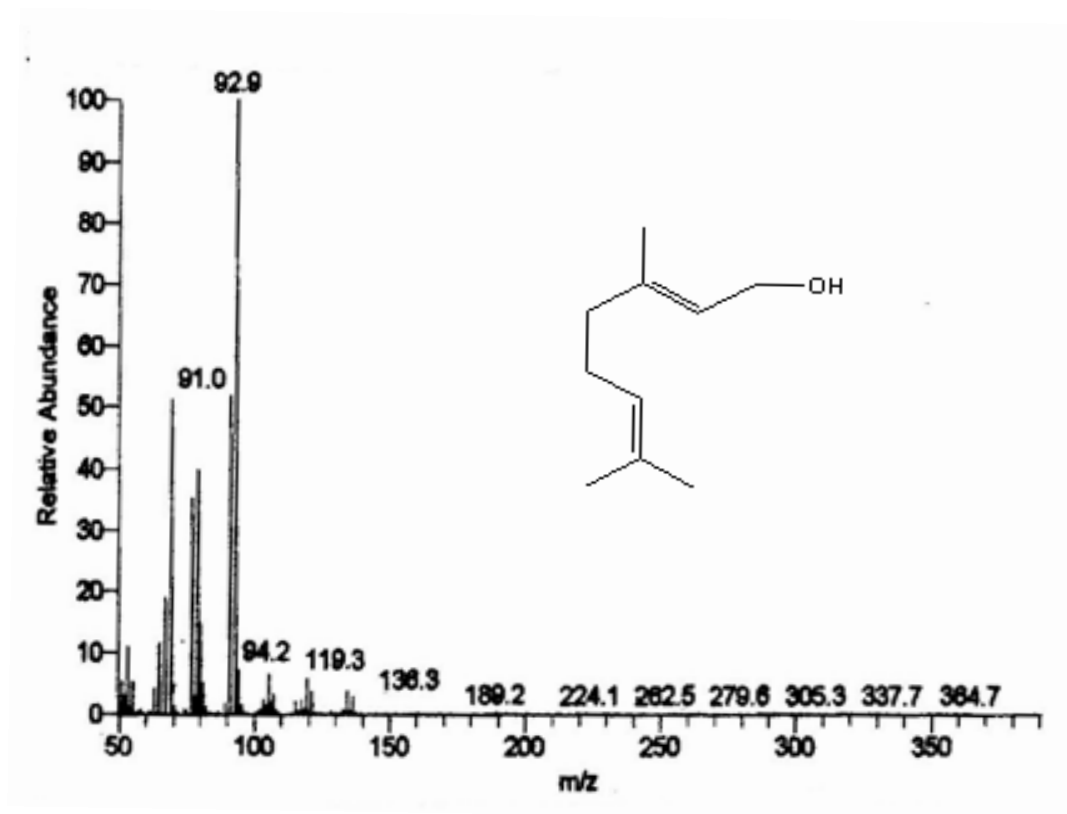
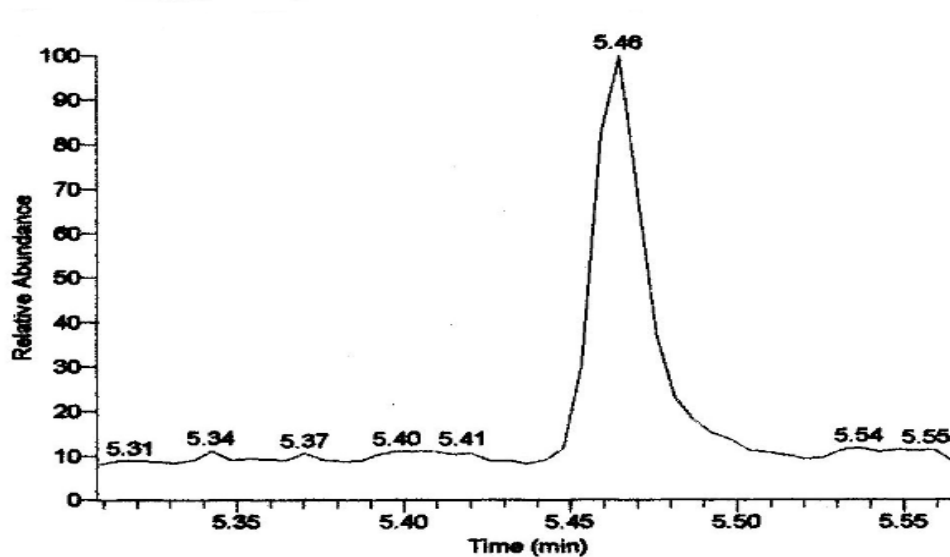


Figure III-12 : Chromatogramme et spectre de masse en IE+ relatif au Tr =4,63 min.

Par comparaison avec le spectre de masse du produit de référence, le géraniol a pu être identifié.

❖ Tr = 5,46 correspond au nérol



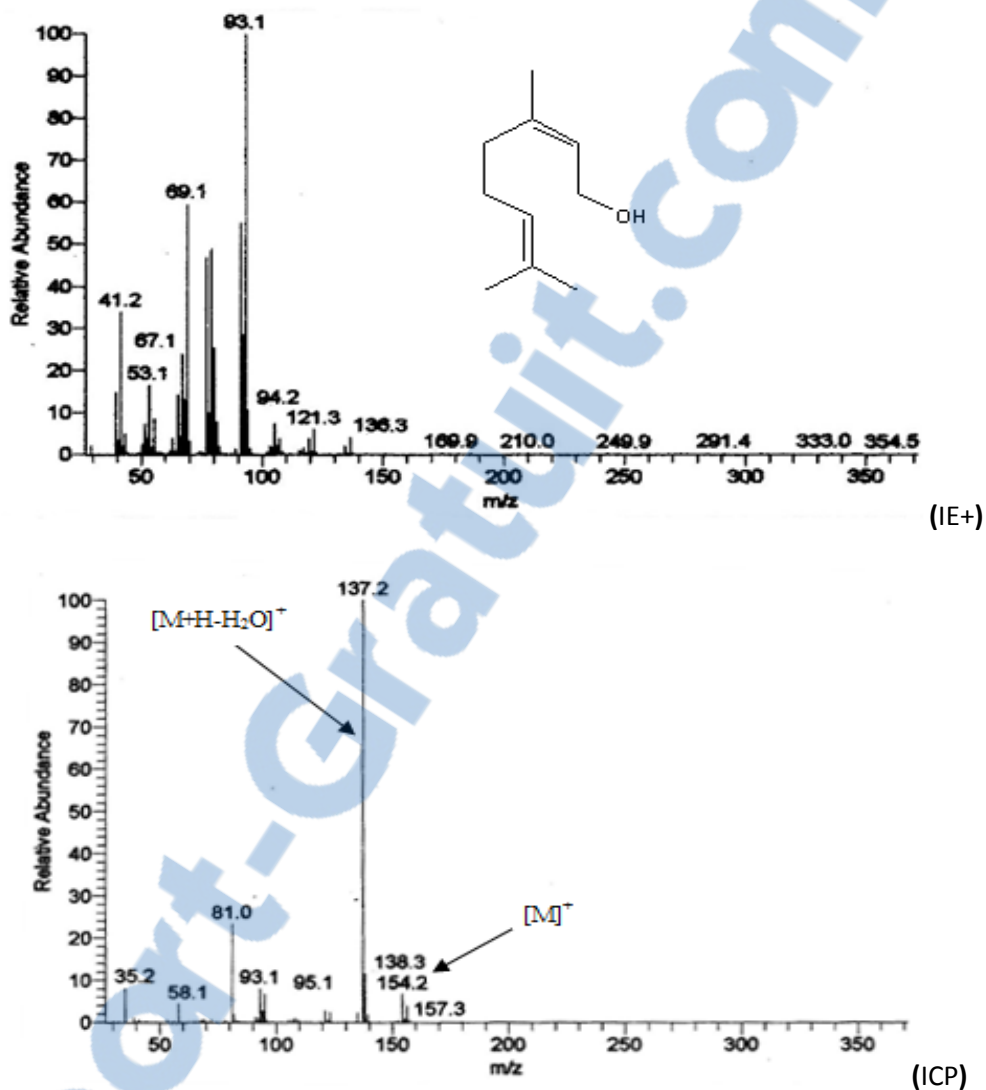
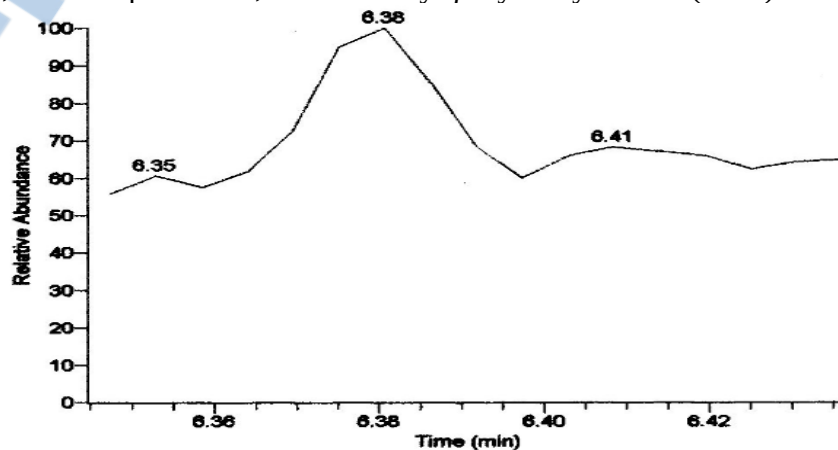


Figure III-13 : Chromatogramme et spectres de masse en IE+ et ICP relatif au $T_r = 5,46$ min.

Le nérol et le géraniol sont des isomères. Ils possèdent des spectres de masse similaires.

❖ $T_r = 6,38$ correspond au 2,6-di-tert-butyl-*p*-hydroxytoluène (BHT).



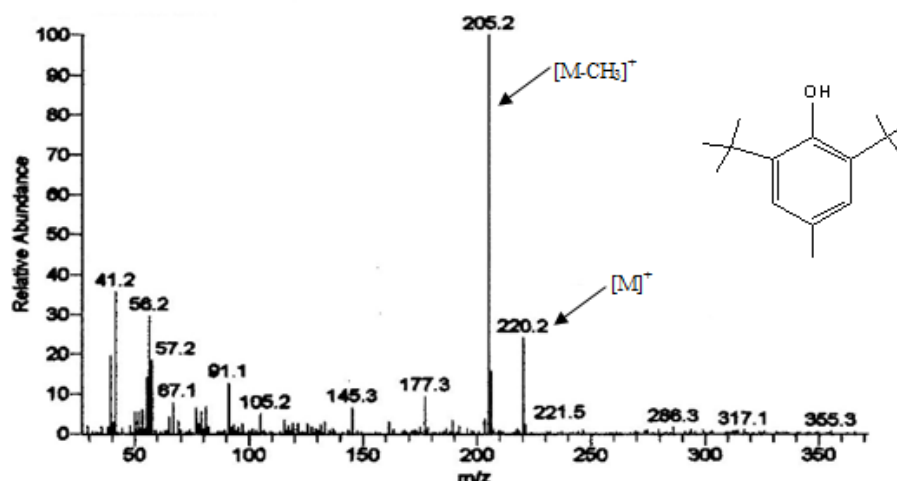


Figure III-14 : Chromatogramme et spectre de masse en IE+ relatif au Tr = 6,38 min.

Les résultats de l'analyse révèlent que l'H.E les graines de coriandre contient principalement du linalol (63,5%), du camphre (2,69%), du géraniol (1,79%), du limonène (0,29%), du α -pinène (0,26%) et une faible quantité de *p*-cymène,...et du 2,6-di-tert-butyl-*p*-hydroxytoluène (BHT).

4.1.2. Essence de coriandre fraîche

La composition chimique de l'H.E de la partie aérienne de coriandre est variable selon le stade de maturité de la plante. Pour cela, nous avons étudié deux essences : une en stade de floraison et l'autre en stade de fructification.

❖ Coriandre collecté en stade floraison

En CPG, le chromatogramme (Figure III-15) révèle 14pics. Les pourcentages et les temps de rétention des pics sont regroupés dans le Tableau III-2.

Tableau III-2 : Analyse par CPG de l'H.E de la partie aérienne de coriandre extraite en stade de floraison

N°de pic	Tr	%	N° de pic	Tr	%
1	4,06	2,02	7	5,27	4,72
2	4,26	9,64	8	5,38	18,78
3	4,63	26,02	9	5,63	13,16
4	4,68	3,33	10	5,90	8,45
5	4,70	3,35	13	6,71	2,00
6	4,92	1,36	14	7,09	1,53

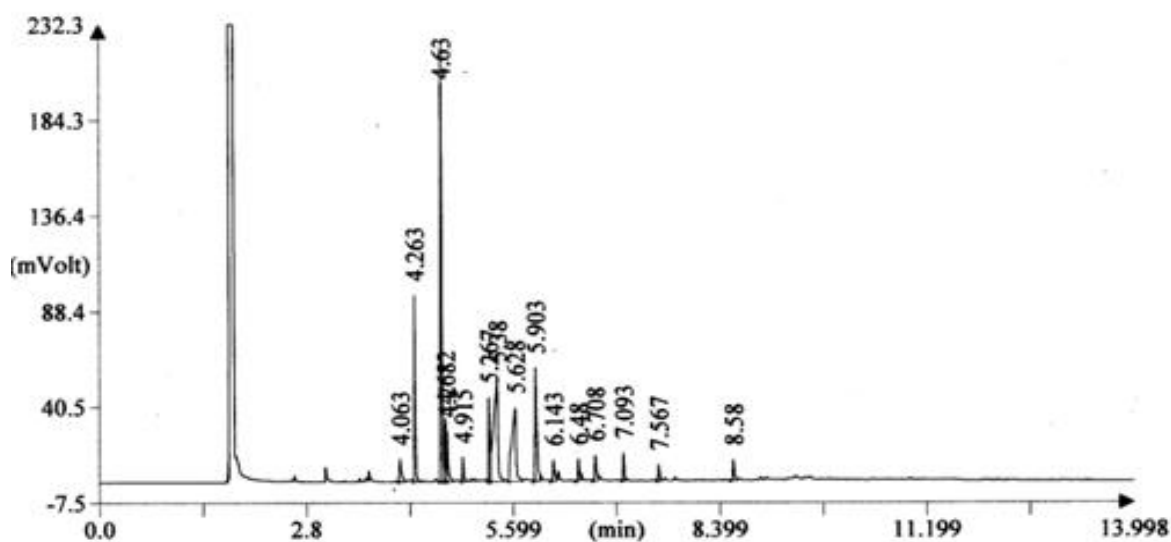


Figure III-15 : Chromatogramme analytique de l'H.E de coriandre fraîche en stade de floraison

A l'aide de la CG/MS, les produits suivants ont pu être identifiés :

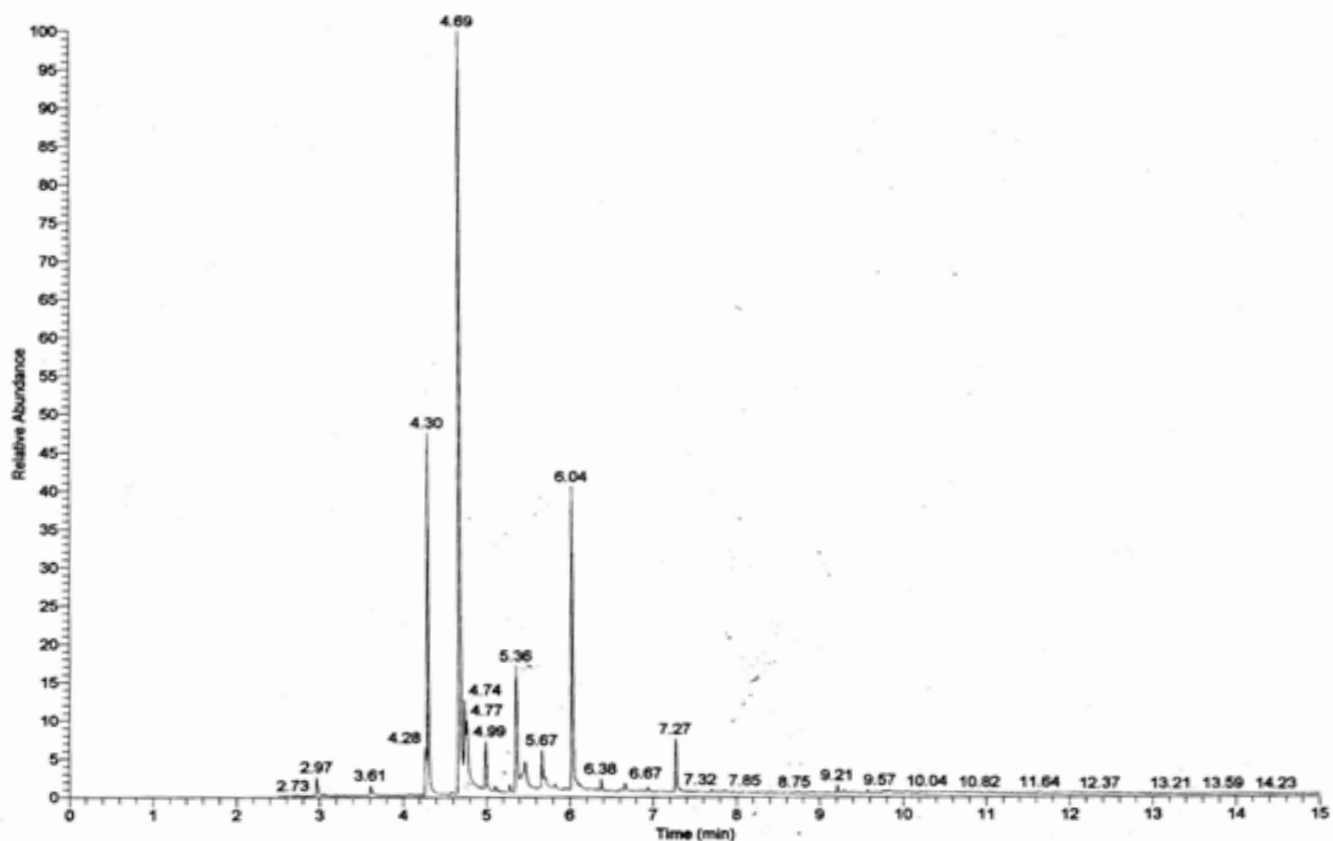


Figure III-16 : Chromatogramme en impact électronique de l'H.E de coriandre fraîche en stade de floraison

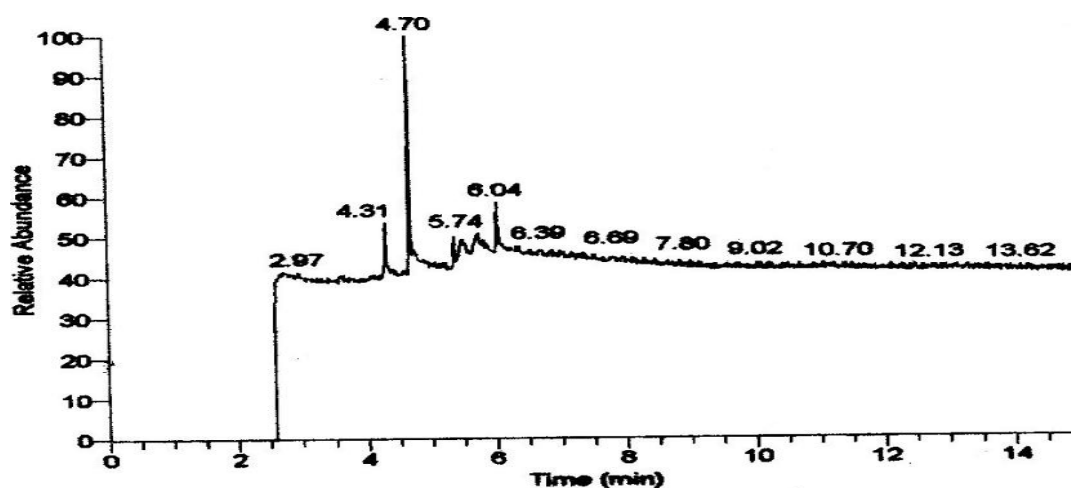


Figure III-17 : Chromatogramme en ionisation chimique de l'H.E de coriandre fraîche en stade de floraison

❖ Tr = 2,97 est relatif à l'octanal : $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{CHO}$

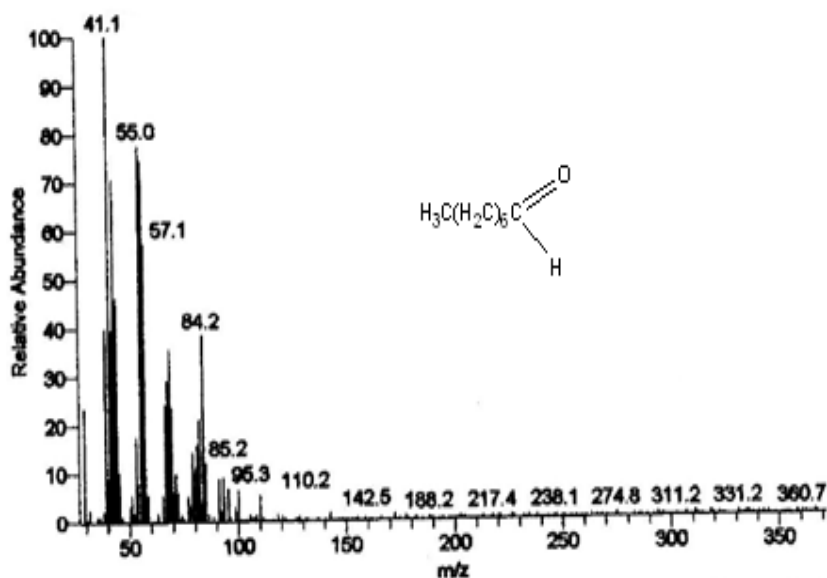
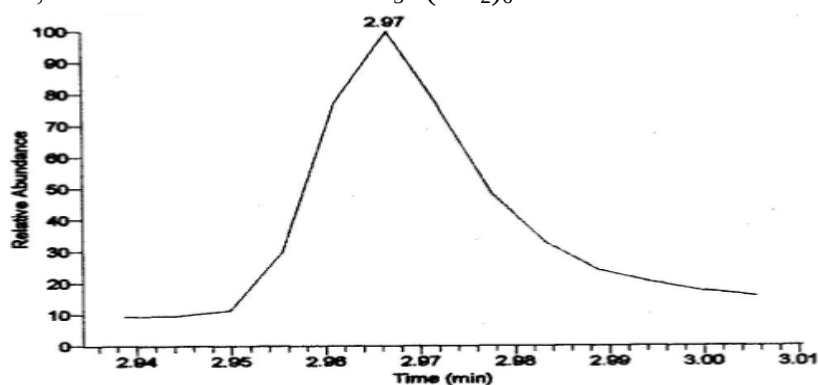


Figure III-18 : Chromatogramme et spectre de masse en IE+ relatif au Tr = 2,97 min.

❖ Tr = 3,61 est attribuable au n-nonaldéhyde (nonanal) : $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{CHO}$

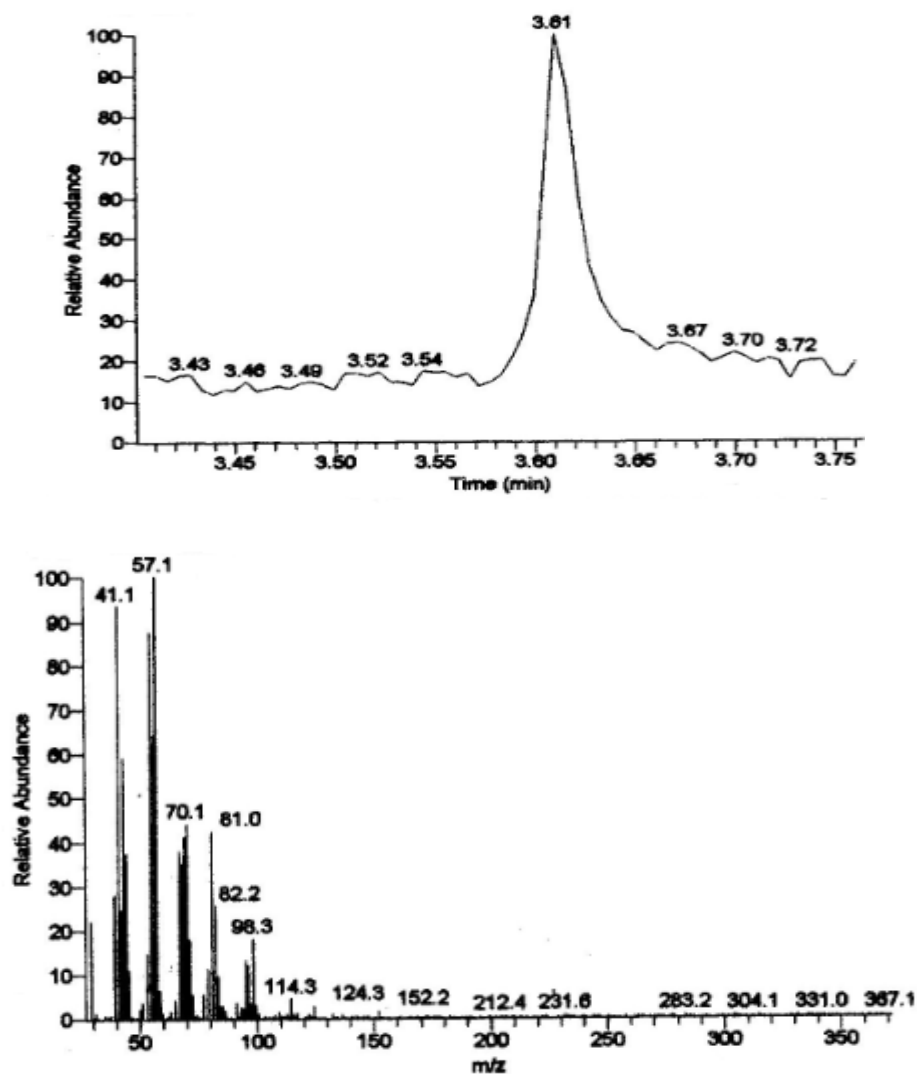
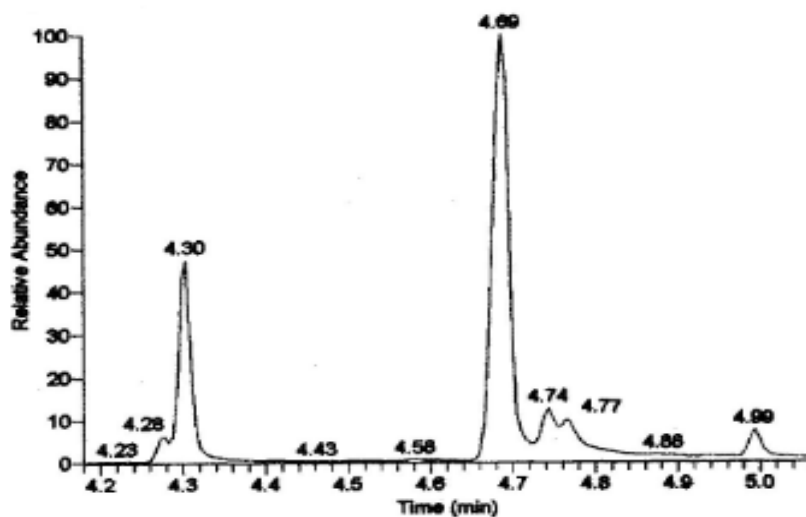


Figure III-19 : Chromatogramme et spectre de masse en IE⁺ relatif au Tr = 3,61 min.

❖ Tr = 4,30 équivaut au n-décaldéhyde ou appelé également décanal : $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_8\text{CHO}$



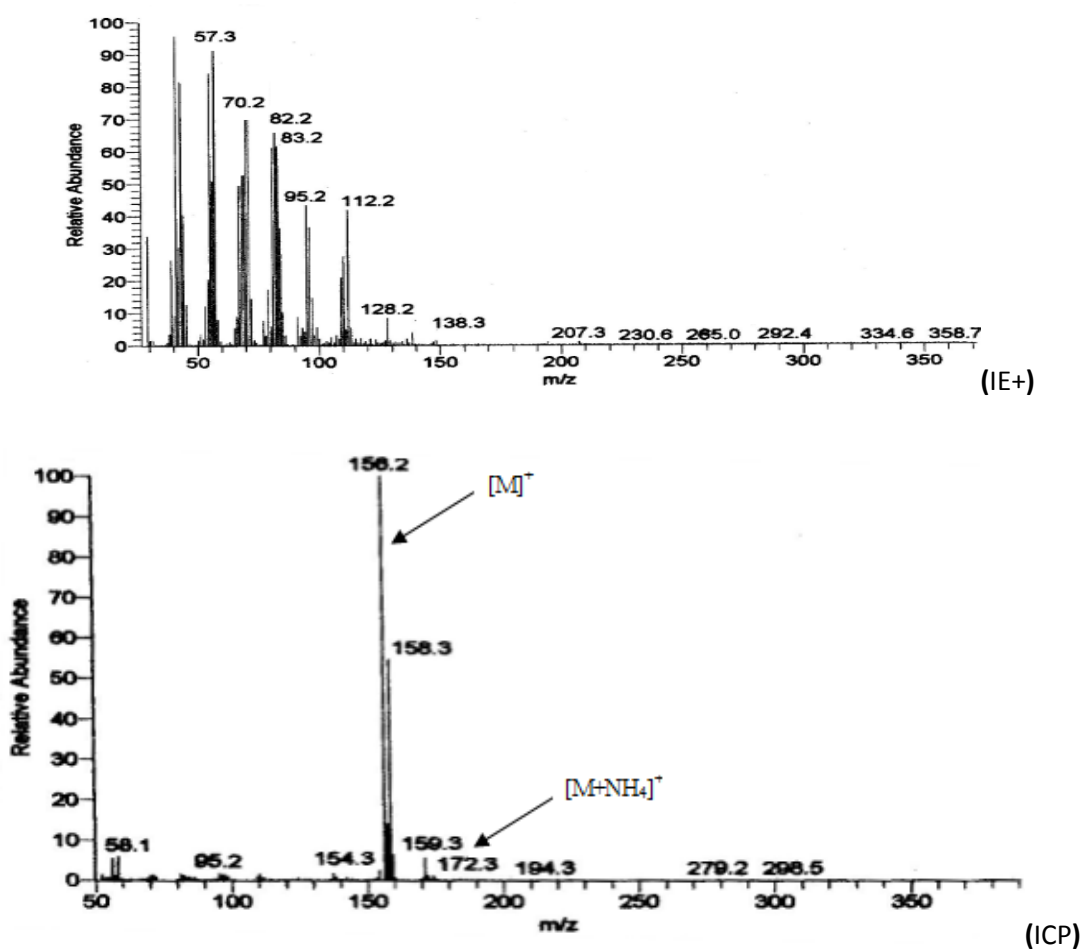
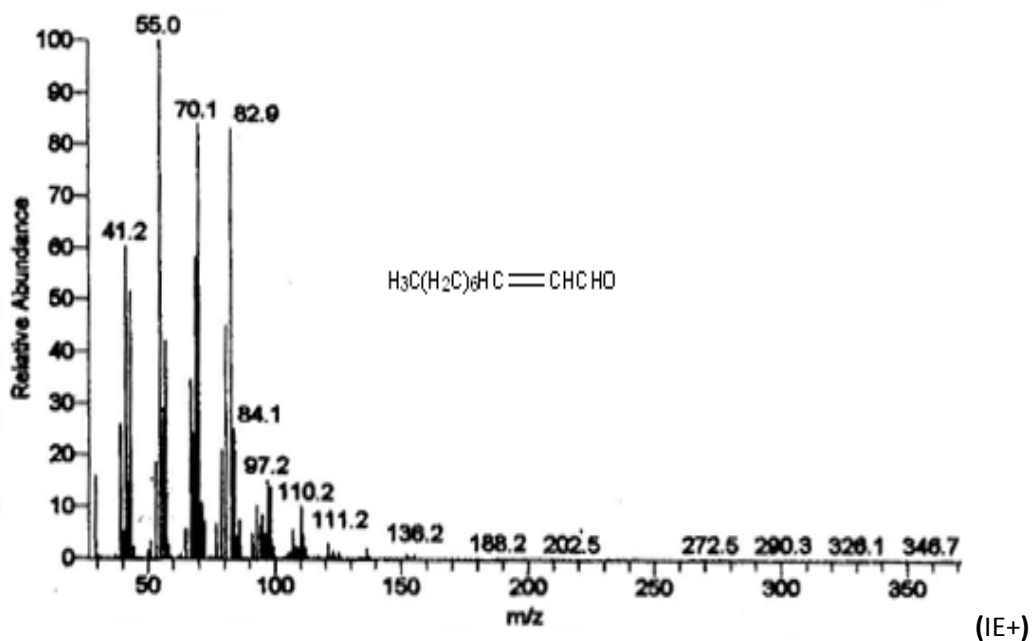


Figure III-20 : Chromatogramme et spectres de masse en IE+ et ICP relatif au
Tr = 4,30 min.

❖ Tr = 4,69 représente le 2-décenal : $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$



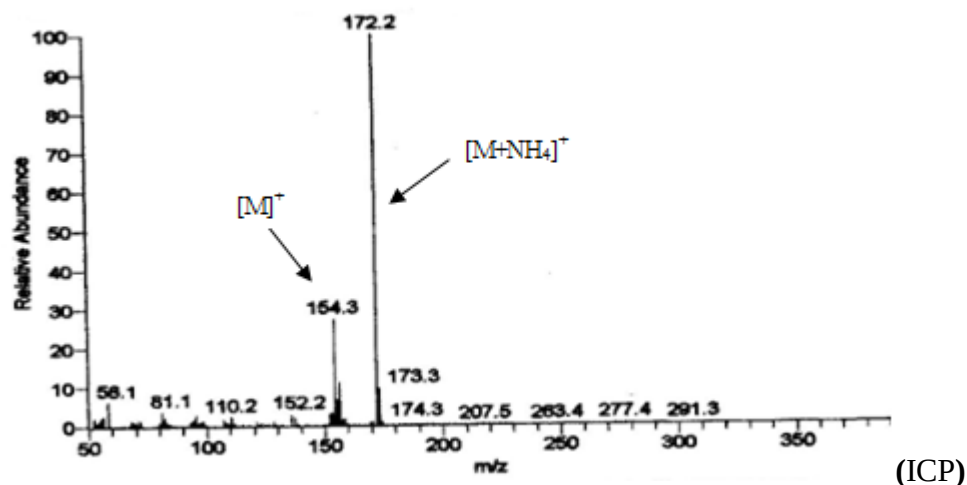


Figure III-21 : Spectres de masse en IE+ et ICP relatif au Tr = 4,69 min.

- ❖ Tr = 4,74 se rapporte au (Z) 3-décèn-2-ol : $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_3)$

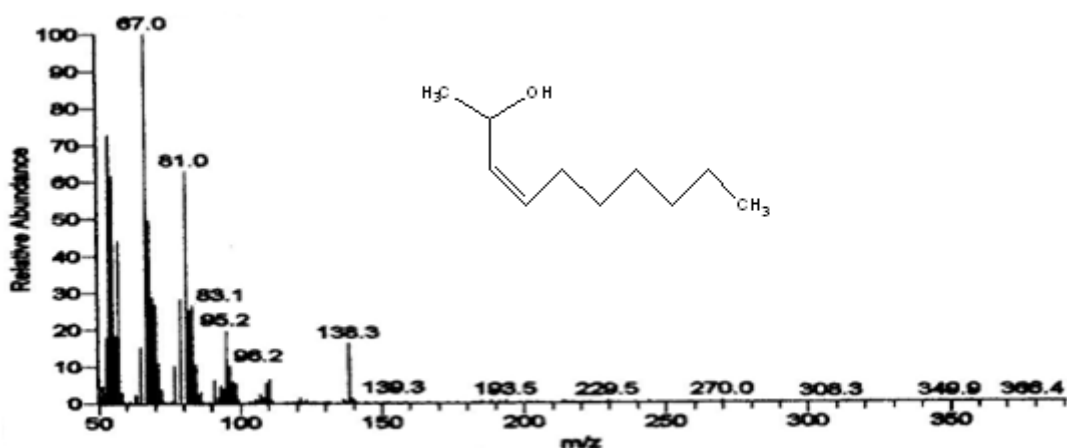


Figure III-22 : Spectre de masse en IE+ relatif au Tr = 4,74 min.

- ❖ Tr = 4,99 correspond au undécanal : $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{CHO}$

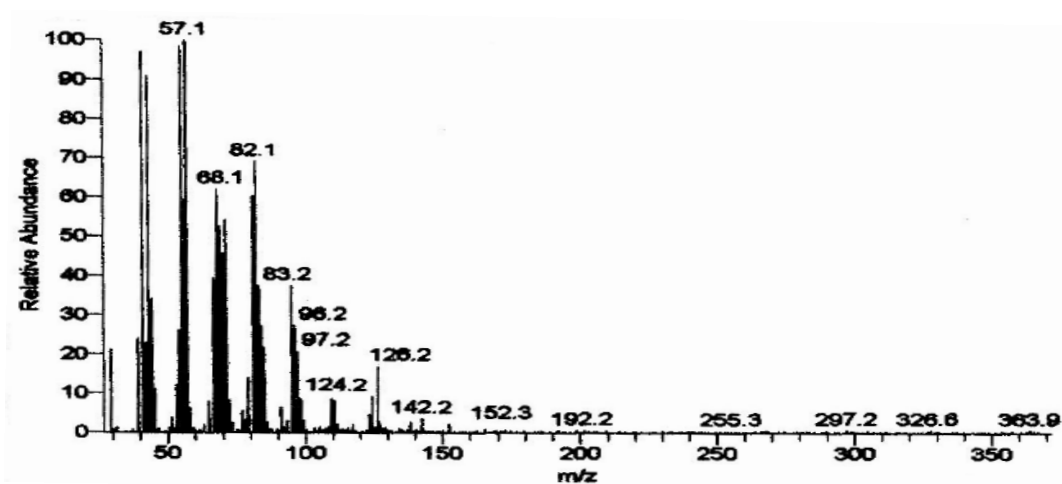


Figure III-23 : Spectre de masse en IE+ relatif au Tr = 4,99 min.

❖ Tr = 5,14-7,27

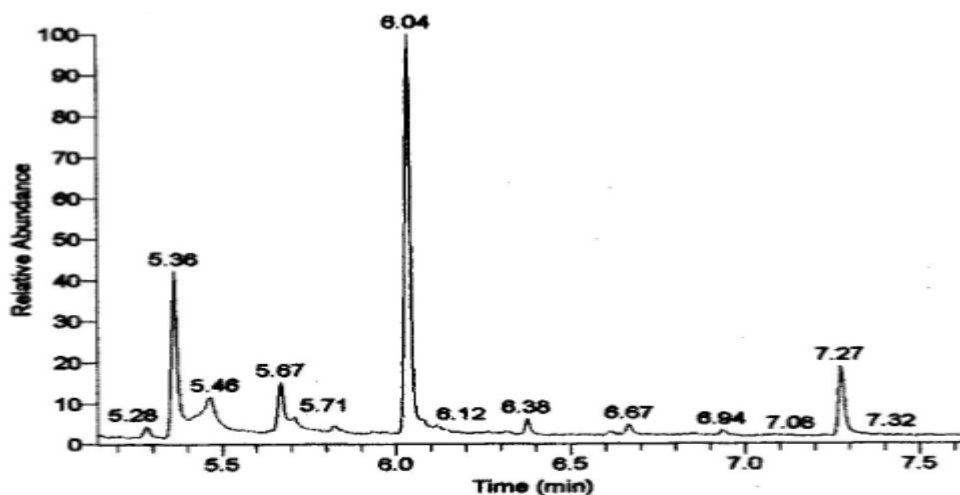
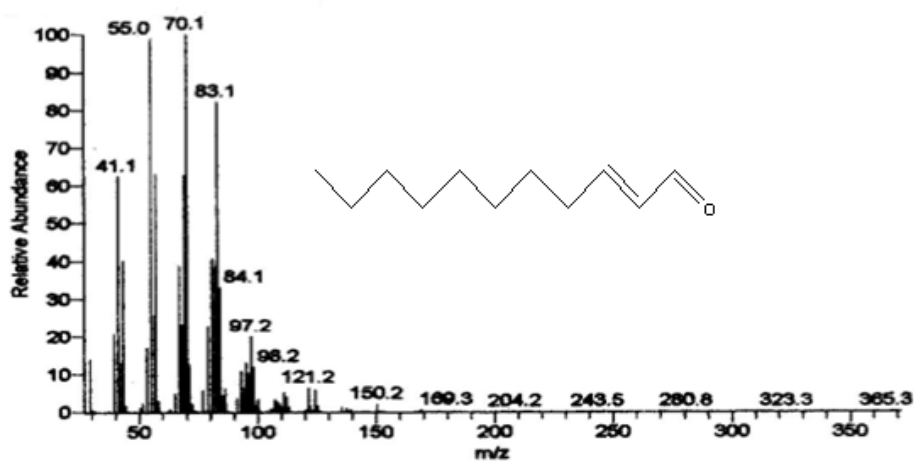
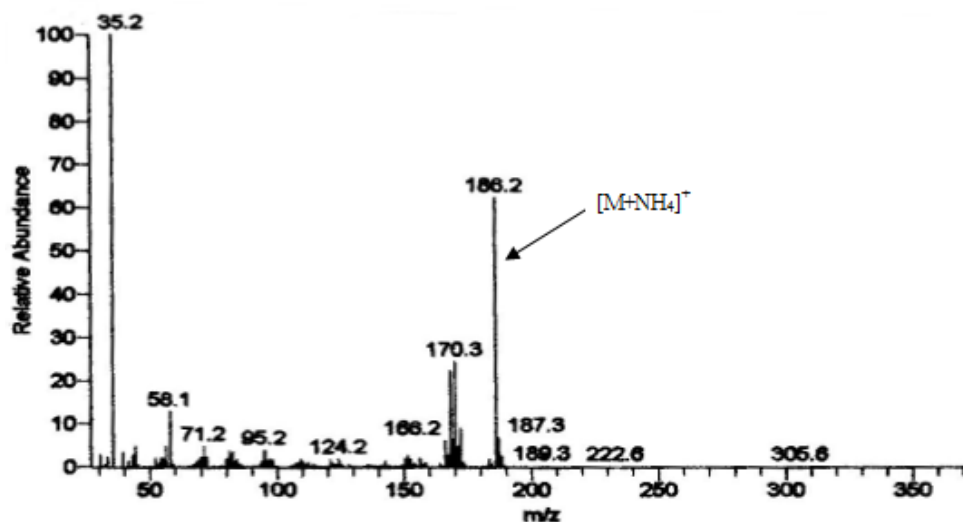


Figure III-24 : Chromatogramme en IE+ relatif au Tr de 5,14 à 7,27 min.

❖ Tr = 5,36 est relatif au 2-undécénal : $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$ 

(IE+)



(ICP)

Figure III-25 : Spectres de masse en IE+ et ICP relatif au Tr = 5,36 min.

En ICP le pic du $m/z = 35$ provient de l'association d'un ion ammonium et d'une molécule d'ammoniaque : $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3 \longrightarrow (\text{NH}_4 + \text{NH}_3)^+$

❖ Tr = 5,67 équivaut au dodécanal (lauraldéhyde) : $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{10}\text{CHO}$

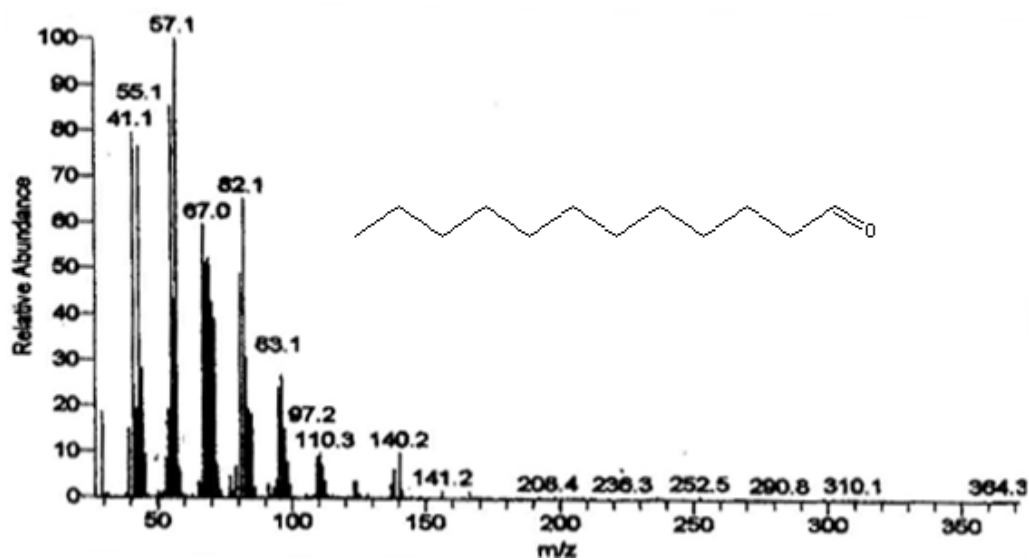
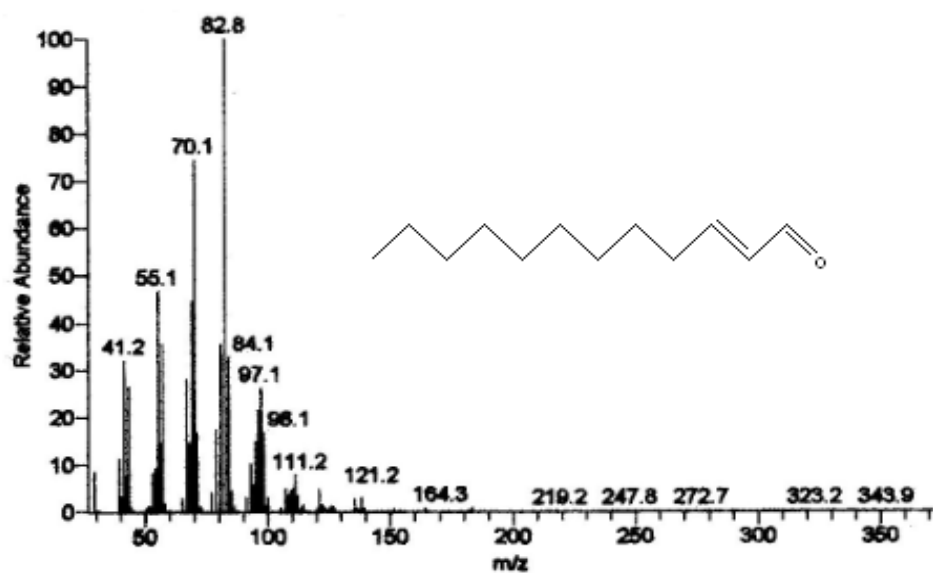


Figure III-26 : Spectre de masse en IE+ relatif au Tr = 5,67 min.

❖ Tr = 6,04 répond au 2-dodécèn-1-al : $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_8\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$



(IE+)

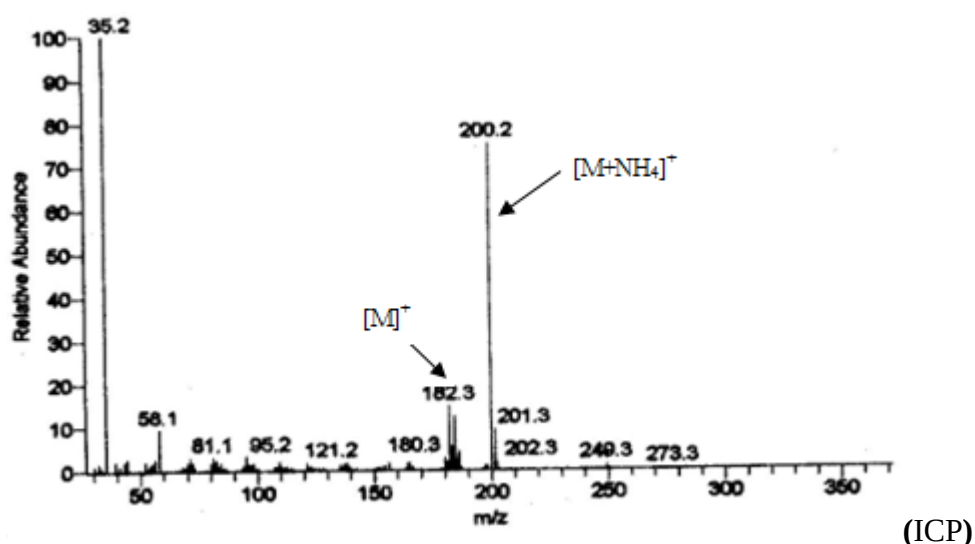


Figure III-27 : Spectres de masse en IE+ et ICP relatif au Tr = 6,4 min.

❖ Tr = 6,38 correspond au 2,6-di-tert-butyl-*p*-hydroxytoluène (BHT)

A la lumière de ces résultats, le produit majoritaire de l'H.E de coriandre fraîche en stade de floraison est le 2-décène (26,02%) suivi par le n-décaldéhyde, le 2-dodécène et le 2-undécène. Cette essence contient également le 2,6-di-tert-butyl-*p*-hydroxytoluène (BHT).

❖ Coriandre collecté en stade de maturité

Le matériel végétal est récolté en stade de maturité (la formation des fleurs avec des petites graines vertes).

En CPG, le chromatogramme analytique de cette essence (Figure III-28) révèle 31pics dont les plus importants sont représentés dans le tableau III-3.

Tableau III-3 : Analyse par CPG de l'H.E de la partie aérienne de coriandre extraite en stade de maturité

N° de pic	Tr	%	N° de pic	Tr	%
1	2,64	0,42	16	4,76	10,68
2	2,85	0,09	18	4,95	2,40
3	3,05	1,28	22	5,31	4,49
8	3,64	1,75	27	5,58	2,29
13	4,32	16,24	28	5,66	1,40
14	4,72	34,52	31	5,95	7,78

La présence de l' α -pinène a été mise en évidence par son co-injection avec l'H.E de coriandre. Ceci a été confirmé par l'augmentation du pic n°2 de 0,09% à 6,91%.

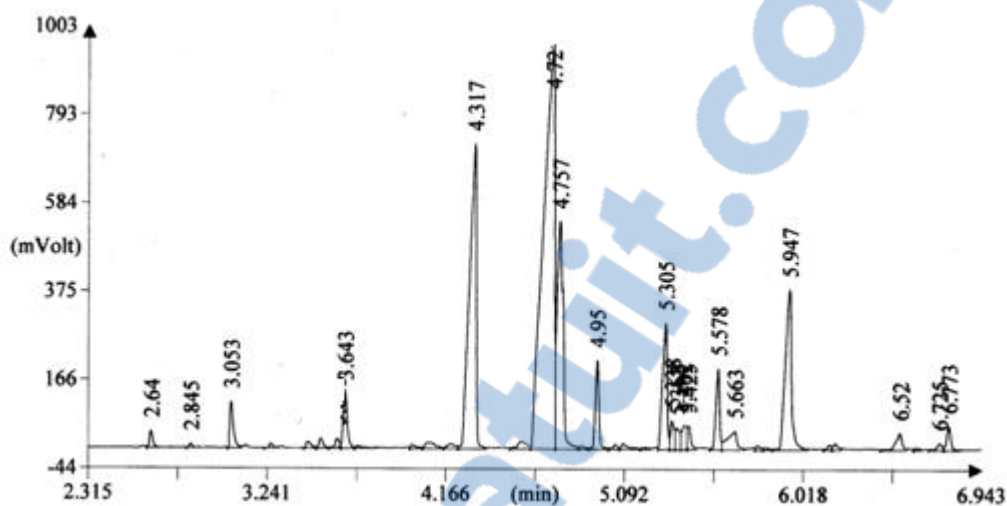


Figure III-28 : Chromatogramme analytique de l'H.E de coriandre fraîche en stade de maturité

En utilisant la CG/MS, les constituants suivants ont pu être identifiés :

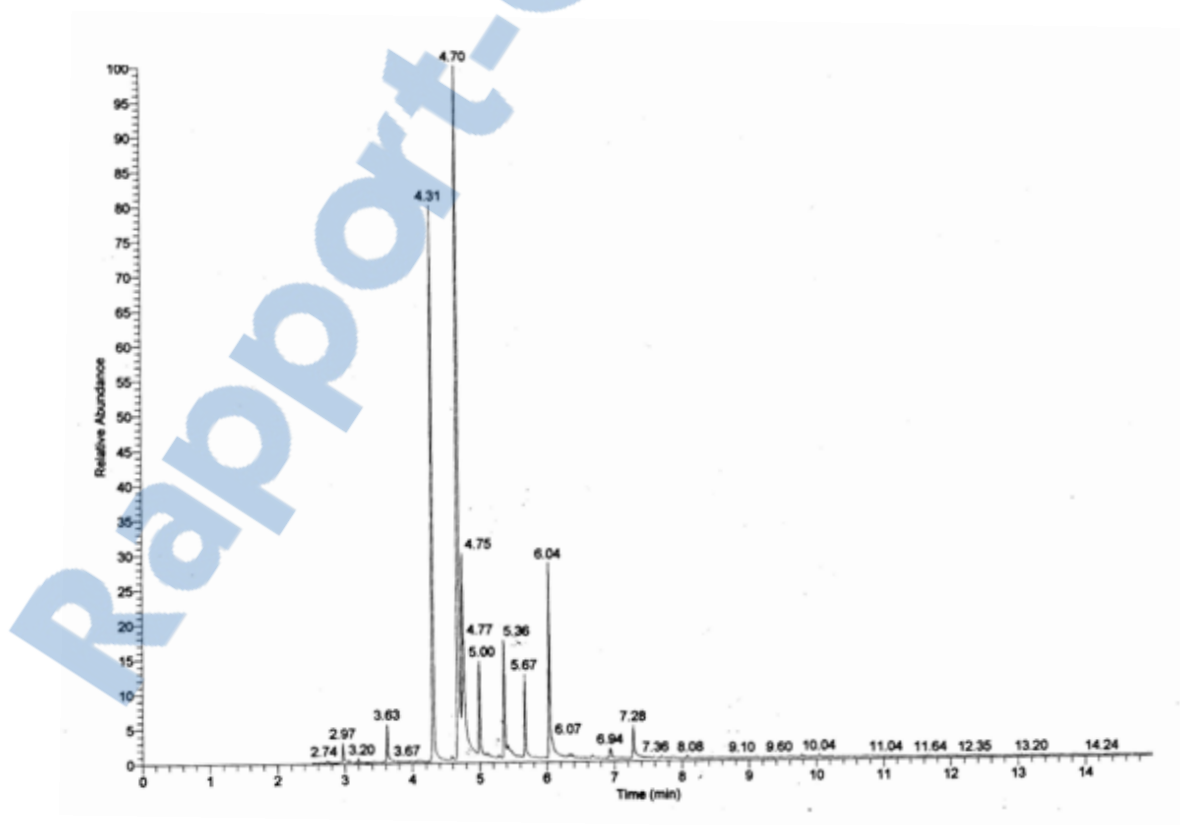


Figure III-29 : Chromatogramme en impact électronique de l'H.E de coriandre fraîche en stade de maturité

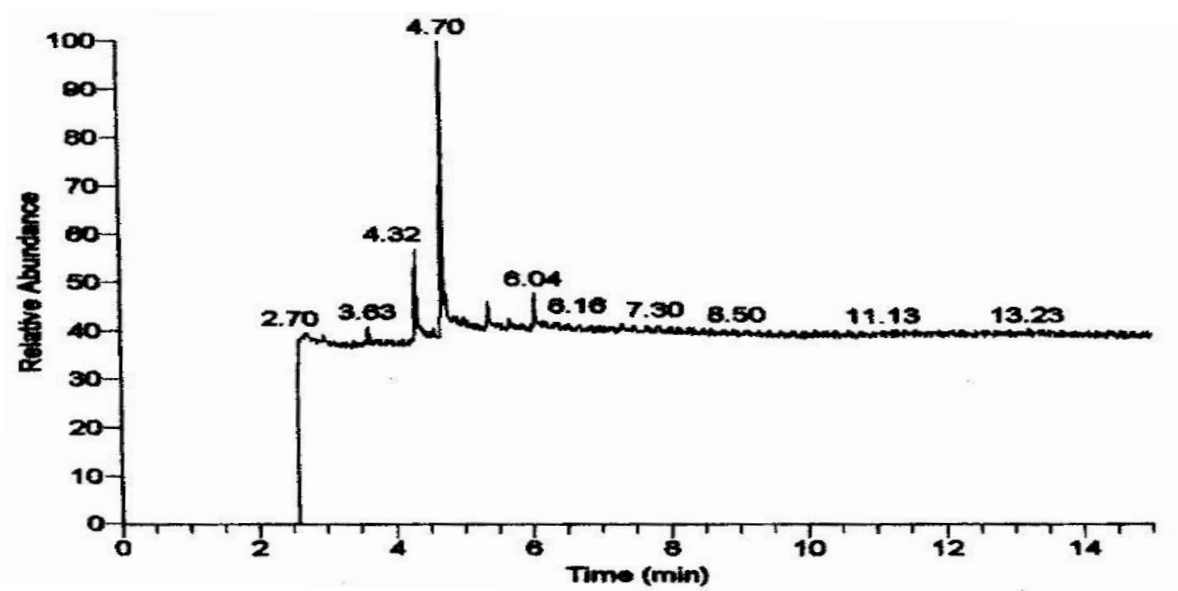


Figure III-30 : Chromatogramme en ionisation chimique de l'H.E de coriandre fraîche en stade de maturité

❖ Tr = 2,74 est relatif à l' α -pinène

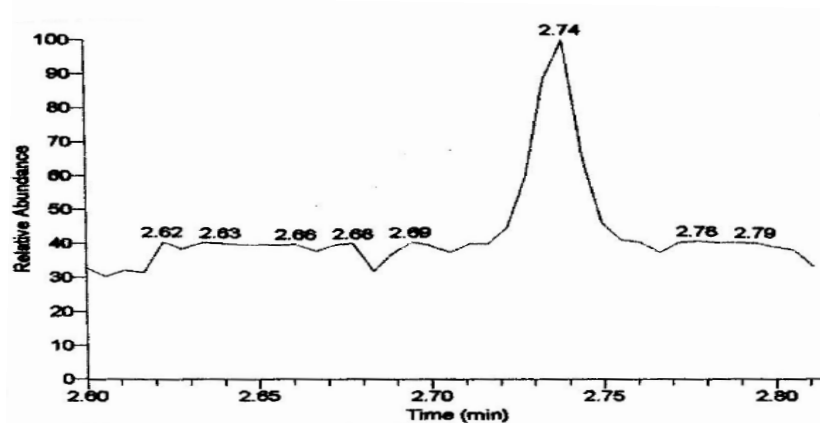


Figure III-31 : Chromatogramme au Tr = 2,74 min.

❖ Tr = 2,97 est relatif à l'octanal : $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{CHO}$

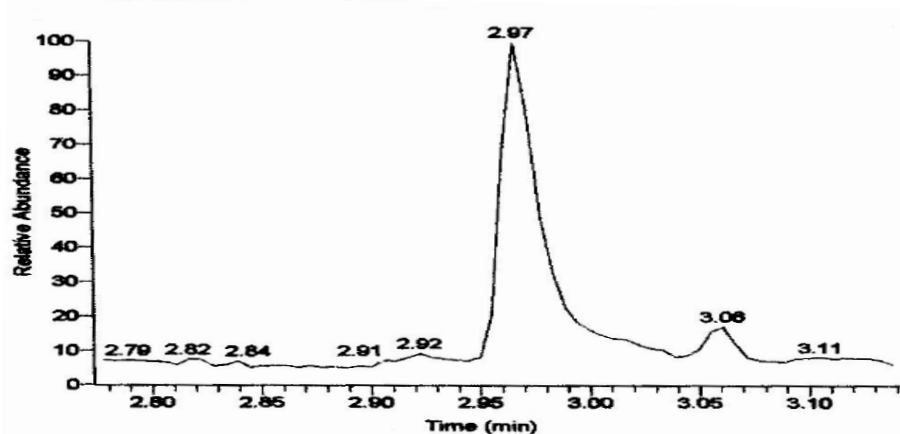


Figure III-32 : Chromatogramme au Tr = 2,97 min.

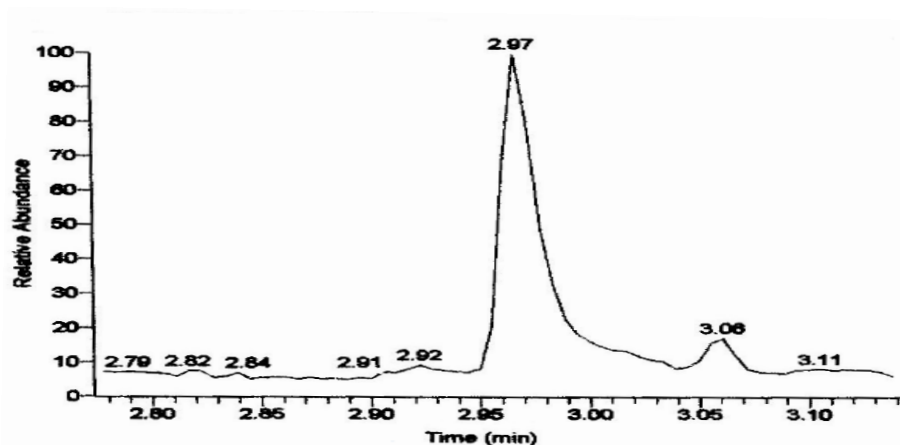


Figure III-33 : Chromatogramme au Tr = 2,97 min.

- ❖ Tr = 3,20 représente le *p*-cymène
- ❖ Tr = 3,63 correspond au linalol

Le linalol est présent dans l'H.E de la partie aérienne de coriandre en stade de maturation à cause de l'apparition des graines dans ce stade.

- ❖ Tr = 4,31 est relatif au n-décaldéhyde : $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_8\text{CHO}$

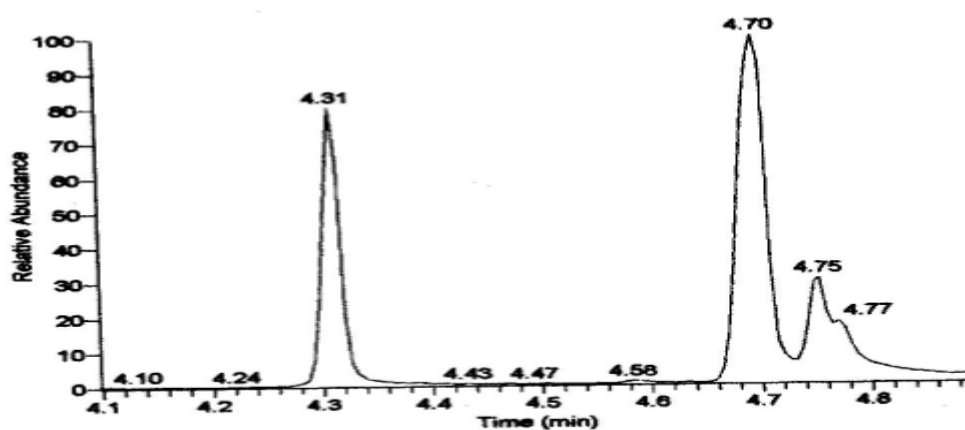


Figure III-34 : Chromatogramme relatif au Tr = 4,31 min. et Tr = 4,70 min.

- ❖ Tr = 4,70 est relatif trans 2-décène
- ❖ Tr = 4,75 est relatif au (Z)3-décène-2-ol
- ❖ Tr = 5,00 est relatif à l'undécanal
- ❖ Tr = 5,36 est relatif à l'undéc-2-ène
- ❖ Tr = 5,67 est relatif au dodécanal
- ❖ Tr = 6,04 est relatif 2-dodécène-1al
- ❖ Tr = 6,94 est relatif au tétradécanal (myristaldéhyde)



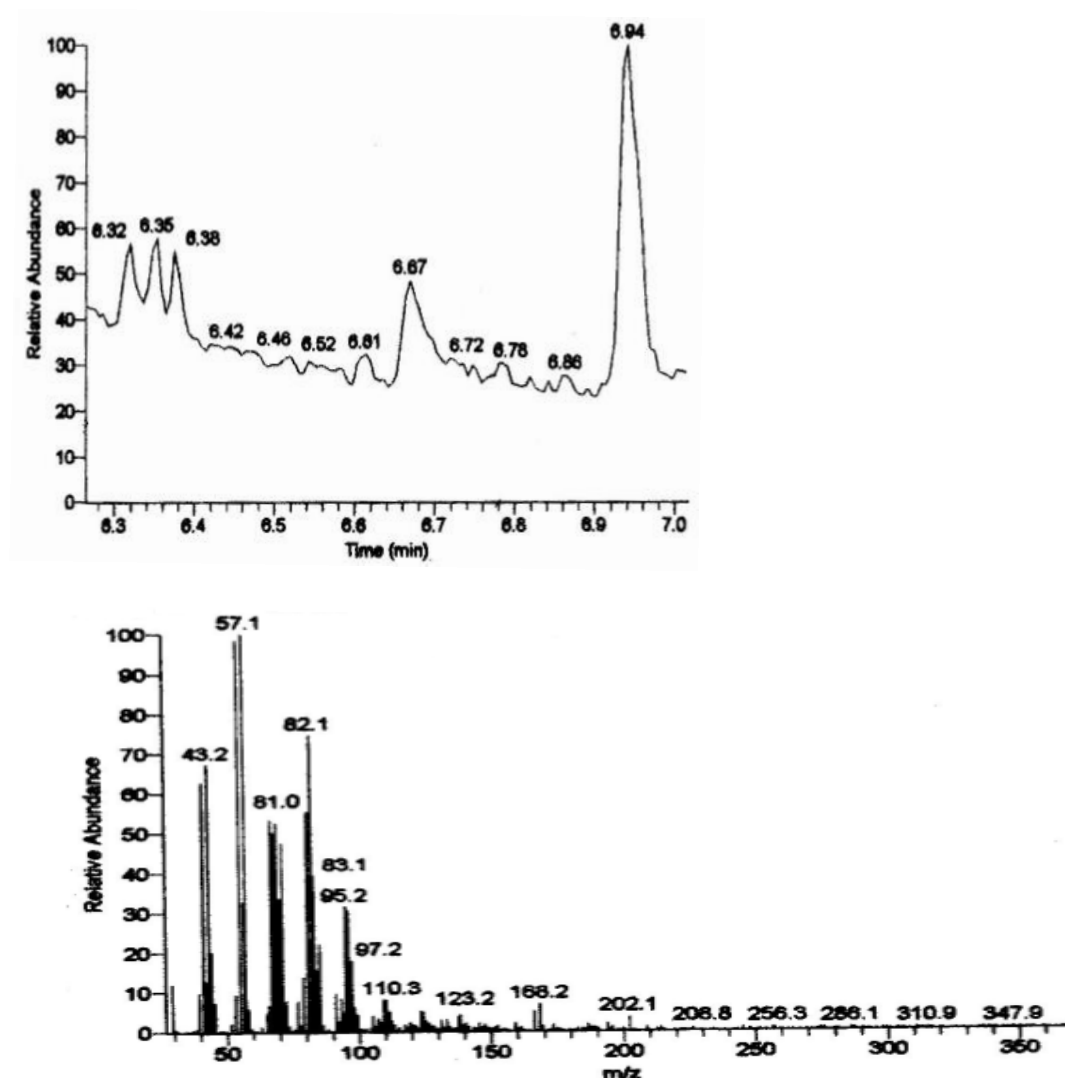


Figure III-35 : Chromatogramme et spectre de masse en IE+ relatif au Tr = 6,94 min.

A la différence de la dernière essence, le produit majoritaire de l'H.E de coriandre fraîche au stade de maturité est le 2-décénal (34,52%) suivi par le n-décaldéhyde (16,24%), 3-décén-2-ol (10,68%) et le 2-dodécén-1-ol. Elle contient également du linalol, le principal constituant de l'H.E des graines. Ceci est dû à la formation du fruit (petites graines vertes) au stade de la maturité de la plante. Par conséquent, la composition chimique des parties aériennes se distingue seulement au niveau quantitatif.

En Outre, toutes les essences de la partie aérienne ainsi que les graines de coriandre sont constituées d'une faible quantité du 2,6-di-tert-butyl-*p*-hydroxytoluène (BHT) qui est un antioxydant ce qui augmente leur pouvoir antioxydant.

4.1.3. Comparaison de la composition chimique de l'H.E de coriandre avec les essences étrangères

Afin de situer les essences de coriandre extraites par rapport aux essences étrangères, nous avons comparé leur composition chimique à celle des H.Es provenant de différents pays (Autriche, Finlande, Tunisie, ...).

Les constituants identifiés dans chacune des essences des graines de coriandre étrangères, ainsi que leur pourcentage relatif sont consignés dans le tableau **III-4**.

Tableau III-4 : Pourcentages des constituants des H.Es étrangères des graines de coriandre

Pays Constituants	Cuba ⁸⁴ %	Tunisie ⁸⁵ %	Finlande ⁸⁶ %	Autriche ⁸⁷ %	Essence étudiée %
α -pinène	1,14	tr	6,5	1,1	0,26
<i>p</i> -cymène	0,90	tr	3,7	1,3	1,11
limonène	1,55	tr	1,7	1,2	0,29
γ -terpinène	4,08	tr	10,1	18,2	0,75
Δ^3 carène	-	0,10	-	60,5	-
linalol	54,57	76,33	65	-	63,5
camphre	5,83	0,13	5	6,5	2,69
bornéol	1,55	0,34	0,13	-	-
terpinèn-4-ol	1,38	0,05	0,31	-	-
α -terpinéol	2,32	0,05	Tr	-	-
dihydrocarvone	-	3,21	-	-	-
citronellol+nérol	1,23	0,52/tr	0,02	-	-
géraniol	6,97	tr	1,7	-	1,79
acétate de géranyle	4,96	2,83	2,6	-	-
acide hexadécanoïque	5,82	-	-	-	-

1^{ière}

⁸⁴Pino, J.A. *J. Essent. Oil Res.* **1996**, 8, 97-98.

⁸⁵Msaada, K.; Hosni, K.; Ben Taarit, M.; Chahed, T.; Kchouk, E.M.; Marzouk, B. *Food Chemistry* **2007**, 102, 1131-1134.

⁸⁶Taskinen, J.; Nykânen, L. *Acta Chemica Scandinavica* **1975**, B (29), 425-429.

⁸⁷Teixeira, B.; Marques, A.; Ramos, C.; Neng, N.R.; Nogueira, J.M.F.; Saraiva, J.A.; Nunes, M.L. *Industrial Crops and Product* **2013**, 43, 587-595.

Notre extrait des graines de coriandre se rapproche de l'H.E obtenue à partir de l'espèce tunisienne en stade de maturité intermédiaire analysée par Marzouk et *al.*⁸⁵. Nos extraits se distinguent par une teneur en linalol légèrement différente (63,5% contre 76,33%) et plus riche en *p*-cymène (1,11%), 2,69% de camphre et de 0,26% d' α -pinène contre des traces.

Nykänen et *al.*⁸⁶ ont montré que l'H.E du fruit de coriandre de la Finlande est constituée de 65% de linalol, 10,1% de γ -terpinène, 5% de camphre, 6,5% d' α -pinène, 3,% de *p*-cymène, de 2,6% d'acétate de géranyle, 1,7% de géraniol et 0,44% de trans-2-dodécanal. Ces résultats d'analyse sont proches de ceux de nos extraits sur le taux de linalol et du géraniol mais plus riches pour les autres composés.

En 2013, l'H.E des graines de coriandre d'origine Autrichienne a été analysée par Nunes et *al.*⁸⁷. Dans ces extraits le Δ^3 carene constitue le composé majoritaire (60,5%) avec le γ -terpinène (18,2%) au lieu du linalol.

Mahbuba *al.*⁸⁸ ont trouvé que l'H.E des graines de coriandre provenant du Bangladesh contient 37,65% de linalol, 14,2% de γ -terpinène, 1,82% de β -pinène, 1,27% du *m*-cymène, 1,96% du citronellal, 1,31% du citronellol, 1,36% de citral, 1,87% de géraniol, 17,57% d'acétate de géranyle par contre l'essence extraite à partir des feuilles de coriandre contient 30,82% d'acide 2-décénoïque, 13,37% d'acide E-11-tétradécénoïque, 12,71% d'acide caprique, 1,32% du 2-dodécanal, 0,99% du E-2-tridécanal, 3,87% du 2-undécénal et 2,45% de cyclododécane

La composition est totalement différente de celles de nos extraits ainsi que celles des autres H.Es étudiées dans les différentes régions géographiques où les acides sont majoritaires au lieu des aldéhydes.

Les constituants identifiés dans chacune des essences étrangères de la partie aérienne de coriandre, ainsi que leur pourcentage relatif sont mentionnés dans le tableau **III-5**.

⁸⁸Md.-Nazrul, I.B.; Jaripa, B.; Mahbuba, S. *Bangladesh J. Pharmacol.* **2009**, 4, 150-153.

Tableau III-5 : Pourcentages des constituants des H.Es étrangères de la partie aérienne de coriandre

Pays Constituants	USA (Massachusetts) (%)	USA (Pennsylvanie) (%)	Essence étudiée	
			a	b
α -pinène	-	-		0,09
Octanal	0,47	0,65		1,28
Linalol	-	2,13		1,75
Nonanal	0,27	0,29		
n-décanal	9,25	51,51	9,64	16,24
2-décène	12,1	31,61	26,02	34,52
2-décène-1-ol	8,18	-	-	-
1-décanol	2,09	-	-	-
3-décène-2-ol	-	-	3,33	10,68
undécanal	2,31	0,59	1,36	2,40
2-undécène	5,32	0,80	18,78	4,49
dodécanal	4,96	0,74	13,16	1,40
dodécène	15,6	4,94	8,45	7,78
tridécanal	1,44	-	-	-
2-tridécanal	2,53	0,61	-	-
tétradécanal	1,61	1,65	-	-
2-tétradécène	12,7	-	-	0,77
(E)-2-pentadécène	4,77	-	-	-

a-stade de floraison; **b**-stade de maturité

Potter⁸⁹ a étudié la composition chimique de l'H.E de coriandre d'USA (Massachusetts) à différents stades de croissance cultivée dans la serre. Au stade de la floraison l'H.E contient 0,47% d'octanal, 0,03% de limonène, 9,25% de décanal, 15,6% du E-2-dodécène, 12,1% du E-2-décène, 12,7% du E-2-tétradécène, 8,18% du 2-décène-1-

⁸⁹Potter, T.L. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 1824-1826.

ol,4,96% du dodécanal, 5,32% du E-undécénal, 2,31% du undécanal, 1,44% du tridécanal, et 4,77% du E-2-pentadécénal.

Une autre étude a été réalisée en 2002 par Xuetong et *al.*⁹⁰ sur l'H.E des feuilles de coriandre de la Pennsylvanie aux USA. Elle est constituée de 51,51% de décanal, 31,61% du E-2-décénal de 0,65% d'octanal, 2,13% de linalol, 4,94% du E-2-dodécénal et 1,65% de tétradécanal.

La composition est totalement différente avec nos résultats où le décanal a remplacé par le E-2-décénal comme produit majoritaire.

Les résultats de notre étude comparés aux données de la littérature confirment que la composition de l'H.E varie selon l'origine géographique et peut varier d'une manière significative au cours de la croissance.

4.2. Huile essentielle de fenouil⁹¹

4.2.1. Essence des graines de fenouil

Le chromatogramme en CPG de l'huile essentielle de fenouil révèle 10 pics (Figure III-36). Les temps de rétention et les pourcentages des pics sont rassemblés dans le Tableau III-6.

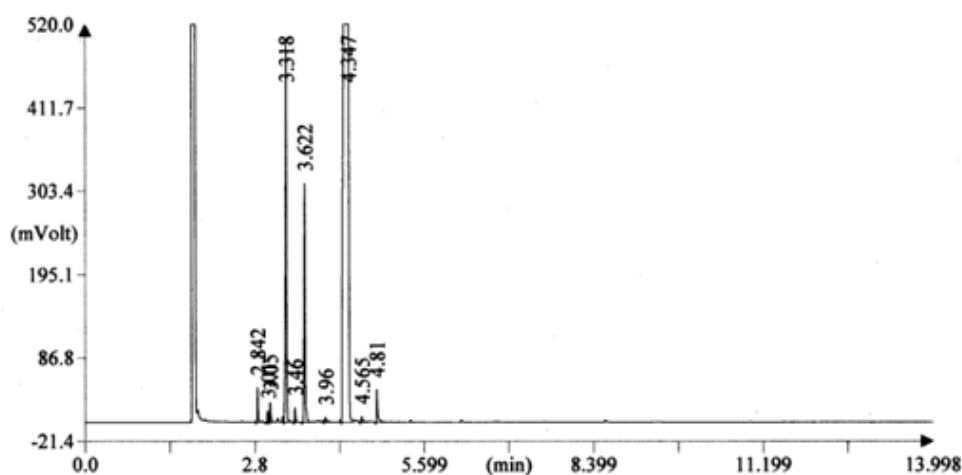


Figure III-36 : Chromatogramme analytique de l'H.E des graines de fenouil

⁹⁰Xuetong, F.; Kimberly, J.B.; Sokorai, A. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 7622-7626.

⁹¹Ouis, N.; Hariri, A. et El Abed, D. *Phyto Chem & BioSub Journal* **2014**, vol.8(3), 198-203.

Tableau III-6 : Analyse par CPG de l'H.E de fenouil

N° de pic	Tr	%	Composés identifiés
1	2,84	0,60	α - pinène
2	3,01	0,20	-
3	3,05	0,40	-
4	3,32	8,65	Limonène
5	3,46	0,28	-
6	3,62	5,37	-
7	3,96	0,15	Camphre
8	4,35	83,28	Estragole
9	4,57	0,22	-
10	4,81	0,80	Trans-anéthole

On note que l'estragole est le produit majoritaire (83,28%) de l'H.E de fenouil. Nous avons de même co-injecté l'H.E de fenouil avec l'estragole. Une augmentation du pic n°8 (83,28% à 84,30%) a été observée.

En plus de la CPG, les principaux constituants de cette essence ont été identifiés par CG/MS.

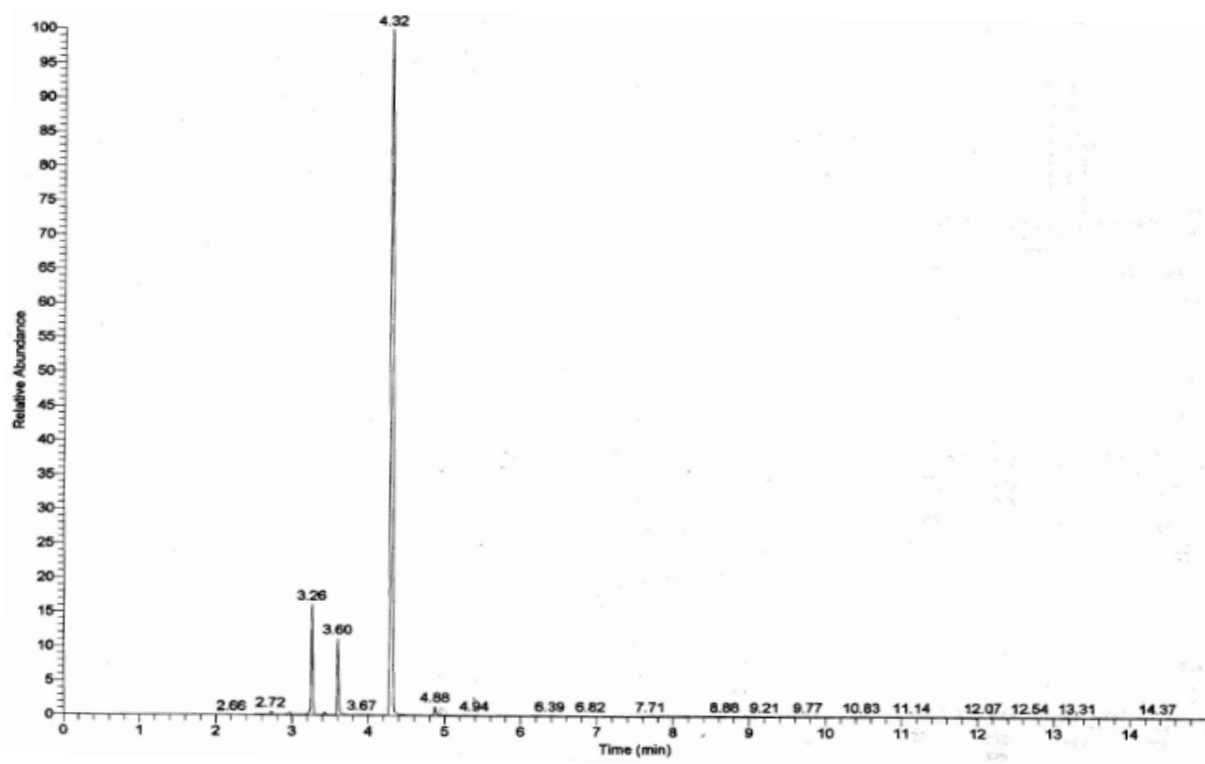


Figure III-37 : Chromatogramme en impact électronique de l'H.E des graines de fenouil

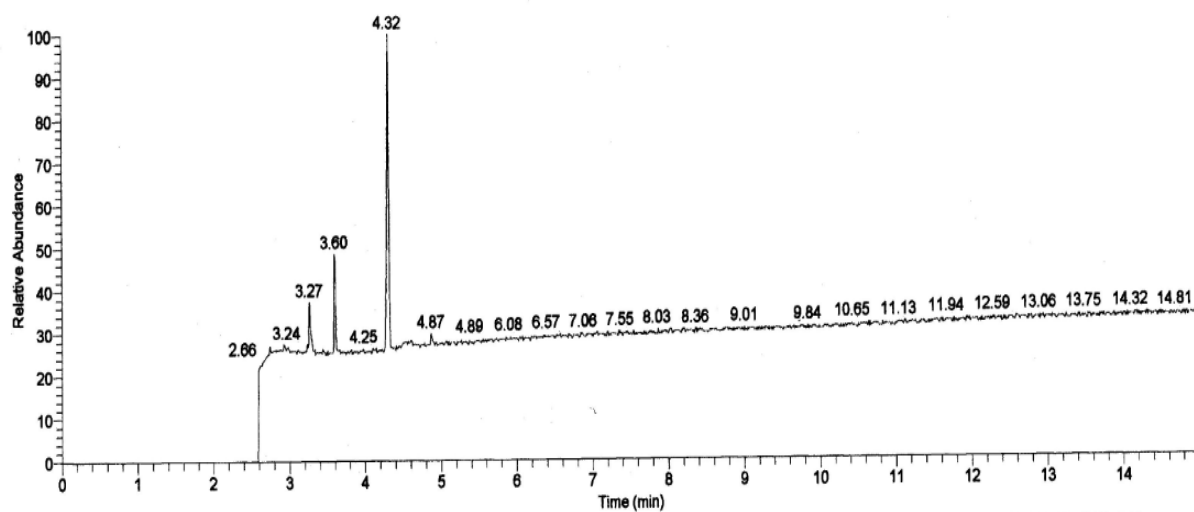


Figure III-38 : Chromatogramme en ionisation chimique de l'H.E des graines de fenouil

❖ Tr = 2,57 à 3,09min.

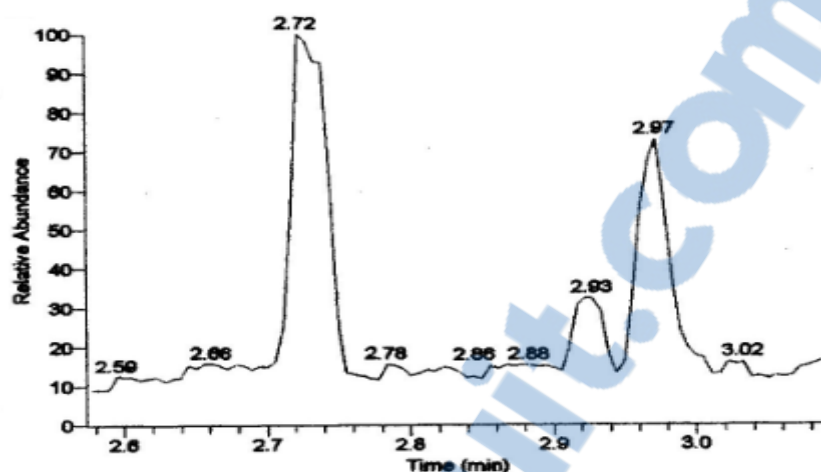


Figure III-39 : Chromatogramme en IE+ de l'H.E de fenouil à
Tr = 2,57 à 3,09min.

- ❖ Tr = 2,72 min. correspond à l' α -pinène
- ❖ Tr = 2,93 min. est relatif à l' α -phellandrène

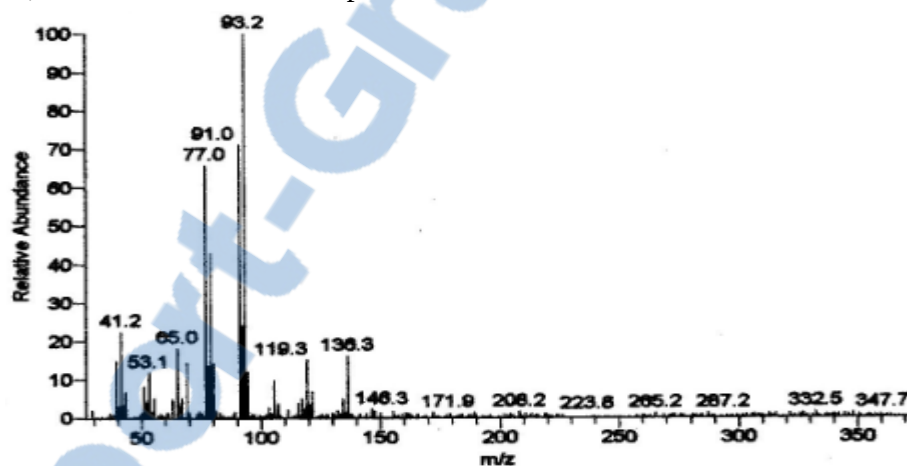


Figure III-40 : Spectres de masse en IE+ de l'H.E de fenouil à Tr = 2,93min.

- ❖ Tr = 2,97 min. est relatif au β -pinène
- ❖ Tr = 3,20-3,75

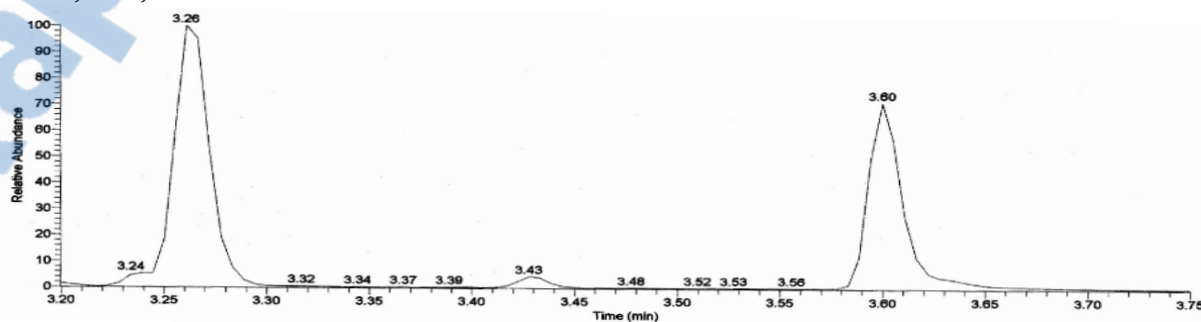
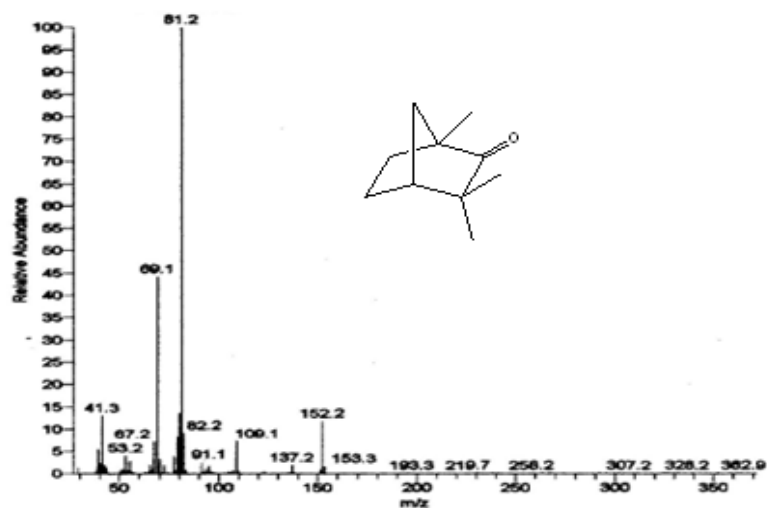


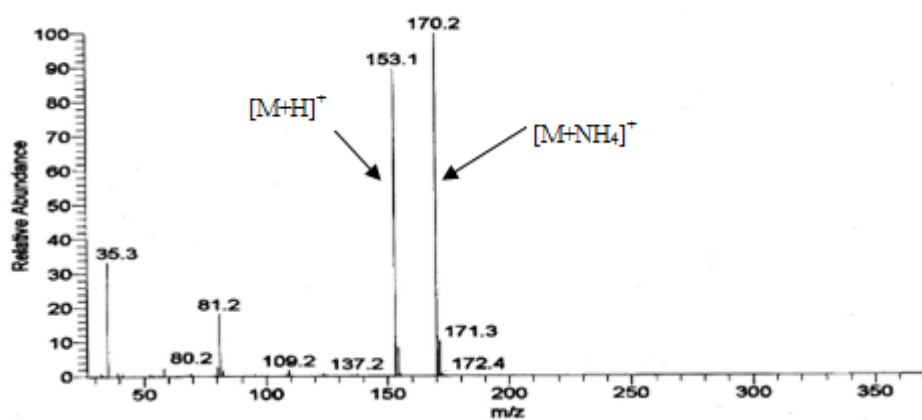
Figure III-41: Chromatogramme en IE+ de l'HE de fenouil de Tr = 3,20 à 3,75min.

- ❖ Tr = 3,26 correspond au limonène
- ❖ Tr = 3,43 correspond au γ -terpinène

❖ Tr = 3,60 est attribuable à la fenchone



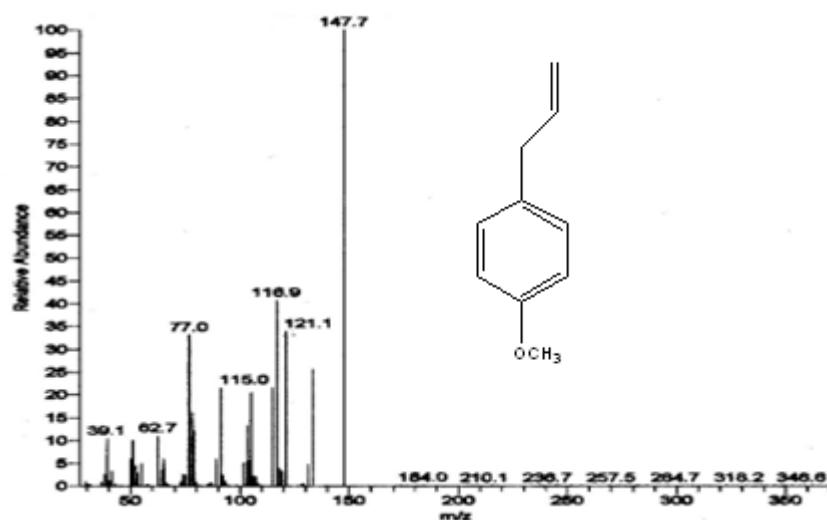
(IE+)



(ICP)

Figure III-42 : Spectres de masse en IE+ et ICP de l'H.E de fenouil à Tr =3,60min.

❖ Tr =4,32 équivaut à l'estragole



(IE+)

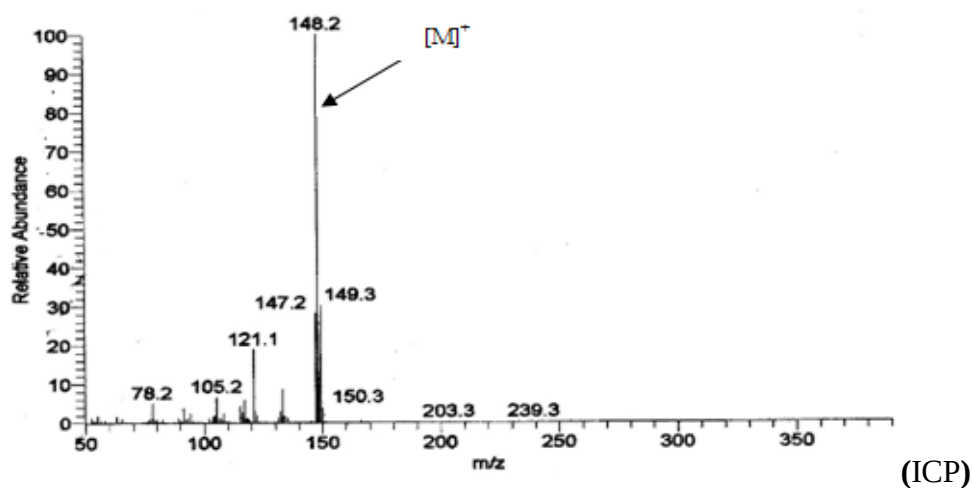


Figure III-43 : Spectres de masse en IE+ et ICP de l'H.E de fenouil à Tr = 4,32min.

Le produit dominant dans l'essence extraite à partir des graines de fenouil est l'estragole.

❖ Tr = 4,87 correspond à l'anéthole

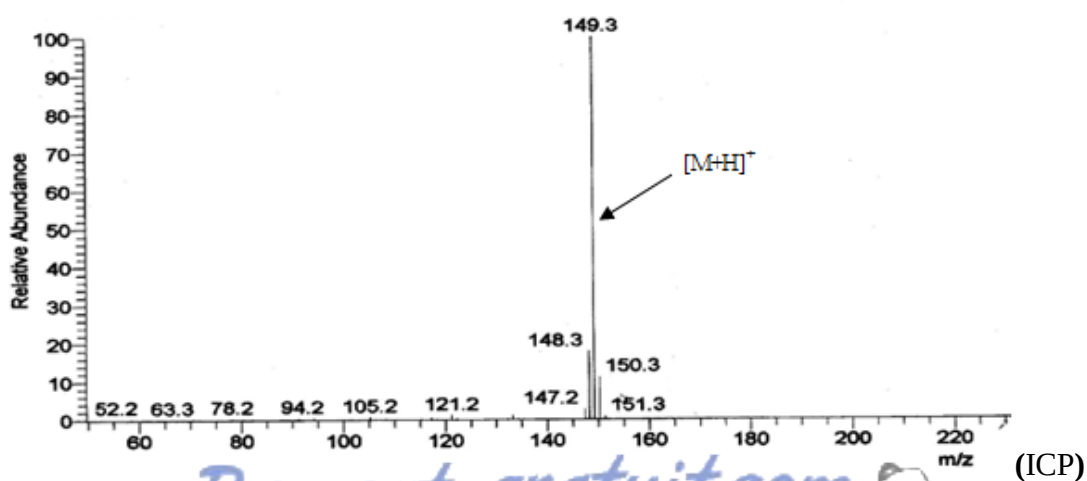
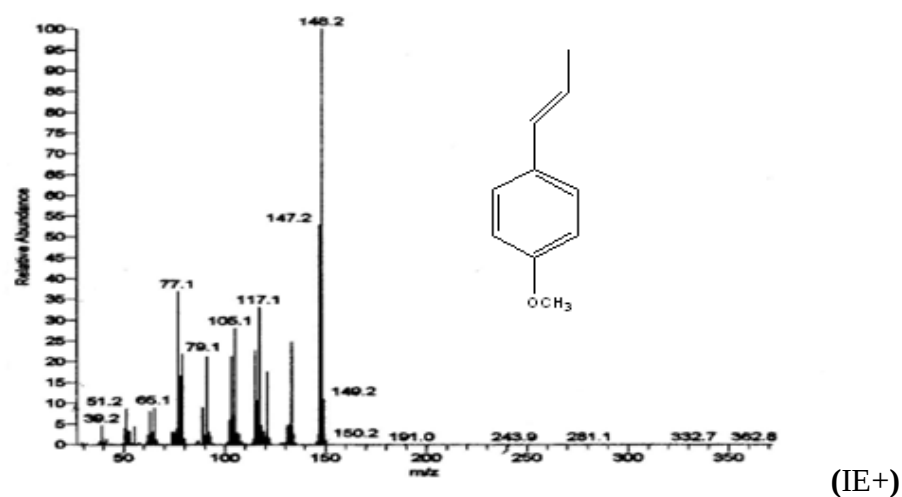


Figure III-44 : Spectres de masse en IE+ et ICP de l'H.E de fenouil à Tr = 4,87min.



4.2.2. Essence des bulbes de fenouil

En CPG, le chromatogramme (Figure III-45) présente deux pics majoritaires qui sont illustrés dans le Tableau III-7.

Tableau III-7 : Analyse par CPG de l'H.E des bulbes de fenouil

N°de pic	Tr	%	Composés identifiés
1	4,80	74,63	Anéthole
2	12,18	25,36	-

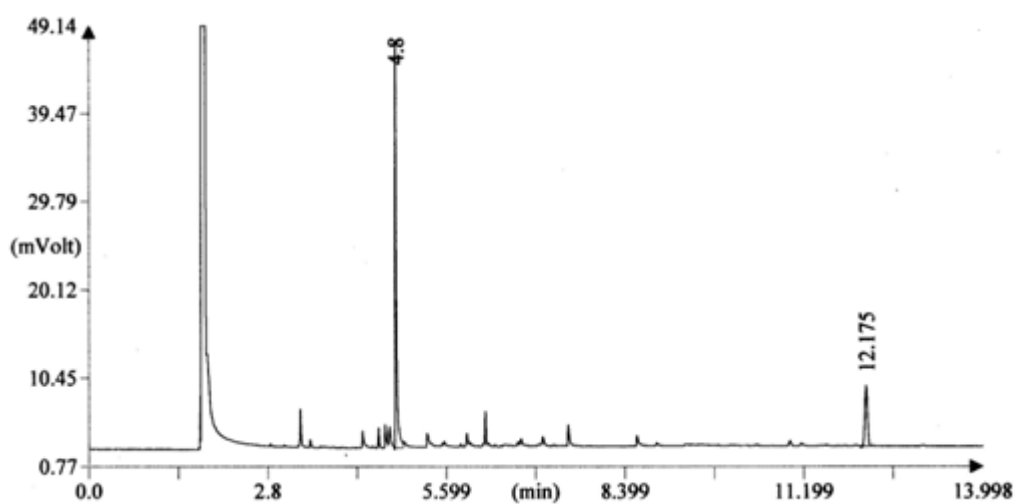


Figure III-45 : Chromatogramme analytique de l'H.E des bulbes de fenouil

L'analyse de l'essence étudiée par CG/MS a permis d'identifier les produits suivants : limonène, estragole et *trans*-anéthole.

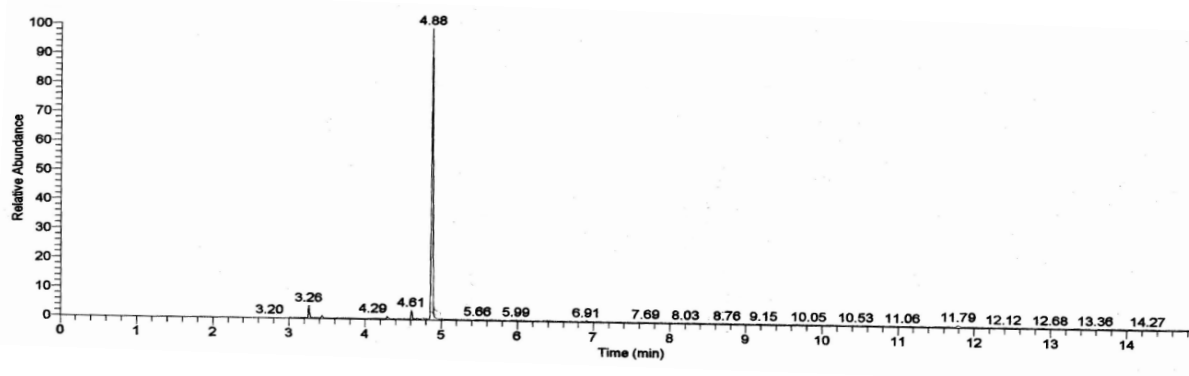


Figure III-46 : Chromatogramme en impact électronique de l'H.E des bulbes de fenouil

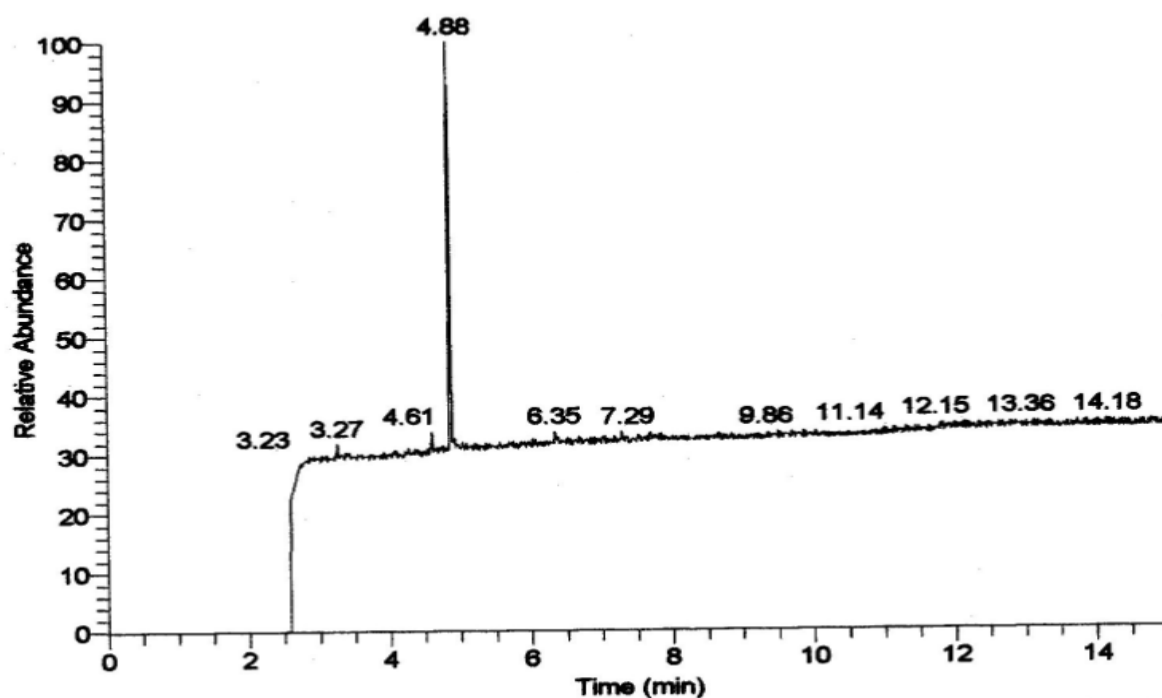
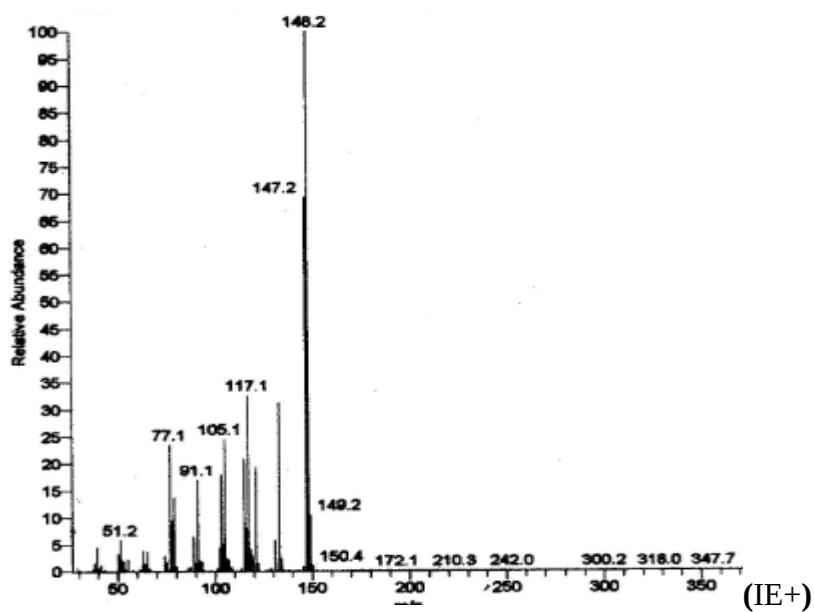


Figure III-47 : Chromatogramme en ionisation chimique de l'H.E des bulbes de fenouil

- ❖ Tr =3,26 correspond au limonène
- ❖ Tr =4,29 correspond à l'estragole
- ❖ Tr =4,88 correspond au *trans*-anéthole



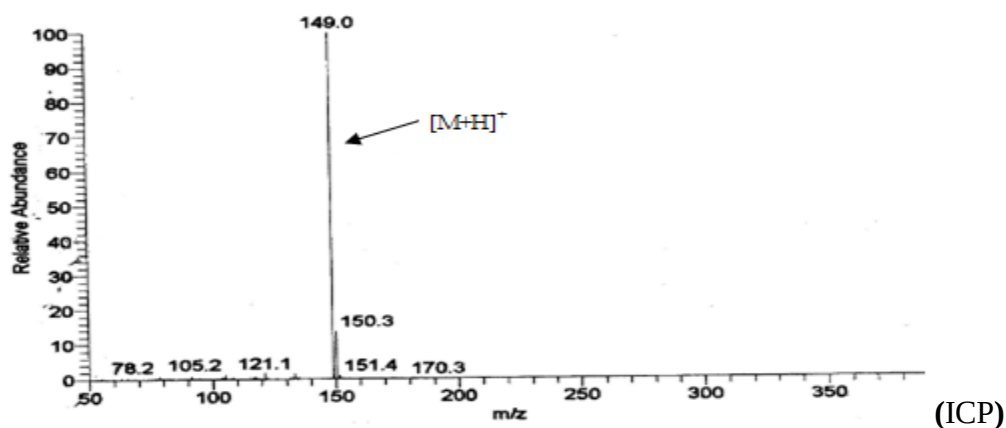
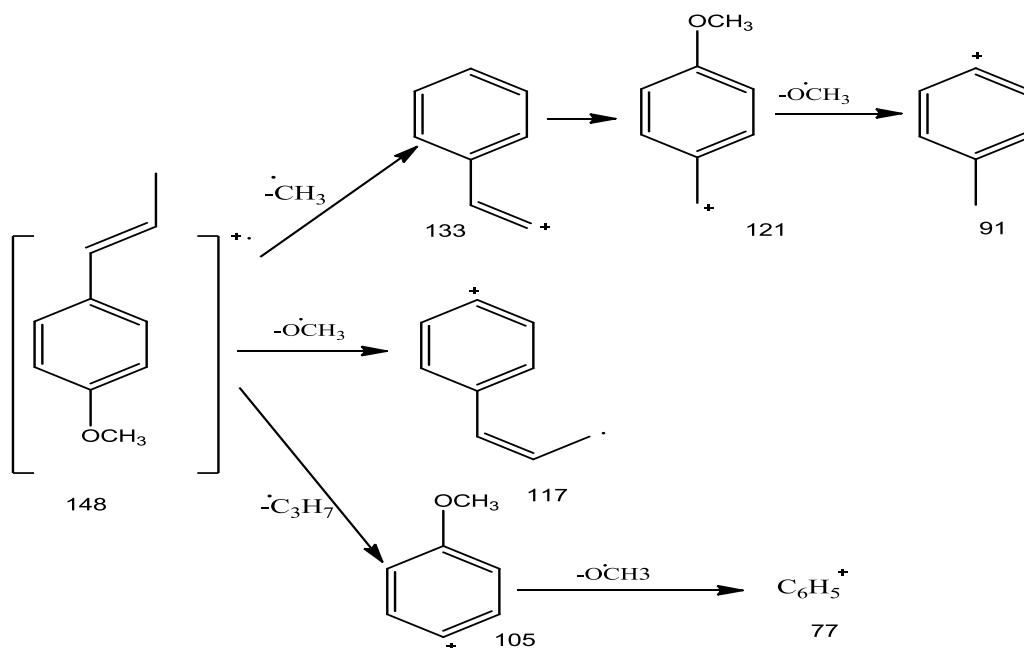


Figure III-48 : Spectres de masse en IE+ et ICP à Tr = 4,88min.

Figure III-49 : Hypothèse de fragmentation du *trans*-anéthole

❖ Tr = 5,99 se rapporte au caryophyllène

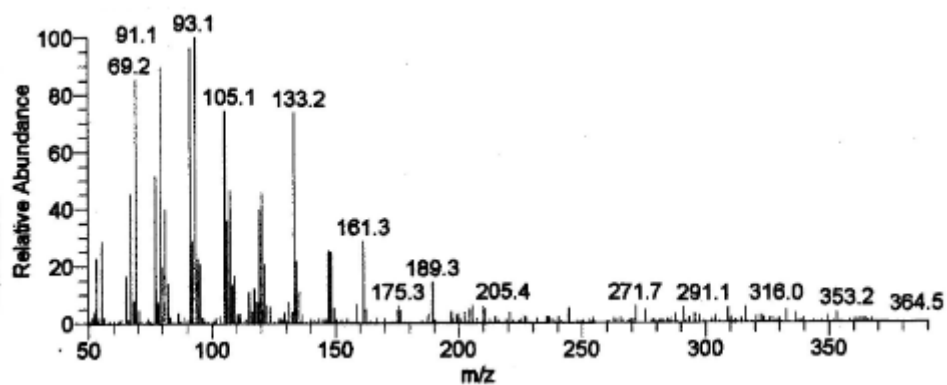


Figure III-50 : Spectre de masse en IE+ à Tr = 5,99min.

Les constituants majoritaires de l'H.E des graines de fenouil sont : l'estragole (83,28%), le limonène (8,65%) et la fenchone (5,37%). En revanche, les bulbes de fenouil contiennent principalement le *trans*- anéthole (74,63%).

4.2.3. Comparaison entre la composition chimique de l'H.E de fenouil avec les essences étrangères

Afin de comparer la composition chimique de l'H.E des graines de fenouil étudiée, avec ceux de la littérature, nous avons regroupé dans le tableau **III-8** le pourcentage des principaux constituants de l'H.E des graines de fenouil provenant de plusieurs pays producteurs.

Tableau III-8 : Pourcentages des principaux constituants des huiles essentielles étrangères de fenouil

Pays Constituants	Espagne ⁹² (%)	Italie ⁹³ (%)			Israël ⁹⁴ (%)			Iran ⁹⁵ (%)	Brésil ⁹⁶ (%)	Sétif (Est d'Algérie) ⁹⁷	Essence étudiée
α-pinène	-	0,4	0,2	0,7	2,47	3,92	1,09	0,89	1,2	1,22	0,60
Limonène	0,7	4,5	0,6	1,6	5,02	5,80	3,49	10,00	5,4	6,37	8,65
γ-terpinène	0,2	0,2	0,2	tr	0,93	1,60	1,30	0,72	0,6	-	0,28
Fenchone	16,9	2,3	10,4	5,4	8,23	24,32	11,45	11,00	15,0	12,93	5,37
Camphre	0,8	-	-	tr	0,19	0,54	0,22	0,24	-	0,21	0,15
Estragole	65,3	8,2	69,3	75	4,67	60,93	50,33	4,45	2,5	3,41	83,28
E-anéthole	4,7	81,6	19	16,3	76,74	0,14	30,65	69,41	74,2	72,86	0,80

⁹²Guillén, M. D.; Manzanos, M. J. *Food Research International* **1996**, Vol 29, n° 1, 85-88.⁹³Miraldi, E. *Flavour and Fragrance Journal* **1999**, 14, 379-382.⁹⁴Barazani, O.; Cohen, Y.; Fait, A.; Diminshtein, S.; Dudai, N. ; Ravid, U.; Putievsky, E. *Friedman J.* **2002**, 30 ,721-731.⁹⁵Yamini, Y.; Sefidkon, et Pourmortazavi, S.M. *Flavour and Fragrance Journal* **2002**, 17,345-348.⁹⁶Moura, L.S.; Carvalho, R.N.; Stefanini, M.B.; Ming, L.C.; Meireles, A.A. *J. of Supercritical fluids* **2005**, 35, 212-219.⁹⁷Zoubiri, S.; Baaliouamer, A.; Seba, N.; Chamouni, N. *Arabian Journal of Chemistry* **2010**.

Des expériences ont prouvées que l'H.E des graines de fenouil d'Espagne extraite avec le pentane par ultrasons avec un bon rendement est riche en dérivés du phénylpropane et pauvre en hydrocarbures terpéniques. Elle contient 16,9% de fenchone, 65,3% d'estragole, 4,7% de *trans*-anéthole, 0,2% de β -myrcène et γ -terpinène, 0,7% de limonène et du linalol et 0,8% du camphre⁹².

Miraldi a étudié l'influence des répartitions géographiques sur la composition chimique de l'essence obtenue par hydrodistillation à partir des graines de fenouil d'Italie. L'H.E des régions montagneuses contient 81,6% de *trans*-anéthole, 8,2% d'estragole, 2,3% de fenchone et 4,5% de limonène. Celle des collines est constituée principalement de 69,3% d'estragole, 19% de *trans*-anéthole et plus riche en fenchone (10,4%) par contre celle des régions situées au bord de la mer contient 75% d'estragole, 16,3% de *trans*-anéthole et 5,4% de fenchone⁹³.

Une autre étude a été réalisée en Israël par Putievsky et *al.* sur l'H.E des graines de fenouil de différentes populations (Nord et sud d'Israël). Ils ont trouvé trois chémotypes : H.E de certaines populations contient principalement de l'estragole, d'autres le *trans*-anéthole comme produit majoritaire, ainsi que le mélange d'estragole/*trans*-anéthole comme produits dominants (50,33 et 30,65%)⁹⁴.

Pourmortazavi et *al.*⁹⁵ ont étudié la composition chimique de l'H.E des graines de fenouil d'origine iranienne extraite par hydrodistillation. Elle contient principalement du *E*-anéthole (69,41%), de la fenchone (11%), du limonène (10%) et 4,45% de l'estragole.

Meireles et *al.*⁹⁶ ont montré que les produits dominants de l'H.E des graines de fenouil du Brésil obtenu par hydrodistillation sont le *trans*-anéthole (74,2%) et la fenchone avec 15%.

En 2010, Chamouni et *al.*⁹⁷ ont trouvé que l'H.E des graines de fenouil cultivées à Sétif (Est d'Algérie) est constituée principalement de *trans*-anéthole (72,86%), 12,93% de fenchone, 6,37% de limonène et 3,41% d'estragole.

4.3. Huile essentielle de persil⁹⁸

4.3.1. Essence des graines de persil

En CPG, le chromatogramme de l'H.E des graines du persil représenté sur la Figure **III-51** révèle 17 pics.

⁹⁸a) Ouis, N. et El Abed, D. *Recherches sur les plantes aromatiques et médicinales*. Actes , H. Greche & A. Ennabili (éd.) **2009**, du Congrès International des 22-24 mars 2007, Mezraoua (Taounate) & Fès, Maroc, 150-154; b) Ouis, N.; Hariri, A. et El Abed, D. 1^{ère} Rencontre de Chimie Fine d'Oran (ReLCFO-2012), Oran le 11-12 novembre **2012**.

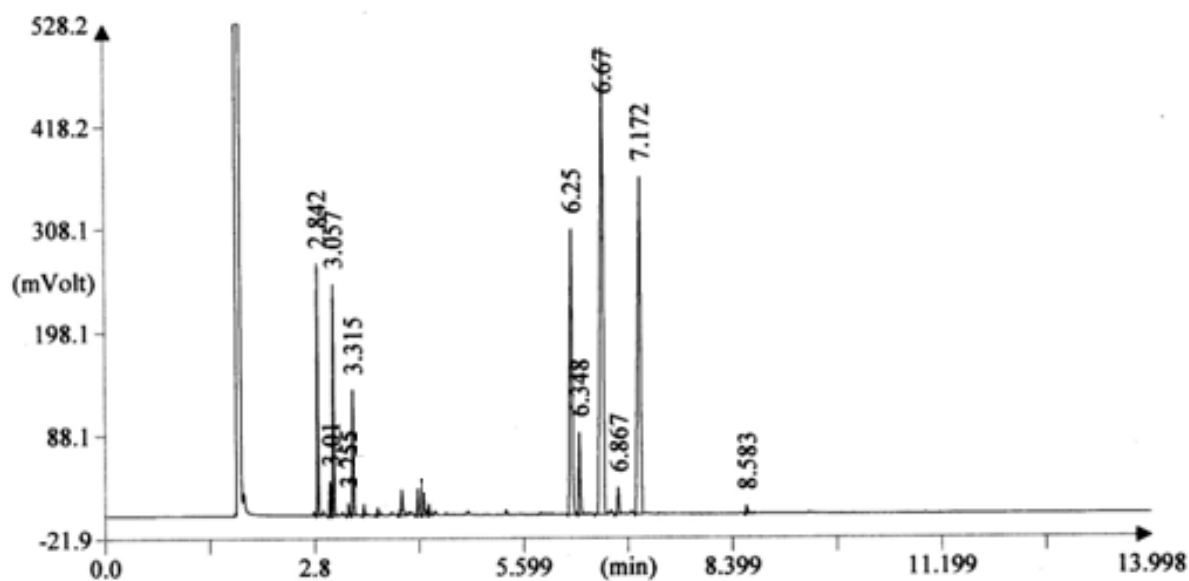


Figure III-51: Chromatogramme analytique de l'H.E des graines de persil

Le tableau **III-9** donne le temps de rétention, le pourcentage de chaque pic, ainsi que le composé identifié pour chaque essence.

Tableau III-9 : Analyse par CPG de l'H.E des graines de persil

N°de pic	Tr	%	Composés identifiés
1	2,84	6,09	α - pinène
3	3,06	6,01	-
5	3,32	3,55	Limonène
8	3,97	1,15	Camphre
10	4,25	1,54	-
12	6,26	16,63	-
13	6,35	3,05	-
14	6,67	34,01	-
15	6,87	1,02	-
16	7,17	23,43	-

Le chromatogramme représentant la co-injection de l'H.E de persil avec l' α -pinène, le limonène et le camphre (annexe) montre qu'elle est constituée pour :

- ❖ 6,09 % de l' α -pinène par une augmentation du pic n°1 de 6,9 à 15,99%
- ❖ 3,55% de limonène par une augmentation du pic n°5 de 3,55% à 11,37%
- ❖ 1,15 % de camphre par une augmentation du pic n°8 de 1,5% à 5,02%

Par CG/MS, les constituants suivants ont pu être identifiés :

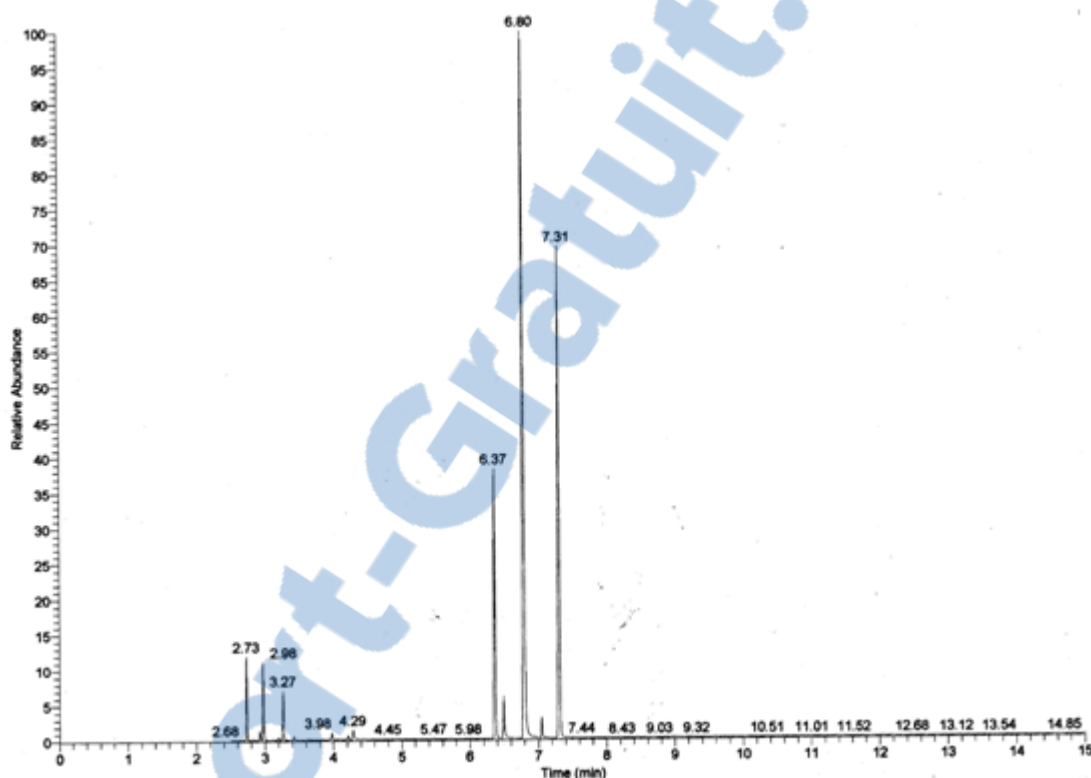


Figure III-52 : Chromatogramme en impact électronique de l'H.E des graines de persil

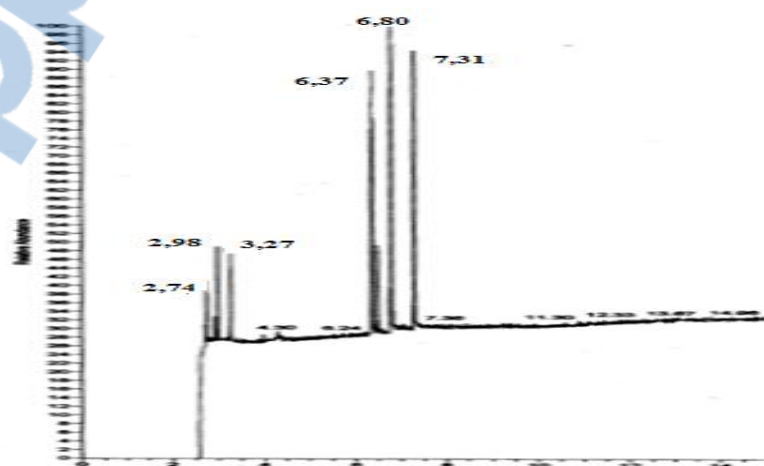


Figure III-53 : Chromatogramme en ionisation chimique de l'H.E des graines de persil

❖ Tr = 2,02 à 4,12

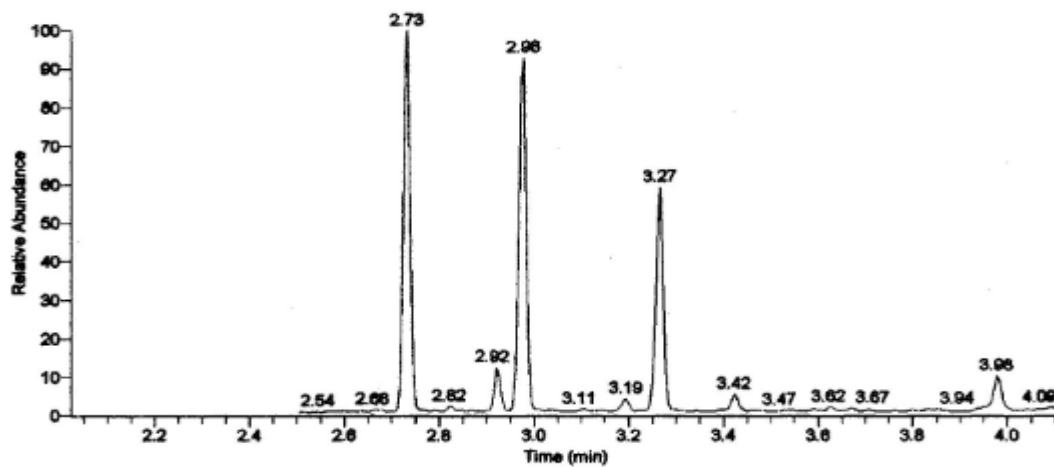
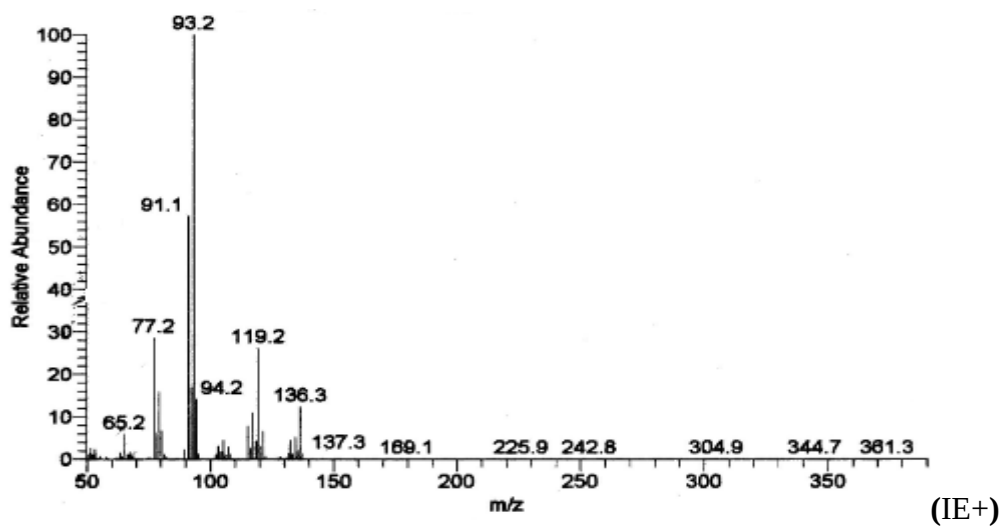
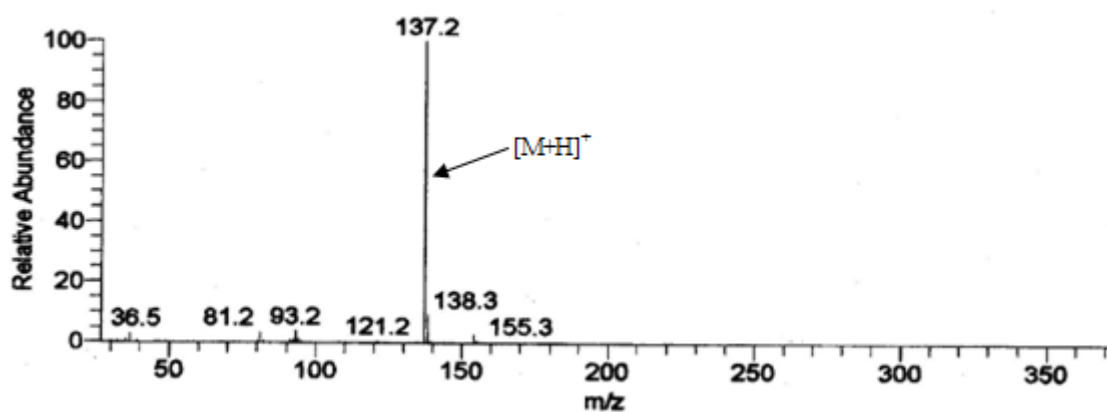


Figure III-54 : Chromatogramme en (IE+) de Tr = 2,02 à 4,12min.

- ❖ Tr=2,73 représente l' α -pinène
- ❖ Tr=2,92 est probablement l' α -phellandrène
- ❖ Tr=2,8 correspond au β -pinène
- ❖ Tr=3,9 correspond au *p*-cymène
- ❖ Tr=3,27 est relatif au β -phellandrène





(ICP)

Figure III-55 : Spectres de masse en (IE+) et (ICP) de Tr = 3,27 min.

- Tr = 4,29 est relatif au 2-méthyl-1-phényl 2-propèn-1-ol

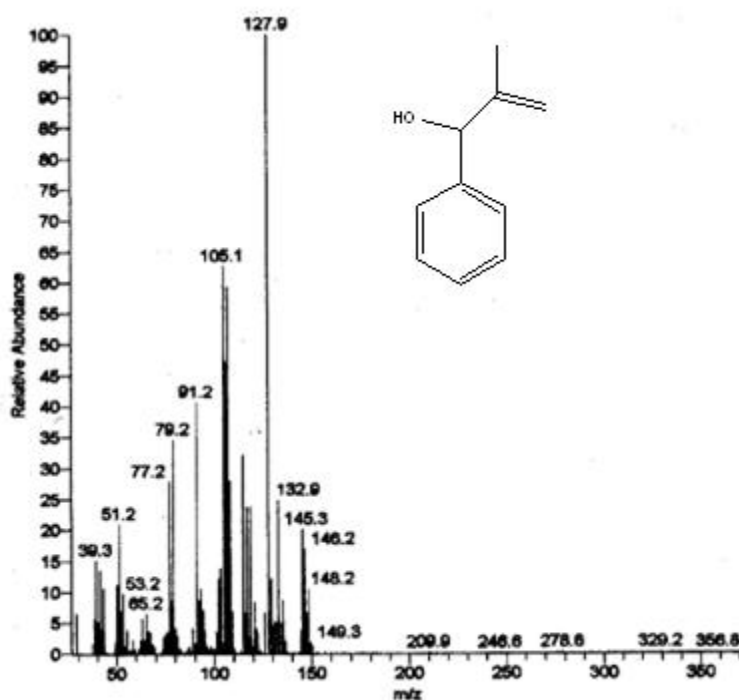


Figure III-56 : Spectre de masse en (IE) de Tr = 4,29 min.

- ❖ Tr = 4,45 d'après la littérature est attribuable au *p*- α -diméthyl-styrène



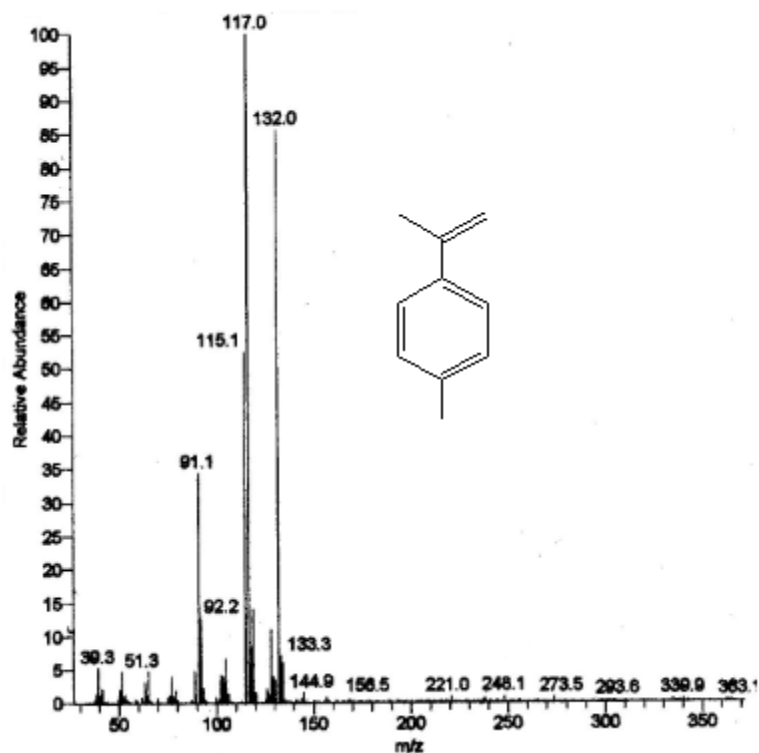
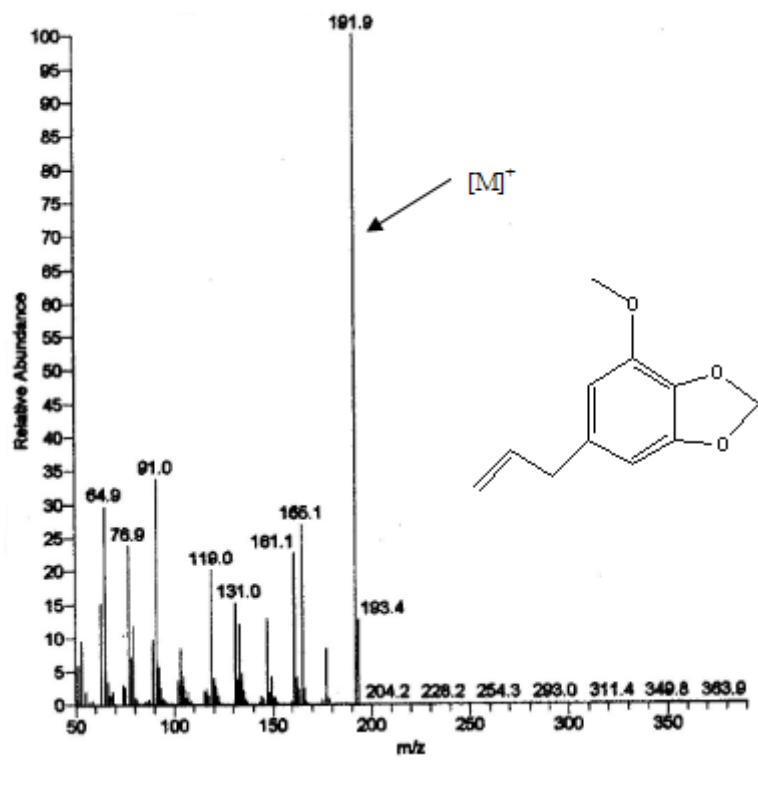


Figure III-57 : Spectre de masse en (IE+) de Tr = 4,45min.

❖ Tr = 6,37 correspond à la myristicine



(IE+)

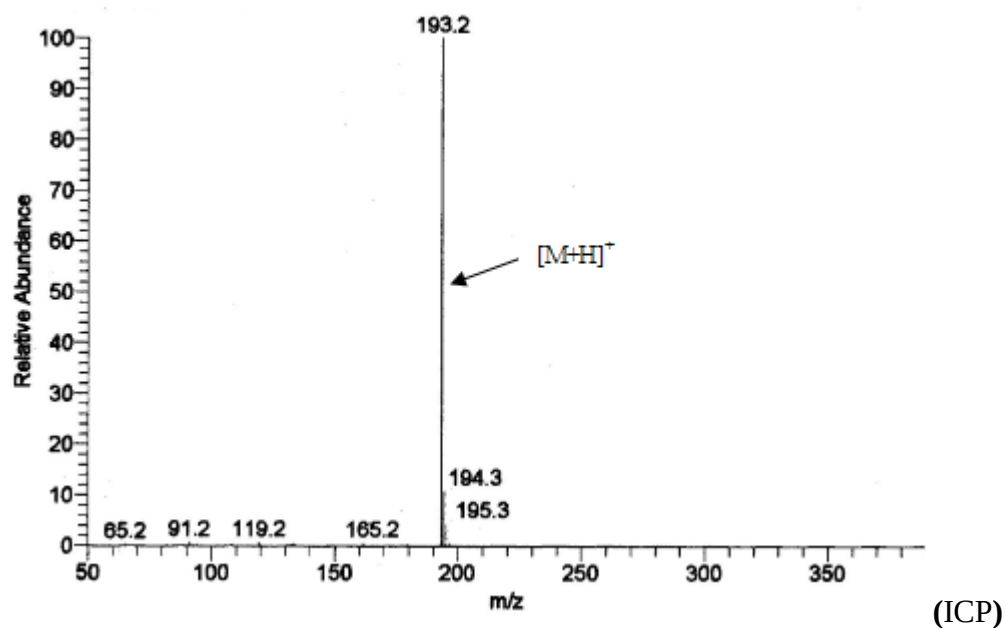
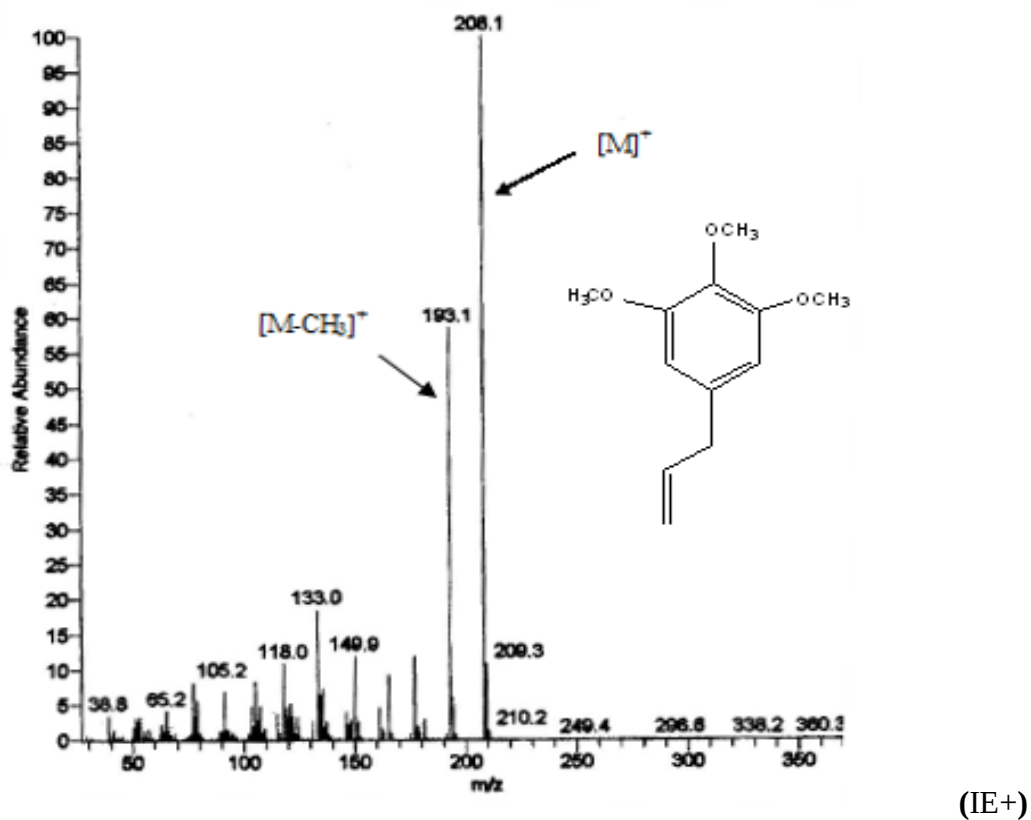


Figure III-58 : Spectres de masse en (IE+) et(ICP) de Tr = 6,37min.

❖ Tr = 6,49 correspond à l'élémicine



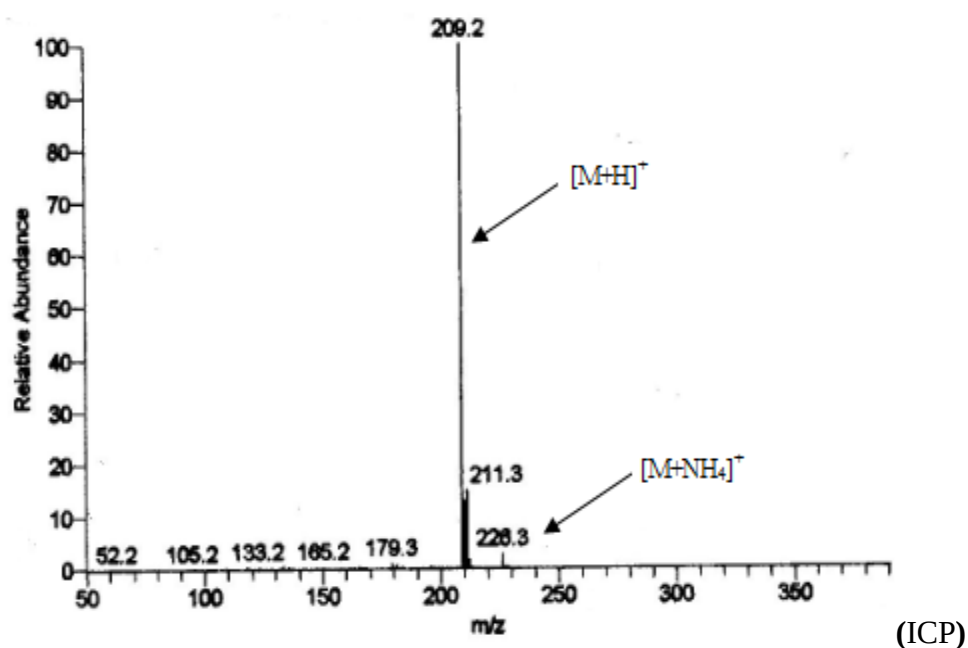
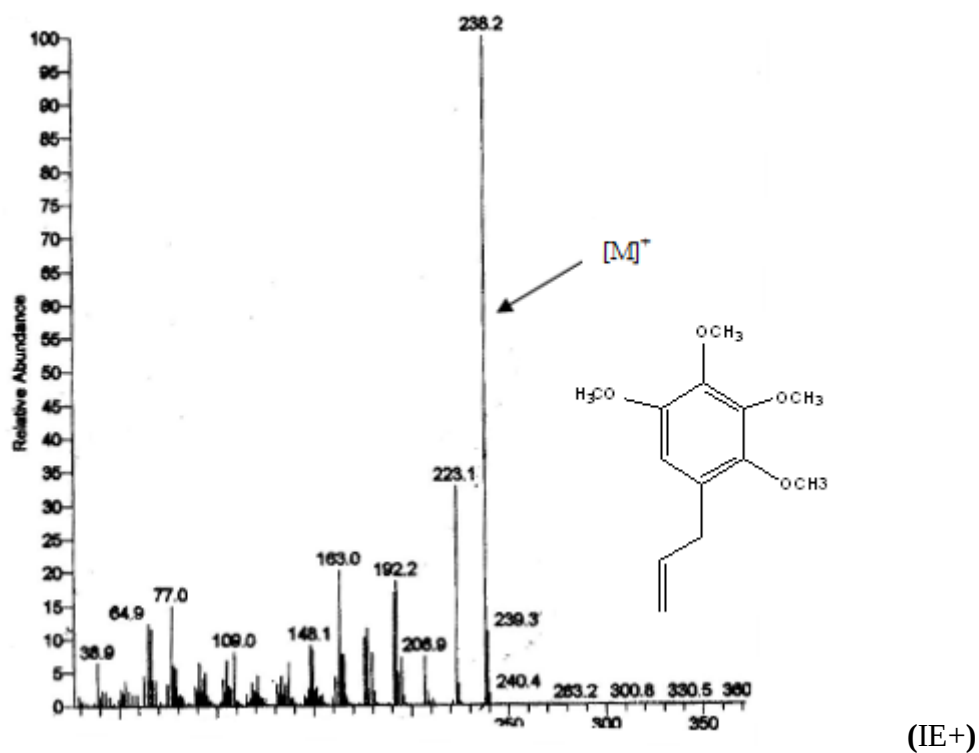


Figure III-59 : Spectres de masse en (IE+) et (ICP) de Tr = 6,49min.

❖ Tr = 6,80 est relatif à l'allyltétraméthoxybenzène



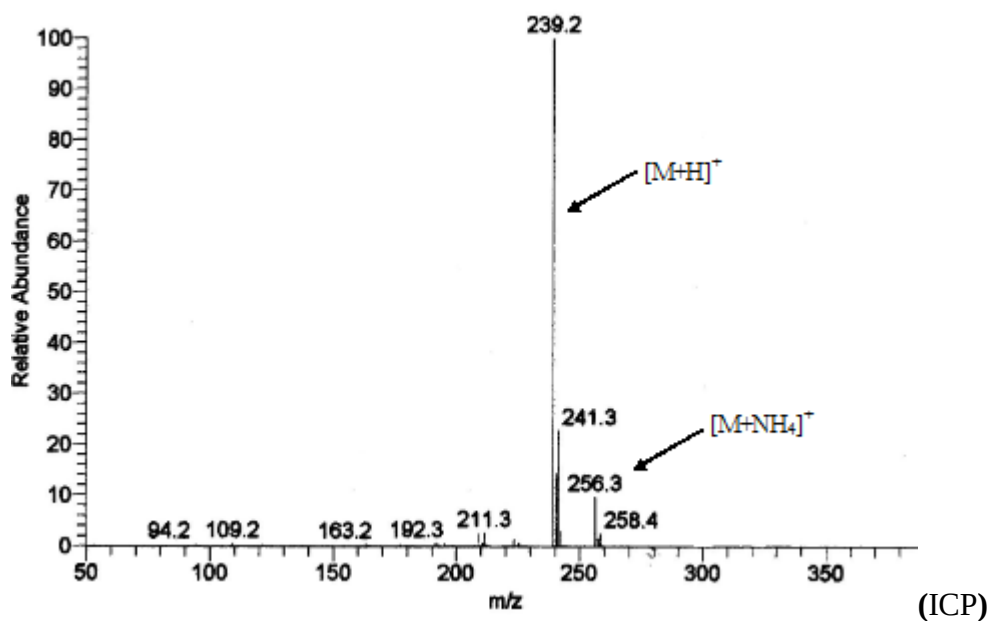
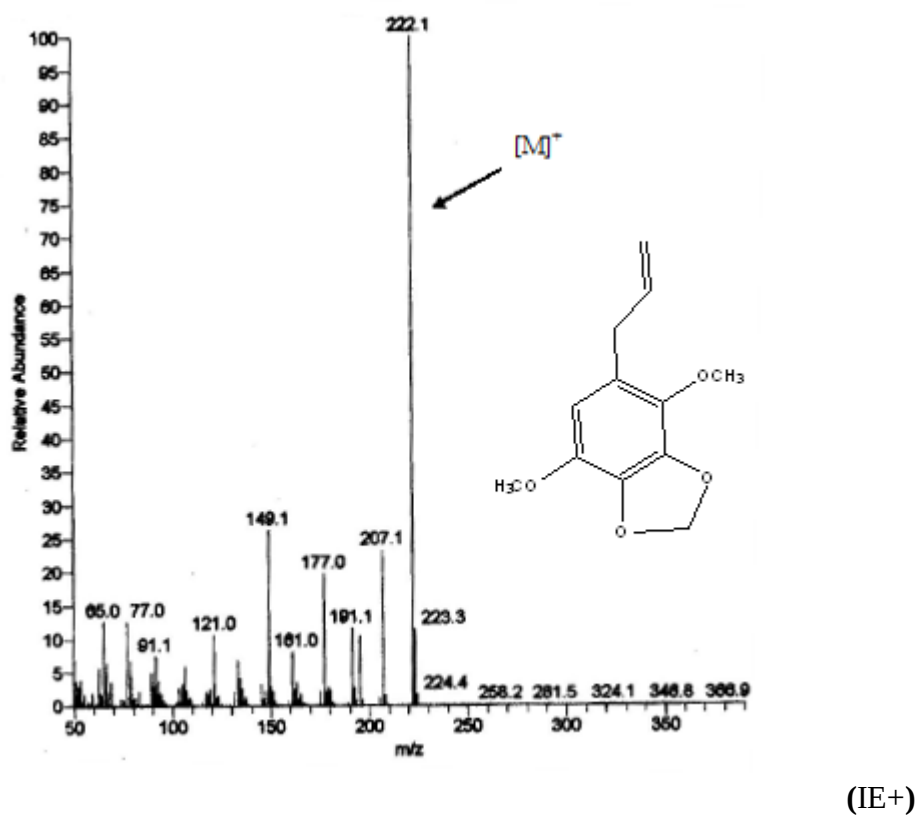


Figure III-60 : Spectres de masse en (IE) et (ICP) de Tr = 6,80min.

❖ Tr=7,31 se rapporte à l'apiole



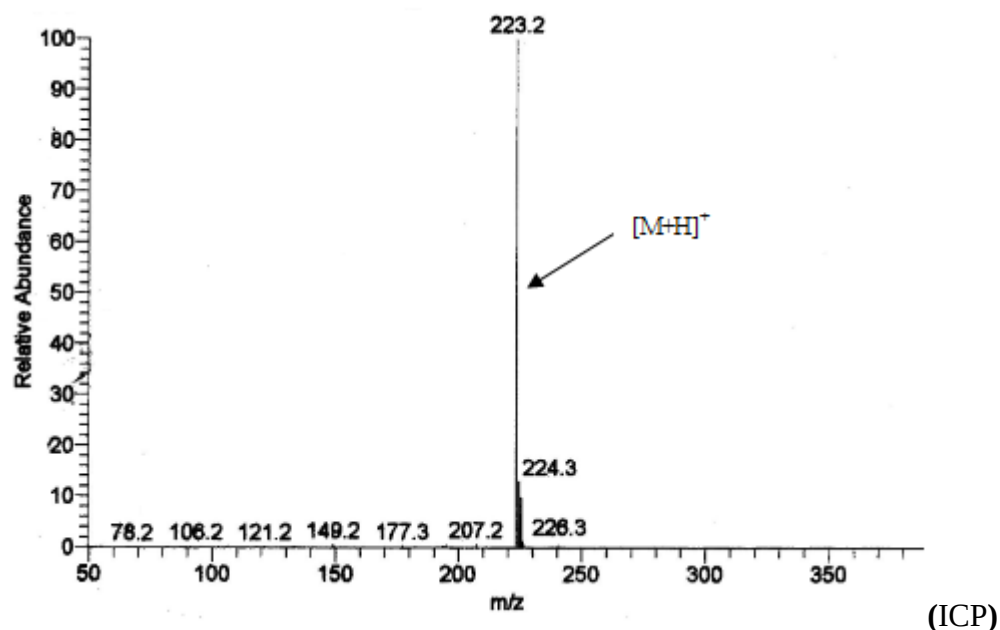


Figure III-61 : Spectres de masse en (IE+) et(ICP) de Tr = 7,31min.

L'H.E des graines de persil est constituée principalement d'allyltétraméthoxybenzène suivi de l'apiol, de la myristicine et de l'élémicine.

4.3.2. Essence de persil frais

Nous avons étudié la composition chimique de l'essence extraite par hydrodistillation à partir de la partie aérienne du persil.

En CPG, le chromatogramme présenté sur la figure **III-62** illustre plusieurs pics dont les plus intenses sont donnés dans le tableau **III-10**.

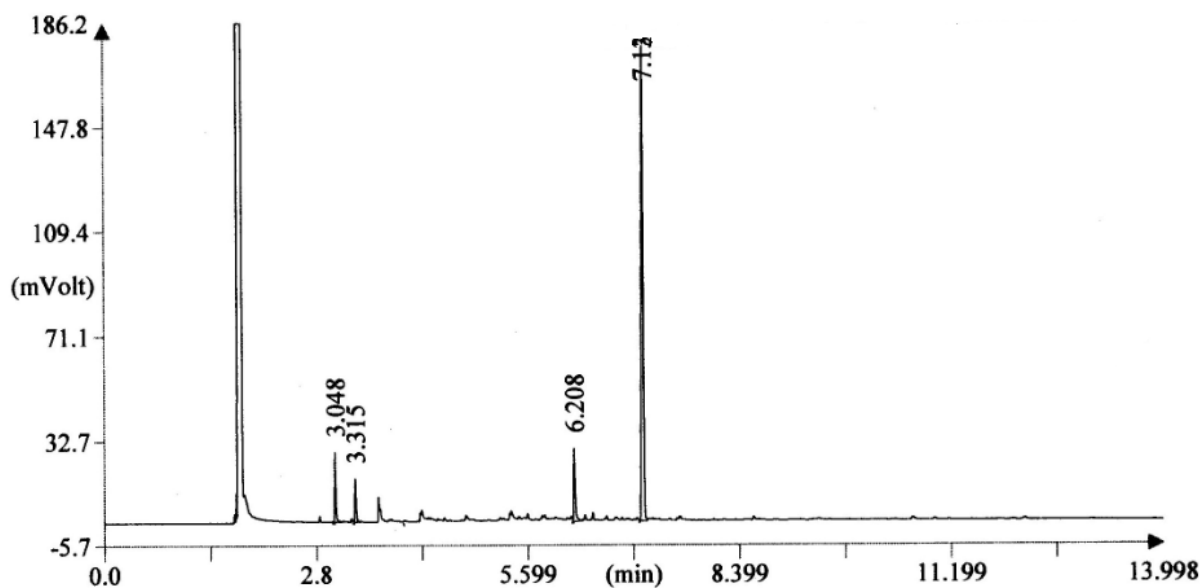


Figure III-62 : Chromatogramme analytique de l'H.E du persil frais

Tableau III-10 : Analyse par CPG de l'H.E de persil frais

N°de pic	Tr	%
1	3,05	7,11
2	3,32	4,7
3	6,21	9,78
4	7,13	78,12

La co-injection de cette essence avec l' α -pinène et le limonène nous a permis de vérifier leur absence par apparition de nouveaux pics respectivement à Tr = 2,84 et 3,31min.

L'analyse par CG/MS-IE+ et ICP de l'H.E des feuilles et tiges du persil a permis d'identifier les produits majoritaires de cette essence.

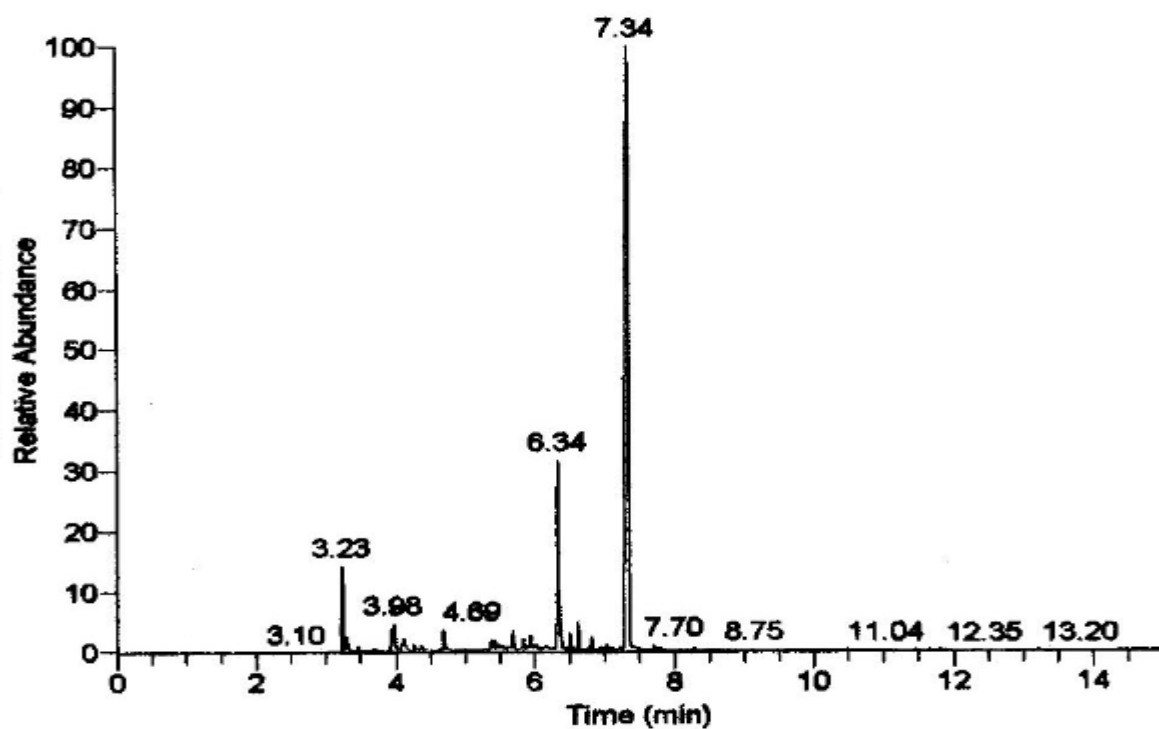


Figure III-63 : Chromatogramme en (IE+) de l'H.E de persil frais

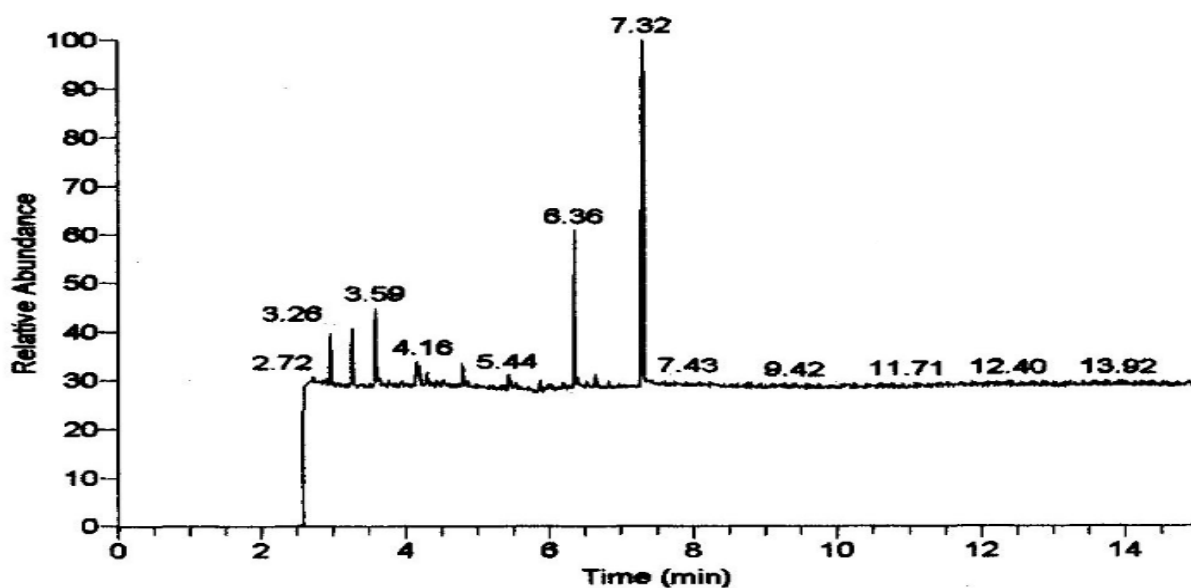


Figure III-64 : Chromatogramme en (ICP) de l'H.E de persil frais

❖ En (ICP) Tr = 2,96

Par comparaison avec le temps de rétention et le spectre de masse, le pic du Tr = 2,96 correspond au β -pinène.

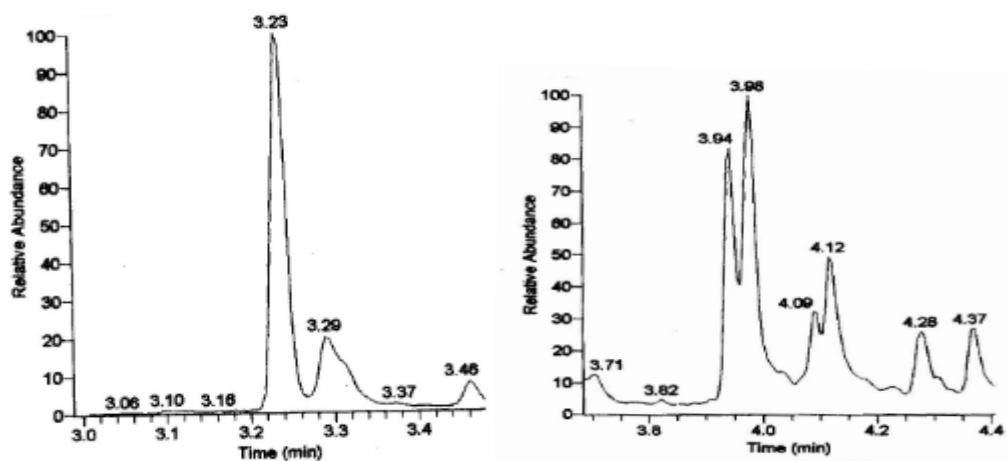


Figure III-65 : Chromatogrammes en (IE+) de Tr = 2,9 à 3,48 et Tr = 3,68 à 4,415min.

❖ Tr = 3,23 correspond à l'*o*-isopropényltoluène

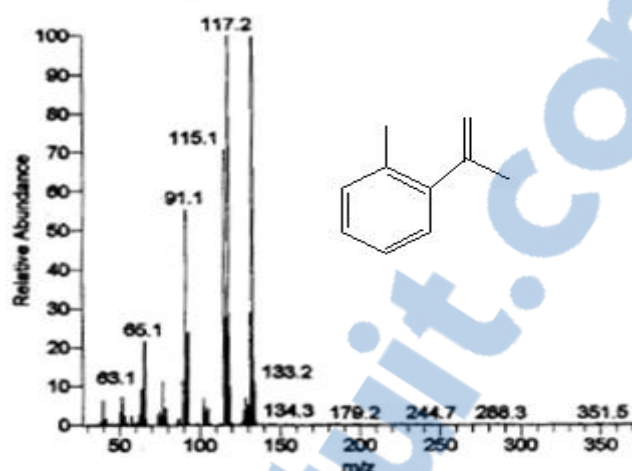
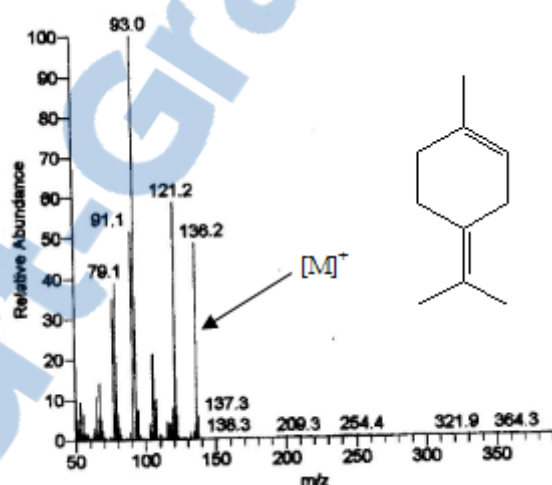
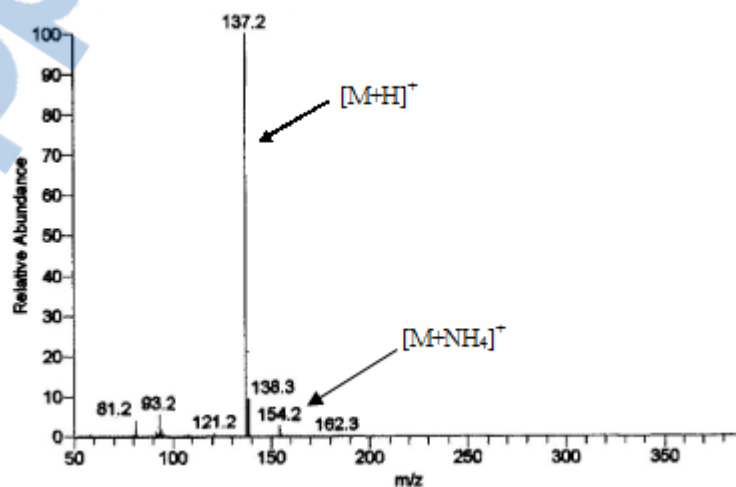


Figure III-66 : Spectre de masse en (IE+) de Tr = 3,23min.

❖ Tr =3,29 est relatif au *p*-mentha-1,4(8)-diène



(IE+)



(ICP)

Figure III-67: Spectres de masse en (IE+) et (ICP) de Tr = 3,29min.

❖ Tr =3,59 est attribuable au *p*-allyl toluène

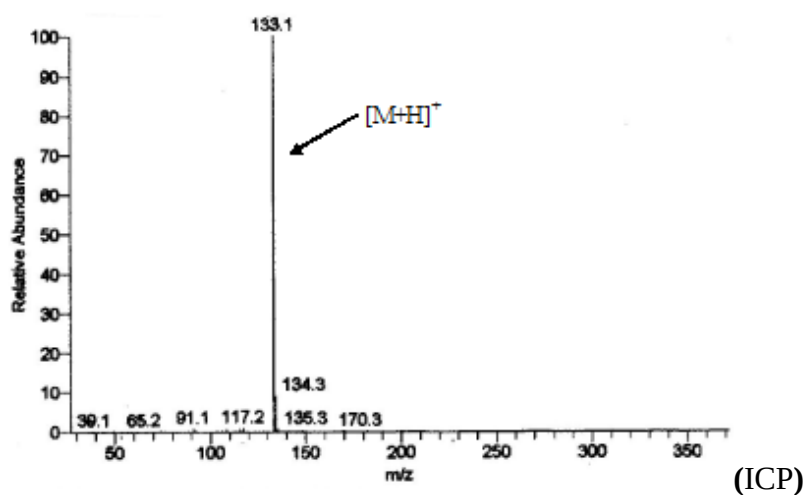
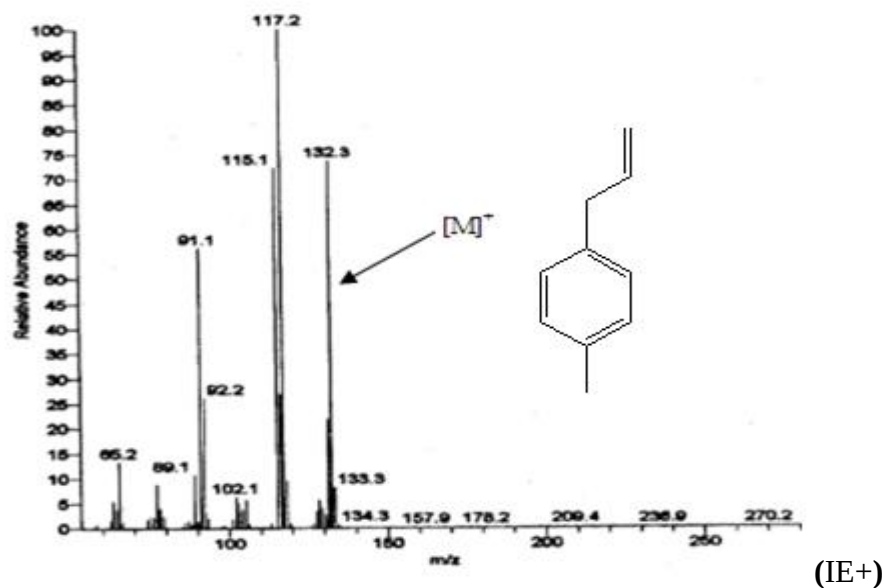


Figure III-68 : Spectres de masse en (IE+) et (ICP) de Tr = 3,59min.

❖ Tr =3,94 correspond au *p*-méthylacétophénone

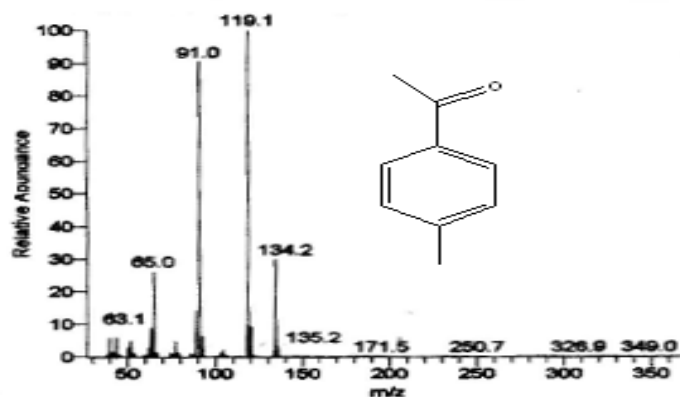


Figure III-69 : Spectre de masse en (IE+) de Tr = 3,94min.

- ❖ Tr =3,98 correspond au benzène-Me,4(1-Me éthényl)

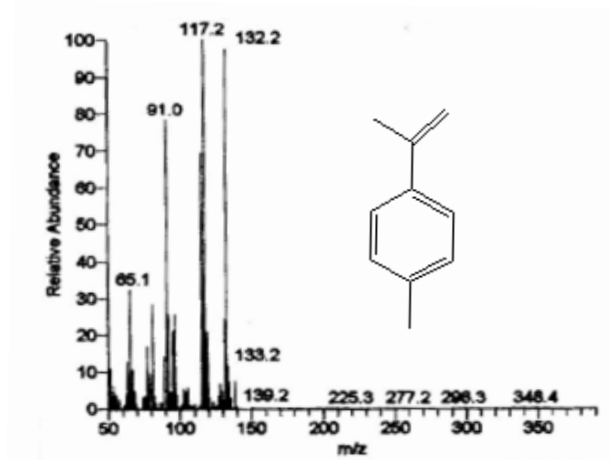


Figure III-70 : Spectre de masse en (IE+) de Tr = 3,98min.

- ❖ Tr =4,37 correspond au (E) 2-carèn-4-ol

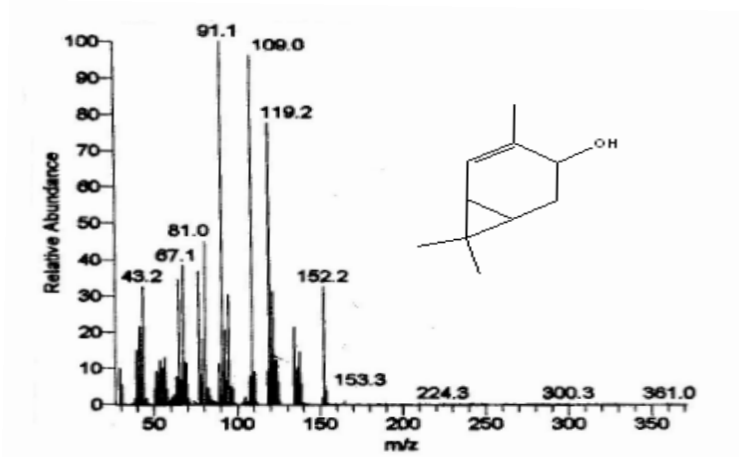


Figure III-71 : Spectre de masse en (IE+) de Tr = 4,37min.

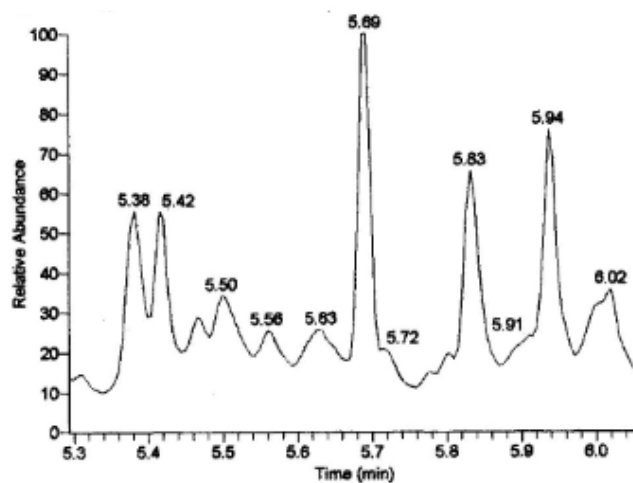


Figure III-72 : Chromatogramme en (IE+) de Tr = 5,29 à 6,06min.

❖ Tr=5,69 correspond au β -élémane

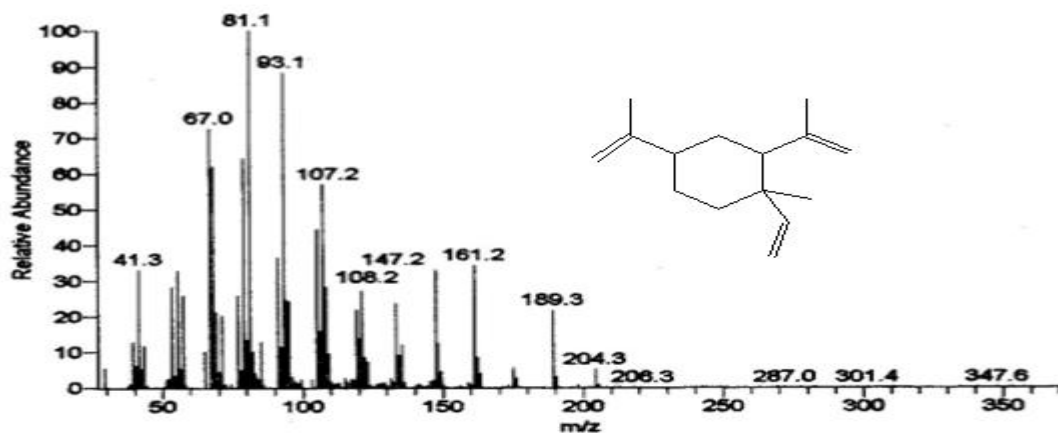


Figure III-73 : Spectre de masse en (IE+) de Tr = 5,69min.

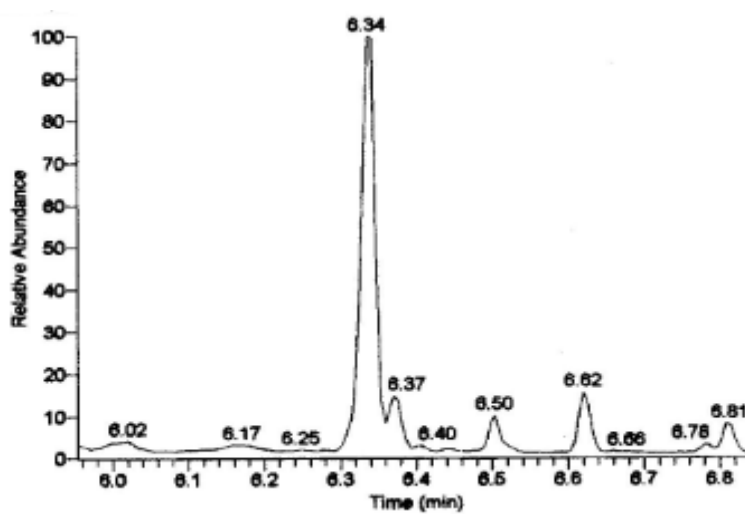


Figure III-74 : Chromatogramme en (IE+) de Tr = 5,95 à 6,85min.

- ❖ Tr = 5,94 équivaut à un sesquiterpène : Le caryophyllène

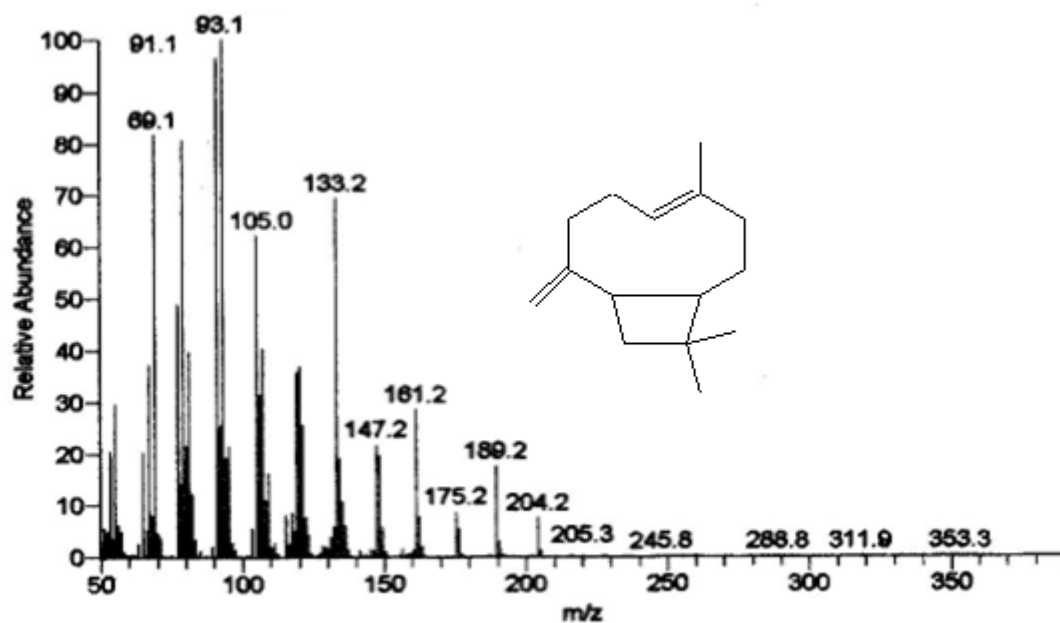


Figure III-75 : Spectre de masse en (IE+) de Tr =5,94 min.

- ❖ Tr = 6,34 est relatif à la myristicine
- ❖ Tr = 6,52 correspond au (E) β -farnésène

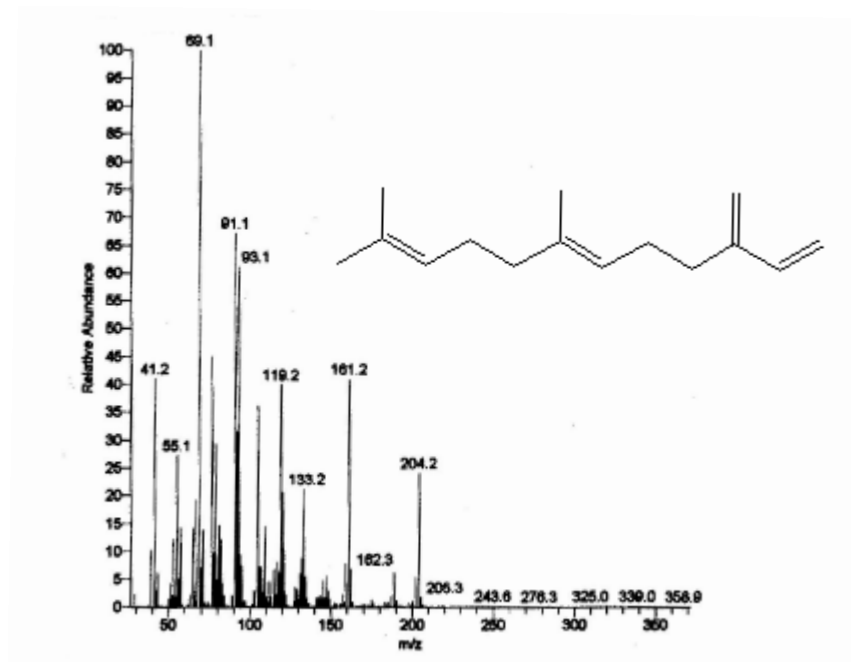


Figure III-76 : Spectre de masse en (IE+) de Tr = 6,52min.

❖ Tr = 6,62 est relatif au germacrène A

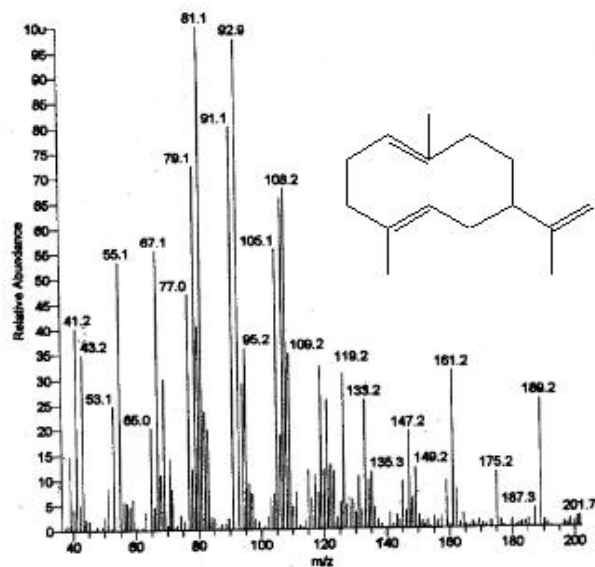


Figure III-77 : Spectre de masse en (IE+) de Tr = 6,62min.

❖ Tr =7,32 est relatif à l'apiole

4.3.3. Comparaison entre la composition chimique de l'H.E de persil avec les essences étrangères

Le tableau **III-11** regroupe les principaux constituants de l'H.E des graines de persil provenant de différents pays.

Tableau III-11 : Pourcentages des constituants des H.Es étrangères des graines de persil

Pays \ Constituants	France ⁹⁹ (%)	Iran ¹⁰⁰ (%)	USA ¹⁰¹ (%)	Essence Etudiée (%)
α -pinène	13,1	11,5	15,5	6,09
β -pinène	7,9	9,6	11,7	6,01
β -phellandrène	-	-	2,9	
myristicine	24,8	43,1	44	16,63
allyltétraméthoxy benzène	24,9	6,1	4,4	27,78
élémicine	1,8	7,6	-	3,05
apiole	23,2	13,9	12,1	23,55

⁹⁹Lamarti, A.; Badok, A.; Deffieux, G.; Carde, J-P. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* **1993**, 132, 90-98

¹⁰⁰Hassanpouraghdam, M.B.; Chemija **2010**, Vol.21, N° 2-3, 123-126.

¹⁰¹Wei, A. et Shibamoto, T. *J. Agric. Food Chemistry* **2007**, 55, 1737-1742.

Carde et al.⁹⁹ ont étudié la composition chimique de l'essence des graines de persil provenant du commerce en France. Elle contient 24,8% de myristicine, 24,9% de l'allyltétraméthoxybenzène, 23,2% de l'apiole, 13,1% d' α -pinène et 7,9% du β -pinène.

Hassanpouraghdam¹⁰⁰ a étudié la composition chimique de l'essence des graines de persil d'origine Iranienne. Elle contient 43,1% de myristicine, 13,9% d'apiole, 11,5% d' α -pinène, 9,6% du β -pinène, 6,1% de l'allyltétraméthoxybenzène et 7,6% de l'élémicine.

Shibamoto et al.¹⁰¹ ont prouvé que l'H.E des graines de persil des USA contient 44% de myristicine, 12,1% d'apiole, 15,5% d' α -pinène, 11,7% de β -pinène, mais elle est pauvre en allyltétraméthoxybenzène(4,4%).

Il convient de signaler qu'une autre étude a été réalisée par Nunes et al. sur l'H.E de persil d'USA mais sur les feuilles et les tiges. Elle contient 45,1% de myristicine, 5,9% de l'élémicine, 16,9% de l'allyltétraméthoxybenzène, 29,9% d'apiole⁸⁷.

Le tableau **III-12** rassemble les principaux constituants de l'H.E de la partie aérienne du persil provenant de différents pays.

Tableau III-12 : Pourcentages des constituants des H.Es étrangères des feuilles et tiges du persil

Pays Constituants	USA (%)	Egypte ¹⁰² (%)	Grèce ¹⁰³ (%)	Estonie ¹⁰⁴ (%)	Essence étudiée(%)
α -pinène	0,4	22,21	5,9	1,49	-
β -pinène	0,5	16,06	2,6	0,9	-
β -phellandrène	-	-	16,8	21,83	-
α -p-diméthylstyrène	-	-	8,6	-	-
1,3,8-p-menthatriene	-	0,44	14	9,97	-
myristicine	45,1	1,09	21,7	42,65	9,78
allyltétraméthoxy- benzène	16,9	-	-	-	-
élémicine	5,9	5,59	-	0,15	-
apiole	29,9	46,46	17,8	0,11	78,13

¹⁰²Viuda-Martos, M.; Mohamady, M.A. ; Farnandez-Lopez, J.; Abdeirazik, K.A.; Omer, E.A.; Pérez-Alvarez, J.A. et Sendra, E. *Food Control* **2011**, 22, 1715-1722.

¹⁰³Petropoulos, S.A.; Daferera, D.; Akoumianakis, C.A.; Passam, H.C. et Polissiou, M.G. *Journal of Science of Food and Agriculture* **2004**, 84, 1606-1610.

¹⁰⁴Vokk, R.; Lougas, T.; Mets, K. et Kravets, M. *Agronomy Research 9(Special Issue II)* **2011**, 515-520.

En 2011, Sendra et al.¹⁰² ont montré que l'H.E de la partie aérienne du persil frais de l'Egypte (Caire) est constituée de 22,1% d' α -pinène, 16,06% du β -pinène et 46,46% d'apiole.

Polissiou et al.¹⁰³ ont étudié la composition chimique de l'H.E des feuilles du persil de la Grèce. Elle contient 21,7% de myristicine, 17,8% d'apiole, 16,8% du β -phellandrène, 14% du 1,3,8 *p*-menthatriène et celle des tiges contient 33,6% du 1,3,8 *p*-menthatriène, 24,1% du β -phellandrène, 16,1% de myristicine et 1,8% d'apiole.

Kravets et al.¹⁰⁴ ont montré que l'H.E des feuilles du persil récoltés en hiver et l'été de l'Estonie (un pays d'Europe du Nord). Celle de l'hiver contient 30,67% de myristicine, 35,88% du β -phellandrène, 8,73% du β -myrcène et 1,76% d'apiole par contre celle de l'été est constituée de 42,65% de myristicine, 21,83% du β -phellandrène, 4,25% du β -myrcène et 0,11% d'apiole.

Aussi, Mordy a étudié l'effet du nickel additionné au sol sur la qualité de l'H.E des feuilles de persil d'Egypte (Ain Shams). Avant le traitement l'H.E contient 62,18% de 1,3,8 *p*-menthatriène, 2,06% de myristicine, 0,2% d'apiole et 2,14% du β -pinène. Par contre après le traitement, il observe une légère modification sur les proportions des composants¹⁰⁵.

4. Conclusion

La composition chimique des trois essences étudiées : Coriandre, Fenouil et Persil a été établie à l'aide des méthodes chromatographiques et spectroscopiques. En premier lieu, nous avons procédé par l'analyse par CPG et GC/MS-EI de toutes les H.Es. Ensuite, pour confirmer certaines identifications, nous avons mis en œuvre le couplage CG/MS selon le mode ionisation chimique ICP en utilisant NH₃ comme gaz réactant.

Les résultats obtenus grâce à l'utilisation de ces techniques montrent que les produits majoritaires des H.Es de fenouil et de persil quel que soit la partie étudiée sont des dérivés du *phénylpropane*. Celle de coriandre est un *terpène* pour les graines et un *aldéhyde* pour la partie aérienne.

Le *linalol* constitue 63,5% de l'H.E des graines de coriandre par contre sa partie aérienne contient 26,02% du 2-*décénal* en stade de floraison et 34,52% en stade de maturité. Quant au fenouil, ses graines sont constituées de 83,28% d'*estragole* et ses bulbes contiennent 74,63% d'*anéthole*. L'*allyltétraméthoxybenzène* est le produit dominant dans l'H.E des graines de persil avec 27,78%, suivi par l'*apiole* avec 23,55%. En revanche, l'essence de persil frais contient principalement de l'*apiole*.

Par comparaison entre nos résultats et ceux cités dans la littérature, on note une variation dans les pourcentages des principaux constituants plus particulièrement pour l'*anéthole* et l'*estragole* pour le fenouil. Ceci peut être dû à l'influence de plusieurs facteurs : les conditions climatiques, le mode d'extraction, etc...

¹⁰⁵ Mordy, A. *Scientia Horticulturae* **1999**, 82, 9-24.

DEUXIEME PARTIE

*Etude Biologique des Huiles Essentielles
de Coriandre, de Fenouil et de Persil*

Chapitre 1'

Activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites

1. Introduction

Dans son environnement, l'homme est entouré d'un grand nombre de microorganismes colonisant sa peau, ses muqueuses, son tube digestif et même son système respiratoire et son appareil urinaire. Ces microorganismes constitués par des bactéries, des champignons, des parasites et des virus peuvent être des saprophytes comme la flore digestive ou pathogènes déterminant une infection chez l'hôte¹⁰⁶.

Certaines espèces microbiennes pathogènes, sont de moins en moins sensibles aux antibiotiques et développent des résistances multiples à ces derniers. Par conséquent, la nécessité de trouver des solutions est à l'ordre du jour.

Les H.Es, vu la diversité des molécules qu'elles contiennent, sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques,...et antimicrobiennes. En effet, L'activité biologique d'une essence est à mettre en relation avec sa composition chimique et les effets synergiques possibles entre ses composants. Sa valeur tient à l'intégralité de ses constituants et non pas seulement à ses composés majoritaires¹⁰⁷.

Grâce à leur forte action antimicrobienne développée depuis plusieurs années, le recours aux H.Es, constitue un sérieux substitut au traitement par les antibiotiques dans les pathologies infectieuses.

Dans ce contexte, nous nous sommes donc intéressés à l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, de coriandre (*Coriandrum sativum*), de fenouil (*Foeniculum vulgare*) et de persil (*Petroselinum crispum*), sur certains germes pathogènes dont *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* et sur des souches fongiques : *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium sp.* et *Penicillium notatum*.

Le choix des bactéries a été porté sur trois souches fréquentes en pathologie humaine. Ces espèces sont souvent responsables de Toxi-infections alimentaires (TIA) constituant ainsi un problème majeur de santé publique par leur résistance naturelle à divers agents antimicrobiens.

Nous avons sélectionnés deux (02) groupes de bactéries :

- ❖ Des bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*;
- ❖ Une bactérie à Gram positif : *Staphylococcus aureus*.

Par ailleurs, la contamination fongique d'un substrat ou d'un aliment provoque des modifications physiques (aspect, goût, odeur) et chimiques (modification des qualités nutritives) en sécrétant des mycotoxines, altérant ainsi l'aliment et provoquant de dangereuses manifestations sur la sécurité alimentaire et la santé publique. C'est pour cela qu'*Aspergillus*

¹⁰⁶ Khiati, M. «Guide des maladies infectieuses et parasitaires», Ed. OPU. 1998.

¹⁰⁷ Lahlou, M. *Phytotherapy Research* 2004, 18, 435-448.

fumigatus, *Fusarium* sp. et *Penicillium notatum*, contaminants les plus fréquents des aliments ont été sélectionnés.

2. Généralités sur les souches testées

2.1. Les moisissures

Les moisissures représentent un groupe hétérogène de champignons microscopiques saprophytes et parfois parasites, caractérisés par :

- ❖ La nature chimique de la paroi cellulaire, riche en chitine;
- ❖ La reproduction par spores sexuées ou asexuées;
- ❖ La présence de glycogène, comme substance de réserve;
- ❖ L'absence de chlorophylle.

Dépourvues de pigments assimilateurs, les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes dépendant d'une source de carbone organique. Globalement peu exigeants sur les conditions environnementales du substrat, ces champignons peuvent contaminer les milieux les plus divers comme les céréales, les produits d'origine animale (lait, viande) mais aussi le papier, les tissus, les matières organiques en décomposition où elles trouvent une source de carbone et d'azote accessible.

Par ailleurs, dans des conditions propices de température, d'humidité, de pH et de composition de substrat, les moisissures peuvent synthétiser des métabolites secondaires toxiques : les mycotoxines.

Parmi les nombreuses mycotoxines, une trentaine d'entre elles sont véritablement importantes pour la santé humaine et animale à cause de leur fréquence ou de leur toxicité¹⁰⁸. Les toxines majeures sont produites par des souches fongiques appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*¹⁰⁹. Ces genres se trouvent dans les céréales ainsi que dans de nombreux autres produits d'origine végétale et animale.

2.1.1. Le genre *Aspergillus*

Le genre *Aspergillus* fait partie de la classe des *Ascomycètes*. Il comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches¹¹⁰. Une vingtaine d'espèces sont impliquées dans des pathologies animale et humaine. Par contre, certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes et d'acides organiques¹⁰⁹.

¹⁰⁸ Bennett, J.W.; Klich, M. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, 16: 497-516.

¹⁰⁹ a) AFSSA. « Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale », **2006**, Rapport synthétique; b) Castegnaro, M.; Pfohl-Leskowicz, A. « *Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans la sécurité alimentaire du consommateur* », Ed. Lavoisier, Techniques et documentation, **2002**.

¹¹⁰ a) Raper, K.; Fennell, D.J. « *The genus Aspergillus* », Williams and Wilkins editors, Baltimore **1965**; b) Botton, B. « *Moisissures utiles et nuisibles – Importance industrielle* », Ed. Masson, Paris **1990**.

2.1.2. Le genre *Fusarium*

Sur le plan économique le genre *Fusarium* est très important. Il regroupe beaucoup d'espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des maladies (fusarioses) chez de nombreuses plantes. Ces espèces peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine), les légumes, les plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers. La majorité de ces espèces sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont ainsi impliquées dans des intoxications.

2.1.3. Le genre *Penicillium*

Ce genre, appartenant au phylum des *Ascomycètes*, comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores¹¹¹. Les *Penicilliums* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, polyphages, pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils sont présents dans le sol, les matières organiques en décomposition, les denrées alimentaires, les graines, les céréales et le compost.

Les espèces du genre *Penicillium* se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*, à des températures plus basses. Il s'agit de contaminants fréquemment retrouvés dans les régions tempérées.

2.2. Les bactéries pathogènes étudiées

2.2.1. Bactéries à Gram négatif

2.2.1.1. Le genre *Escherichia*

Ce genre appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les entérobactéries sont les hôtes du tube digestif de l'homme et des animaux, mais aussi de nombreuses souches de cette famille ont été isolées de l'environnement aquatique ou terrestre. Les bactéries de cette famille cultivent facilement sur milieux ordinaires et utilisent une très large variété de composés organiques simples comme source d'énergie : sucres, acides aminés, acides organiques. La plupart des entérobactéries pathogènes se multiplient à la température optimale de 37°C.

Ce genre comprend cinq (5) espèces, mais *E. coli* (*Escherichia coli*) est la plus importante. C'est un hôte commun de l'intestin de l'homme et des animaux. A l'intérieur de l'espèce il y a des pathotypes souvent associés à des sérotypes particuliers. Certains de ces pathotypes sont responsables d'infections intestinales (gastro-entérites et diarrhées), leur pouvoir pathogène est induit par des facteurs d'adhésion et/ou par la production d'entérotoxines.

¹¹¹Pitt, JI. « *Laboratory guide to common Penicillium species* », Academia Press editor, London 1988.

Certains d'entre eux sont responsables de méningites néonatales, d'autres provoquent des infections du tractus urinaire, ou encore des septicémies qui correspondent à un nombre restreint de sérotypes¹¹².

2.2.1.2. Le genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* fait partie de la famille des *Pseudomonadaceae*. Les bactéries de ce genre sont des bâtonnets, mobiles par cils polaires, aérobies strictes. Les *Pseudomonas* cultivent facilement sur les milieux d'usage courant en aérobiose, à la température de 30°C, certaines espèces comme *P. aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa*) en sont capables à 41°C et même à 43°C.

Elles sont capables d'utiliser une variété très large de substrats comme source de carbone et d'énergie tels que les glucides, les lipides, les acides aminés, les acides organiques, les composés terpéniques et stéroïdiques, et également un grand nombre de corps aromatiques benzéniques ou phénoliques, etc...

Ce genre comprend une centaine d'espèces ubiquitaires. *P. aeruginosa* en est l'espèce type. C'est un germe ubiquiste communément rencontré dans le sol et plus encore dans les eaux ou à la surface des végétaux. Il vit à l'état commensal au niveau du tube digestif de l'homme et des animaux. Il est capable de se multiplier à 41°C contrairement à *P. fluorescens* et *P. putida*. Fréquemment isolé sur la peau et les muqueuses de l'homme ou de l'animal, il est caractérisé particulièrement par sa résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques.

En milieu hospitalier, *P. aeruginosa* est à l'origine des infections et de suppurations locales ou profondes, isolé essentiellement chez des patients présentant une immuno-déficience locale ou générale (brûlés, cancéreux, diabétiques, etc...). Aussi, il est très fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales (infections pulmonaires, cutanées). Il est également phytopathogène avec beaucoup d'autres espèces du même genre.

2.2.2. Bactéries à Gram positif

Les staphylocoques, bactéries à Gram positif, sont de forme sphérique et se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers à la façon d'une grappe de raisin, d'où leur nom (staphylos tiré du grec). Ce sont des germes ubiquistes largement distribués dans l'environnement naturel de l'homme (air, eau et sol,) et en plus forte densité sur les surfaces cutano-muqueuses des mammifères.

Les staphylocoques ont un pouvoir pathogène opportuniste extrêmement large qui s'exerce avec une grande fréquence en milieu hospitalier. L'espèce *S. aureus* (*Staphylococcus aureus*) est responsable d'infections pyogènes de la peau et des muqueuses, mais aussi osseuses (ostéomyélites), digestives (entéocolites post-antibiotiques), et septicémiques. Aussi l'espèce *S. epidermidis* est un agent de plus en plus fréquent d'infections nosocomiales¹¹⁰.

¹¹²Leclerc, H.; Gaillard, J.L.; Simonet, M. «Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien», Doin Editeurs, Paris 1995.

3. Activité antimicrobienne

L'essor de la chimie a permis l'apparition de nouvelles substances antimicrobiennes. Ces dernières sont définies comme étant des substances utilisées pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens et antifongiques. Ces substances synthétiques ont été employées couramment.

Cependant, en raison du souci majeur des consommateurs de denrées sans additifs chimiques, la recherche d'additifs naturels, notamment d'origine végétale, s'est développée particulièrement ces dernières années. Par conséquent, l'utilisation de produits naturels possédant une activité antibactérienne s'avère nécessaire¹¹³.

En effet, les huiles essentielles (H.Es) sont connues pour posséder une activité antimicrobienne et certaines sont classées comme des substances sûres et pourraient donc être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants¹¹⁴.

3.1. Mode d'action des huiles essentielles

Le mode d'action des H.Es sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé^{32, 115}. Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles essentielles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Figure I'-1).

Du fait de la variabilité quantitative et qualitative des composants des H.Es, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire¹¹⁶.

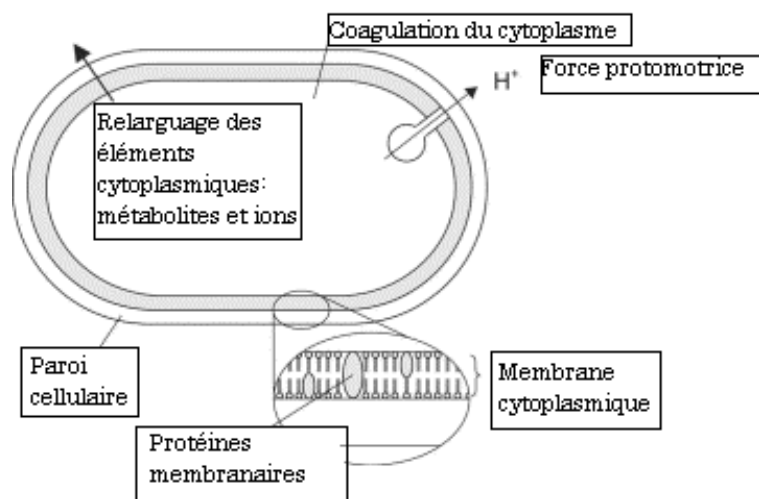


Figure I'-1 : Action des H.Es et de leurs constituants sur la cellule bactérienne³²

¹¹³ Rožman, T.; Jeršek, B. *Acta agriculturae Slovenica* **2009**, 93 (1): 51-580.

¹¹⁴ a) Gachkar, L.; Yadegari, D.; Rezaei, M.B.; Taghizadeh, M.; Astaneh, S.A.; Rasooli, I. *Food Chem.* **2007**, 102: 898-904; b) Rasooli, I.; Fakoor, M.H.; Yadegarinia, D.; Gachkar, L.; Allameh, A.; Rezaei, M.B. *Food Chem.* **2008**, 135-140.

¹¹⁵ Kalembe, D.; Kunicka, A. *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10 (10): 813-829.

¹¹⁶ Souza, E.L.; Guerr, N.B.; Stamford, T.L.M.; Lima, E.O. *Rev. Bras. Farm.* **2006**, 87 (1): 22-25; b) Bajpai, V.K.; Kang, S.C. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2010**, 87: 327-336.

Le mode d'action des H.Es 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^+)¹¹⁷.

Certains composés phénoliques des H.Es 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'ADP¹¹⁸.

Aussi, une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a été rapportée par Sakaguchi et al.¹¹⁹.

Les H.Es peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN et de l'ARN des protéines et des polysaccharides¹²⁰. 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.

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1. Souches testées

Pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne, trois (03) souches bactériennes et trois (03) fongiques ont été testées vis-à-vis de nos H.Es. Les souches bactériennes utilisées proviennent de l'Institut Pasteur d'Oran et les souches fongiques du Laboratoire de protection des végétaux, de l'université de Mascara.

Tableau I'-1 : Souches bactériennes et fongiques testées

Bactéries	Champignons
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25853	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25922	<i>Fusarium sp.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Penicillium notatum</i>

3.2.2. Tests de confirmation des souches

Les souches bactériennes utilisées sont des souches déjà identifiées et référenciées. Nous avons tenu à vérifier leur pureté par quelques tests biochimiques et culturels. Après ensemencement de bactéries sur leurs milieux sélectifs, la coloration de Gram a été réalisée après 24 heures d'incubation à 37°C, ce qui a permis ainsi l'observation de la forme des cellules bactériennes et de leur mode de regroupement (Tableau I'-2).

¹¹⁷Souza, EL.; Stamford, TLM.; Lima, EO. *Brazilian Journal of Microbiology* **2006**, 37: 527-532; b) Cox, SD.; Mann, CM.; Markham, JL.; Bell, HC.; Gustafson, JE.; Warmington, JR.; Wyllie, SG. *Journal of Applied Microbiology* **2000**, 88: 170-175.

¹¹⁸Pavel, M.; Ristić, M.; Stević, T. *J. Serb. Chem. Soc.* **2009**, 75 (1): 27-34.

¹¹⁹Wendakoon, CN.; Sakaguchi, M. *Journal of Food Protection* **1995**, 58:280-283.

¹²⁰Malecky, M. «*Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins*», **2007**, Thèse de Doctorat, INRA, UMR 791 Physiologie de la Nutrition et Alimentation, F-75231 Paris.

Tableau I'-2 : Caractères des souches bactériennes étudiées

Espèces bactériennes	Milieu de culture sélectif	Gram	Aspect microscopique
<i>E. coli</i>	Gélose Hektoen	-	Coccobacilles
<i>P. aeruginosa</i>	Gélose au cétrimide	-	Bacilles
<i>S. aureus</i>	Chapman	+	Cocci en grappe de raisin

Des tests biochimiques ont été effectués pour confirmer les souches étudiées :

Test de la catalase, de la coagulase, de l'oxydase¹²¹ et Galerie biochimique d'identification de *S. aureus* API staph (Biomérieux).

N.B : Les résultats d'identification des souches testées sont présentés en Annexe.

3.2.3. Antibiogramme

Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne estensemencée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose Mueller-Hinton. Des disques pré-imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose. L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration.

Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits par la détermination du diamètre de la zone d'inhibition. Les souches ont été testées vis-à-vis d'antibiotiques choisis selon leur disponibilité sur le marché (Tableau I'-3).

Tableau I'-3 : Antibiotiques utilisés

Antibiotique	Sigle
Oxacilline	OX ₅
Pénicilline	P ₁₀
Céfazoline	CZ ₁₀
Céfalexine	CN ₁₀
Colistine	CT ₁₀

En pratique, on réalise à partir de l'isolement (souche pure) un ensemencement en tapis sur le milieu. Ensuite, les disques d'antibiotiques sont disposés, puis incubés à 37°C pendant 24 heures. La lecture se fait après 24 heures à 37°C, en mesurant avec précision les diamètres des zones d'inhibition. Afin d'obtenir des résultats convenables, les conditions suivantes ont été exigées :

¹²¹a) Leminor, L. et Richard, C. «Méthodes de laboratoire pour l'identification des *Entérobactéries*». Ed : Institut Pasteur, Paris, **1993**, 56-179; b) Paul, S. «*Bactériologie*», Ed. DUNOD, Paris, **2002**, 356-360.

- ❖ L'inoculum doit être de concentration connue, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mac Farland. Cette valeur correspond à une DO de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm et une concentration de 10^6 à 10^8 UFC/mL;
- ❖ Bien inonder la suspension bactérienne sur le milieu de culture afin de permettre une bonne adhésion;
- ❖ Bien répartir les disques sur le milieu (séparés de 30 mm de centre à centre);
- ❖ Ne pas inverser les boîtes lors de l'incubation.

3.2.4. Tests de l'activité antimicrobienne

3.2.4.1. Méthode de diffusion ou des aromatogrammes

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles est réalisée d'abord par la méthode de diffusion sur disques, en raison de sa simplicité et son efficacité pour tester la sensibilité des bactéries.

La méthode des aromatogrammes est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne des H.Es à tester. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire H.Es sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Cette méthode nous permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'H.E sur les bactéries, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de cette essence. La méthode de diffusion des disques appliquée (Figure I'-2) est celle décrite par Rasooli et al.^{114a}.

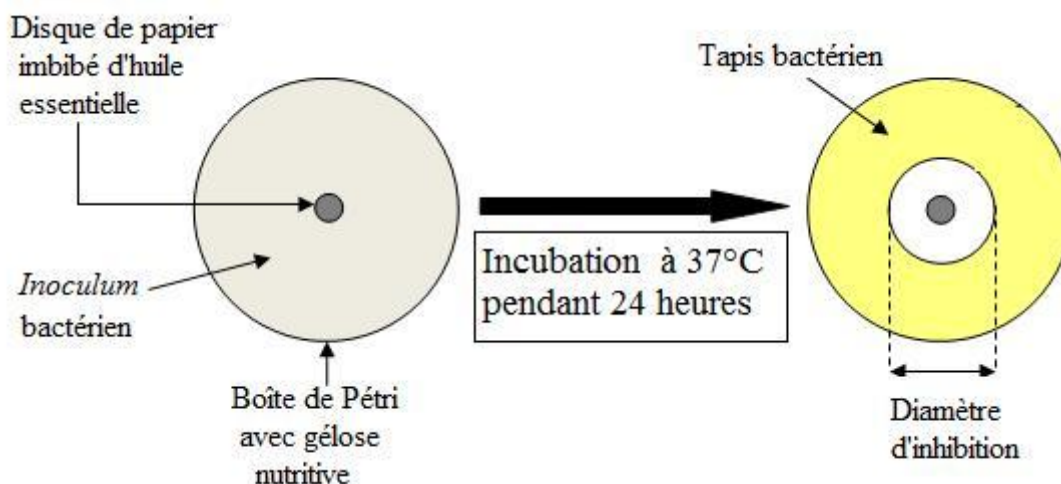


Figure I'-2 : Principe de la méthode de diffusion sur disques

- ❖ **Ensemencement** : Vingt millilitres (20 mL) de l'agar de Muller Hinton en surfusion sont coulés dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu de culture, 100 µL de la suspension bactérienne à tester (10^8 UFC/mL) sont étalés en surface;
- ❖ **Dépôt des disques** : Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier Wattman N° 40 sont déposés sur l'agar, précédemment inoculé avec le microorganisme choisi, puis imbibés par 5 µL d'H.E à tester. Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 1h pour que l'H.E puisse diffuser¹¹¹;

- ❖ **Contrôle positif** : L'amoxicilline a été utilisée comme contrôle positif, ce choix est dû à la sensibilité des souches choisies pour cet antibiotique;
- ❖ **Incubation** : Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h;
- ❖ **Expression des résultats** : A la sortie de l'incubateur, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (y compris le diamètre de disque de 6 mm)¹²².

D'après Roura et al.¹²³, la sensibilité à l'essence a été classée par le diamètre des halos d'inhibition :

- ❖ *Non sensible (-) pour les diamètres moins de 8 mm;*
- ❖ *Sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14 mm;*
- ❖ *Très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19 mm;*
- ❖ *Extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20 mm.*

Pour mettre en évidence l'activité antifongique des H.Es, la méthode de diffusion rapportée par Rasooli et al. a été utilisée^{114b}.

- ❖ **Ensemencement** : Vingt millilitres (20 mL) du PDA en surfusion sont coulés dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu de culture, 100 µL de la suspension de spores (10⁶ spores/mL) ont été étalés en surface;
- ❖ **Dépôt des disques** : Dans des conditions aseptiques, des disques de papier Wattman № 40 (disque/boîte) ont été déposés sur l'agar, qui a été précédemment inoculé avec les moisissures à tester, puis ces disques sont imbibés par 5 µL d'H.E. Pour que l'H.E puisse diffuser, les boîtes ont été maintenues à 4°C pendant 1h. Ensuite, elles ont été incubées à 30°C pendant 2 à 7 jours;
- ❖ **Expression des résultats** : L'absence de la croissance mycélienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (y compris le diamètre du disque de 6 mm). Les résultats sont exprimés en mm.

3.2.4.2. Méthode des micro-atmosphères

L'activité antifongique des composés volatils des huiles essentielles a été testée par la méthode des micro-atmosphères décrite par Catalan et al.¹²⁴.

- ❖ **Inoculation** : Des boîtes de Pétri (90 mm de diamètre) contenant 20 mL du milieu de Sabouraud ont été préparées. Une prise d'agar d'inoculum fongique (6 mm de diamètre) a été enlevée d'une culture précédente de chaque souche fongique à tester et placée au centre des boîtes de Pétri;

¹²²Baser, K.H.C.; Buchbauer, G. «*Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*», Ed.Taylor and Francis Group, LLC.United States of America **2010**, 994.

¹²³Ponce, A.G.; Fritz, R.; Del Valle, C.; Roura, S.I. *J. Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **2003**, 36: 679-684.

¹²⁴Singh, G.; Maurya, S.; de Lampasona, M.P.; Catalan, C. *Food Control* **2006**, 17: 745-752.

- ❖ **Dépôt des disques** : Un disque stérile de papier Wattman № 40 (6 mm) imbibé par 5µL d'H.E a été placé au centre du couvercle de chaque boîte de Pétri. Les boîtes sont fermées par le parafilm (dépôt en position inversée sur le couvercle de la boîte de Pétri);
- ❖ **Incubation** : Les boîtes de Pétri ont été incubées (sur le couvercle de sorte que les composés volatils puissent atteindre les souches fongiques) à 30°C pendant 2 à 14 jours, jusqu'à ce que la croissance dans les boîtes de contrôle atteigne les bords des boîtes de Pétri;
- ❖ **Expression des résultats** : Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne, par comparaison au témoin a été calculé par la formule suivante :

$$IA_{vap} (\%) = (D_C - D_T) / D_C \cdot 100$$

IA_{vap} (%) : Index antifongique des composés volatils de l'H.E.

D_C : Diamètre des disques mycéliens de contrôle.

D_T : Diamètre des disques mycéliens avec l'H.E.

3.2.4.3. Antibiogramme sur milieu liquide (micro-dilution)

C'est une méthode de dilution sur milieu liquide permettant de déterminer la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) d'une substance antimicrobienne et donc de vérifier son activité (bactériostatique ou bactéricide). Dans des conditions rigoureuses d'asepsie :

- ❖ Préparer à partir d'une culture de 18 heures la suspension bactérienne et ajuster sa concentration à 10⁶ UFC /mL;
- ❖ Remplir toutes les cupules par 50 µL de bouillon nutritif;
- ❖ Introduire 50 µL d'H.E dans la 3^{ème} cupule;
- ❖ Commencer à partir de cette dernière à réaliser des dilutions binaires (1/2, 1/4,...) de l'huile et jeter 50 µL de la dernière cupule;
- ❖ Remplir, à l'exception de la 2^{ème} cupule, les autres par 50 µL de la suspension bactérienne;
- ❖ Introduire dans la 2^{ème} cupule 50 µL d'H.E. La 1^{ère} et la 2^{ème} cupule serviront ainsi comme témoin;
- ❖ Incuber à 37°C, puis suivre la cinétique par l'Eliza à différents intervalles de temps. La CMI est déterminée par la première cupule ne présentant pas de trouble visible (Figure I'-3).

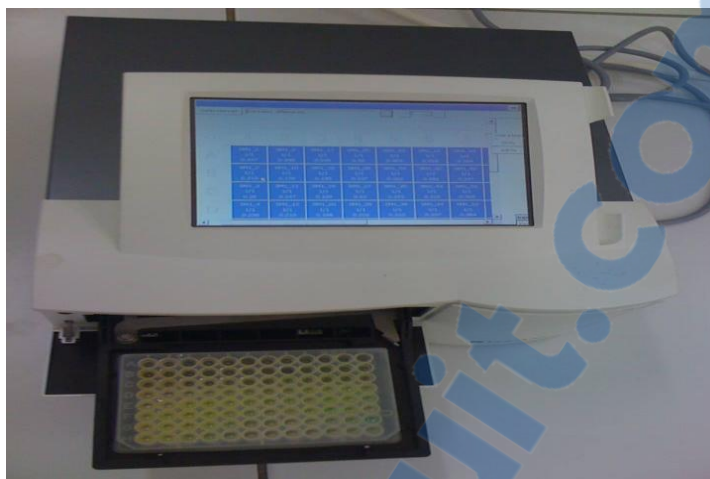


Figure I'-3 : Lecture de la microplaque par l'Eliza

4. Résultats et discussion¹²⁵

4.1. Résultats de l'Antibiogramme

L'antibiogramme permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne *in vitro*. Les représentations graphiques des diamètres d'inhibition des bactéries étudiées vis-à-vis de différents antibiotiques sont regroupées dans les figures I'-4-6.

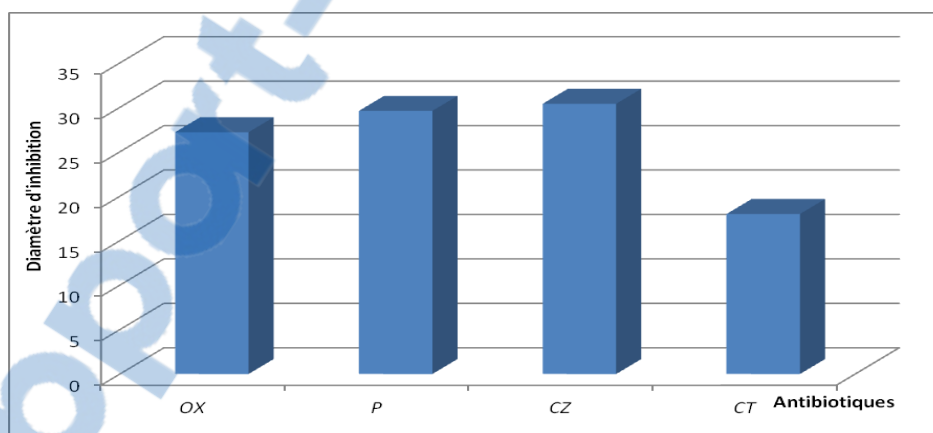


Figure I'-4 : Représentation graphique des diamètres d'inhibition d'*E. coli* vis-à-vis de différents antibiotiques (OX : Oxacilline, P : Pénicilline, CZ : Céfazoline, CT : Colistine)

¹²⁵ a) Ouis, N.; Hariri, A. et El Abed, D. 2^{ème} Rencontre de Chimie Fine d'Oran (ReLCFO-2013), Oran les 27-28 Octobre 2013; b) Ouis, N.; Hariri, A. et El Abed, D. *African Journal of Microbiology Research* 2014, 8(11), 1157-1169.

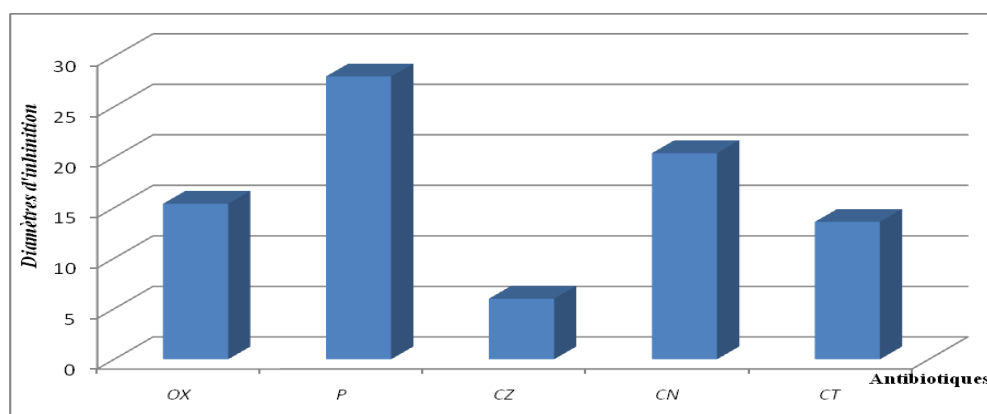


Figure I'-5 : Représentation graphique des diamètres d'inhibition de *P.aeruginosa* vis-à-vis de différents antibiotiques (OX : Oxacilline, P : Pénicilline, CZ : Céfazoline, CN : Céfalexine, CT : Colistine)

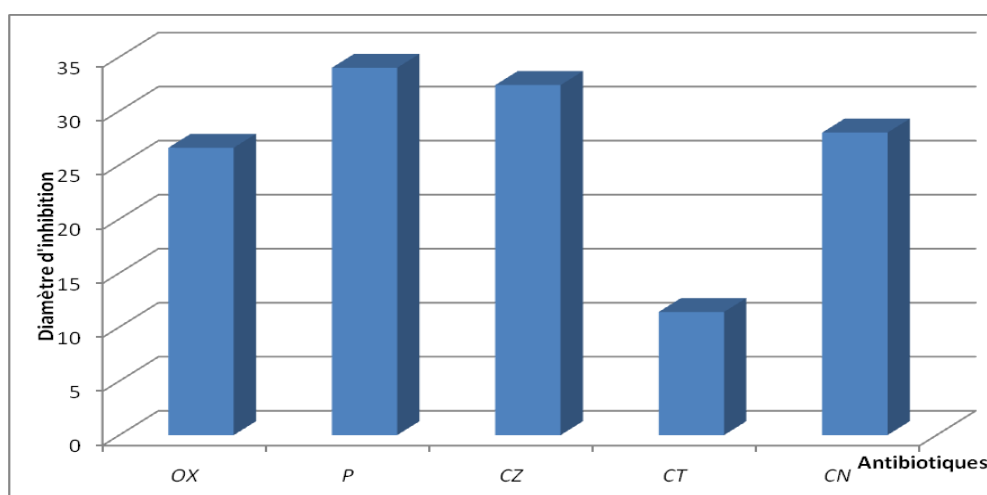


Figure I'-6 : Représentation graphique des diamètres d'inhibition de *S. aureus* vis-à-vis de différents antibiotiques (OX : Oxacilline, P : Pénicilline, CZ : Céfazoline, CN : Céfalexine, CT : Colistine)

Les résultats mentionnés montrent que le degré de sensibilité de chaque bactérie vis-à-vis des antibiotiques est différent d'une espèce à une autre. Les caractéristiques des zones d'inhibition révèlent que :

- ❖ *E. coli* (ATCC 25922) est sensible à tous les antibiotiques testés;
- ❖ *P.aeruginosa* (ATCC 25853) présente une résistance vis-à-vis de la Céfazoline;
- ❖ *S. aureus* (ATCC 25923) est résistante à la Colistine.

4.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

La sensibilité des trois bactéries (*E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*) a été mise en évidence par la technique de diffusion des disques (*Planche I*) vis-à-vis des quatre (04) H.Es testées : H.E des graines de coriandre; H.E des graines de fenouil; H.E des graines de persil; H.E de la partie aérienne fraîche (feuilles et tiges) du persil.

Planche I

Figure I'-7 : Effet de l'H.E des graines de coriandre sur la croissance de :

A : *Escherichia coli* (ATCC 25922);

B : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853);

C : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Figure I'-8 : Effet de l'H.E des graines de fenouil sur la croissance de :

A : *Escherichia coli* (ATCC 25922);

B : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853);

C : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Figure I'-9 : Effet de l'H.E des graines de persil sur la croissance de :

A : *Escherichia coli* (ATCC 25922);

B : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853);

C : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Figure I'-10 : Effet de l'H.E de la partie aérienne fraîche (feuilles et tiges) du persil sur la croissance de :

A : *Escherichia coli* (ATCC 25922);

B : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853);

C : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Planche I

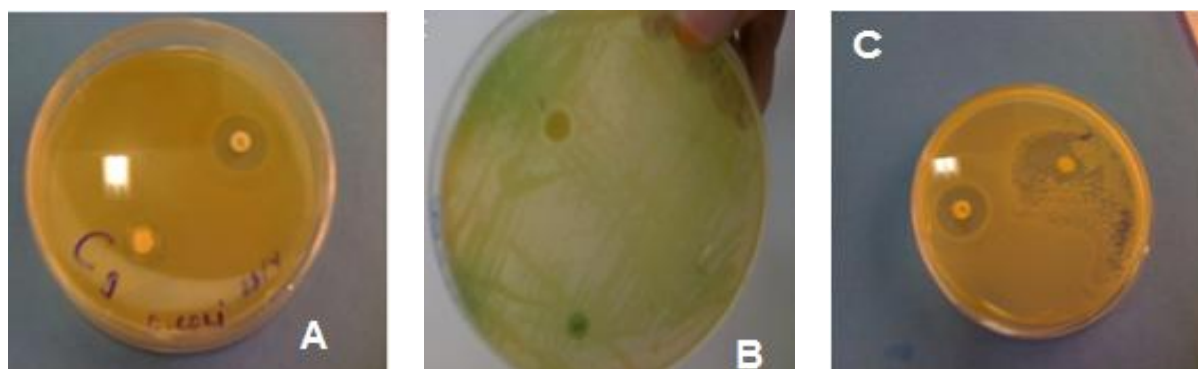


Fig. I'-7 : Effet de l'H.E des graines de coriandre sur la croissance de :
A : *Escherichia coli* (ATCC 25922); **B :** *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853);
C : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

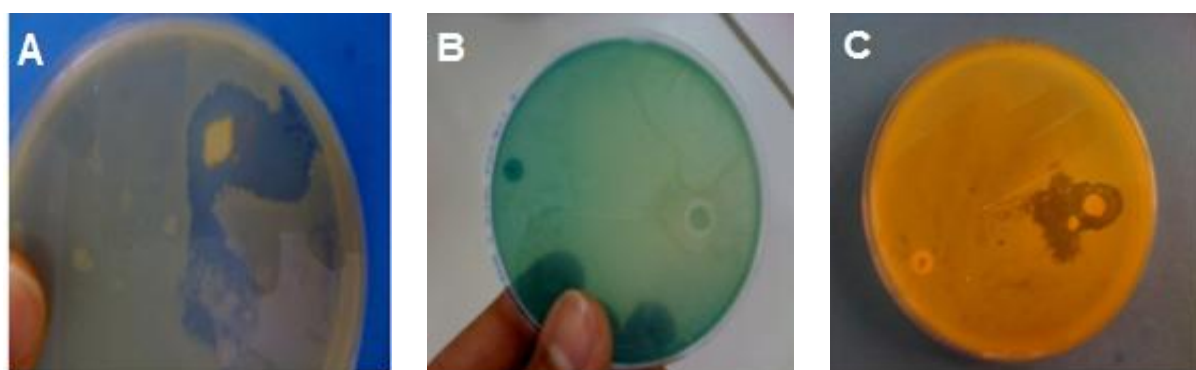


Fig. I'-8 : Effet de l'H.E des graines de fenouil sur la croissance de :
A : *Escherichia coli* (ATCC 25922); **B :** *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853);
C : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

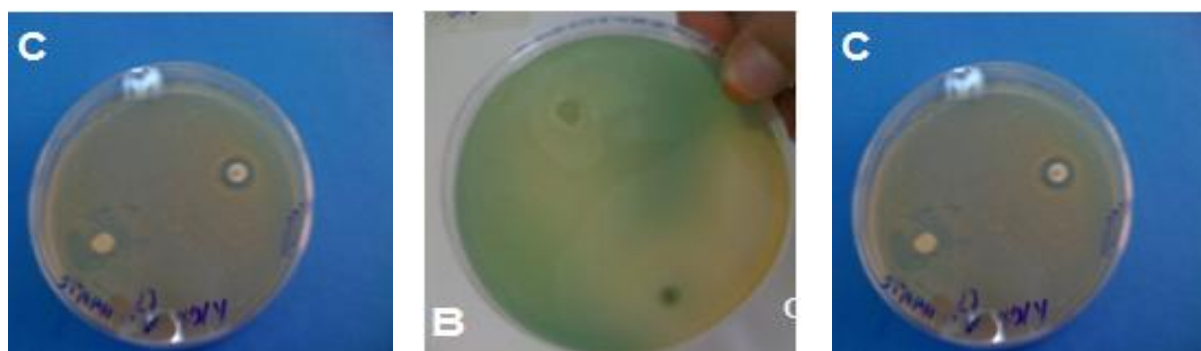


Fig. I'-9 : Effet de l'H.E des graines de persil sur la croissance de :
A : *Escherichia coli* (ATCC 25922); **B :** *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853);
C : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

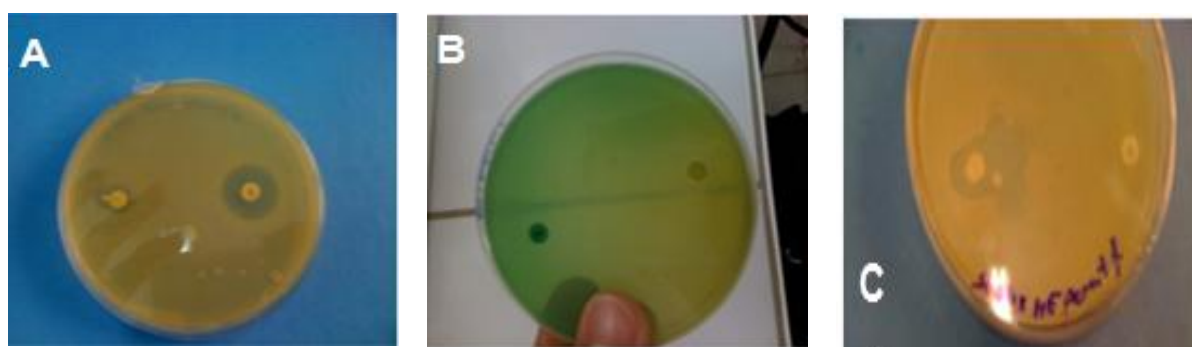


Fig. I'-10 : Effet de l'H.E de la plante fraîche (feuilles et tiges) du persil sur la croissance de :
A : *Escherichia coli* (ATCC 25922); **B** : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853);
C : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

Au vu des résultats obtenus, le classement de la sensibilité des bactéries est mentionnée sur le tableau I'-4.

Tableau I'-4 : Halos d'inhibition en mm provoqués par les quatre H.Es testées

Huiles essentielles	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 25853)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)
Graines de coriandre	16,7 Très sensible	13 sensible	22,1 Extrêmement sensible
Graines de fenouil	26 extrêmement sensible	12,4 sensible	18,2 Très sensible
Graines de persil	24,7 Extrêmement sensible	8,00 sensible	27,5 Extrêmement sensible
Plante fraîche de persil	11,7 sensible	8,1 sensible	22,1 Extrêmement sensible

Les résultats obtenus montrent que l'activité antibactérienne est fonction de la bactérie cible. Il s'est avéré que toutes les bactéries testées ont été sensibles vis-à-vis des quatre H.Es.

En revanche, *Pseudomonas* possède un potentiel de résistance un peu élevé par rapport aux autres espèces suite aux faibles zones d'inhibition observées (8 mm) vis-à-vis de l'H.E de la plante fraîche et des graines de persil. Les résultats observés montrent qu'un important effet antibactérien a été exercé par les H.Es de fenouil et de coriandre vis-à-vis de cette bactérie.

Concernant *S. aureus*, cette bactérie a manifesté une sensibilité variable à ces H.Es. Il faut noter que l'activité antibactérienne la plus élevée a été enregistrée avec l'H.E des graines de persil.

Ces résultats ont montré que *S. aureus* était plus sensible qu'*E. coli* et *P. aeruginosa*. Cette sensibilité plus marquée des Gram (+) par rapport aux Gram (-) vis-à-vis des H.Es a été déjà observée dans plusieurs études antérieures¹²⁶.

La grande résistance des bactéries à Gram (-) est liée en partie à la complexité de la paroi cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à Gram (+)¹²⁷.

L'activité antibactérienne des essences étudiées vis-à-vis des trois souches testées est due aux constituants terpéniques et aux dérivés du phénylpropane qu'elles contiennent. Le linalol, l'estragole, l'apiole et l'allyltétraméthoxybenzène sont les composés majoritaires des essences de coriandre, de fenouil et de persil, respectivement. En effet, les terpénoïdes et leurs dérivés oxygénés sont les composants principaux des H.Es. Ces composés ont un potentiel inhibiteur fort sur les souches microbiennes pathogènes¹²⁸.

En plus, les principaux composants actifs des H.Es contre les agents pathogènes d'origine alimentaire contiennent généralement 1% de composés phénoliques tels que l'eugénol, le thymol...¹²⁹. Les propriétés antibactériennes de ces composés sont en partie liées à leurs caractères lipophiles menant à l'accumulation au niveau des parois bactériennes, perturbant ainsi le fonctionnement et la perméabilité des membranes cellulaires, la dégradation de la paroi cellulaire¹³⁰, l'altération de la membrane cytoplasmique, et l'épuisement de la force motrice des protons.

4.3. Détermination de la CMI et la CMB en milieu liquide

La méthode par dilution a pour but d'évaluer les concentrations minimales inhibitrices. Elle consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme. L'efficacité de l'H.E testée est évaluée par la mesure de deux concentrations: la *concentration minimale inhibitrice* (CMI) et la *concentration minimale bactéricide* (CMB). Ces concentrations nous permettent de connaître la nature de l'activité antimicrobienne de l'H.E : bactériostatique ou bactéricide.

La CMI est la plus faible concentration d'H.E inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 16 à 20 heures d'incubation à 37°C. Les microorganismes restent cependant viables¹³¹.

¹²⁶ a) Cox, S.D.; Mann, C.M.; Markham, J.L. *Journal of Applied Microbiology* **2001**, 91: 492-497; b) Friedman, M.; Henika, P.R.; Mandrell, R.E. *Journal of Food Protection* **2002**, 65(10): 1545-1560.

¹²⁷ Poole, K. «*Current opinion in microbiology*», **2001**, 4: 500-508.

¹²⁸ a) Gudzik, B.; Djokovic, D.; Vajs, V.; Palic, R.; Stojanovic, G. *Flavour Frag. J.* **2002**, 17 (5), 392-394; b) Cakir, A.; Kordali, S.; Zengin, H.; Izumi, S.; Hirata, T. *Flavour Frag. J.* **2004**, 19 (1), 62-68; c) Shunying, Z.; Yang, Y.; Huaidong, Y.; Yue, Y.; Guolin, Z. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 96, 151-158; d) Su, Y.C.; Ho, C.L.; Wang, I.C.; Chang, S.T. *Taiwan J. For Sci.* **2006**, 21 (1), 49-61; e) Fontenelle, R.O.S.; Morais, S.M.; Brito, E.H.S.; Kerntopf, M.R.; Brillhante, R.S.N.; Cordeiro, R.A.; Tome, A.R.; Queiroz, M.G.R.; Nascimento, N.R.F.; Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2007**, 59, 934-940; f) Hossain, M.A.; Ismail, Z.; Rahman, A.; Kang, S.C. *Industrial Crops And Products* **2008**, 2(7), 328-334.

¹²⁹ Cristiani, M.; D'arrigo, M. *Journal of agriculture and food chemistry* **2007**, 55-63.

¹³⁰ Helander, I.M.; Alakone, H.L. *Journal of agriculture and food chemistry* **1998**, 3590-3595.

¹³¹ a) De Billerbeck, V.G.; Roques, C.; Vanière, P.; Marquier, P. *Revue hygiène* **2002**, 10 (3) : 248-251; b) Yang, E.J.; Kim, S.S.; Oh, T.H.; Baik, J.S.; Lee, N.H.; Hyun, C.G. *Int. J. Agric. Biol.* **2010**, 11: 791-794.

La CMB est la concentration minimale d'H.E nécessaire pour détruire l'inoculum initial après incubation en conditions standards et dans ce cas les microorganismes ne sont plus viables²⁶.

Les dilutions utilisées pour évaluer la CMI et CMB sont présentées dans le tableau I'-5.

Tableau I'-5 : Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer la CMI et la CMB

Rapport de dilution (H.E/BN)	1/2	1/4	1/8	1 /16	1/32	1 /64
Pourcentage (%)	50	25	12,5	6,25	3,12	1,5
µL H.E / mL	500	250	125	62,5	31,2	15,62

Rapport de dilution (H.E/BN)	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Pourcentage (%)	0,78	0,39	0,19	0,097	0,04	0,02
µL H.E / mL	7,81	3,90	1,95	0,97	0,4	0,2

H.E : Huile essentielle, BN : Bouillon Nutritif

Les courbes de la cinétique de croissance des différentes souches bactériennes (*Escherichia coli* ; *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de coriandre, de fenouil et de persil sont données sur les *planches II, III et IV*.

Pour l'espèce *E. coli*, la croissance cellulaire débute par une DO initiale de 0,2 pour l'ensemble des tests et s'arrête après 24 heures de culture. L'absence de l'H.E des graines de coriandre permet l'obtention d'une DO finale de l'ordre de 0,4 alors que l'ajout des différentes doses d'H.E provoque une diminution remarquable de la croissance cellulaire et même une lyse cellulaire pour les faibles doses.

Par contre, elle est sans effet en ce qui concerne les espèces *P. aeruginosa* et *S. aureus*, puisque la croissance cellulaire de ces souches est variable d'une dose à une autre.

La croissance cellulaire d'*E. coli*, de *P. aeruginosa* et de *S. aureus* est inversement proportionnelle à la dose de l'H.E des graines de fenouil ajoutée (pour les fortes doses allant de 1,56 à 50%). Plus on augmente la dose plus la croissance de ces espèces diminue. Or pour les faibles doses (allant de 0,02 à 0,78%) l'effet inverse est remarqué.

Quant à l'H.E de persil, Il semble qu'elle manifeste un effet plutôt stimulateur vis-à-vis de la croissance des souches testées selon la dose ajoutée comparée au témoin.

Planche II

Figure I'-11 : Cinétique de croissance d'*Escherichia coli* (ATCC 25922) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de coriandre

Figure I'-12 : Cinétique de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de coriandre

Figure I'-13 : Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de coriandre

Planche III

Figure I'-14 : Cinétique de croissance d'*Escherichia coli* (ATCC 25922) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de fenouil

Figure I'-15 : Cinétique de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de fenouil

Figure I'-16 : Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de fenouil

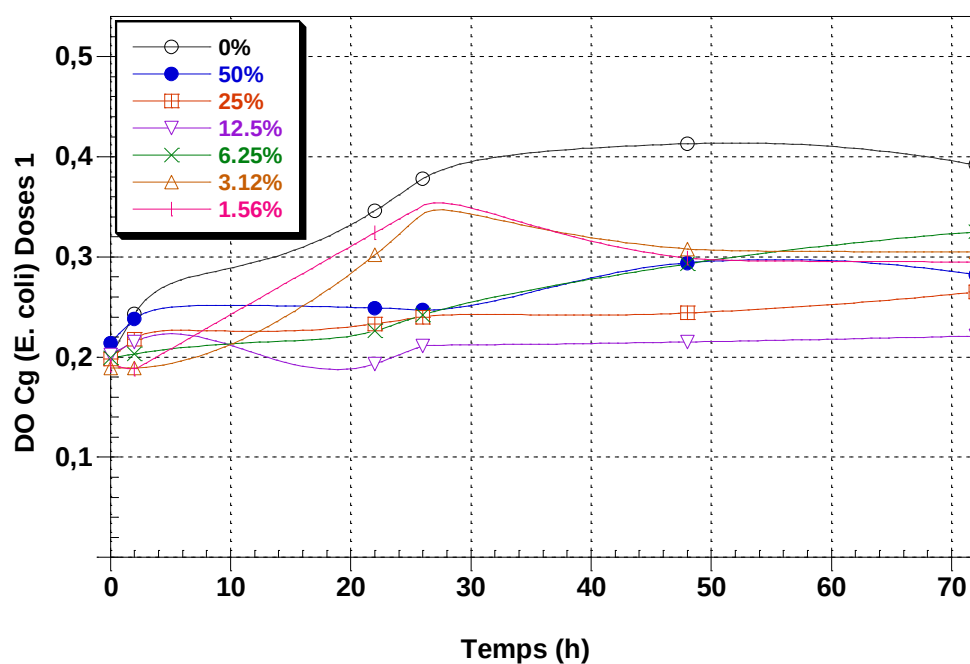
Planche IV

Figure I'-17 : Cinétique de la croissance d'*Escherichia coli* (ATCC 25922) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de persil

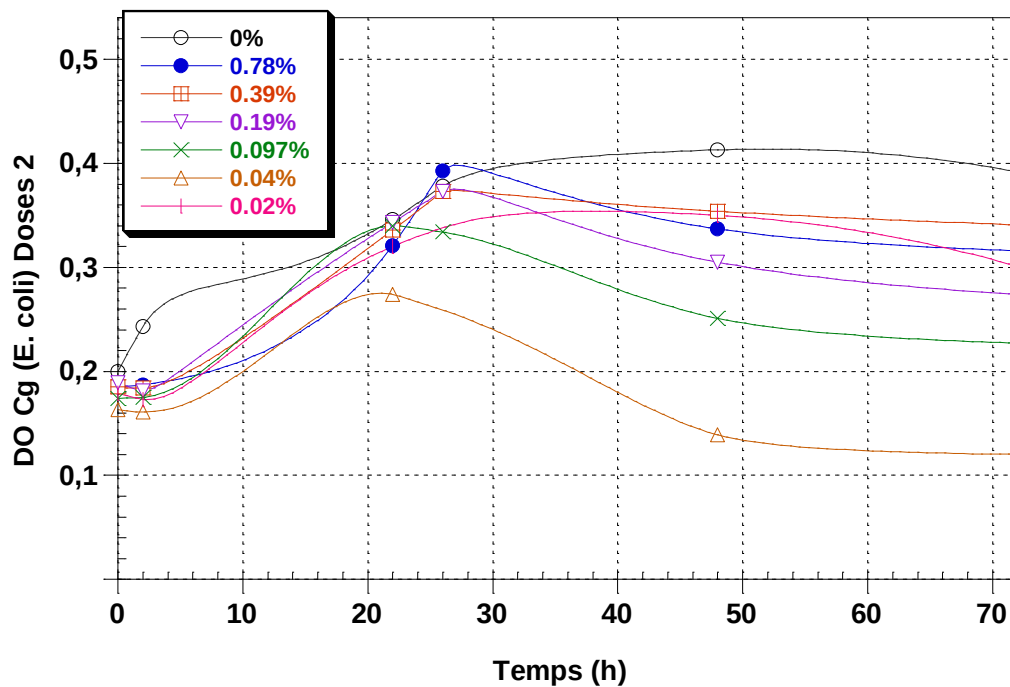
Figure I'-18 : Cinétique de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de persil

Figure I'-19 : Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de persil

Planche II

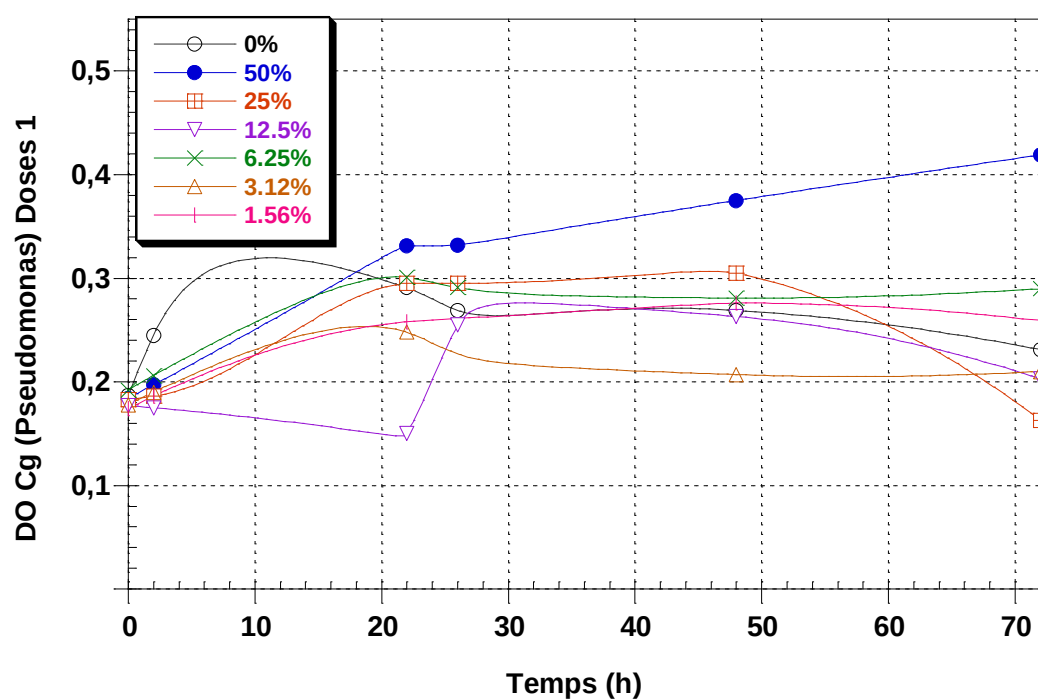


(A)

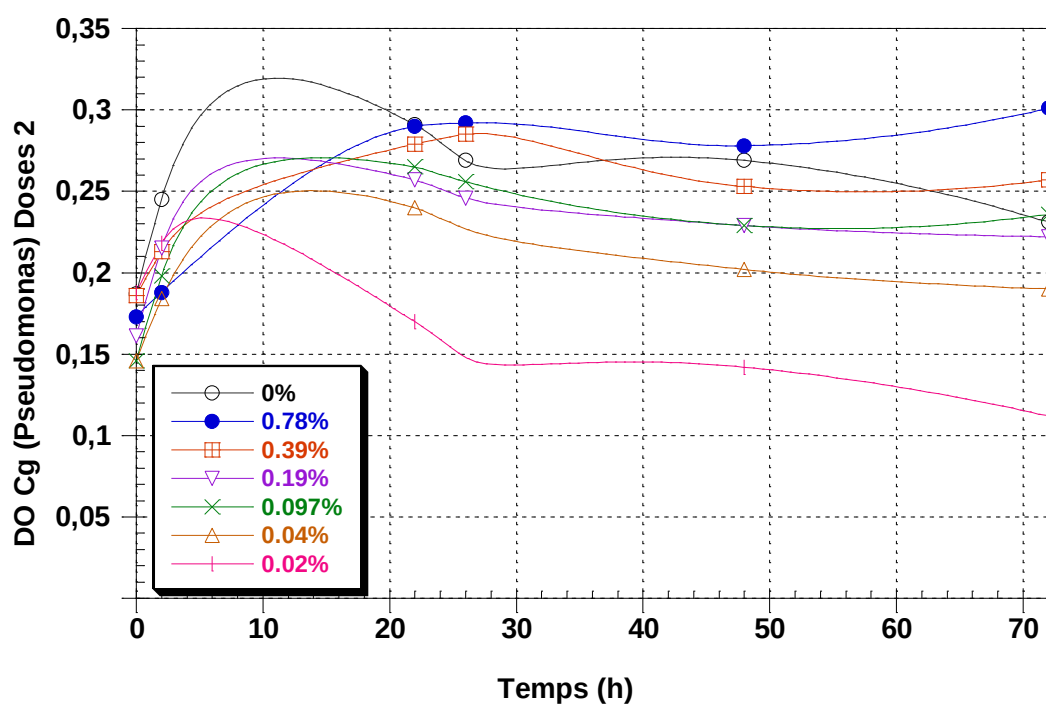


(B)

Fig. I'-11 : Cinétique de croissance d'*E. coli* (ATCC 25922) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de coriandre (**A** : Doses de 50% à 1,56%, **B** : Doses de 0,78% à 0,02%)

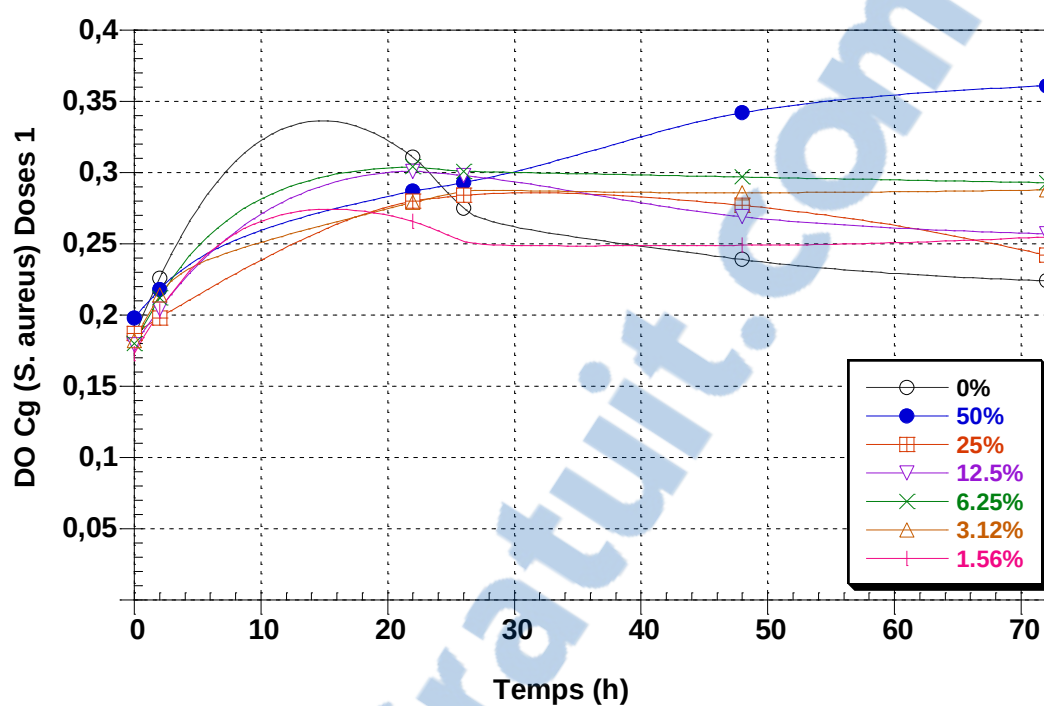


(A)

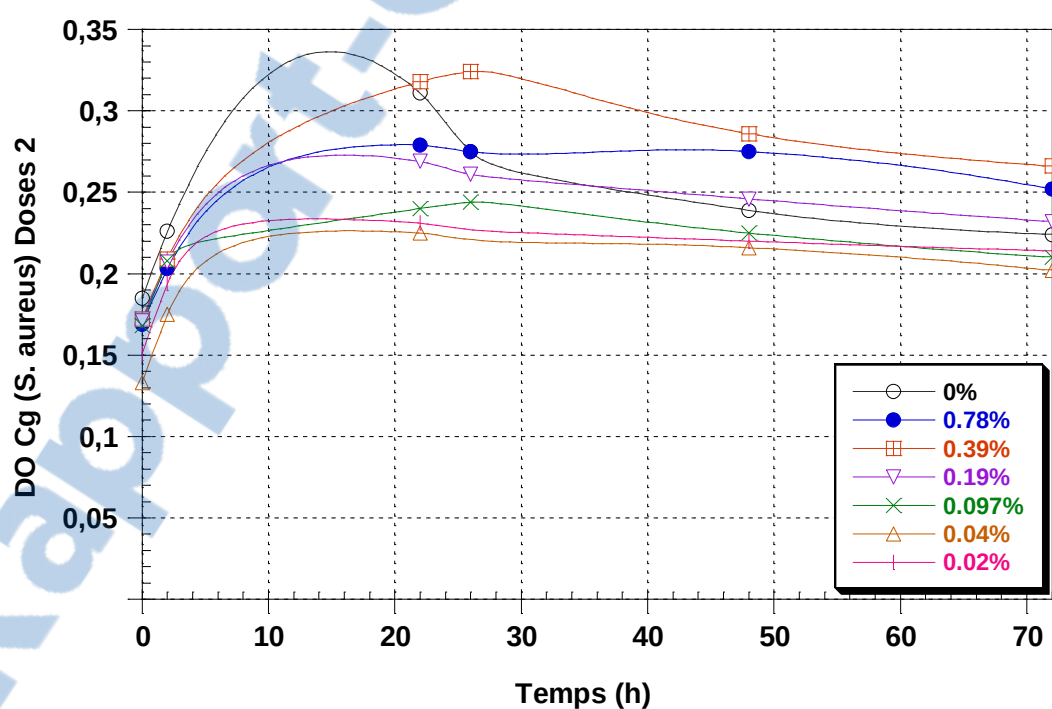


(B)

Fig. I'-12 : Cinétique de croissance de *P. aeruginosa* (ATCC 25853) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de coriandre (**A** : Doses de 50% à 1,56%, **B** : Doses de 0,78% à 0,02%)



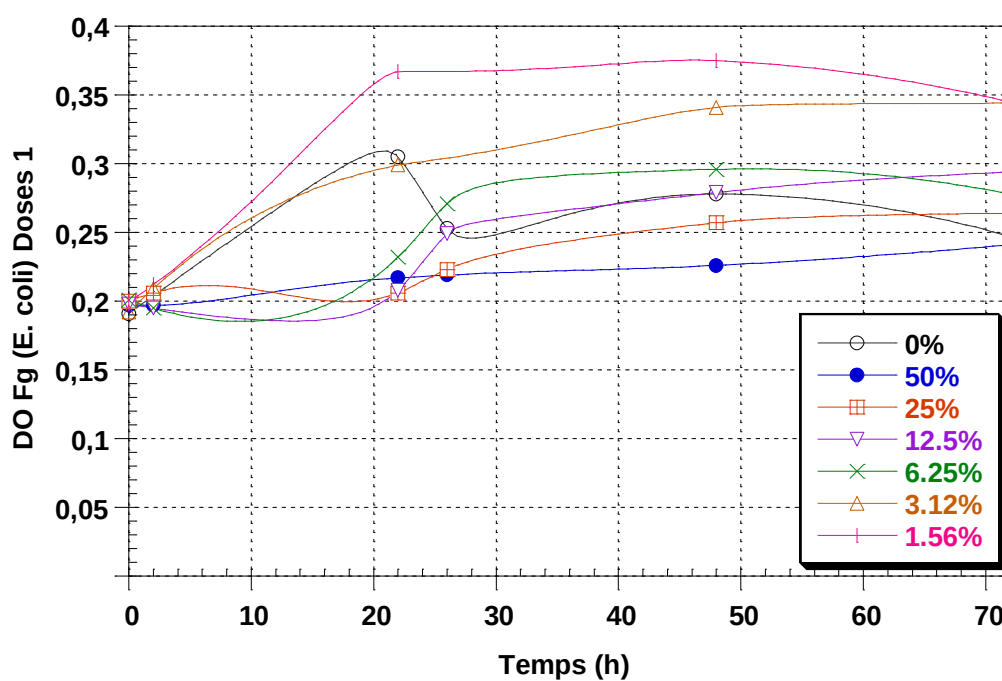
(A)



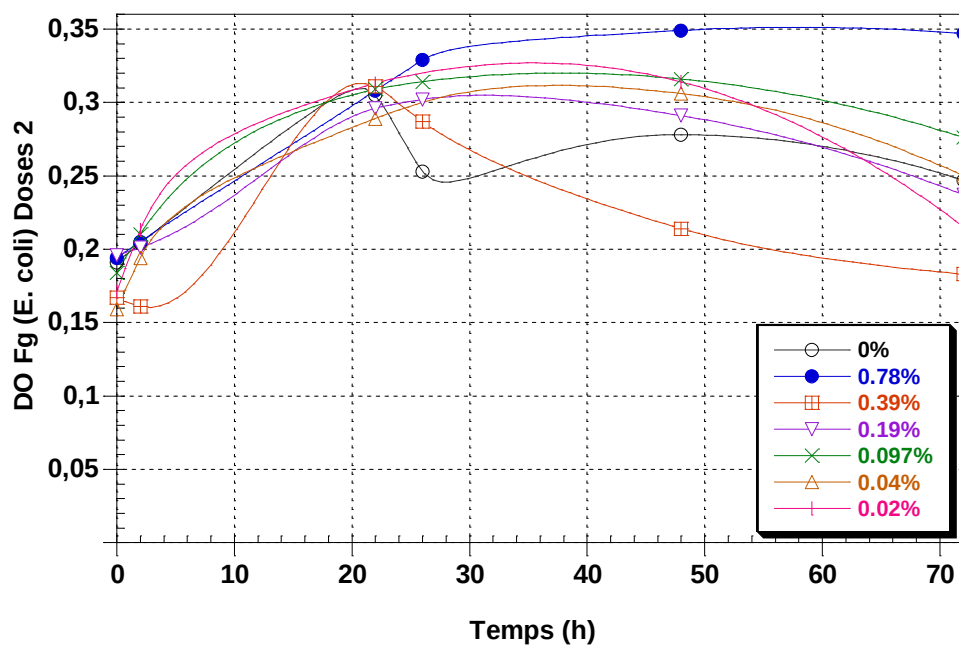
(B)

Fig. I'-13 : Cinétique de croissance de *S. aureus* (ATCC 25923) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de coriandre (**A** : Doses de 50% à 1,56%, **B** : Doses de 0,78% à 0,02%)

Planche III

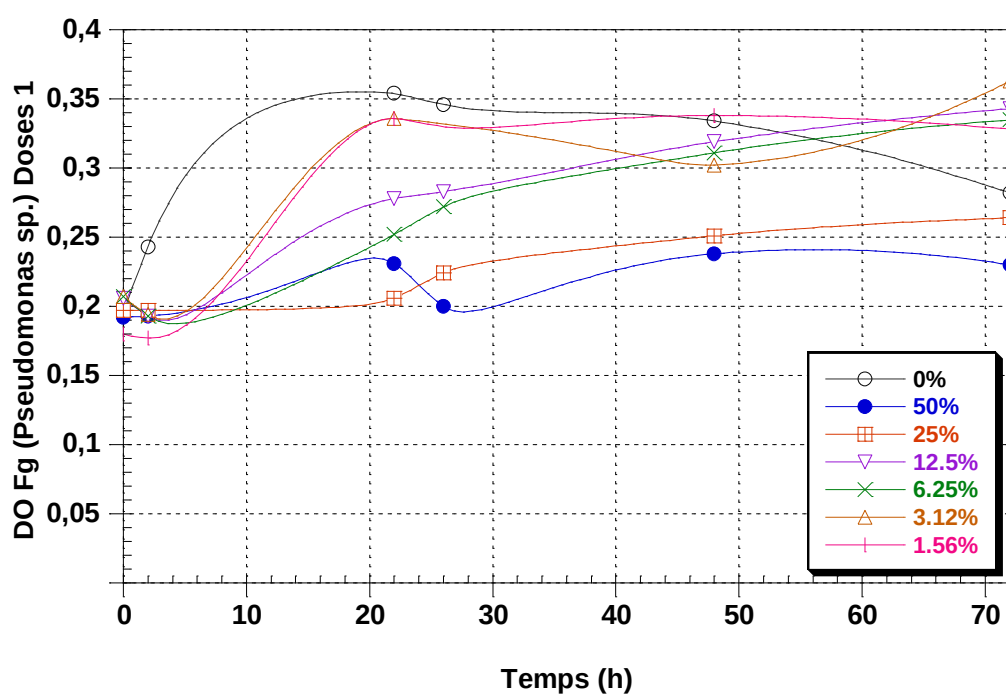


(A)

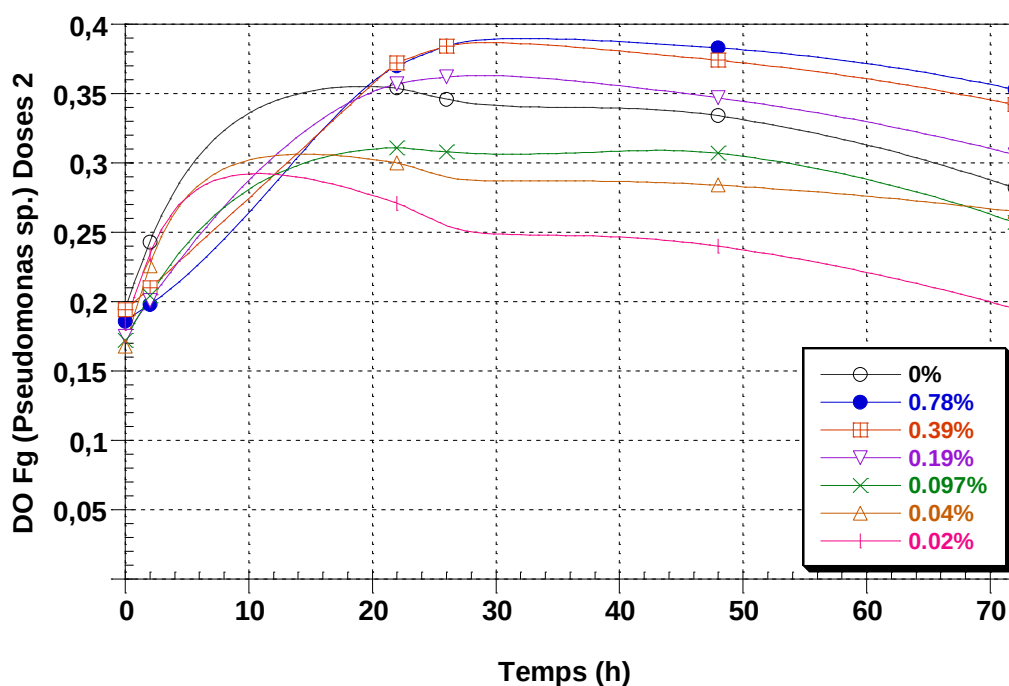


(B)

Fig. I'-14 : Cinétique de croissance d'*E. coli* (ATCC 25922) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de fenouil (**A** : Doses de 50% à 1,56%, **B** : Doses de 0,78% à 0,02%)

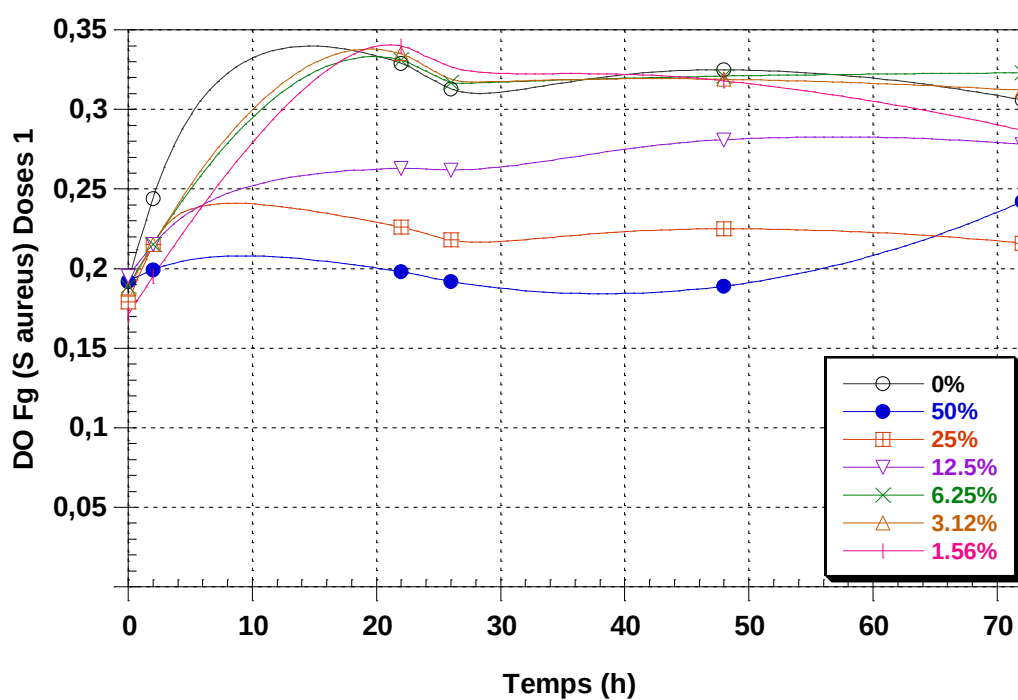


(A)

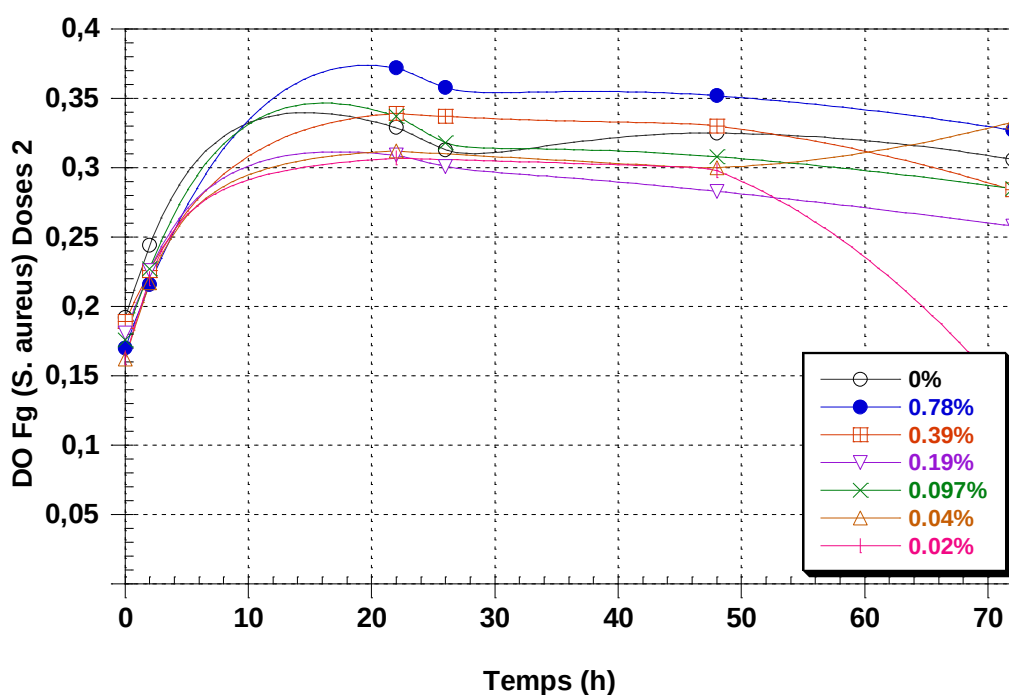


(B)

Fig. I'-15 : Cinétique de croissance de *P. aeruginosa* (ATCC 25853) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de fenouil (**A** : Doses de 50% à 1,56%, **B** : Doses de 0,78% à 0,02%)



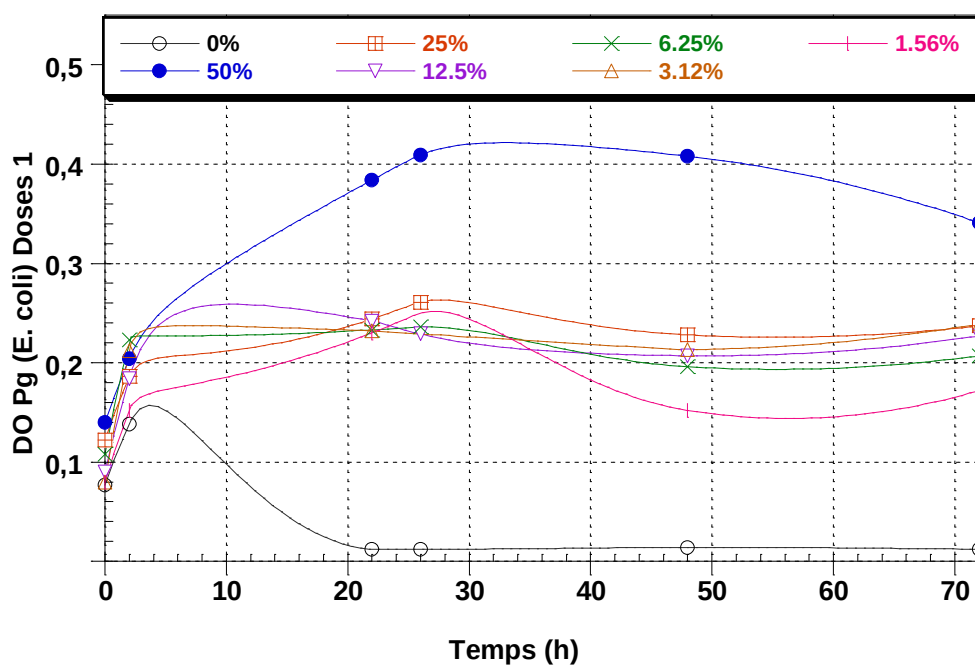
(A)



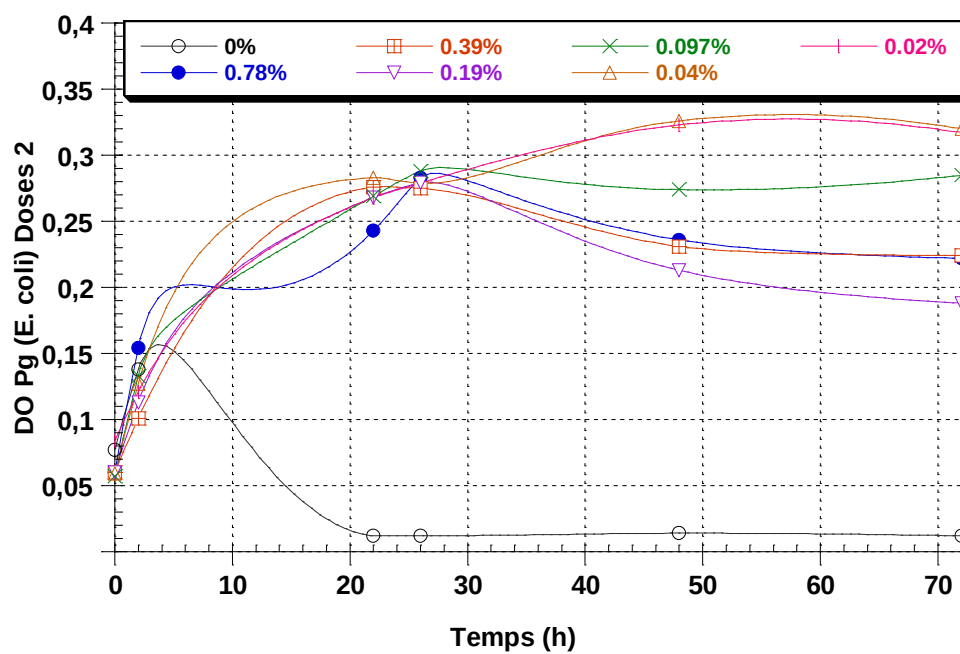
(B)

Fig. I'-16 : Cinétique de croissance de *S. aureus* (ATCC 25923) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de fenouil (**A** : Doses de 50% à 1,56%, **B** : Doses de 0,78% à 0,2%)

Planche IV

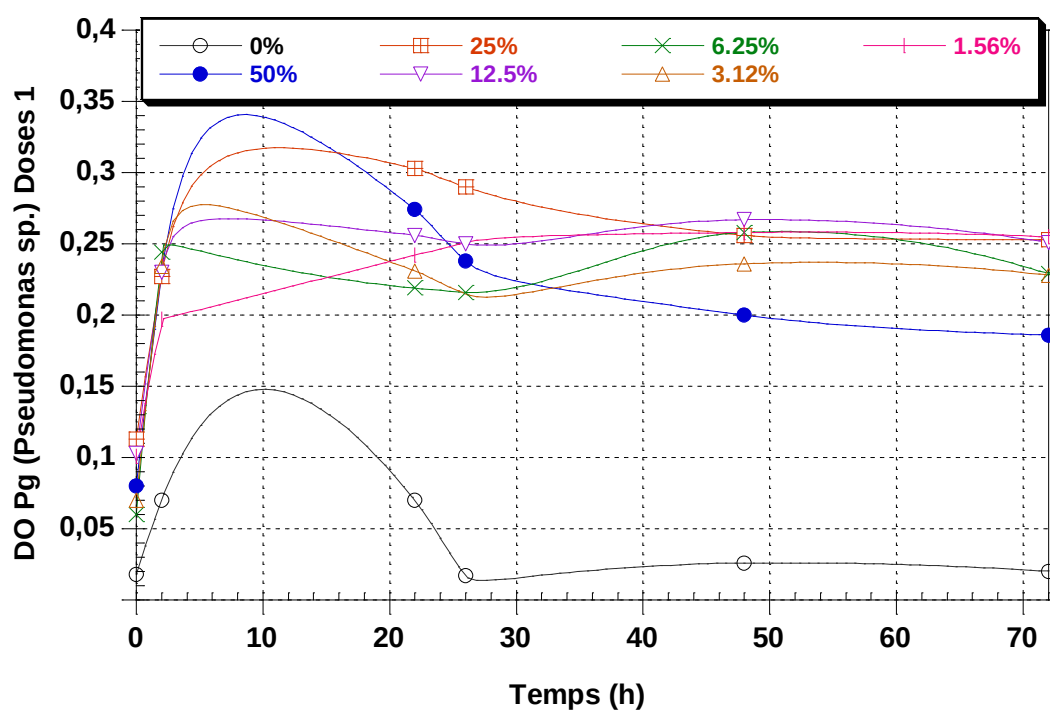


(A)

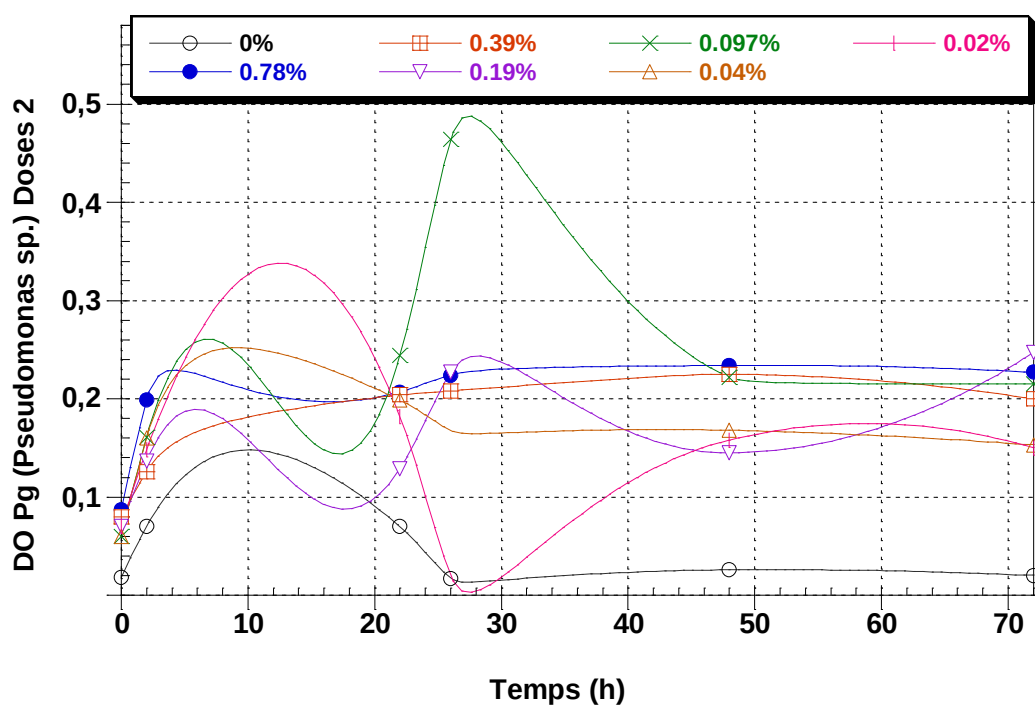


(B)

Fig. I'-17 : Cinétique de croissance d'*E. coli* (ATCC 25922) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de persil (**A** : Doses de 50% à 1,56%, **B** : Doses de 0,78% à 0,02%)

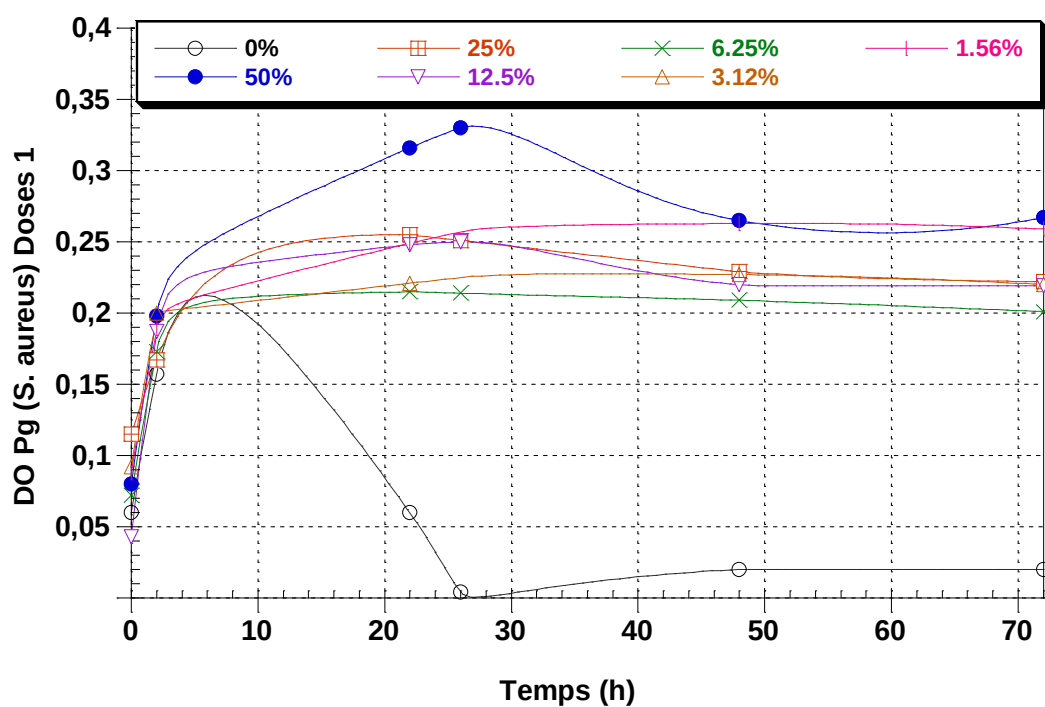


(A)

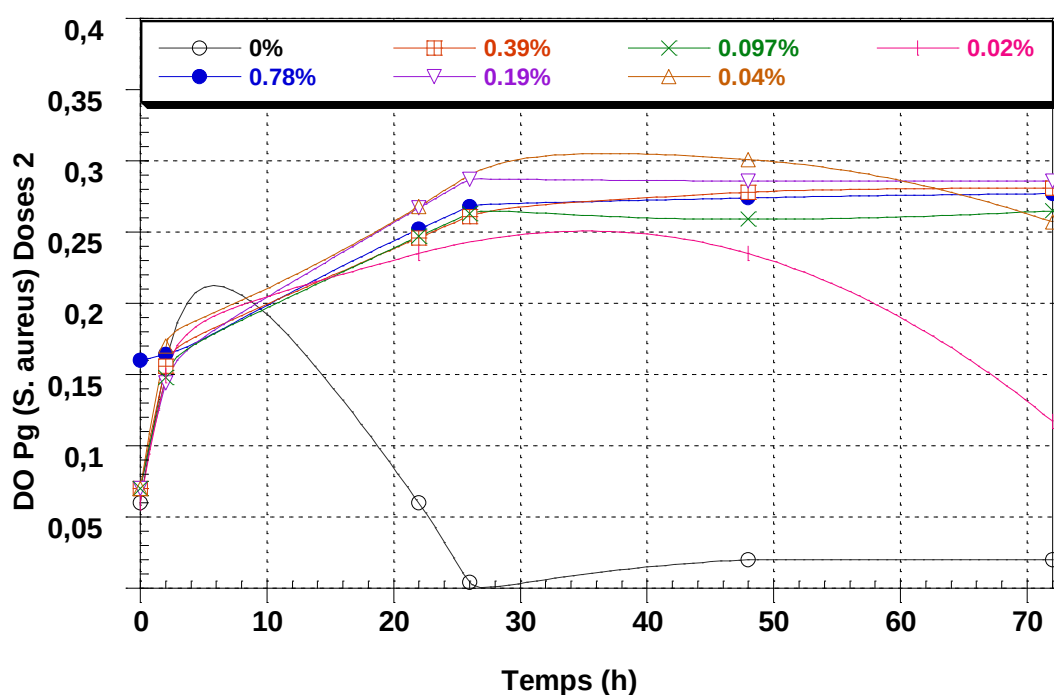


(B)

Fig. I'-18 : Cinétique de croissance de *P. aeruginosa* (ATCC 25853) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de persil (**A** : Doses de 50% à 1,56%, **B** : Doses de 0,78% à 0,02%)



(A)



(B)

Fig. I'-19 : Cinétique de croissance de *S. aureus* (ATCC 25923) en présence de différentes doses de l'H.E des graines de persil (**A** : Doses de 50% à 1,56%, **B** : Doses de 0,78% à 0,02%)

Les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) des différentes H.Es testées sont regroupées dans le tableau I'-6.

Tableau I'-6 : Valeurs de la CMI et CMB (exprimées en μL / mL) pour les différentes H.Es testées

Bactéries	H.E de Coriandre		H.E de Fenouil		H.E de Persil
	CMI	CMB	CMI	CMB	Effet
<i>E. coli</i>	62,5	125	250	-	Stimulateur de croissance
<i>P. aeruginosa</i>	31,2	125	62,5	-	
<i>S. aureus</i>	31,2	-	125	-	

Concernant l'H.E des graines de coriandre, la plus faible CMI est obtenue pour *S. aureus* ATCC 25923 et *P. aeruginosa* ATCC 25853 (31,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Dans la méthode de diffusion des disques et contrairement aux résultats de la micro-dilution, *E. coli* a montré une grande sensibilité vis-à-vis de l'H.E des graines de coriandre ce qui affirme que la méthode employée peut être un facteur influant sur les résultats de l'activité antibactérienne.

Les résultats obtenus de la micro-dilution permettent de confirmer que l'H.E des graines de fenouil possède la CMI la plus faible pour *P. aeruginosa* ATCC 25853 (62,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Les valeurs de la CMI montrent que l'H.E des graines de fenouil exerce en milieu liquide une faible activité antibactérienne. Les différentes valeurs de la CMI obtenues nous permettent de constater que l'activité antibactérienne dépend du type de microorganismes.

D'après nos résultats, et selon la classification de Canillac¹³², le rapport CMB/CMI est de 2 (inférieur à 4) ce qui confère à l'H.E des graines de la coriandre un pouvoir bactéricide vis-à-vis de *P. aeruginosa* et *E. coli*.

En ce qui concerne l'H.E des graines de persil, elle a montré un effet stimulateur de croissance pour les trois souches étudiées où les densités optiques obtenues étaient nettement supérieures à celles du témoin. Contrairement aux résultats obtenus par la méthode de diffusion des disques où cette H.E a exercé une activité antibactérienne non négligeable vis-à-vis des trois souches.

4.4. Evaluation de l'activité antifongique

4.4.1. Méthode des disques

La méthode de diffusion des disques nous a permis aussi de déterminer le pouvoir antifongique des quatre huiles essentielles vis-à-vis d'*Aspergillus fumigatus*, de *Fusarium sp.* et de *Penicillium notatum*.

L'activité antifongique est révélée par la présence ou l'absence d'un halo translucide autour du disque (*Planche V*).

¹³²Mourey, A.; Canillac, N. *Food Control* **2002**, 13:289-292.

Planche V

Figure I'-20 : Effet de l'huile essentielle des :

- A :** Feuilles du persil sur *Fusarium sp.*
- B :** Graines de persil sur *Fusarium sp.*
- C :** Graines de coriandre sur *Fusarium sp.*

Figure I'-21 : Effet de l'huile essentielle des :

- A :** Graines de coriandre sur *Aspergillus fumigatus*
- B :** Graines de persil sur *Penicillium notatum*
- C :** Graines de fenouil sur *Penicillium notatum*

Planche V

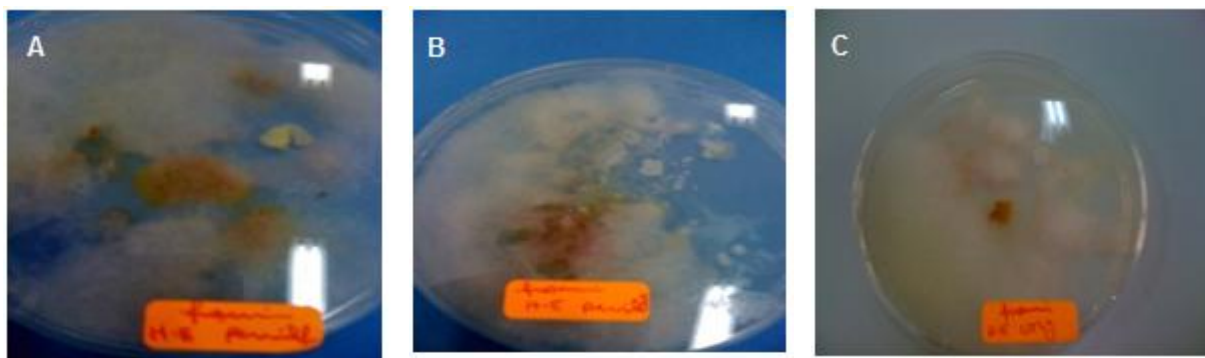


Fig. I'-20 : Effet de l'H.E (**A** : des feuilles de persil; **B** : des graines de persil; **C** : des graines de coriandre) sur *Fusarium* sp.



Fig. I'-21 : Effet de l'H.E (**A** : des graines de coriandre sur *A. fumigatus*; **B** : des graines de persil sur *P. notatum*; **C** : des graines de fenouil sur *P. notatum*)

Le tableau I'-7 rassemble les diamètres d'inhibition de la croissance mycélienne des H.Es étudiées vis-à-vis d'*Aspergillus fumigatus*, *Fusarium sp.* et *Penicillium notatum*.

Tableau I'-7 : Diamètres d'inhibition (exprimés en mm) de la croissance mycélienne des H.Es étudiées vis-à-vis des trois souches fongiques

Champignons	H.E de coriandre (graines)	H.E de fenouil (graines)	H.E de persil (graines)	H.E de persil (feuilles)
<i>A. fumigatus</i>	31,6	25,9	0	14,4
<i>Fusarium sp.</i>	11,5	25,9	19,8	13,5
<i>P. notatum</i>	11,0	21,7	31,6	12

Les résultats relatifs à la mesure des diamètres d'inhibition de la croissance mycélienne prouvent que les H.Es testées sont dotées d'un grand pouvoir antifongique.

En effet, *Aspergillus fumigatus* est extrêmement sensible aux H.Es des graines de coriandre et de fenouil, et présente également une sensibilité non négligeable vis-à-vis de l'H.E de persil (feuilles).

Les essences extraites à partir des graines de fenouil et de persil ont provoqué une importante inhibition de la croissance mycélienne des moisissures du genre : *Penicillium* et *Fusarium*.

Par conséquent, toutes les H.Es ont été clairement efficaces contre les trois souches fongiques à l'exception de l'essence des graines de persil qui n'avait aucun effet à l'égard d'*Aspergillus*.

4.4.2. Sensibilité des souches fongiques aux composés volatils des H.Es

L'activité antifongique des composés volatils des H.Es a été déterminée par la méthode de la boîte de Pétri inversée (*Planche VI*).

Après plusieurs essais, la phase volatile des H.Es des graines de fenouil et de persil a montré un taux d'inhibition de la croissance mycélienne d'*Aspergillus fumigatus* de 72,66 % et 63,33%, respectivement.

Aussi, les vapeurs des H.Es des graines de coriandre et de persil ont inhibé la croissance mycélienne de *Fusarium sp.* avec un taux de 93% et 66,66% respectivement.

Planche VI

Figure I'-22 : Effet des H.Es sur *Aspergillus fumigatus*

T : Témoin

A : Graines de fenouil

B : Graines de persil

Figure I'-23 : Effet des H.Es sur *Fusarium sp.*

T : Témoin

A : Graines de coriandre

B : Graines de persil

Planche VI

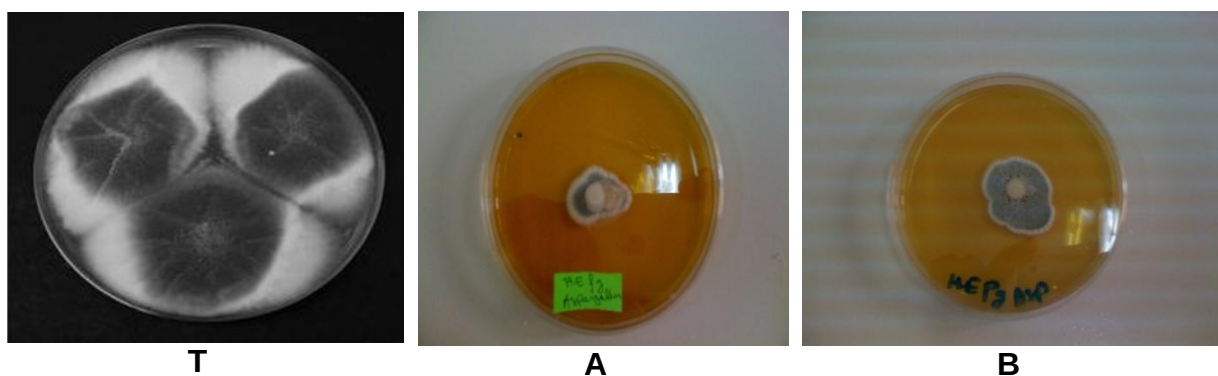


Fig. I'-22 : Effet des H.Es sur *A. fumigatus* (**T** : Témoin, **A** : graines de fenouil, **B** : graines de persil)

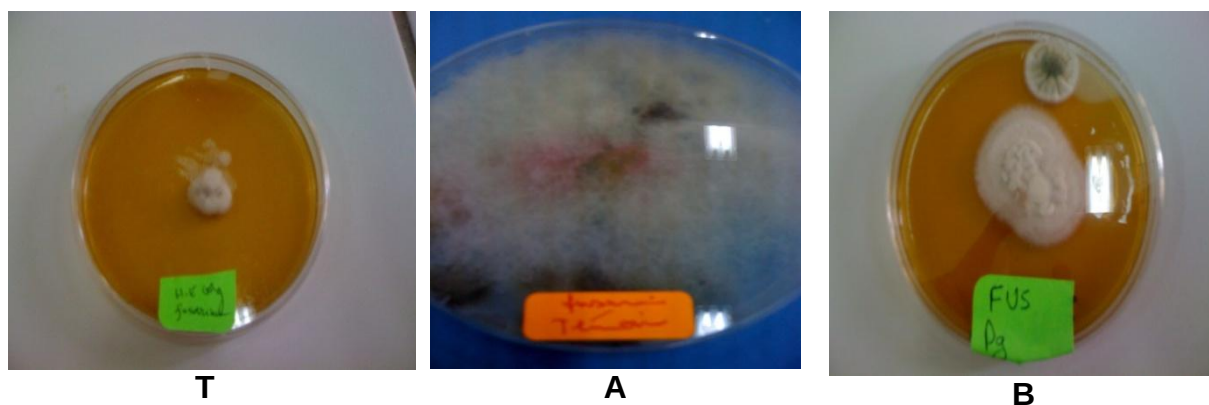


Fig. I'-23 : Effet des H.Es sur *Fusarium sp.* (**T** : Témoin, **A** : graines de coriandre, **B** : graines de persil)



Malgré l'existence de nombreux rapports sur l'activité antifongique des H.Es par la méthode de contact direct, les informations sur l'activité antifongique de la phase volatile des H.Es sont rares. Les composés volatils de l'H.E des graines de coriandre, de fenouil et de persil se sont avérés doués d'activité antifongique.

Dans la présente étude, la vapeur de l'H.E de ces graines a montré une activité inhibitrice qui n'est pas négligeable à une dose de 5 µL/boîte.

Kaya et *al.* ont trouvé que l'H.E des graines de fenouil est efficace par la méthode des boîtes inversées que par la méthode de contact direct. Ils sont plus absorbables par les mycéliums fongiques que par l'agar de nature hydrophile¹³³. La même méthode a été utilisée par Catalan et *al.*¹²⁴ Dans ce cas l'H.E des graines de fenouil montre un taux d'inhibition de 100% vis-à-vis d'*A. niger* et *A. flavus* à une dose de 6 µL/disque. Cette méthode s'est avérée fortement efficace même à 4 µL pour *A. niger*.

En se basant sur les résultats des micro-aromatogrammes, l'activité antifongique des H.Es des graines de coriandre, de fenouil et de persil pourrait être due à l'effet combiné de la vapeur de l'H.E et du contact direct.

A la lumière des résultats de l'activité antifongique des H.Es des graines étudiées, il est clair que les souches étudiées n'ont pas les mêmes valeurs que l'IA (index antifongique des composés volatils de l'H.E). Ceci serait dû à la composition chimique des essences et à la nature de la paroi des souches fongiques qui se compose d'un réseau complexe de protéines et de polycarbohydres et qui varie en composition selon les espèces fongiques. La perturbation de cette matrice peut avoir comme conséquence une paroi défectueuse, qui devient sensible à la lyse osmotique et aux agents antifongiques¹³⁴.

En plus des produits dominants, les constituants mineurs des H.Es ont pu également être impliqués dans l'activité antifongique¹³⁵. La nature et la proportion des différents constituants de l'H.E et de leurs effets synergiques ont une forte influence sur l'activité antifongique des H.Es. L'activité inhibitrice peut être due aux différents modes d'action de tous les composants de l'H.E sur les moisissures¹³⁶.

La couleur caractéristique de beaucoup de moisissures, d'après Wiley¹³⁷, résulte de la pigmentation des conidiums. En conséquence, le changement de la couleur d'*A. fumigatus*, et du *Fusarium sp.* pourrait s'expliquer probablement par l'effet de l'H.E sur les conidiums.

¹³³Yigitba, H., Tok, F.M., Soyulu, S., Kurt, S., Baysal, Ö., Kaya, A.D. *Journal of Plant Diseases and Protection* **2005**, 112 (3): 229-239.

¹³⁴Yen, T.B.; Chang, S.T. *Bioresource Technology* **2008**, 99: 232-236.

¹³⁵a) Jantan, I.B.; Moharam, B.A.K.; Santhanam, J.; Jamal, J.A. *Pharmaceutical Biology* **2008**, 46 (6): 406-412; b) Bajpai, V.K.; Kang, S.C. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2010**, 87: 327-336; c) Sidhu, O.P.; Chandra, H.; Behl, H.M. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, 47: 774-777.

¹³⁶Pattnaik, S.; Subramanyan, V.R.; Bapaji, M.; Kole, C.R. *Microbios* **1997**, 89: 39-46.

¹³⁷Wiley, J. «*Essential microbiology*», Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England **2005**, 481.

5. Conclusion

Les essences de coriandre et de fenouil ont exercé un important effet antimicrobien à l'égard de *P. aeruginosa*. Quant à l'H.E des graines de persil, cette huile a révélé une intéressante activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus*. Concernant *E. coli*, cette bactérie a marqué une certaine sensibilité à toutes les huiles étudiées.

Par la méthode de la micro-dilution et les valeurs de la CMI et CMB nous avons pu confirmer que l'H.E des graines de coriandre a certainement un effet bactéricide vis-à-vis de *P. aeruginosa* et d'*E. coli*, notant aussi l'effet bactériostatique de l'essence des graines de fenouil vis-à-vis des trois souches bactériennes de notre étude.

Les résultats de l'antifongigramme et des micro-atmosphères ont montré que les H.Es des graines de coriandre, de fenouil et de persil ont été clairement efficaces à l'égard d'*A. fumigatus*, *Fusarium sp.* et *P. notatum*.

Chapitre 2'

Effet des huiles essentielles sur les bactéries lactiques

1. Introduction

Grâce à leurs métabolismes et leurs sécrétions, certains microorganismes sont devenus très utiles dans divers domaines et surtout dans le volet de la fermentation, plus précisément le groupe des bactéries lactiques qui constituent un sujet d'étude très vaste.

Les H.Es de fenouil et de persil ayant manifesté un effet inhibiteur vis-à-vis des germes pathogènes et des moisissures (cf.chap.1'), nous avons voulu dans cette partie d'étude vérifier l'action de ces huiles sur les germes utiles pour le corps humain et utilisés dans la formulation de divers produits alimentaires tels que les bactéries lactiques.

L'objectif de ce chapitre est la détermination de l'effet des H.Es des graines de persil (*Petroselinum crispum*) et de fenouil (*Foeniculum vulgare*) sur la cinétique de production d'acide lactique par *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus rhamnosus*. Aussi, une autre étude est menée pour exploiter ces H.Es dans l'amélioration de certaines qualités du yaourt étuvé.

2. Bactéries lactiques

Il est important de noter que le terme bactérie lactique n'a pas un statut dans la taxonomie, mais c'est en général une meilleure expression pour décrire l'ensemble des bactéries qui se ressemblent phylogénétiquement¹³⁸. Vers la fin du XIX^{ème} siècle, certains chercheurs ont démontré qu'il était possible de fabriquer des produits de qualité constante en utilisant des cultures pures de microorganismes. Actuellement, on définit les levains ou ferments lactiques comme étant des cultures pures ou des mélanges de bactéries lactiques sélectionnées et utilisées pour la fabrication de produits fermentés.

Au cours de la fermentation, les bactéries se multiplient et produisent des composés conférant à l'aliment ses propriétés organoleptiques comme *l'acidité*, *la saveur*, *l'arôme* et *la texture*. En effet, les bactéries lactiques inhibent la prolifération des microorganismes par la production de composés inhibiteurs tels les bactériocines et abaissent le pH par la production d'acide lactique.

Ces espèces bactériennes ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles¹³⁹.

¹³⁸Hutkins, Robert, W. « *Microbiology and Technology of Fermented Food* », Blackwell Publishing 2006, 45-47.

¹³⁹a) Kalidas, S. « *Food biotechnology* », 2^{ème} édition, CRC, 2006, 1360; b) Dellaglio, F.; De Roissart, H.; Torriani, S.; Curk, M.C.; Janssens, D. « *Caractéristiques générales des bactéries lactiques* » dans De Roissart, H.; Luquet, F. « *Bactéries Lactiques* », Ed. Loriga Uriage, 1994, 1:25-116.

Elles ont été isolées sur de nombreux milieux naturels végétaux (plantes et fruits), animaux et humains à savoir cavités buccale, vaginale et lait¹⁴⁰. Selon les espèces, on peut tenter les généralisations suivantes :

- **Les espèces du genre *Streptococcus*** : Ces espèces se rencontrent surtout chez les hommes, les animaux et les oiseaux. Elles sont pour la plupart saprophytes mais certaines ont un caractère pathogène.
- **Les espèces du genre *Lactobacillus*** : Ces espèces se rencontrent plus couramment dans la nature où elles sont associées aux plantes, aux animaux et aux hommes. Peu d'espèces ont un caractère pathogène.
- **Les espèces du genre *Bifidobacterium*** : Ces espèces sont découvertes dans les selles d'enfants, de nouveau-nés. Elles peuvent être isolées de l'intestin, du vagin ou de la bouche des adultes. Elles se trouvent également dans les tractus intestinaux de nombreuses espèces animales¹⁴¹.

En général les bactéries lactiques se trouvent associées à d'autres microorganismes dans de nombreux produits de fermentation naturelle d'origine animale et végétale : laits fermentés (fromage, beurre), viandes fermentées (saucisson, jambon), boissons alcoolisées (vin, cidres, bière), légumes et fruits fermentés (olives, cornichons, concombres), céréales fermentés (différentes variétés de pain), fourrages fermentés (ensilage).

2.1. Déroulement de la croissance des bactéries lactiques

La croissance résulte de la division des bactéries par scissiparité en présence d'un milieu et d'un environnement favorables. La bactérie atteint un volume critique, puis elle se divise en deux cellules filles¹⁴². Elle est influencée par plusieurs facteurs comme : La température, le pH, l'oxygène, le milieu de culture et les exigences nutritionnelles¹⁴³.

2.1.1. Indicateurs de croissance

Les indicateurs de croissance englobent le temps de génération (Tg) qui correspond au temps nécessaire au déroulement d'une population et le (μ) qui représente le nombre des cellules produites par heure^{141b,142}.

¹⁴⁰ Leveau, J.Y.; Bouix, M. «La flore lactique» in «Techniques d'Analyses et de Contrôle dans les Industries Agroalimentaires», Tec et Doc. Lavoisier, France, **1991**, Vol 3,152-186.

¹⁴¹ a) Guiraud, P.J. « Identification des bactéries lactiques » in «Microbiologies alimentaire», Ed. Dunod, Paris **2003**;
b) Larpent, J.P. «Les probiotiques en alimentation humaine», Tec et Doc Lavoisier **1994**.

¹⁴² Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. «Introduction à la microbiologie», Erpi :édition Renouveau pédagogique Inc., Montréal **2003**.

¹⁴³ a) Hernnier, J. ; Lenoir, J. ; Weber, F. « Métabolisme des bactéries lactiques ».**1992**, Ed. Cepil, Paris. b) Drouault, S. ; Corthier, G. « Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé », **2001**, INRA, EDP Sciences, 102-104.

2.1.2. Phases de la cinétique de croissance¹⁴⁴

En présence d'une culture discontinue dont le milieu n'est pas renouvelé, on peut distinguer six phases de croissance :

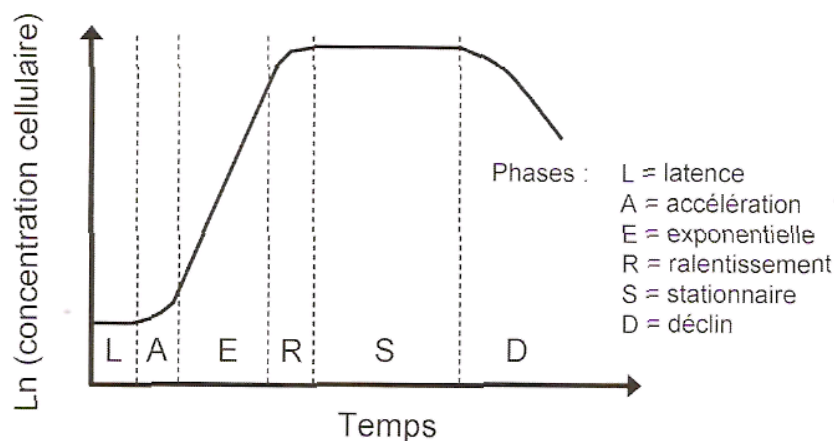


Figure II'-1 : Représentation schématique des principales phases de croissance d'une culture bactérienne discontinue¹⁴⁵

***Phase de latence ($\mu = 0$)** : C'est la période d'adaptation au milieu de culture. Généralement les cellules ne se divisent pas ou très peu juste après leur introduction dans un nouveau milieu. Sa durée est en corrélation avec l'état physiologique de la bactérie, ses exigences nutritionnelles, les conditions de culture et le taux d'inoculum.

***Phase d'accélération (μ croît)** : C'est là où la croissance débute ; les cellules commencent à se diviser, le matériel génétique et enzymatique se dédouble.

***Phase de croissance exponentielle (μ max)** : Durant cette période, la reproduction cellulaire est plus intense tandis que pour l'activité métabolique, le taux de croissance atteint est constant.

***Phase de ralentissement (μ diminue)** : La plupart des cellules vont chuter du fait de l'épuisement d'un ou de plusieurs substrats, ou bien de l'accumulation de produits toxiques tels que l'acide lactique.

***Phase stationnaire ($\mu = 0$)** : Arrivant à cette phase d'équilibre, toutes les cellules sont divisées, donc c'est l'arrêt de la croissance, le nombre de cellules mortes est égal au nombre des nouvelles cellules.

***Phase de déclin (μ négatif)** : C'est la mort cellulaire; l'épuisement du milieu de culture et les produits toxiques libérés deviennent néfastes.

¹⁴⁴Cogan, T.M. *Irich Journal of Food Science and Technology*, **1978**, 2: 105-115.

¹⁴⁵Corrieu, G.; Luquet, F.M. «bactéries lactiques : de la génétique aux ferments», Ed. Lavoisier, Techniques et Documentation, Paris **2008**.

2.2. Utilisation des bactéries lactiques dans l'industrie

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans les procédés industriels de fabrication agro-alimentaire; l'exemple le plus connu est la fabrication du YAOURT par *St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus*. Elles ont plusieurs rôles dans la production et la conservation des produits fermentés. Tout d'abord, elles vont permettre de changer la *saveur* de l'aliment, sa *texture* et sa *couleur*¹⁴⁶. Ces changements sont dus notamment à l'acide lactique produit au cours de la croissance. D'autre part, elles produisent des peptides et des molécules comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde, le diacétyle ou l'éthanol qui sont importants pour la flaveur des aliments¹⁴⁷.

Les bactéries lactiques jouent un autre rôle positif sur les qualités hygiéniques des aliments par inhibition du développement de la flore bactérienne indésirable qu'elle soit pathogène ou d'altération.

2.3. Effets des bactéries lactiques sur la santé

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé en 1907, par le russe Metchnikoff. Selon lui, les lactobacilles peuvent modifier la microflore intestinale et par suite réduire sa dégradation, et ainsi prolonger la vie.

Plus récemment, des études de type pharmaceutique ont été menées à grande échelle dans plusieurs laboratoires afin de démontrer l'effet bénéfique des bactéries lactiques sur la santé. Certains sont maintenant bien établis tels que l'amélioration de la digestion du lactose et le traitement des désordres diarrhéiques, d'autres restent encore controversés tels que la diminution du cholestérol sérique ou encore la réduction de la formation de tumeurs. Les bactéries lactiques pour lesquelles ces effets sont décrits sont appelées probiotiques¹⁴⁵.

3. Matériel et méthodes

3.1. Etude de l'activité des H.Es de fenouil et de persil sur la cinétique de croissance de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*

3.1.1. Souches lactiques utilisées

Les bactéries lactiques testées sont *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* qui ont été isolées à partir d'un ferment lactique (culture mixte des deux souches) utilisé dans la fabrication du yaourt et qui a été procuré par l'Orolait de Tizi (Mascara).

3.1.2. Préparation du ferment lactique

Les étapes suivantes ont été suivies :

- ❖ Mettre 134 g de lait écrémé en poudre dans un bécher contenant de l'eau distillée;
- ❖ Agiter à l'aide d'un agitateur et compléter le volume jusqu'à 1000 mL;
- ❖ Répartir dans des tubes bien fermés et mettre à l'autoclave à 121°C /10 min.

¹⁴⁶a) Montel, M. ; Rettz, J. ; Talon, R. ; Berdagné, J.L. ; Rosset, A. *Food Microbial*.**1996**, 13, 489- 499; b) Talon, R. ; Walter D. ; Viallon, C. ; Berdague, J.L. *Journal of Microbiological Methods*. **2002**, 48, 271-279.

¹⁴⁷Vierling, E. « *Aliments et boissons : filières et produits* », **2008**, 3^{ème} édition, CRDP d'Aquitaine.

Onensemence le lait écrémé stérile par 1,9g de culture mixte (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) puis on incube la culture à une température de 44°C avec le maintien de l'agitation. L'incubation est arrêtée au bout de 3 heures de culture pour arriver à une acidité de 65 à 70 °D.

3.1.3. Isolement des souches lactiques

3.1.3.1. Isolement de *Streptococcus thermophilus*

On fait couler dans une boîte de pétri, la gélose M17 (gélose de Terzaghi et Sandine) préalablement fondue et refroidie à 45°C et on faitensemencer la gélose en surface (par des stries) après enrichissement dans le bouillon M17. L'incubation se fait dans l'étuve à 44°C pendant 48 h. Les *St thermophilus* donnent des colonies rondes ou lenticulaires à contours réguliers de coloration blanc crème.

3.1.3.2. Isolement de *Lactobacillus bulgaricus*

Dans une boîte de Pétri, on fait couler la gélose MRS (gélose de Man Rogosa et Sharpe) préalablement fondue et refroidie à 45°C. L'ensemencement se fait par des stries en surface et l'incubation est réalisée à 45°C en anaérobiose (dessiccateur avec bougie) pendant 2 à 3 jours. Les colonies sont rondes, lenticulaires, blanchâtre, de taille variable de 1 à 4 mm¹⁴⁸.

3.1.4. Identification des souches lactiques

Après 24 h à 48 h d'incubation, des colonies sont obtenues sur les deux milieux MRS et M17. A partir de ces colonies, on a effectué les tests suivants :

-Observations macroscopiques et microscopiques : Il s'agit d'une observation à l'œil nu qui consiste à déterminer la forme, la couleur, l'aspect général et la taille des colonies bactériennes. La coloration de Gram a été réalisée sur des souches pures à partir des boîtes contenant des cultures jeunes. Cet examen nous a permis de déterminer la forme et la disposition des cellules bactériennes.

- Tests biochimiques : Les principaux tests d'identification biochimiques utilisés sont : test de catalase, type fermentaire, température de développement (deux tubes de milieu MRS, et deux tubes de milieu M17 sont incubés l'un à 45°C, pendant une période de 24 heures, l'autre à 15°C durant 1 à 2 semaines), fermentation des sucres (y compris les pentoses) et du gluconate, hydrolyse de l'esculine et de l'arginine, croissance dans des conditions hostiles : en présence de 6,5% de chlorure de sodium (NaCl) et d'un pH (ajusté à 3,9 pour le bouillon MRS et ajusté à 9,6 pour M17, tous deux sontensemencés et incubés à 30°C).

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur leurs milieux spécifiques et sont maintenues à 4°C. Les résultats d'identification sont présentés en annexe.

¹⁴⁸Guiraud, J.P. «Microbiologie alimentaire», Ed. Dunod, Paris 1998.

3.1.5. Fixation de la dose d'huile essentielle

Après l'isolement et l'identification des deux espèces bactériennes *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, nous avons réalisé une étude pour fixer la dose de l'H.E que nous allons utiliser ultérieurement. Durant cette expérience nous avons choisi 3 temps différents et à chaque temps on mesure le *pH*, l'*acidité*, la *densité optique* et le *dénombrement des bactéries*. Deux doses sont testées : 5 et 20 µL de chaque huile et sur chaque espèce bactérienne.

3.1.6. Détermination de l'effet des huiles essentielles

D'après les essais préliminaires réalisés avec les deux doses (5 et 20 µL) des H.Es de chaque plante et selon la valeur de *pH*, de l'*acidité* et de la *densité optique*, la dose de 5 µL est retenue pour nos essais. Pour pouvoir déterminer l'effet de cette dose d'H.E des deux plantes sur le comportement des bactéries lactiques, des cultures ont été réalisées pour chaque espèce bactérienne. Des cultures sont considérées comme témoin et d'autres sont caractérisées par l'ajout de 5 µL d'H.E de chacune des deux plantes. Le comportement cinétique et biochimique de ces fermentations est déterminé par la mesure du *pH*, de l'*acidité*, de la *densité optique* (DO), du *dénombrement* et enfin du *taux de sucre résiduel*.

3.1.7. Dosages analytiques

3.1.7.1. Détermination du pH et de l'acidité

Le pH est mesuré par un pH-mètre. L'industrie laitière exprime classiquement l'acidité globale provoquée par la fermentation du lactose en degrés Doronic. Ceci correspond à la quantité de soude utilisée pour neutraliser 0,1g d'acide lactique par kg de produit laitier¹⁴⁹.

Le principe correspond à la neutralisation de l'acidité totale par une solution de soude de titre N/9 en présence d'un indicateur coloré, la phénolphtaléine (solution à 1% dans l'éthanol à 95°). Les mesures de l'acidité doivent s'effectuer stérilement¹⁵⁰. On prélève 1mL de bouillon (MRS ou M 17), on ajoute 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine à 2% puis on titre avec NaOH (N/9) jusqu'au début du virage de la couleur vers le rose clair. La mesure de l'acidité titrable se fait par la formule suivante :

$$\text{Acidité en degrés Doronic} = 10.V$$

V : volume de NaOH

3.1.7.2. Dosage des sucres totaux par la méthode de Dubois

La méthode de dosage des sucres par le réactif au phénol et acide sulfurique introduite par Dubois¹⁵¹, permet de déterminer la concentration des sucres dans le produit. Les

¹⁴⁹Adrian, J.; Potus, J.; Poiffait, A.; Dauvillier, P. «Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires», Ed. Lavoisier, Techniques et Documentation, Paris 1998.

¹⁵⁰Larpent, J.P.; Larpent-Gourgaud, M. «Mémento technique de microbiologie», Ed. Lavoisier, Techniques et Documentation, Paris 1997.

¹⁵¹Dubois, M.K.; Gille, A; Hamilton, J.; Rebers, P.A.; Smith, F. *Anal. and Chem.*1956, 28(3), 350-356.

monosaccharides perdent de l'eau en présence de l'acide sulfurique et se transforment en dérivés furfuraliques qui, en milieu acide réagissent avec les phénols pour donner des composés colorés, l'intensité de la coloration (densité optique) est proportionnelle à la concentration des sucres. En milieu acide et à température élevée les disaccharides se transforment en monosaccharides et subissent la même réaction.

Mode opératoire : A 5mL de produit, on ajoute 300 mL d'eau distillée et 3 g de bicarbonate de calcium (CaCO_3) pour la neutralisation. Le mélange subit un chauffage pendant 30 minutes jusqu'à ébullition avec agitation à l'aide d'un agitateur magnétique. Après le refroidissement du mélange, on complète jusqu'à 1000 mL d'eau distillée, puis on ajoute une quantité d'acétate de plomb.

- La première filtration : Dans ce cas le but est d'éliminer les protéines précipitées par l'acétate de plomb. Ensuite on ajoute une petite quantité d'oxalate de potassium.

- La deuxième filtration : Le but de cette opération est d'éliminer le plomb précipité par l'oxalate de potassium.

***Le témoin :** 1mL d'une solution de phénol (5%), avec 5mL d'acide sulfurique (H_2SO_4), et 1mL d'eau distillée pour calibrer le spectrophotomètre.

***Le dosage :** Après la 2^{ème} filtration, on obtient un extrait filtré pour le dosage. On fait la préparation des échantillons témoins. Les solutions étalons ont été préparées selon des concentrations croissantes de pentoses et d'hexoses. Après la préparation des échantillons, on fait la lecture de la *densité optique* de chaque échantillon (après l'étalonnage avec le témoin) à une longueur d'onde de 490 nm.

***L'expression des résultats :** A partir des solutions étalons du glucose dont leur DO ont été déterminées à 490 nm, les courbes d'étalonnage sont tracées pour différentes concentrations, à partir de ces courbes, on détermine la concentration des sucres réducteurs de nos échantillons.

3.1.7.3. Dénombrement de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*

Le dénombrement est basé sur la fixation de la charge microbienne initiale à 0,7. Si la charge est inférieure à 0,7, nous avons ajouté une suspension bactérienne et si c'est le contraire on ajoute le bouillon M17 ou MRS (selon le germe à doser). Le calibrage du spectrophotomètre est réalisé par un bouillon MRS pour *Lactobacillus bulgaricus* et M17 pour *Streptococcus thermophilus*. A chaque temps, nous avons mesuré la DO de chaque suspension bactérienne

3.2. Etude de l'activité des H.Es des graines de fenouil et de persil sur la cinétique de production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus*

L'objectif de ce travail est la détermination de l'effet des H.Es des graines de persil et de fenouil sur la cinétique de production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus*. Pour cela, des cultures discontinues en fermenteur (Applikan de 2L) sur milieu MRS ont été

réalisées, l'une est considérée comme contrôle, la deuxième est caractérisée par l'ajout de 20 µL d'H.E de persil en pleine phase exponentielle de la croissance et la troisième additionnée par 20 µL d'H.E de fenouil.

3.2.1. Microorganisme et milieu de culture

La souche utilisée dans ce travail est *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* (LBC80 10D), fournie par le groupe Rhône Poulenc (France). La souche stockée dans le milieu MRS en présence de glycérol à 10% est conservée à - 20°C. La composition du milieu utilisé est la suivante (g/L) : 10 peptone de soja, 10 extrait de viande, 5 extrait de levure, 2 K₂HPO₄, 5 NaCH₃CO₂.3H₂O, 2 citrate d'ammonium, 0,2 MgSO₄.7H₂O, 0,05 MnSO₄.4H₂O, 15 glucose, 1mL Tween 80. Le pH a été ajusté à 6,25 avant la stérilisation à 108°C pour 15 min. La phase de réactivation est réalisée après deux repiquages successifs à 42°C pendant 2h sur milieu MRS liquide¹⁵².

3.2.2. Méthodes et conditions de fermentation

Toutes les expériences ont été menées dans un fermenteur de 2L (Applikon Biocontroller ADI1030) avec un volume utile de 1,5 L à 42°C et la vitesse d'agitation a été fixée à 200 tours/min pour assurer une parfaite homogénéité du milieu de culture. L'inoculum a été incubé à 42°C pendant 12 h à 200 tr/min avant l'ensemencement dans le fermenteur à raison de 10% du volume réactionnel. Le pH de la culture a été maintenu à 6,25 par l'ajout automatique de 25 % (v/v) d'ammoniaque (NH₄OH) en utilisant une pompe péristaltique pendant 24 heures de fermentation. Les échantillons ont été retirés à un intervalle donné et ont été congelés pour leur analyse. Une fermentation discontinue (Contrôle) de *Lactobacillus casei subs prhamnosus* a été effectuée pour la production d'acide L-lactique à partir d'une concentration initiale de glucose (15 g.L⁻¹). Des cultures similaires ont été aussi menées dans les mêmes conditions et elles ont été ajoutées de 20 µL d'H.E de la plante choisie (persil ou fenouil) au cours de la phase exponentielle de croissance. L'évolution de la biomasse, le glucose résiduel et la production d'acide lactique sont suivis à des intervalles réguliers.

3.2.3. Méthodes d'analyse

La concentration cellulaire est déterminée par Spectrophotomètre (Hitachi 4-2000) en mesurant la Densité Optique à une longueur d'onde de 570nm. Les échantillons prélevés des cultures sont centrifugés (13200 g à 4°C pendant 5 minutes), dilués et filtrés. Le glucose résiduel et la concentration d'acide lactique sont déterminés par l'Analyseur Médical Multi paramétrique. Le Kit enzymatique employé pour le dosage de l'acide lactique est le PAP Ref-61 192 et pour le dosage du glucose est le Elitech diagnostique réf - GPSL-0500.

¹⁵²Amrane, A.; Prigent, Y. J. Chem. Tech. Biotechnol. **1994**, 60: 241-246.

3.2.4. Calcul des paramètres cinétiques des fermentations

Les différentes analyses effectuées permettent de suivre au cours du temps de fermentation l'évolution des concentrations des composants présents dans le milieu de culture.

[Biomasse : X (DO)=f (t), sucres : S =f (t) et le métabolite produit (l'acide lactique) : P =f (t).

De ces données brutes, il est possible de calculer les paramètres cinétiques des fermentations par le calcul de la vitesse volumique de croissance (rx'''), la vitesse spécifique de croissance (μ), la vitesse volumique de consommation des sucres (rs'''), la vitesse spécifique de consommation des sucres (Qs), la vitesse volumique de production d'acide lactique (rp''') et la vitesse spécifique de production d'acide lactique (Πp). La vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{max}) a été déterminée par les pentes des droites des courbes $\ln X/X_0=f(t)$.

3.2.5. Rendements en biomasse et en acide lactique

Les rendements en biomasse ($Y_{x/s}$) et en produits ($Y_{p/s}$) présentent les proportions massives de biomasse et métabolites (acide lactique) formés par gramme de substrat carboné consommé. L'approche utilisée pour déterminer ces rendements, consiste à tracer la courbe $[(X-X_0) = f(S_0-S)]$ et $[(AL-AL_0) = f(S_0-S)]$, les pentes obtenues de ces droites représentent respectivement les rendements de conversion des sucres en biomasse et en acide lactique.

3.3. Etude de l'activité des H.Es des graines de fenouil et de persil sur la qualité du yaourt étuvé

Le but de cette partie d'étude est la recherche de l'amélioration de certaines qualités du yaourt étuvé par l'application des H.Es des graines de persil et de fenouil. Le choix de ces huiles est basé sur leur effet antimicrobien remarquable sur les germes pathogènes et les moisissures et leur effet modéré surtout celui du persil contre les bactéries lactiques utilisées pour la fabrication du yaourt.

3.3.1. Préparation du levain lactique

Le levain lactique est préparé à partir d'un ferment obtenu auprès de l'unité GIPLait de Tizi (Mascara). On stérilise 1 litre de lait partiellement écrémé à 100°C pendant 5 minutes puis on diminue la température jusqu'à 45°C (température optimale de croissance du ferment lactique formé par les deux souches *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. Après le repiquage des souches lactiques déshydratées, on effectue l'étuvage à 45°C jusqu'à maturation (acidité de 90 à 100°D), l'arrêt de la fermentation se fait par le refroidissement à 4°C. Pour faciliter l'utilisation nous avons divisé la quantité préparée en plusieurs flacons qui sont gardés au froid en attendant leur utilisation.

3.3.2. Préparation des échantillons de yaourt étuvé

Trois yaourts étuvés ont été préparés (contrôle, yaourt additionné avec 5 μ L d'H.E de graines de persil et yaourt additionné avec 5 μ L d'H.Es de graines de fenouil.

Pour la préparation du yaourt étuvé nous avons suivi le schéma présenté dans la figure II'-2. Pour chaque litre de lait pasteurisé partiellement écrémé, 54 g de la poudre de lait à 0% de matière grasse et 84 grammes de sucre cristallisé (saccharose) sont ajoutés.

Après homogénéisation, le mélange subit une pasteurisation et un refroidissement à 45°C. Les ferments lactiques sont ajoutés à raison de 2% (20 mL pour un litre de lait) puis agités après ajout de 5 µL de l'H.E de persil ou de fenouil. L'incubation se fait à 45°C pendant 2 à 3 heures (jusqu'à l'obtention de l'acidité de 70-90°D). L'étuvage est arrêté par refroidissement à 4°C.

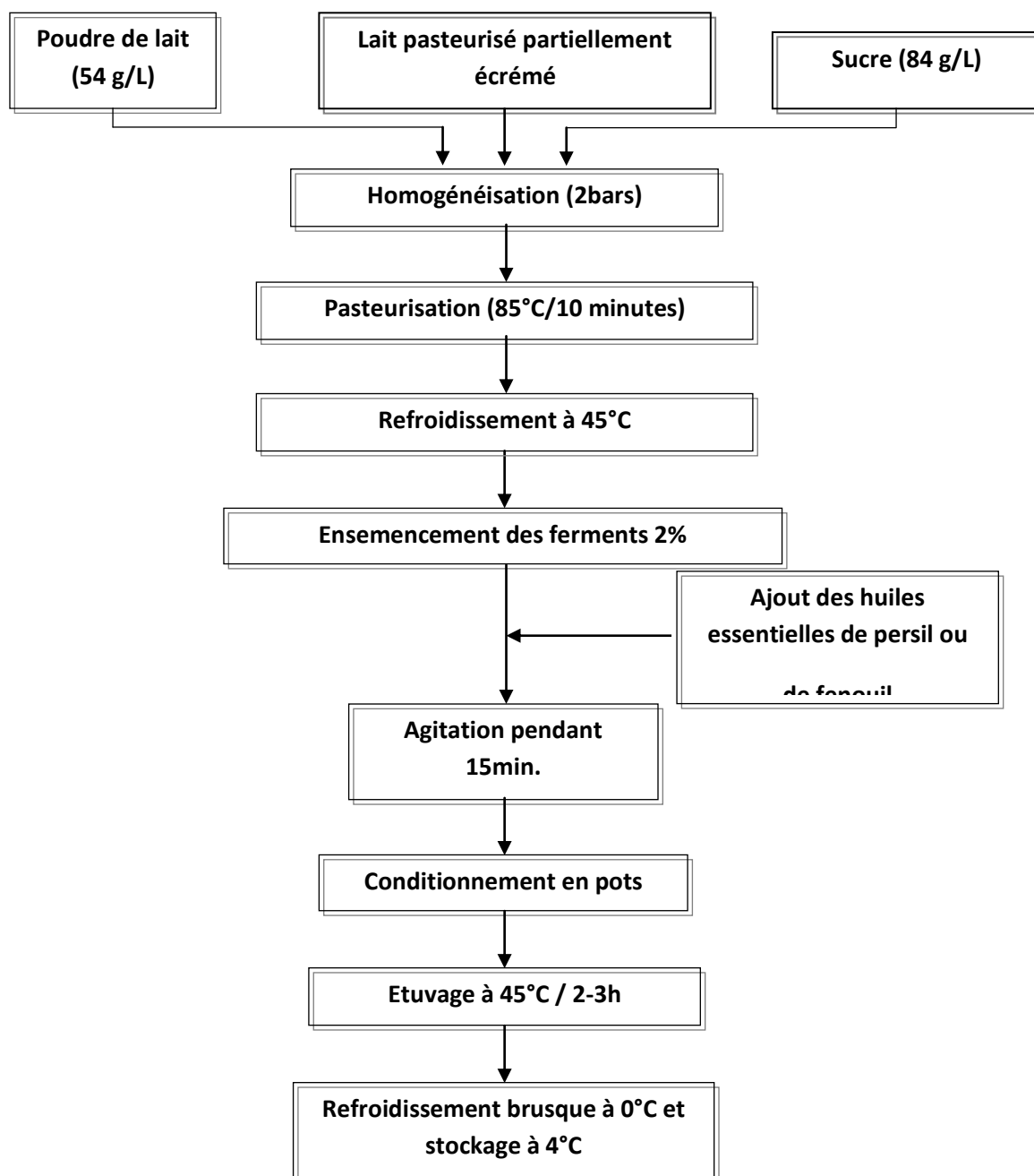


Figure II'-2 : Diagramme de fabrication expérimentale du yaourt étuvé

3.3.3. Méthodes d'analyse physico-chimiques et biochimiques du yaourt

Ces analyses permettent de suivre l'évolution des différents paramètres physico-chimiques et biochimiques. Elles sont effectuées le premier jour de fabrication et après chaque semaine de stockage du yaourt étuvé.

3.3.3.1. Mesure du pH et de l'acidité

La mesure du pH et de l'acidité sont déterminés par la même méthode que celle décrite précédemment.

3.3.3.2. Détermination de la matière sèche (Extrait Sec Total)

On pèse 5g de yaourt dans des capsules, qui sont mis dans une étuve à 105°C, pendant 2 heures jusqu'à l'obtention d'un poids constant (différence entre deux pesées successives ne dépassant pas 0,005 g). La teneur du yaourt en matière sèche en % est égale à :

$$MS \text{ en } \% = 100. (M_2 - M_1) / m$$

Où M_1 : poids de la capsule vide.

M_2 : poids de la capsule après dessiccation.

m : masse de la prise d'essai.

3.3.3.3. Détermination de la matière grasse par méthode acido-butyrométrique

Cette méthode est basée sur l'attaque du yaourt par addition d'acide sulfurique en présence d'alcool iso-amylque. La séparation de la matière grasse s'effectue par centrifugation. L'obtention de la teneur en matière grasse (en g/L) s'effectue par lecture directe¹⁵³. La méthode de mesure consiste à mettre dans un butyromètre, 10 mL d'acide sulfurique concentré, 11 mL de yaourt et 1 mL d'alcool iso-amylque. Le butyromètre est agité jusqu'à la disparition des particules blanches qui indique la dissolution des caséines. Puis, il est placé dans une centrifugeuse. La lecture exprimée en gramme par litre se fait après 05 minutes.

3.3.3.4. Dosage des protéines par la méthode de formol-titration

Le dosage des protéines par formol titration est basé sur la combinaison du formaldéhyde avec le groupement basique de la lysine et l'arginine en libérant un proton par site de fixation. L'augmentation de l'acidité qui en résulte est neutralisée par l'addition d'une solution standard basique (NaOH). Le volume et le titre de cette solution nécessaire pour neutraliser l'acidité apparue fournissent la teneur en protéines. On prend 10 mL du produit, auquel on ajoute 1 mL de phénophtaléine et 0,4 mL d'oxalate de potassium saturé. Le mélange est titré avec une solution de NaOH (N/10) jusqu'à l'apparition de la couleur rose.

¹⁵³Multon, J.L. «Techniques d'analyses et de contrôles dans les industries agroalimentaires», Ed. Lavoisier, Techniques et Documentation, 2^{ème} édition, volume 4, Paris 1991.

Après addition de 2 mL de formaldéhyde à la solution, on refait le titrage avec du NaOH (N/10) jusqu'à l'obtention de la couleur rose, (V₁).

Essai à blanc : On prend 2 mL de formaldéhyde auquel on ajoute 10 mL d'eau distillée, puis la solution est titrée avec du NaOH (N/10), (V₂). Le taux de protéines est calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux de protéine (en \%)} = (V_1 - V_2) \cdot 1,71$$

Où : V₁ : volume de NaOH (N/10) nécessaire pour neutraliser la solution après l'addition de 2 mL de formaldéhyde.

V₂ : volume de NaOH (N/10) nécessaire pour neutraliser les 2 mL de formaldéhyde.

1,71 : Coefficient de Bayne.

3.3.3.5. Dosage des cendres par calcination¹⁵⁴

On sèche une capsule dans le four Pasteur à 103 ± 2°C pendant 30 minutes puis on l'a refroidi dans le dessiccateur jusqu'à température ambiante, on la pèse et on la note (m₀). On prélève 5 g de yaourt et on le met dans la capsule et on la place dans le four à moufle. La calcination s'effectue à 560°C pendant 5 heures. Les capsules sont placées ensuite dans le dessiccateur pour le refroidissement jusqu'à une température ambiante et on le note (m₂). Le taux de cendre exprimé en % est calculé par la formule suivante :

$$TC \% = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

m₀ : masse de la capsule vide en g.

m₁ : masse de la capsule et la prise d'essai avant la calcination en g.

m₂ : masse de la capsule et la prise d'essai après la calcination en g.

3.3.3.6. Dosage des sucres par la méthode de Dubois¹⁵¹

Les sucres réducteurs sont déterminés par la méthode de Dubois décrite précédemment.

3.3.3.7. Méthodes d'analyses microbiologiques du yaourt

Ces analyses ont été effectuées sur la matière première une seule fois et sur le yaourt tout au long de la durée de conservation. Les analyses microbiologiques permettent de déterminer le degré de contamination par les germes pathogènes, les indices de contamination fécale par les levures et les moisissures.

3.3.3.7.1. Dénombrement des coliformes totaux et fécaux

Les coliformes fermentent rapidement le lactose avec dégagement gazeux. Cette fermentation est rendue sélective à ces espèces par l'utilisation d'un milieu liquide. La technique fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

¹⁵⁴Salgarolo, P. «Pratique des manipulations de chimie à l'usage des Biologistes», Ed. Lavoisier, Techniques et Documentation, Paris 2003.

- ❖ Le test de présomption est réservé à la recherche des coliformes totaux.
- ❖ Le test de confirmation, appelé test de Mac Kenzie est réservé à la recherche des coliformes fécaux à partir des réactions positives du test de présomption.

Test de présomption : À partir des dilutions décimales allant de 10^{-3} à 10^{-1} , on porte aseptiquement 1 mL dans chacun des trois tubes correspondant à une dilution donnée. On chasse le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et on mélange bien le milieu et l'inoculum. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures. Sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois un dégagement gazeux (supérieur au 1/10 de la hauteur de la cloche) et un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (fermentation de lactose).

Test de confirmation ou test de Mac Kenzie : Les tubes de VBL (bouillon lactosé bilié au vert brillant) trouvés positifs lors du dénombrement des coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'une anse bouclée dans à la fois :

- ❖ Un autre tube de VBL muni d'une cloche.
- ❖ Un tube d'eau peptonée exempt de indole.

On chasse le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et on mélange bien le milieu et l'inoculum. Les tubes sont incubés à 44°C pendant 24 heures. Sont considérés comme positifs les tubes présentant un dégagement gazeux dans les tubes de VBL et un anneau rouge en surface, (témoin de la production d'indole par *Escherichia coli*) après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs dans le tube d'eau peptonée pour les coliformes fécaux. La lecture finale s'effectue selon les prescriptions de la table de Mac Grady.

3.3.3.7.2. Recherche des Streptocoques fécaux

La recherche des Streptocoques fécaux se fait en milieu liquide par la technique du nombre le plus probable (N.P.P.). Cette méthode fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

- ❖ Le test de présomption qui se fait sur milieu de Rothe;
- ❖ Le test de confirmation qui se fait sur milieu Eva Litsky.

Test de présomption : À partir des dilutions décimales allant de 10^{-3} à 10^{-1} , on porte aseptiquement 1mL dans chacun des trois tubes correspondant à une dilution donnée. On mélange bien le milieu et l'inoculum et l'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Test de confirmation : Chaque tube de Rothe positif fera donc l'objet d'un repiquage à l'aide d'une anse bouclée sur tube contenant le milieu Eva Litsky. L'incubation se fera à 37°C pendant 24 heures. Il y a des streptocoques lorsque le milieu d'Eva Litsky est trouble avec une pastille blanchâtre ou violette au fond du tube. Le nombre de Streptocoques fécaux est déterminé selon la table de Mac Grady.

3.3.3.7.3. Recherche des *Staphylococcus aureus*

La recherche des *Staphylococcus aureus* est basée sur l'emploi de milieux sélectifs:

- ❖ Milieu d'enrichissement (bouillon de Giolitti et Cantoni);
- ❖ Milieu d'isolement (gélose de Chapman).

***Enrichissement :** À partir des dilutions de 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} , on porte aseptiquement 1 mL par dilution dans un tube à vis stérile. On ajoute par la suite environ 15 mL du milieu d'enrichissement contenant la solution de tellurite de potassium et on mélange bien le milieu et l'inoculum. L'incubation se fait dans une étuve réglée à 37°C pendant 24 à 48 heures.

***Isolement :** Seront considérés comme positifs, les tubes ayant virés au noir. Ces tubes font l'objet d'un isolement sur gélose de Chapman à l'aide d'une anse bouclée sous forme de stries. Les boîtesensemencées seront incubées à leur tour à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les *Staphylococcus aureus* se présentent sous forme de colonies dorées, jaunâtres, brillantes et convexes entourées d'une zone transparente.

3.3.3.7.4. Dénombrement des *Clostridium sulfito-réducteurs*

La recherche de *Clostridium* sulfito-réducteurs peut s'effectuer par dénombrement des formes sporulées, mais les formes végétatives sont détruites par chauffage à 80°C pendant 10 min. Les tubes contenant les dilutions de 10^{-1} et 10^{-2} seront soumis d'abord à un chauffage à 80°C pendant 10 minutes, puis à un refroidissement immédiat sous l'eau du robinet. À partir de ces dilutions, on porte aseptiquement 1 mL de chaque dilution en double dans deux tubes à vis stériles, puis on ajoute environ 15 mL de VF (gélose Viande Foie) additionné de ses additifs (sulfite de sodium et alun de fer). On mélange bien le milieu et l'inoculum et les tubes seront incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les *Clostridium* sulfito-réducteurs apparaissent sous forme de colonies entourées d'un halo noir. Le résultat est exprimé en nombre de germes par millilitre de produit.

3.3.3.7.5. Dénombrement des levures et des moisissures

Le principe repose sur l'emploi d'un milieu de culture sélectif par acidification à pH acide compris entre 3,5 et 4,5 et par addition d'antibiotique. Le milieu dit de base OGA s'utilise avec addition de l'oxytétracycline. On coule aseptiquement environ 15 mL de la gélose OGA préalablement fondue puis on la refroidit à 45°C et on laisse le milieu se solidifier. À partir des dilutions décimales de 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} , on porte aseptiquement 4 gouttes par dilution sur des boîtes d'OGA (Gélose à l'Oxytétracycline) puis on étale à l'aide d'un râteau stérile en commençant par la plus haute dilution. L'incubation de ces boîtes se fait à 22°C à couvercle en haut pendant 5 jours. Les levures présentent des colonies pigmentées souvent opaques avec un bord régulier ou irrégulier de formes convexes ou plates. Tandis que les moisissures apparaissent sous forme de colonies pigmentées à aspect velouté. Le résultat est exprimé en nombre de germes par millilitre de produit.

3.3.3.7.6. Recherche de *Salmonelles*

Du fait de leur rareté et de l'endommagement des cellules selon les produits, il s'applique un processus de revivification. Ces opérations sont suivies d'isolement et d'identification de salmonella.

***Enrichissement** : L'enrichissement s'effectue sur milieu sélectif SFB (Selenite F Broth) réparti à raison de 100 mL par flacon auquel sont ajoutés 10 mL du yaourt additionné d'un additif dit "additif de SFB" sous forme de disques. Une fois le milieu est bien mélangé, le flacon est incubé à 37°C pendant 24 heures.

***Isolement** : Chaque flacon présentant un virage de couleur fera l'objet d'un isolement sur gélose de Hektoen à l'aide d'une anse sous forme de stries. Les boîtes isolées sont incubées à 37°C pendant 24 heures. Les salmonelles donnent des colonies le plus souvent grises bleues à centre noir.

3.3.3.7.7. Dénombrement de la flore lactique

❖ *Streptococcus thermophilus*

Leur recherche fait appel à des milieux contenant les éléments nutritifs du lait comme la gélose de Terzaghi et Sandine (M17) qui favorise leur croissance. On prépare les dilutions à examiner par exemple pour un yaourt, les dilutions de 10^{-4} à 10^{-7} . On prélève aseptiquement 1 mL de chaque dilution et on l'introduit dans une boîte de Pétri stérile ensuite on coule la gélose M17 fondue au préalable et refroidie à 45°C. On homogénéise bien le milieu et l'inoculum et on laisse le milieu se solidifier. On place ensuite les boîtes dans une étuve réglée à 37°C pendant 48 heures. Les *Streptococcus thermophilus* se développent en donnant des colonies rondes ou lenticulaires à contours réguliers de coloration blanche crème.

❖ *Lactobacillus bulgaricus*

Le dénombrement de *Lb. bulgaricus* dans le yaourt s'effectue à l'aide de la gélose MRS à pH de 5,4. On prépare des dilutions de 10^{-4} à 10^{-7} , puis on introduit 1mL de chacune des dilutions dans une boîte de Pétri stérile ensuite on coule la gélose de MRS fondue au préalable et refroidie à 45°C. On homogénéise bien le milieu et l'inoculum et l'incubation se fait à 37°C pendant 72 heures. Les *Lactobacillus* se développent en donnant des colonies rondes, lenticulaires de taille variable de 1 à 4 mm. Les résultats sont exprimés en germes/mL de produit.

3.3.4. Analyses sensorielles

Comparé à toutes les autres méthodes, la technique d'évaluation sensorielle apparaît spécifique. Elle est la seule à mettre en œuvre l'homme non seulement comme expérimentateur ou praticien, mais également comme « Générateur de données ».

L'analyse sensorielle est un examen des propriétés organoleptiques d'un produit par les organes de sens.

Dans notre travail, ce test permet de juger et d'apprécier la qualité des différents yaourts fabriqués, par plusieurs dégustateurs en évaluant les caractéristiques suivantes : *le goût*, *la texture* et *l'acidité*, qui présentent les caractéristiques clés de la maturation du produit, du comportement des ferments lactiques et des interactions physico-chimiques des différentes substances dont l'arôme peut avoir un rôle significatif.

3.3.4.1. Formation du jury

Les sujets doivent être choisis selon le but de l'épreuve et avec un nombre fixe. Pour chaque épreuve il est imprudent d'avoir moins de trois sujets. Les critères les plus importants dans le choix des sujets se résument dans leur disponibilité, leur bonne santé et leur motivation. Ces sujets ont regroupé des enseignants, des ingénieurs, des étudiants et des techniciens de laboratoire.

3.3.4.2. Epreuve de notation

Son principe repose sur l'attribution des notes au moyen de nombres. Ces derniers forment une échelle d'intervalle ou une échelle de rapport. Les critères de qualité élaborés pour l'appréciation des échantillons du yaourt reposent sur : *la texture*, *l'acidité* et *le goût d'arôme* suivant une grille de notation : 1 (non appréciable), 3 (appréciable) et 5 (très bon). Une analyse de la variance est effectuée pour l'interprétation des résultats.

4. Résultats et discussion

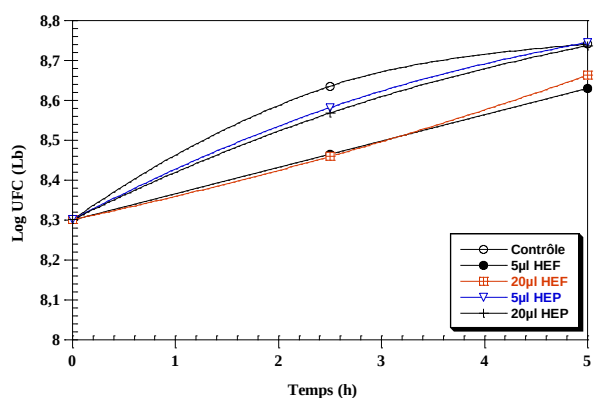
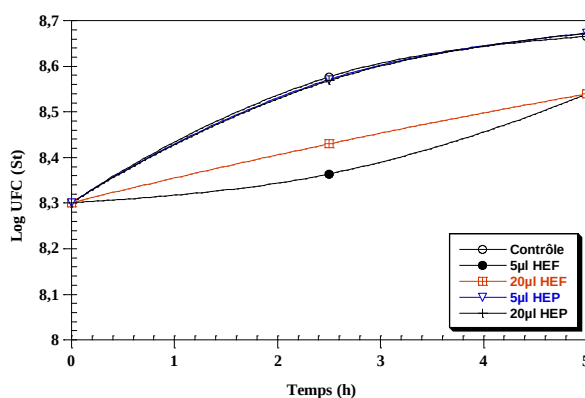
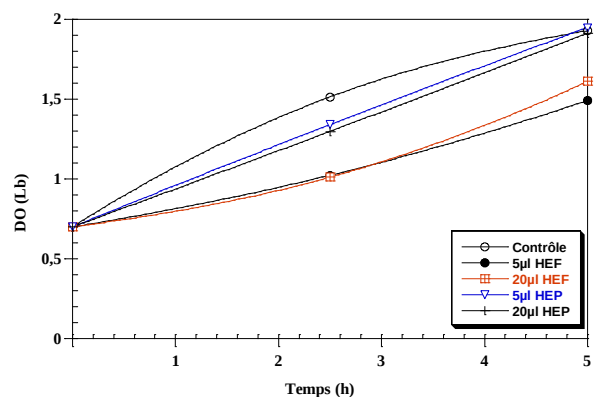
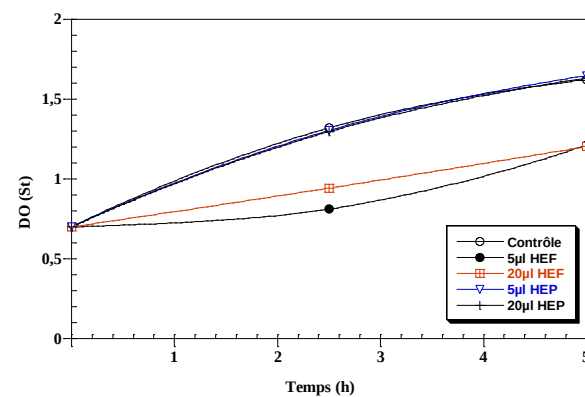
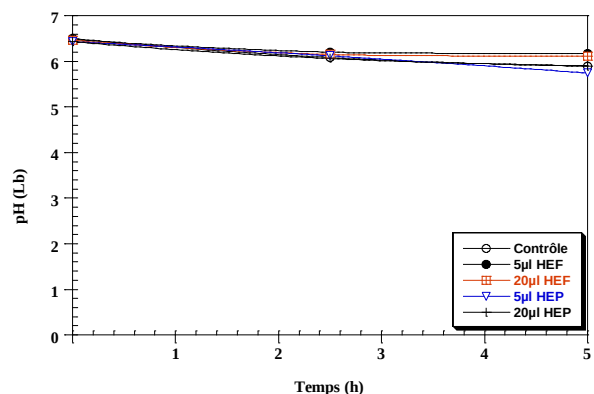
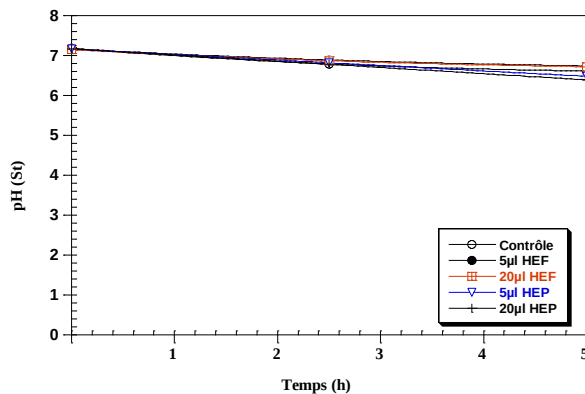
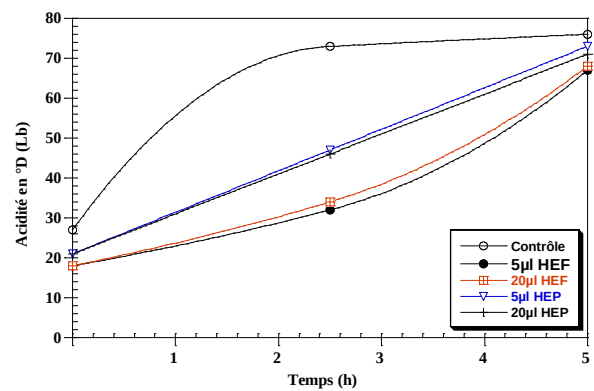
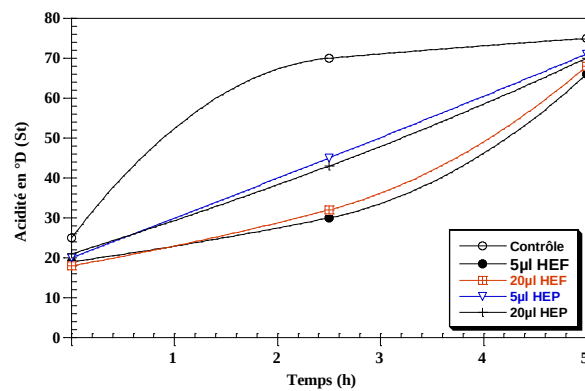
4.1. Résultats de l'effet des H.Es des graines de fenouil et de persil sur les bactéries lactiques

4.1.1. Fixation de la dose de l'huile utilisée

Les résultats de suivi de l'acidité, du pH, de la densité optique et du dénombrement du nombre des unités formant colonies pour les deux souches lactiques, en absence (contrôle) et en présence de 5 et 20µL des H.Es de persil et de fenouil sont présentés dans la figure II'.3.

D'après ces résultats, on constate que le taux de l'acidité produit par *Streptococcus thermophilus* varie de (25 °D à 75 °D) et par *Lactobacillus bulgaricus* (27°D à 76°D) durant 5 heures de culture. L'augmentation de l'acidité est liée à une croissance bactérienne importante des bactéries lactiques.

Il semble que l'H.E de fenouil exerce un certain effet inhibiteur quel que soit la dose utilisée sur les bactéries lactiques (croissance et production de l'acidité), alors que l'H.E de persil n'exerce aucun effet sur la croissance de *Streptococcus thermophilus* et un faible effet sur la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* comparé à celui du contrôle.



Streptococcus thermophilus

Lactobacillus bulgaricus

Figure II'-3 : Paramètres de culture de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* en absence et en présence de 5 et 20µL des H.Es de persil et de fenouil

Pour l'acidité, on constate une production pratiquement linéaire avec le temps en présence des H.Es de persil, alors que pour le témoin la production s'arrête au bout de 2,5 heures de croissance. Le pH diminue dans toutes les cultures dues à la production de l'acide lactique. On estime que le fenouil possède un effet inhibiteur et le persil un effet négligeable sur les bactéries lactiques. Les deux doses appliquées (5 et 20µL) des H.Es de persil et de fenouil ont pratiquement le même effet.

4.1.2. Résultats de l'effet de l'ajout de 5µL des H.Es de persil et de fenouil sur les bactéries lactiques

Les résultats des paramètres des fermentations de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* en absence (contrôle) et en présence de 5 µL des H.ES de persil et de fenouil sont présentés sur les figures II'-4 et II'-5.

Les résultats indiquent clairement l'effet inhibiteur de l'H.E de fenouil même à faible dose 5 µL sur la cinétique de croissance et d'acidification de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* et aucun effet inhibiteur de 5 µL de l'H.E de persil sur ces deux souches. La souche *Streptococcus thermophilus* arrive à une DO finale de 2 au bout de 12 heures de culture. Cette croissance se manifeste par une consommation accrue des sucres qui seront utilisés pour le développement et la maintenance cellulaire et pour la production de l'acidité (81°D qui correspond à 8,1 g/L d'acide lactique) en fin de fermentation.

L'ajout de 5µL d'H.E de persil perturbe peu la croissance cellulaire où la DO finale est de l'ordre de 1,9 et la quantité d'acide lactique finale obtenue est de l'ordre de 7,5 g/L. Par contre, l'ajout de 5µL d'H.E de fenouil diminue la croissance cellulaire de *Streptococcus thermophilus* où la DO finale ne dépasse pas le 1,1 et puisque la production de l'acide lactique est associée à la croissance cellulaire la quantité d'acide lactique obtenue en fin de fermentation ne dépasse pas 6,5 g/L (Figures II'-4 et II'-6).

En ce qui concerne la souche *Lactobacillus bulgaricus*, la présence ou l'absence de 5 µL d'H.E de persil n'affecte pas la croissance cellulaire et la production de l'acide lactique alors que la présence de 5 µL d'H.E de fenouil diminue considérablement cette croissance et par conséquent l'acidification par l'acide lactique (Figures II'-5 et II'-6).

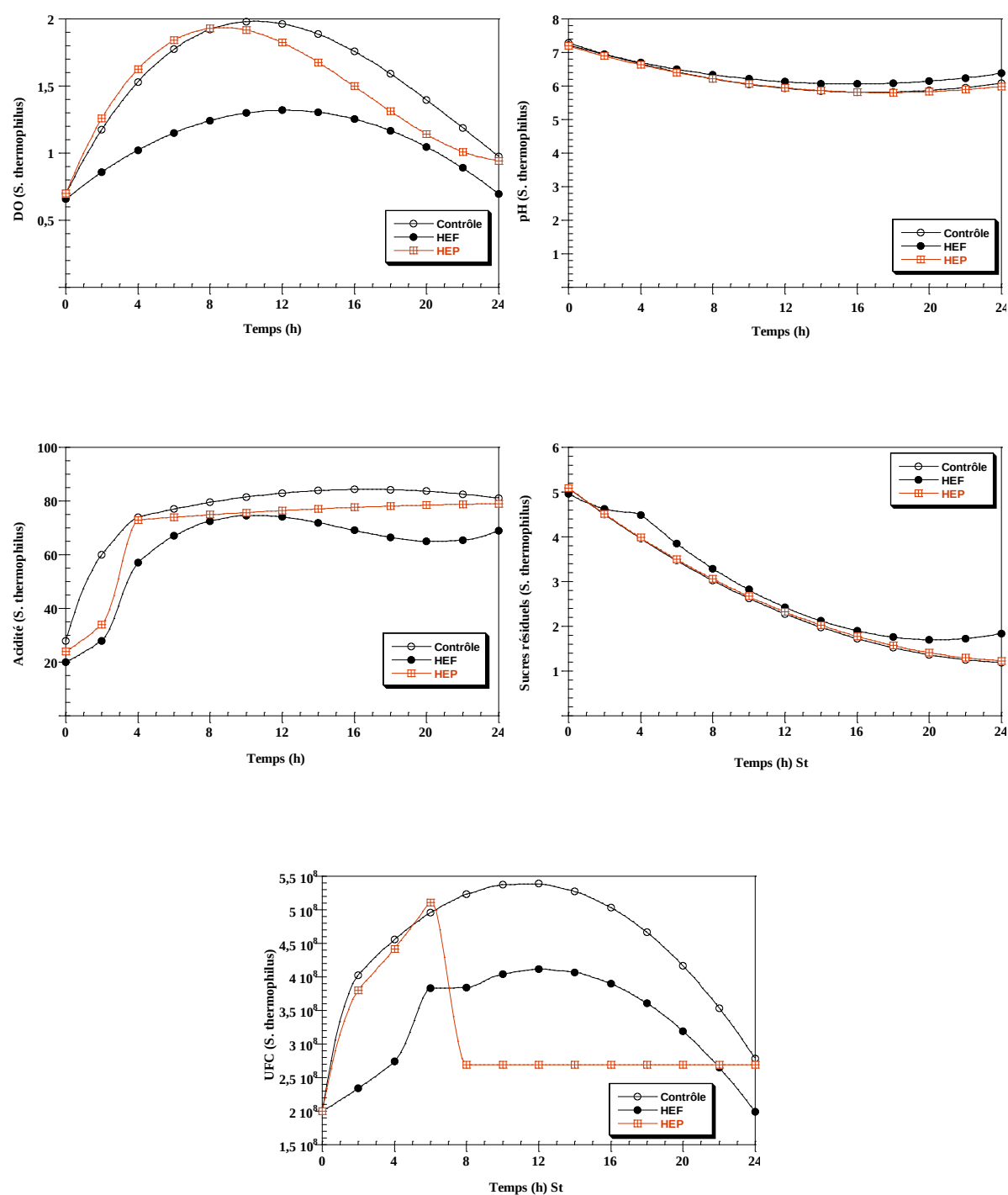


Figure II'-4 : Paramètres de culture de *Streptococcus thermophilus* en absence (contrôle) et en présence de 5 μ L des H.Es de persil et de fenouil

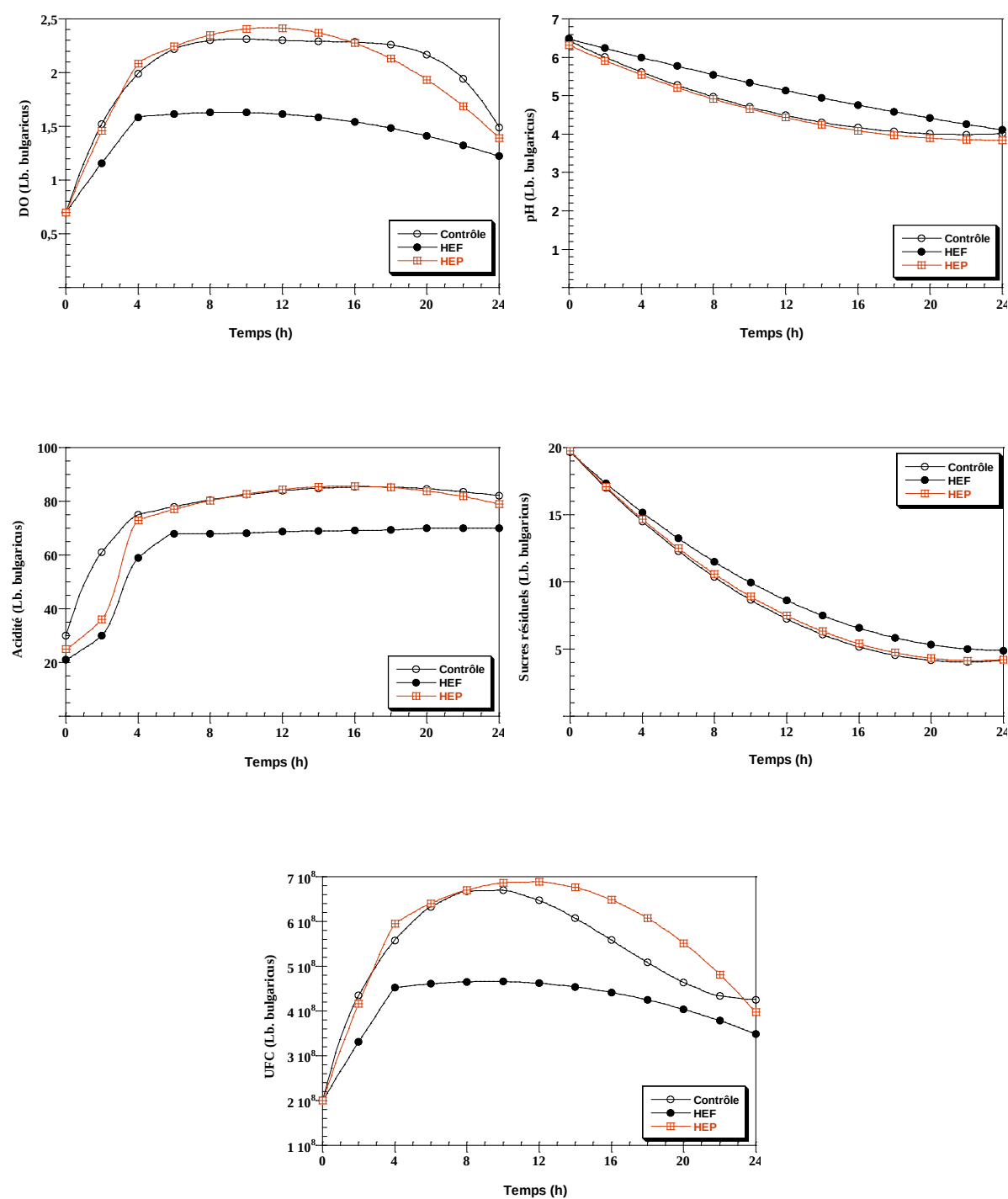


Figure II'-5 : Paramètres de culture de *Lactobacillus bulgaricus* en absence (contrôle) et en présence de 5 μ L des H.Es de persil et de fenouil

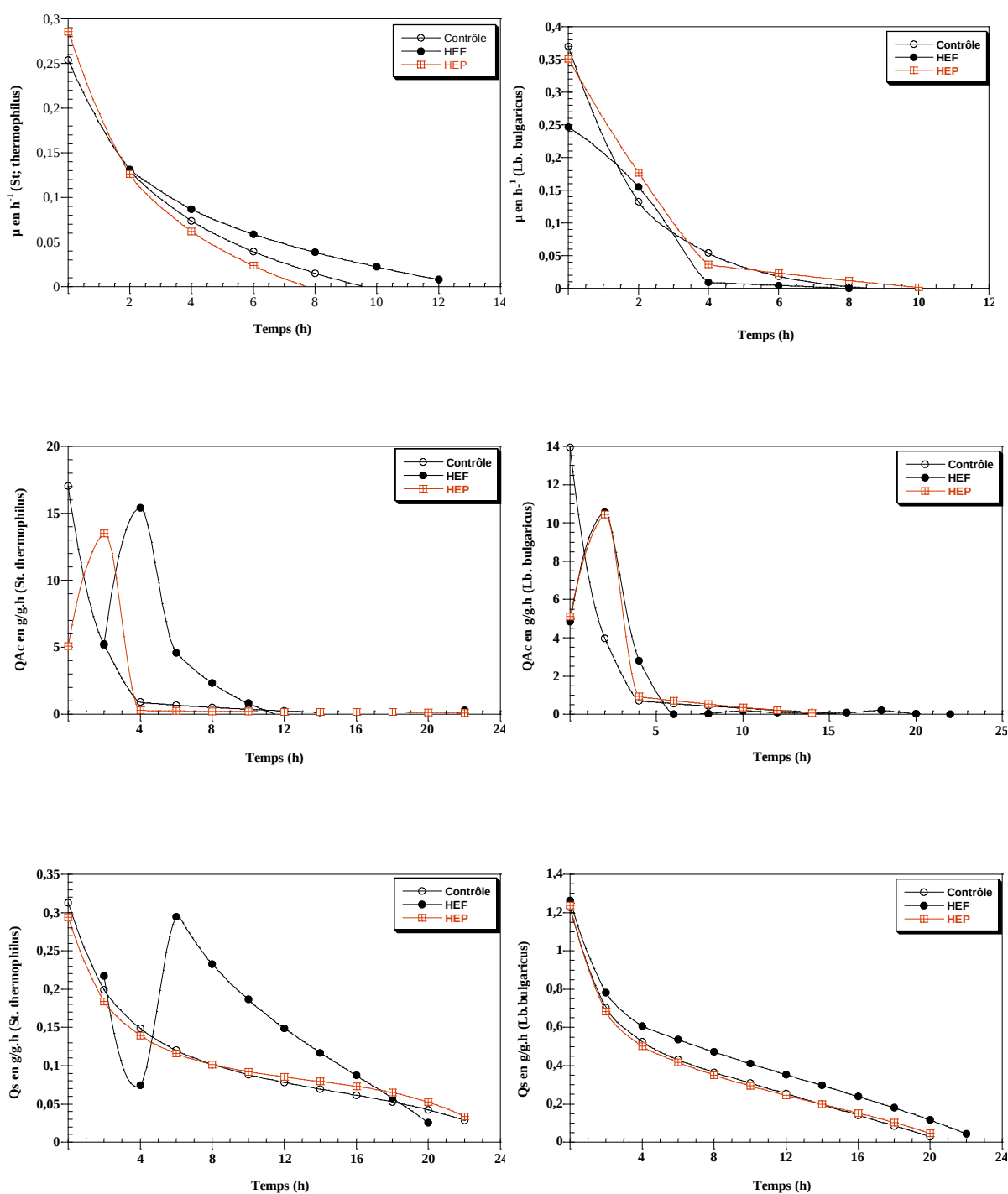


Figure II'-6 : Paramètres cinétiques (vitesse spécifique de croissance μ , de production de l'acidité Q_{Ac} et de consommation des sucres Q_s) des cultures de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* en absence (contrôle) et en présence de 5 μ L des H.Es de persil et de fenouil

4.2. Résultats de l'effet des H.Es des graines de fenouil et de persil sur la cinétique de production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus*¹⁵⁵

Les trois fermentations discontinues ont été débutées par la même concentration initiale en glucose (15 g.L^{-1}) etensemencées avec la même quantité de biomasse $1,2 \text{ g.L}^{-1}$. D'après les résultats obtenus, il ressort que la croissance de *Lactobacillus rhamnosus* pour les trois fermentations est caractérisée par une courte durée de la phase de latence ce qui indique que les cellulesensemencées étaient en pleine phase exponentielle.

Pour l'essai contrôle, la teneur en biomasse arrive après 6h de fermentation à $3,5 \text{ g.L}^{-1}$ puis à $4,575 \text{ g.L}^{-1}$, après 8h de culture (fin de la phase exponentielle). L'arrêt de la croissance est dû à l'épuisement du glucose dans le milieu de culture qui atteint une valeur finale de $0,008 \text{ g.L}^{-1}$, après 24h de fermentation. Au cours de la phase stationnaire, la souche continue à consommer le glucose et l'utilise uniquement pour la maintenance cellulaire. La quantité d'acide lactique obtenue en fin de fermentation est de $10,96 \text{ g.L}^{-1}$.

Pour la deuxième fermentation, l'H.E de persil a été ajoutée en pleine phase exponentielle et au bout de 6h de culture qui correspond à une quantité de biomasse de $3,5 \text{ g.L}^{-1}$. Après 10h de fermentation, la concentration cellulaire arrive à une valeur de $5,51 \text{ g.L}^{-1}$ et produit $13,78 \text{ g.L}^{-1}$ d'acide lactique. En fin de fermentation, le taux de glucose résiduel est de l'ordre de $0,0070 \text{ g.L}^{-1}$. Il semble que l'H.E de persil a favorisé la croissance cellulaire et la synthèse d'acide lactique par rapport à l'essai contrôle.

Pour la troisième fermentation, l'ajout d'H.E de fenouil est effectué après 6h de fermentation ($3,5 \text{ g.L}^{-1}$ de biomasse). Une lyse et une diminution de la multiplication cellulaire est constatée au moment de l'ajout de l'H.E de fenouil. La quantité de biomasse diminue jusqu'à une valeur finale de $0,98 \text{ g.L}^{-1}$, après 24h de fermentation. La teneur du milieu en glucose reste élevée jusqu'à la fin de la fermentation ($12,33 \text{ g.L}^{-1}$) et la quantité d'acide lactique produite a été nettement inférieure à celle de la culture contrôle : $5,14 \text{ g.L}^{-1}$ (Figure II'-7).

La cinétique de croissance peut être caractérisée par une vitesse spécifique maximale de croissance $\mu_{\max}$, elle est de $0,17 \text{ h}^{-1}$ dans le milieu MRS contrôle, augmente jusqu'à $0,22 \text{ h}^{-1}$ en présence de $20 \mu\text{L}$ d'H.E de persil. La troisième fermentation est caractérisée par une $\mu_{\max}$ de $0,17 \text{ h}^{-1}$ avant l'ajout d'H.E de fenouil puis descend à 0 h^{-1} au moment du traitement (Figure II'-8, Tableau II'-1).

¹⁵⁵Ouis, N.;Hariri, A.etEl Abed, D. « Effect of the essential oils from parsley and fennel seeds on the growth of *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus*.», *J. Biotechnologie Biomaterials***2012**, 2(3): 1-5.

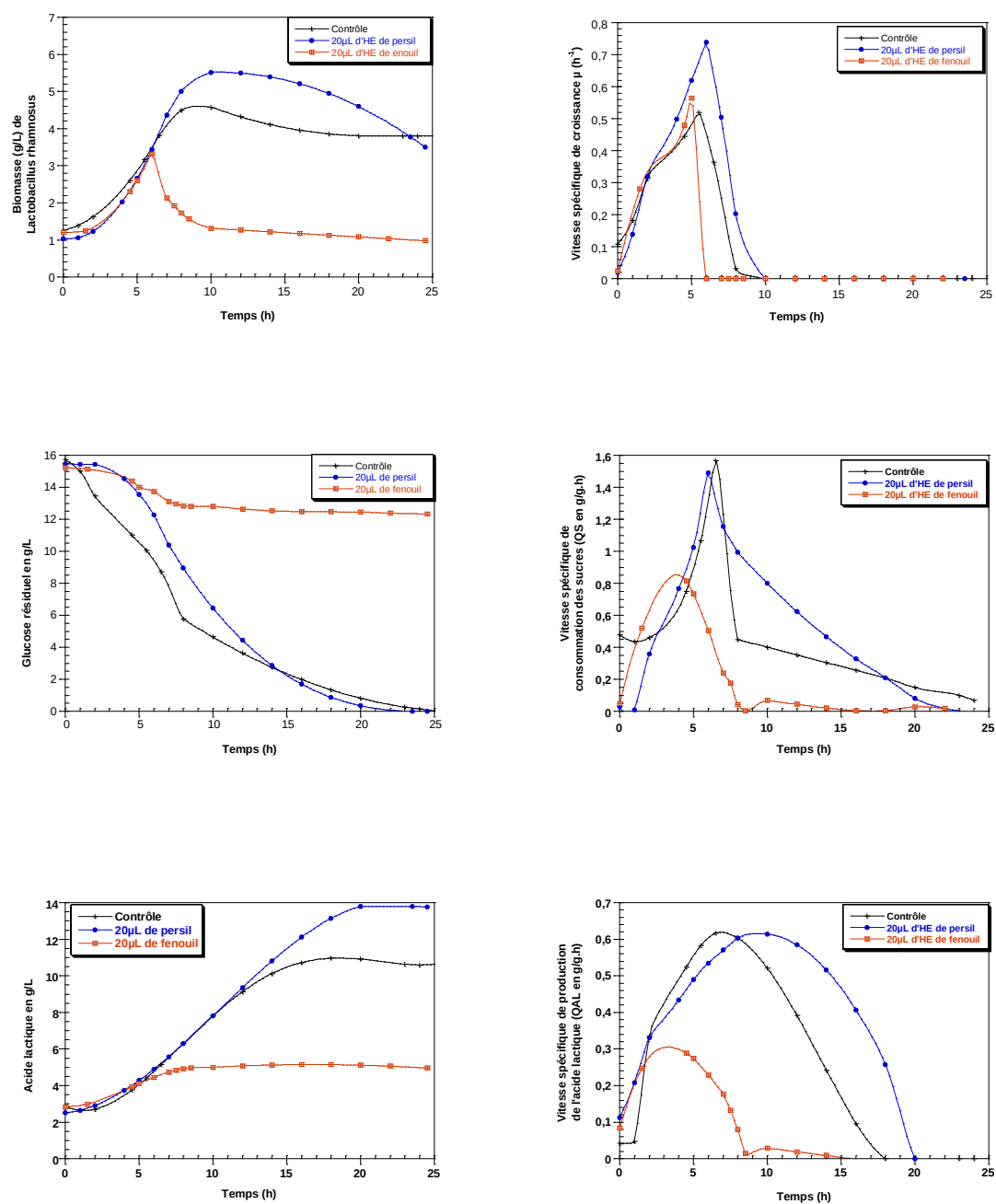


Figure II'-7 : Paramètres de cultures et vitesses spécifiques de croissance, de consommation du glucose et de production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* au cours des trois fermentations (Contrôle, avec 20µL d'H.E de persil et de fenouil)

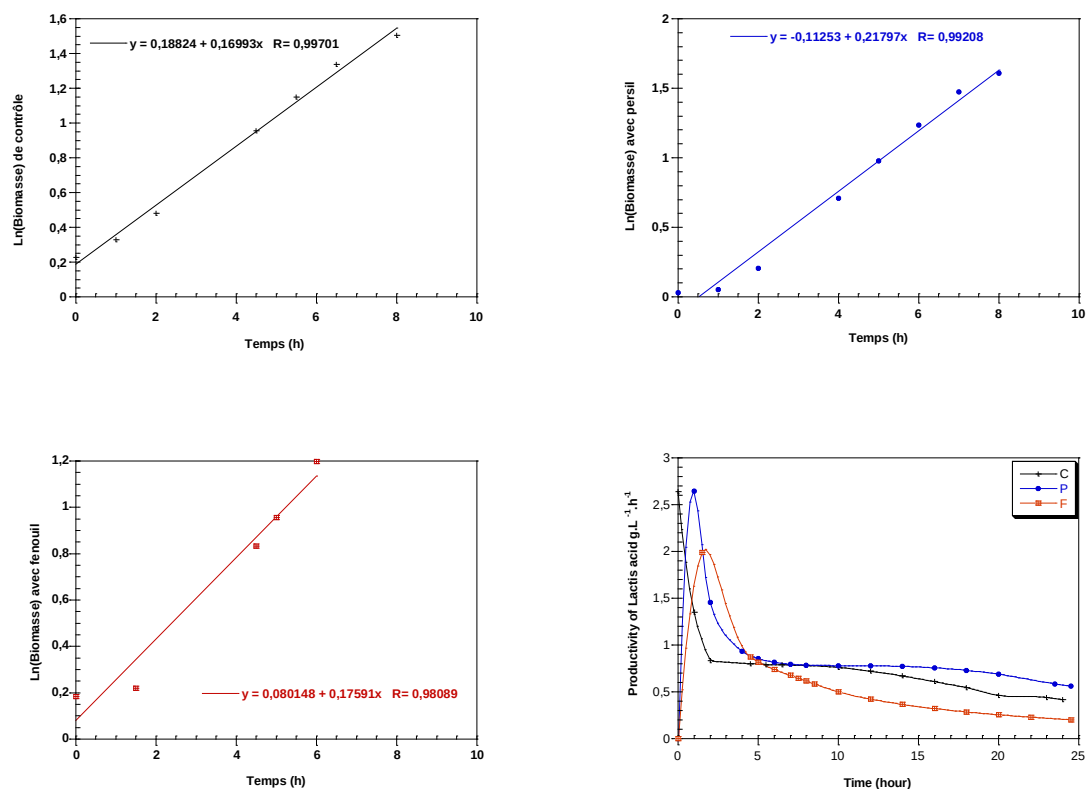


Figure II'-8 : Vitesses spécifiques maximales de croissance $\mu_{\max}$ (pentes) et productivité en acide lactique des trois fermentations discontinues

Les paramètres cinétiques des trois fermentations discontinues sont regroupées dans le tableau II'-1.

Tableau II'-1 : Paramètres cinétiques des trois fermentations discontinues

Fermentations Paramètres	Contrôle	20 μ L d'H.E de persil	20 μ L d'H.E de fenouil
Biomasse max (g.L ⁻¹)	4,57	5,51	0,98
Acide lactique max (g.L ⁻¹)	10,96	13,78	5,14
Glucose résiduel (g.L ⁻¹)	0,008	0,007	12,33
$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	0,17	0,22	0,17
Qs.max (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	1,56	1,50	0,73
Πp .max (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	0,61	0,61	0,29
Yx/s (g.g ⁻¹)	0,84	0,41	0,54
Yp/s (g.g ⁻¹)	0,71	0,87	0,47
Productivité en acide lactique (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	2,64	2,64	1,98

$\mu_{\max}$: vitesse spécifique maximale de croissance; **Qs.max** : vitesse spécifique maximale de consommation des sucres; **Πp .max** : vitesse spécifique maximale de production d'acide lactique; **Yx/s** : rendement de conversion des sucres en biomasse; **Yp/s** : rendement de conversion des sucres en acide lactique.

Les vitesses spécifiques maximales de consommations des sucres $Q_{s,max}$ sont de l'ordre de $1,5 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour les deux premières cultures et descendent jusqu'à $0,73 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour la troisième fermentation. La vitesse spécifique maximale de production d'acide lactique $\Pi_{p,max}$ est pratiquement identique entre la culture contrôle et celle avec l'H.E de persil de l'ordre de 0,61, par contre elle diminue considérablement dans la culture additionnée avec l'essence de fenouil jusqu'à $0,29 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Figure II'-7, Tableau II'-1).

La productivité en acide lactique est identique pour les deux premières cultures de l'ordre de $2,64 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ mais elle est plus faible lors de la troisième fermentation $1,98 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Figure II'-8, Tableau II'-1).

Pour l'essai contrôle, le rendement de conversion des sucres en biomasse est de $0,84 \text{ g.g}^{-1}$ et en acide lactique $0,71 \text{ g.g}^{-1}$. Il semble que la majorité des sucres sont utilisés pour la maintenance et la multiplication cellulaire et la partie restante pour la production de l'acide lactique. L'arrêt de la consommation des sucres et de la multiplication de *Lactobacillus rhamnosus* dans la culture additionnée à l'essence de fenouil explique les faibles rendements obtenus en acide lactique ($0,47 \text{ g.g}^{-1}$). L'ajout de l'H.E de persil à la culture stimule la production de l'acide lactique avec un rendement de conversion de $0,87 \text{ (g.g}^{-1})$.

4.3. Résultats de l'effet des H.Es des graines de fenouil et de persil sur la qualité du yaourt étuvé

4.3.1. Résultats des analyses de la matière première

4.3.1.1. Poudre de lait

Le tableau II'-2 présente les résultats des analyses physico-chimiques et biochimiques de la poudre de lait utilisée pour la fabrication du yaourt. D'après nos résultats, on constate une conformité parfaite de la qualité de la poudre de lait avec les normes¹⁵⁶.

Tableau II'-2 : Résultats des analyses physico-chimiques et biochimiques de la poudre de lait

Echantillons	1	2	3	4	5	Moyenne	Norme
% d'humidité	3,2	2,9	2,9	3,3	2,7	3	2-4
% de MG	1,2	1,25	1,19	1,23	1,25	1,22	0,6-1,25
Acidité en °D	12,5	16,5	15	14,5	14,5	14,5	15,5
pH	6,48	6,58	6,52	6,57	6,57	6,55	6,5-6,6
Protéines en g/L	26,9	27,1	28,3	26,7	27	27	27-29
EST en %	95	96	97	95,8	96,2	96	96-100

¹⁵⁶Luquet, F. M. «Lait et produits laitiers : vache, brebis et chèvre», Ed. Lavoisier, Techniques et Documentation-APRIANParis 1985.

4.3.1.2. Lait pasteurisé

Les résultats des analyses physico-chimiques et biochimiques du lait pasteurisé partiellement écrémé sont reportés dans le tableau II'-3.

Tableau II'-3 : Résultats des analyses physico-chimiques et biochimiques du lait pasteurisé partiellement écrémé

Critères	Lait pasteurisé	Norme (JO n°35)
pH	6,52	6,5-6,7
Acidité en °D	17	15-18
MG en g/L	15	15-20
Densité	1,030	1,030
EST en %	2,95	-

Selon les résultats affichés dans le tableau II'-3, on remarque la conformité de la qualité du lait pasteurisé avec les normes.

4.3.2. Résultats des analyses physico-chimiques et biochimiques du yaourt

4.3.2.1. Acidité titrable

La mesure de l'acidité a été effectuée au cours de l'étuvage (incubation à 45°C) et au cours du stockage du yaourt (Figures II'-9 et II'-10).

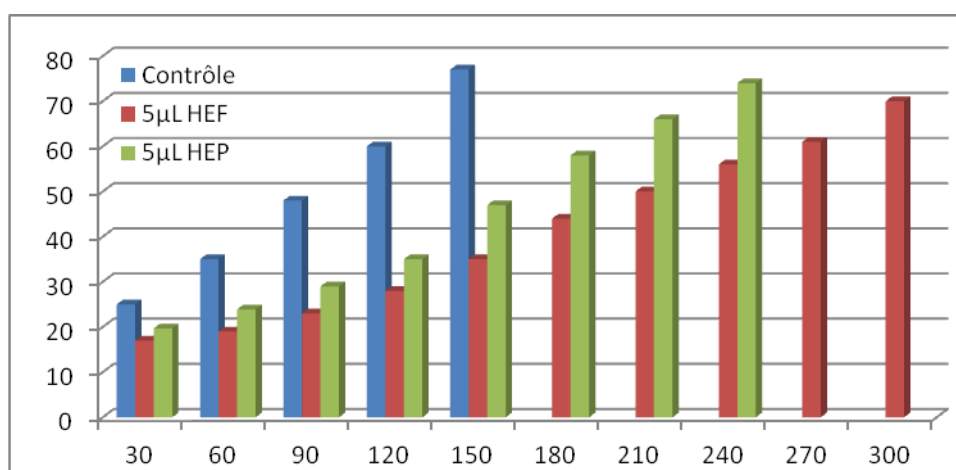


Figure II'-9 : Evolution de l'acidité titrable au cours de l'incubation des yaourts (contrôle, avec 5 µL d'H.E de fenouil et 5 µL d'H.E de persil)

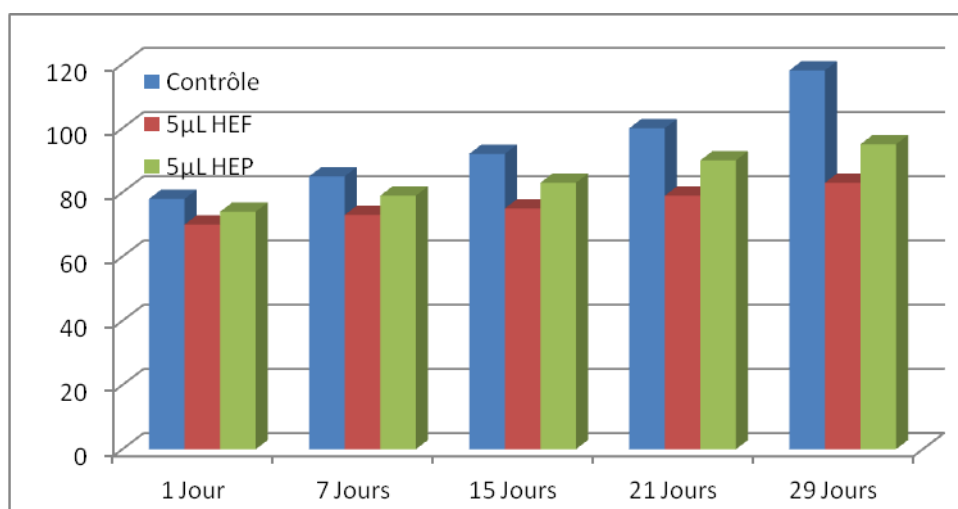


Figure II'-10 : Evolution de l'acidité titrable au cours du stockage des yaourts (contrôle, avec 5 µL d'H.E de fenouil et 5 µL d'H.E de persil)

Pour le yaourt contrôle (sans H.Es), l'acidité augmente au cours de la durée d'incubation et atteint la valeur demandée (77°D) au bout de 2,5 heures d'étuvage suite à la dégradation du lactose du lait et à la production d'acide lactique par les ferments.

En présence de 5 µL d'H.E de fenouil, l'incubation a duré 5 heures pour atteindre une acidité de 70°D alors qu'en présence de 5 µL d'H.E de persil, l'incubation est de 4 heures pour atteindre une acidité de 74°D. Il semble que l'ajout de 5µL d'H.Es a une influence sur l'activité des ferments lactiques; ce qui provoque une augmentation de la durée d'incubation. Cet effet est plus marqué pour le yaourt à H.E de fenouil.

L'ajout de ces huiles est difficile après l'incubation à cause de la texture ferme qui se développe suite à l'activité des ferments rendant difficile la diffusion homogène de ces essences à l'intérieur du yaourt (Figure II'-9).

Au cours du stockage des yaourts, l'acidité du contrôle augmente progressivement pour atteindre une valeur de 118°D au bout de 29 jours de stockage (rendant le produit très acide), alors que l'ajout d'H.Es de fenouil et de persil aux yaourts provoque une certaine stabilité de l'acidité de 83 et 95°D respectivement, après 29 jours de stockage (Figure II'-10).

4.3.2.2. pH

Le pH du contrôle diminue au cours de la durée du stockage suite à l'acidification du produit par l'acide lactique. La faible acidité produite par les ferments dans le cas des yaourts aux H.Es justifie les valeurs élevées du pH comparées au témoin (Figure II'-11).



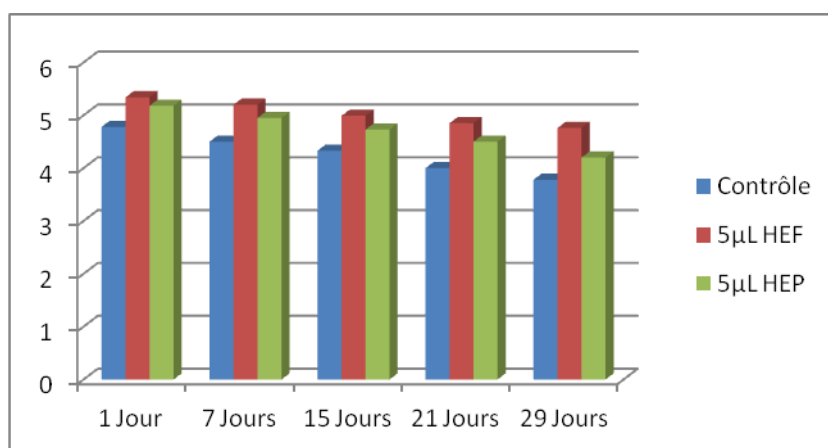


Figure II'-11 : Evolution du pH au cours du stockage des yaourts étuvés

Selon Luquet¹⁵⁶, le pH du yaourt doit être dans l'intervalle de 4 à 5. Les valeurs obtenues montrent que le yaourt contrôle est très acide, après 29 jours de stockage (3,78) comparé aux yaourts aux H.Es de fenouil et de persil qui affichent des valeurs de pH de 4,76 et 4,2 respectivement, après 29 jours de stockage.

4.3.2.3. Extrait Sec Total (EST)

L'extrait sec total ou la matière sèche est représenté principalement par les protéines, les sucres, les sels minéraux, les matières grasses et les vitamines du yaourt. La diminution du taux de l'EST est proportionnelle à la durée de stockage à cause de l'utilisation de ces éléments nutritifs par les ferments et les microorganismes. Après 29 jours de stockage, le taux de la matière sèche arrive à une valeur de 4% pour le yaourt contrôle, 12% pour le yaourt additionné d'H.E de fenouil et 9,2% pour le yaourt à l'H.E de persil (Figure II'-12). La présence des H.Es dans le yaourt semble préserver la matière sèche du yaourt et donc sa valeur nutritive.

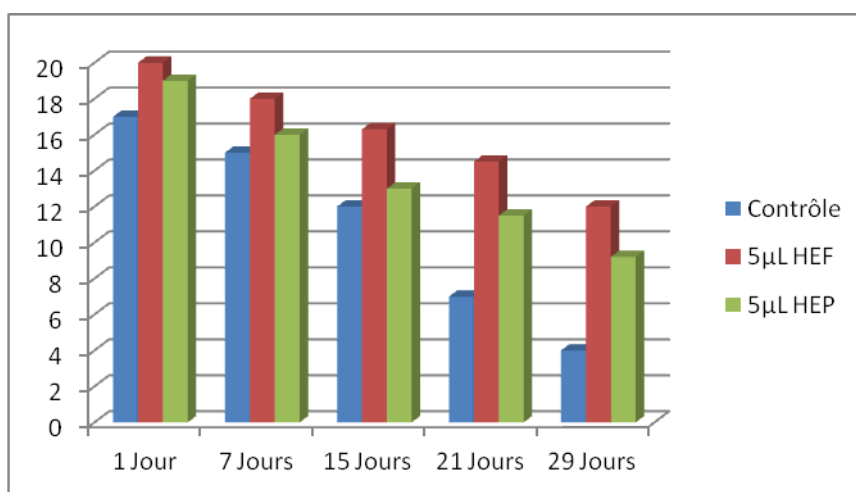


Figure II'-12 : Evolution de l'extrait sec total en % au cours du stockage des yaourts étuvés

4.3.2.4. Taux de protéines

Les protéines sont des substances azotées utilisées par les ferments lactiques et les microorganismes pour leur croissance et leur multiplication. Au cours de la durée de stockage, le taux de protéines diminue progressivement au bout de la 3^{ème} semaine de conservation (il passe de 4,4% le premier jour à 3,6% pendant la troisième semaine) et rapidement lors de la quatrième semaine de stockage (1,05%), suite au développement intense des microorganismes et des ferments lactiques (Figure II'-13). Les yaourts aux H.Es de fenouil et de persil préservent leurs qualités nutritionnelles même après 29 jours de stockage (taux de protéines est de 4,2 et 4% respectivement).

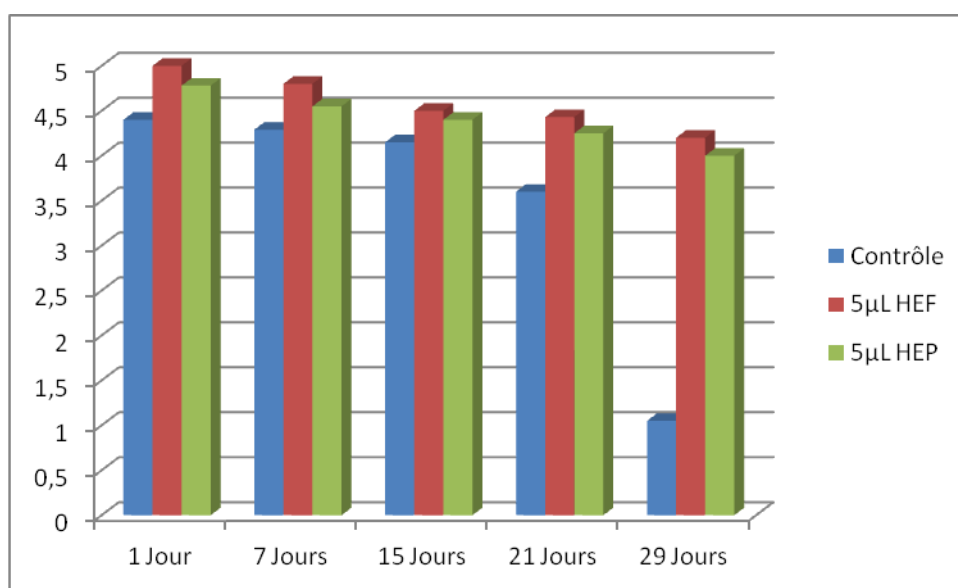


Figure II'-13 : Evolution du taux de protéines en % au cours du stockage des yaourts étuvés

4.3.2.5. Taux de cendres

Le taux de cendres diminue progressivement au cours du stockage du yaourt contrôle et atteint après 29 jours de conservation une valeur de 0,4% alors que les yaourts aux H.Es affichent une très légère diminution avec un taux de sels minéraux après 29 jours de l'ordre de 1,14% pour le yaourt à H.E de fenouil et 1,02% pour celui additionné à l'H.E de persil (Figure II'-14).

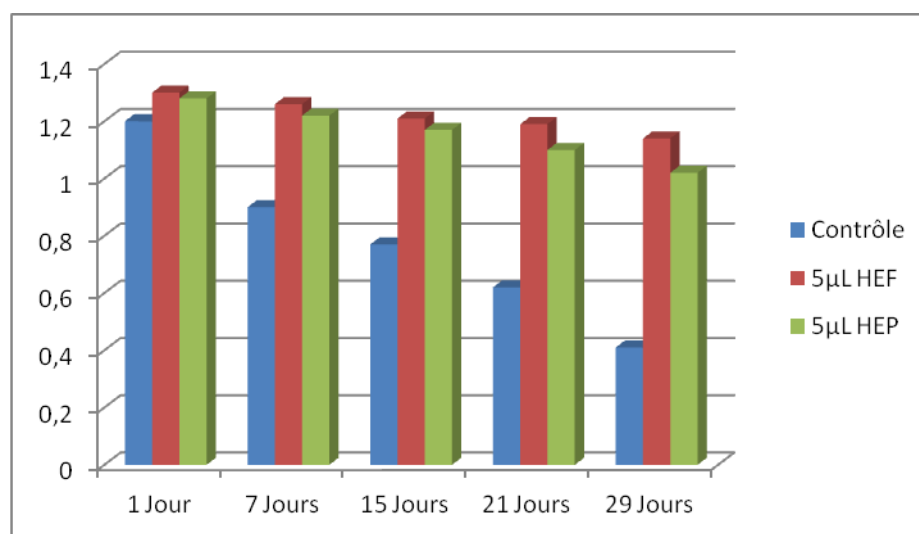


Figure II'-14 : Evolution du taux de cendres en % au cours du stockage des yaourts étuvés

4.3.2.6. Taux de sucres

Le saccharose utilisé pour la fabrication du yaourt ainsi que le sucre du lait (lactose) sont utilisés par les ferments lactiques et par les microorganismes au cours de la durée de stockage. Le yaourt témoin est marqué par une diminution de la quantité de sucres de 130 g/L le premier jour de fabrication jusqu'à 42 g/L, après 29 jours de stockage. Cette diminution de la quantité de sucre altère la qualité nutritionnelle du yaourt étuvé. Les yaourts aux H.Es de fenouil et de persil préservent leur qualité nutritionnelle où la quantité de sucres résiduels après 29 jours de conservation est de 118 g/L pour le yaourt à H.E de fenouil et 94 g/L pour celui additionné à l'H.E de persil (Figure II'-15).

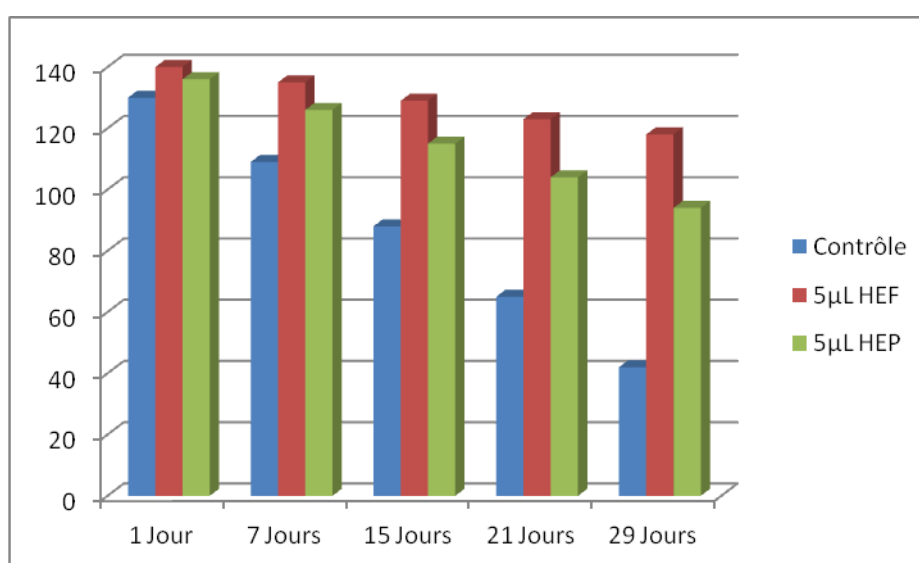


Figure II'-15 : Evolution du taux de sucres en g/L au cours du stockage des yaourts étuvés

4.3.2.7. Taux de matières grasses

D'après les résultats obtenus, on remarque une très légère variation de la matière grasse du yaourt contrôle avec la durée de stockage (14,2 g/L après 29 jours de conservation) contrairement au yaourt à l'H.E de fenouil où il ne reste que des traces le dernier jour de stockage. Pour le yaourt à l'H.E de persil, le taux de matière grasse au dernier jour de conservation reste faible par rapport au témoin (5 g/L).

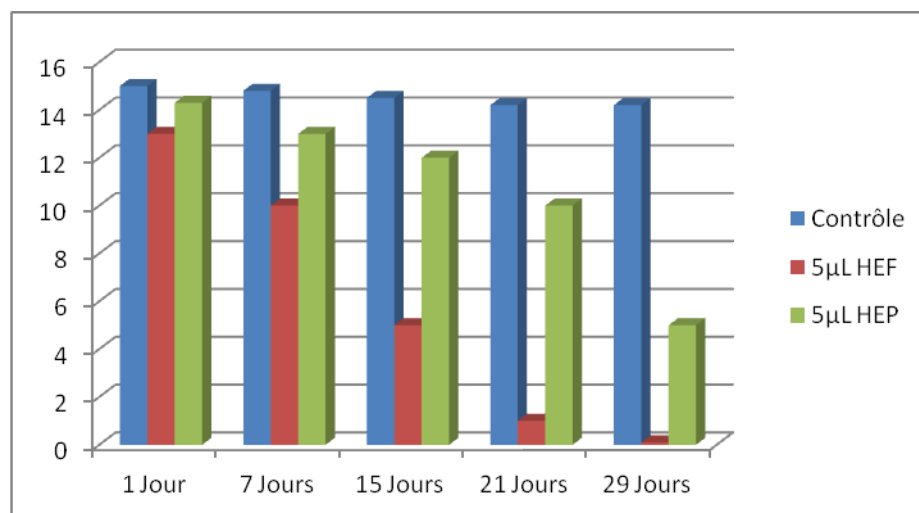


Figure II'-16 : Evolution du taux de matière grasse en g/L au cours du stockage des yaourts étuvés

4.3.3. Résultats des analyses microbiologiques

4.3.3.1. Résultats des analyses microbiologiques des matières premières

Les résultats des analyses microbiologiques des matières premières utilisées dans la fabrication du yaourt étuvé sont rassemblés dans le tableau II'-4.

Tableau II'-4 : Résultats des analyses microbiologiques des matières premières utilisées dans la fabrication du yaourt étuvé

Matières premières Germes	Poudre de lait	Normes	Lait pasteurisé	Normes	Sucres	Normes
Coliformes totaux	1	< 5 germes/g	0	1	0	0
Coliformes fécaux	0	Abs	Abs	Abs	0	Abs
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	Abs	Abs	0	Abs
Streptocoques fécaux	-	-	Abs	1	0	Abs
<i>Clostridium sulfito</i> réducteur	0	Abs	Abs	Abs	0	1
Levures et moisissures	12	50	Abs	-	1	1
Salmonelles	Abs	Abs	-	-	-	-

D'après les résultats obtenus il semble que les matières premières utilisées dans la fabrication du yaourt étuvé sont de bonne qualité microbiologique et hygiénique.

4.3.3.2. Résultats des analyses microbiologiques des yaourts étuvés

Nos analyses microbiologiques indiquent une absence totale des coliformes totaux et fécaux, des *staphylococcus aureus*, des streptocoques fécaux et des salmonelles dans tous les types de yaourt et durant toute la durée de stockage. Cette absence peut être expliquée par le respect des conditions d'hygiène, l'efficacité des traitements thermiques et l'activité acidifiante des ferments lactiques qui inhibe la prolifération de ces germes.

Concernant les levures et les moisissures, on note une apparition de ces micro-organismes la première semaine de stockage (2 germes/mL), puis ce nombre augmente jusqu'à 5 levures/mL lors de la dernière semaine de stockage pour le yaourt étuvé contrôle. Les yaourts aux H.Es de persil et de fenouil sont marqués par une absence totale de ces micro-organismes tout au long de la durée de stockage.

4.3.3.3. Résultats du dénombrement des ferments lactiques (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) au cours de la durée de stockage des yaourts étuvés

La figure II'-17 montre que le logarithme du nombre de *Streptococcus thermophilus* reste stable pour le yaourt contrôle autour de 8 puis diminue rapidement lors de la dernière semaine de stockage jusqu'à 6. Cette diminution peut être expliquée par l'inhibition de la croissance de *Streptococcus thermophilus* par sa propre acidité.

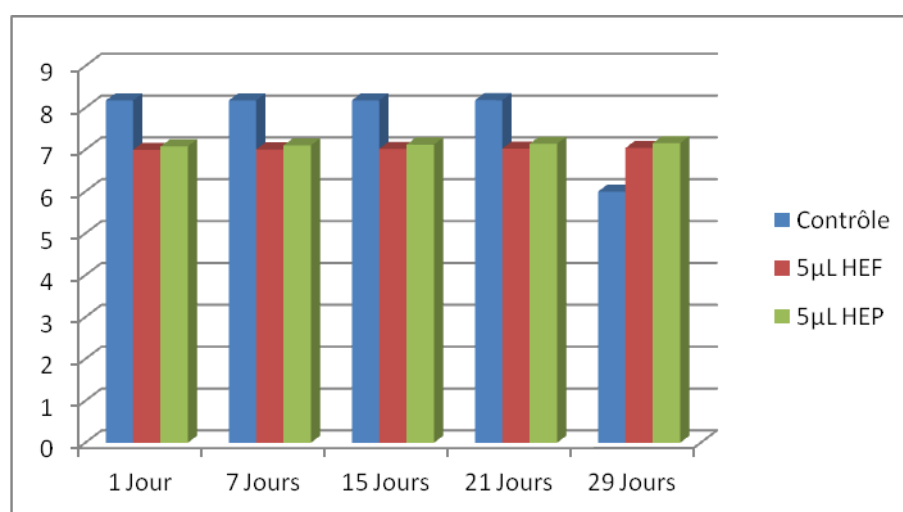


Figure II'-17 : Evolution logarithmique du nombre de *Streptococcus thermophilus* au cours du stockage des yaourts étuvés

Pour les yaourts aux H.Es de fenouil et de persil, on observe une stabilité de la quantité de *Streptococcus thermophilus* à une valeur logarithmique de 7 tout au long de la durée de stockage.

Concernant les *Lactobacillus bulgaricus*, une stabilité de la quantité de ce germe pour le yaourt contrôle autour d'une valeur logarithmique de 8 a été observée durant les trois semaines de stockage, puis cette valeur diminue jusqu'à 6 après la quatrième semaine de conservation. Une certaine stabilité de la quantité de *Lactobacillus bulgaricus* à une valeur logarithmique de 7 est observée tout au long de la durée de stockage pour les yaourts aux H.Es de fenouil et de persil (Figure II'-18).

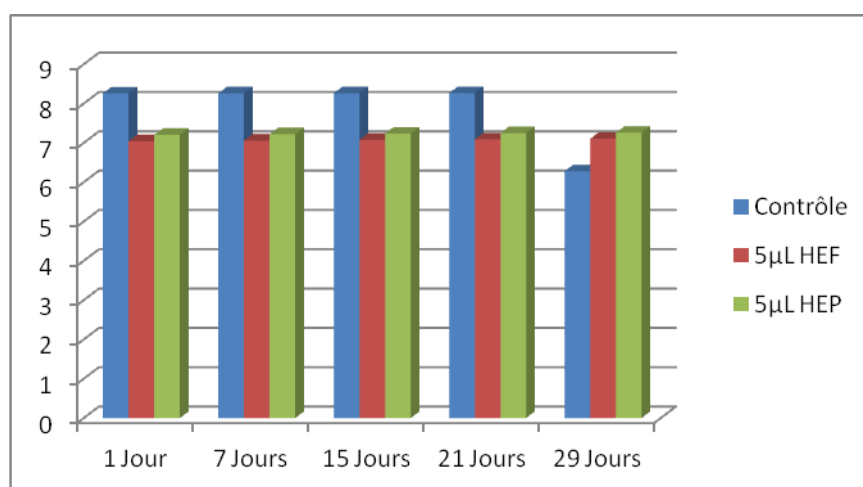


Figure II'-18 : Evolution logarithmique du nombre de *Lactobacillus bulgaricus* au cours du stockage des yaourts étuvés

Le rapport de la quantité de *Lb.bulgaricus*/*St.thermophilus* est de 1,20 lors des trois premières semaines de stockage pour le yaourt contrôle, puis augmente jusqu'à 1,9 après 29 jours de conservation. L'augmentation de ce rapport est due à l'inhibition de la croissance de *Streptococcus thermophilus* par la forte acidité produite et son remplacement par *Lactobacillus bulgaricus* qui produit et supporte davantage d'acidité. Cette forte acidité altère la qualité organoleptique et nutritionnelle du yaourt contrôle lors de la dernière semaine de stockage, ce qui le rend impropre à la consommation humaine.

Pour le yaourt additionné avec 5 µL d'H.E de fenouil, ce rapport est faible dès le premier jour de fabrication (1,1), puis augmente légèrement au cours du stockage jusqu'à un rapport de 1,15 le 29^{ème} jour de conservation, rendant le yaourt toujours propre à la consommation. Le yaourt enrichi avec 5 µL d'H.E de persil est marqué par un rapport *Lb.bulgaricus*/*St.thermophilus* de 1,33 le premier jour de fabrication, puis ce rapport diminue légèrement et arrive à une valeur de 1,26 à la fin de la durée de conservation rendant le yaourt toujours propre à la consommation humaine (Figure II'-19).

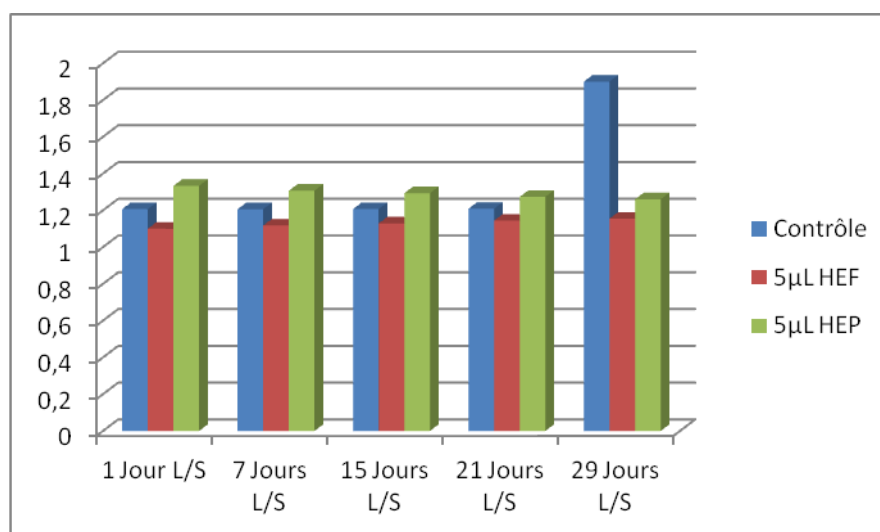


Figure II'-19 : Evolution du rapport de (*Lb. bulgaricus*/*St. thermophilus*) au cours du stockage des yaourts étuvés

Les valeurs du rapport *Lb. bulgaricus* / *St. thermophilus* au cours du stockage des yaourts étuvés pour le yaourt contrôle et les yaourts enrichis avec les H.Es de fenouil et de persil sont reportées sur le tableau II'-5.

Tableau II'-5 : Rapport *Lb. bulgaricus* / *St. thermophilus* au cours du stockage des yaourts étuvés

	1 Jour	7 Jours	15 Jours	21 Jours	29 Jours
Contrôle	1,20666667	1,20609675	1,20685112	1,20852459	1,9
5µL HEF	1,1	1,11764706	1,12857143	1,14392523	1,15454545
5µL HEP	1,33333333	1,30708661	1,29323308	1,27338129	1,26041667

4.3.4. Résultats des analyses sensorielles

Les analyses sensorielles sont effectuées sur les yaourts conservés pendant 3 semaines car le yaourt contrôle est impropre à la consommation lors de la quatrième semaine de stockage. Les épreuves de notation sont effectuées sur l'*acidité*, le *goût* et la *texture* des yaourts. L'échelle de notation utilisée pour l'évaluation sensorielle de l'acidité, le goût et la texture est le suivant : 1 : Non appréciable; 3 : Appréciable; 5 : Très bon.

4.3.4.1. Epreuve de notation sur l'acidité

Les résultats de l'épreuve de notation effectuée sur l'*acidité* des yaourts sont donnés sur le tableau II'-6.

Tableau II'-6 : Epreuve de notation sur l'acidité des yaourts

Sujets \ Yaourts	Contrôle	5µL HEF	5µL HEP
1	1	5	3
2	1	5	1
3	3	5	3
4	1	3	3
5	3	5	1
6	3	5	1
7	3	5	1
8	3	3	3
9	3	5	1
10	1	5	1
Totale	22	46	18
Moyenne	2,2	4,6	1,8

D'après les résultats affichés dans le tableau II'-6, le yaourt additionné avec 5 µL d'H.E de fenouil est le mieux apprécié par les membres du jury de dégustation et présente la meilleure acidité avec une moyenne de 4,6 suivi par le yaourt contrôle puis celui au persil avec des moyennes de 2,2 et 1,8, respectivement.

4.3.4.2. Epreuve de notation sur le goût

Les résultats de l'épreuve de notation effectuée sur le goût des yaourts sont présentés dans le tableau II'-7

Tableau II'-7 : Epreuve de notation sur le goût des yaourts

Sujets	Contrôle	5µL HEF	5µL HEP
1	5	5	1
2	3	5	1
3	3	5	1
4	5	5	1
5	5	5	1
6	3	5	1
7	3	5	1
8	3	5	1
9	3	5	1
10	3	5	1
Totale	36	50	10
Moyenne	3,6	5	1

À l'unanimité, les membres du jury ont désigné le yaourt à 5 μ L d'H.E de fenouil comme étant le yaourt au meilleur goût avec une moyenne de 5, suivi par le yaourt contrôle (3,6) puis le yaourt à 5 μ L de persil (1). Les dégustateurs n'ont pas apprécié l'acidité et le goût du yaourt à l'H.E de persil. Le goût du yaourt provient des arômes produits par les ferments lactiques lors de l'étuvage et le stockage principalement des diacétyles et de l'acide butyrique.

4.3.4.3. Epreuve de notation sur la texture

Les résultats de l'épreuve de notation effectuée sur *la texture* des yaourts, sont reportés sur le tableau II'-8.

Tableau II'-8 : Epreuve de notation sur la texture des yaourts

Sujets	Contrôle	5 μ L HEF	5 μ L HEP
1	1	5	3
2	1	5	3
3	3	5	3
4	3	5	1
5	3	5	3
6	3	5	1
7	3	5	1
8	3	3	3
9	3	5	3
10	3	3	1
Totale	26	46	22
Moyenne	2,6	4,6	2,2

D'après les membres du panel, la texture ferme du yaourt étuvé enrichi avec 5 μ L d'H.E de fenouil est la mieux appréciée avec une moyenne de 4,6, suivi par le yaourt contrôle (2,6) et le yaourt à 5 μ L d'H.E de persil avec une moyenne de notation de 2,2.

Il ressort de cette étude que le yaourt étuvé enrichi avec l'H.E de fenouil est le mieux apprécié que celui du persil.

5. Conclusion

Les résultats de l'effet de l'ajout des H.Es des graines de fenouil et de persil sur l'activité acidifiante des bactéries lactiques indiquent clairement l'effet inhibiteur de l'H.E de fenouil même à faibles doses 5 μ L sur la cinétique de croissance et d'acidification de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus*. Mais aucun effet inhibiteur de 5 μ L d'H.E de persil sur ces deux souches n'a été observé. Les mêmes résultats sont obtenus pour les fermentations réalisées par *Lactobacillus rhamnosus* en présence de 20 μ L des deux H.Es testées.

Pour l'effet de ces huiles sur la qualité du yaourt étuvé, il a été enregistré une prolongation de la durée d'incubation : 2,5h pour le contrôle sans huile, 5h en présence de 5µL d'H.E de fenouil et 4h pour celui avec 5µL d'H.E de persil.

Par ailleurs, l'ajout des H.Es de fenouil et de persil a stabilisé la qualité microbiologique et nutritionnelle du yaourt; ce qui rallonge sa durée de conservation. Les analyses sensorielles réalisées sur *l'acidité, le goût et la texture* optent surtout pour le yaourt enrichi avec 5µL d'H.E de fenouil.

Chapitre 3'

*Effet antioxydant des huiles
essentielles extraites*

1. Introduction

L'oxygène, élément gazeux de la seizième colonne de la classification périodique des éléments est indispensable à la vie. Néanmoins, c'est une source d'agression pour les êtres vivants. En effet, une petite partie de l'oxygène est transformée en radicaux libres tels que le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet et les radicaux hydroxyles ($OH^{\bullet}$), collectivement connus sous le nom d'oxygène actif ou encore appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO)¹⁵⁷.

Les produits agroalimentaires, riches en fraction lipidique, sont susceptibles de subir des transformations chimiques et des dégradations (oxydation et rancissement des graisses et des vitamines, hydrolyse et polymérisation non contrôlée, modification de textures et perte des propriétés organoleptiques ou nutritionnelles) sous l'influence de différents paramètres, entre autre l'oxygène. Ces phénomènes sont réduits ou empêchés par l'ajout d'antioxydants synthétiques. Mais ces additifs engendrent des effets secondaires.

Plusieurs travaux ont été réalisés pour isoler des composés naturels en remplacement des produits chimiques pour protéger la qualité des produits alimentaires et la santé des consommateurs.

Actuellement, les H.Es et leurs constituants représentent un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires. Ils s'avèrent un choix pertinent à la nécessité de réduire ou de remplacer les agents de conservation. Cependant, le recours aux H.Es nécessite de connaître le seuil de leur efficacité afin de mieux cerner leur activité pour éviter qu'elles soient toxiques pour l'homme.

Ce chapitre est consacré à un bref rappel bibliographique sur les antioxydants et l'évaluation du pouvoir antioxydant des H.Es de coriandre, de fenouil et de persil.

2. Etude bibliographique

2.1. Les Antioxydants

2.1.1. Historique

À l'origine, le terme antioxydant était utilisé pour désigner les substances chimiques qui empêchent les réactions avec l'oxygène. Ce n'est qu'à la fin du XIX^{ème} siècle et au début du XX^{ème} siècle que les propriétés des antioxydants ont été largement étudiées pour leur utilisation dans les procédés industriels afin de réduire par exemple, la vulcanisation du caoutchouc et la polymérisation des carburants dans les moteurs à explosion.

¹⁵⁷ Boyd, B.; Ford, C.; Koepke- Michael, C.; Gary, K.; Horn, E.; McAnalley, S.; McAnalley, B. *GlycoScience & Nutrition* **2003**, 4(6),7.

En biologie, les premières recherches sur les antioxydants ont porté sur la réduction de l'oxydation des acides gras insaturés. Dans ce cas, l'activité antioxydante a été facilement mesurée en enfermant des corps gras dans des récipients hermétiques avec de l'oxygène, et en vérifiant le taux d'absorption de ces derniers. Cependant, ce n'est qu'avec l'identification des vitamines A, C et E qu'est apparue l'importance des antioxydants dans la biochimie des organismes vivants.

En effet, l'action de la vitamine E dans la limitation de l'oxydation des lipides a démontré son rôle dans l'élimination des molécules contenant un atome d'oxygène actif avant qu'elles n'attaquent les cellules.

2.1.2. Définition

Du point de vue biologique, les antioxydants sont toute substance présente à concentration faible par rapport à celle du substrat oxydable et qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques.

Un antioxydant alimentaire idéal doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose et non toxique, n'entraînant ni coloration ni odeur, ni saveur indésirable, résistant aux processus technologiques et stable dans le produit fini¹⁵⁸.

2.1.3. Caractéristiques des antioxydants

Un composé est considéré antioxydant *in vivo*, lorsqu'il requière les propriétés suivantes :

- ❖ Le produit de la réaction de l'antioxydant avec l'oxydant ne doit pas être toxique pour l'organisme.
- ❖ L'antioxydant doit être présent dans l'organisme en concentration suffisante;
- ❖ La demi-vie de l'antioxydant doit être suffisamment longue pour réagir avec l'oxydant.

Les antioxydants peuvent jouer leur rôle à différents niveaux du processus oxydatif en neutralisant les radicaux initiateurs et les radicaux peroxydes, en liant les ions métalliques et en éliminant les biomolécules endommagées par oxydation, ainsi que d'autres types de réactions.

2.1.4. Principaux antioxydants et leurs caractéristiques

Les antioxydants existent sous deux types : les antioxydants non enzymatiques et les antioxydants de nature enzymatique.

¹⁵⁸Pokorný, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. «Antioxydants in Food , Pratical Applications», Wood head Publishing limited. CRC Press. Cambridge Angleterre2001.

2.1.4.1. Antioxydants enzymatiques¹⁵⁹

Parmi les antioxydants de nature enzymatique les plus courants, on peut citer : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la thiorédoxine (TRX) et la glutathion peroxydase.

2.1.4.2. Antioxydants non enzymatiques

Le deuxième type d'antioxydants comprend des :

- ❖ Antioxydants moléculaires liposolubles comme les caroténoïdes, la vitamine E qui agissant au niveau des membranes et des lipoprotéines circulantes;
- ❖ Antioxydants hydrosolubles comme les protéines, l'acide urique et les polyphénols qui assurent une protection des milieux intra et extracellulaire.

2.1.4.3. Antioxydants naturels dans les fruits et légumes

Les fruits et les légumes contribuent largement à l'équilibre hydrique, vitaminique et minéral de l'alimentation. Leur composition peut être très différente, puisqu'ils peuvent provenir de toutes les parties de la plante : bourgeons, bulbes, racines.

Pour expliquer les bienfaits des fruits et des légumes sur la santé, des mécanismes mettent en jeu les propriétés suivantes :

- ❖ Propriétés antioxydantes (vitamines, polyphénols);
- ❖ Régulation des enzymes de détoxification (antioxydants);
- ❖ Inhibition de la formation de composés cancérogènes (fibres);
- ❖ Effet spécifique de nature immunitaire (composé phénolique);
- ❖ Action mécanique sur le tractus digestif (fibres).

2.1.4.4. Antioxydants de synthèse et antioxydants naturels

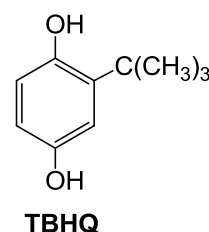
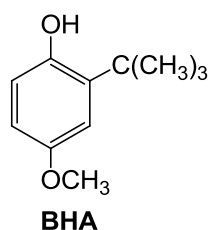
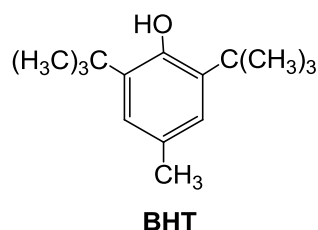
De nombreuses molécules naturelles ou de synthèse sont dotées de propriétés antioxydantes antiradicalaires ou préventives pour leur utilisation dans les produits alimentaires. Le choix se porte sur des produits présentant, les caractères suivants :

- ❖ Dépourvus de toxicité;
- ❖ Sans odeur, saveur, ni couleur;
- ❖ Efficaces à faible concentration;
- ❖ Faciles à incorporer;
- ❖ Résistants aux traitements thermiques;
- ❖ Disponibles à bas prix.

¹⁵⁹ a) Ahmad, S. «*Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*», 1st Ed. Chapman & Hall. New York, 1995, 1-457; b) Matés, J. M.; Pérez-Gómez, C.; Núñez de Castro, I. *Clin. Biochem.* **1999**, 32(8), 595-603.

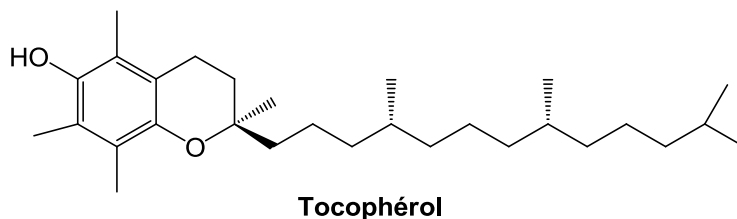
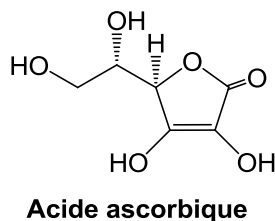
Les additifs antioxygènes les plus utilisés à travers le monde sont les :

- ❖ Produits de synthèse : le **BHA**, le **BHT**, les gallates et la **TBHQ**.



A noter que les antioxydants de synthèse sont efficaces, mais leurs doses autorisées sont largement limitées pour éviter tout problème de toxicité.

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



2.1.5. Additifs antioxydants

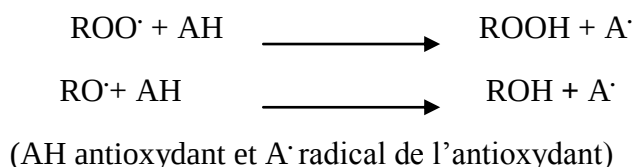
Les réactions radicalaires se déroulent en trois phases : une réaction d'initiation, de propagation des radicaux et une phase de terminaison. Le rôle d'un antioxydant est d'éviter la phase de propagation^{159b} et de limiter l'oxydation qui se traduit pour les fruits et les légumes par un brunissement et pour les corps gras par un rancissement. Quelques additifs antioxydants sont donnés ci-après :

- ❖ Acide ascorbique : ses sels de sodium et de calcium et son dérivé le palmitate d'ascorbyle;
- ❖
- ❖ Tocophérols : ils existent sous forme d'extraits naturels ou préparés par synthèse, ils sont ajoutés aux matières grasses industrielles qu'ils protègent de l'oxydation;
- ❖
- ❖ Antioxygènes phénoliques : ils sont ajoutés aux corps gras alimentaires et dans de nombreux corps gras déshydratés.

Les antioxydants sont classés en trois types en fonction de leurs mécanismes d'action : *antioxydants de type I*, *antioxydants de type II* et *antioxydants de type III*.

2.1.5.1. Les antioxydants de type I

L'action des antioxydants de type I repose sur leur capacité à inactiver les radicaux libres. Ils inhibent la propagation des réactions radicalaires en fournissant des hydrogènes aux radicaux libres présents.



Les radicaux A· sont stables et ne possèdent pas l'énergie suffisante pour arracher un hydrogène aux lipides, la propagation s'arrête alors. Les composés phénoliques naturels : tocophérols ou de synthèse : *butyl hydroxy toluène* (BHT), *gallate de propyl* appartiennent à cette classe d'antioxydants.

2.1.5.2. Les antioxydants de type II

Ce type d'antioxydant prévient la formation des radicaux libres et peut intervenir par différents mécanismes. Certains chélatent les ions métalliques réduisant ainsi l'effet pro-oxydant des ions, c'est le cas des *acides phosphoriques et citriques*.

2.1.5.3. Les antioxydants de type III

Ces antioxydants regroupent les facteurs de l'environnement qui ont une action antioxydante en agissant sur le potentiel red-ox du milieu, la température, la pression en oxygène, la lumière. L'emballage des produits permet ainsi de minimiser l'exposition à l'air et à la lumière. La mise sous vide permet de limiter les réactions d'oxydation et donc de prolonger la durée de vie des produits.

2.1.5.4. Les agents synergiques

Ce sont des molécules qui améliorent l'action de certains antioxydants ce qui se traduit souvent par un accroissement de la période de protection, parmi elles se trouvent : les acides lactique, tartrique et *orthophosphorique* et leurs sels de sodium, potassium ou calcium. L'efficacité des antioxydants peut être augmentée par l'utilisation d'un mélange d'antioxydant de type I et II. L'association de ces deux types d'antioxydants permet d'inhiber les phases d'initiation et de propagation de l'oxydation des lipides.

2.1.5.5. Autres types d'antioxydants

Certains composés protéiques possèdent une activité antioxydante. C'est le cas par exemple de la *carnosine*, des concentrés protéiques obtenus à partir du lait. Ces antioxydants

sont susceptibles de complexer le fer. De plus, ils contiennent des composés polyphénoliques et des flavonoïdes présentant une activité antioxydante¹⁶⁰

2.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des H.Es sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général la *coloration* ou la *décoloration* d'un réactif spécifique en présence d'agent antioxydant (H.E). Selon la bibliographie, les méthodes les plus utilisées sont celles de la *réduction du 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH•)*, de l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique¹⁶¹, du blanchiment du β -carotène dans l'acide linoléique et de la chélation des métaux¹⁶².

3. Matériel et méthodes

3.1. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH•. Le pouvoir antioxydant des H.Es testées a été estimé par comparaison avec un antioxydant naturel très puissant (acide ascorbique). Une série de dilution de chaque essence a été préparée pour évaluer l'activité antioxydante. Le méthanol a été utilisé pour solubiliser et diluer les H.Es. Les concentrations d'H.Es et d'acide ascorbique allant de 0,0051 à 23000 $\mu\text{g/mL}$ ont été testées.

3.2. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH•

3.2.1. Principe : Le potentiel anti-radicalaire d'une substance peut être évalué à l'aide d'une méthode colorimétrique en utilisant des radicaux de substitution tels que le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle appelé DPPH. En effet, à température ambiante et en solution, le radical DPPH• présente une coloration violette intense. Son passage à la forme non radicalaire, après saturation de ses couches électroniques s'accompagne de la disparition de la coloration violette et l'apparition d'une couleur jaune pâle (Figure III'-1).

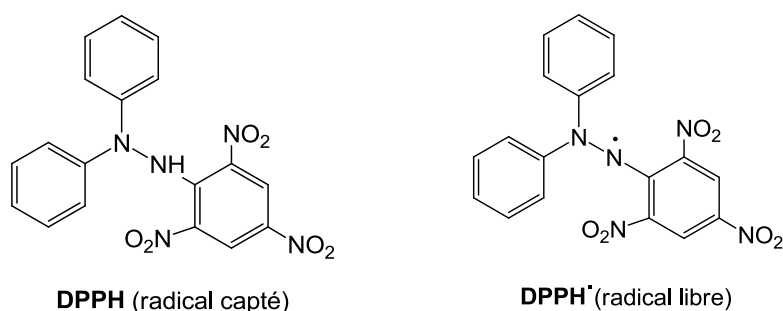


Figure III'-1 : Forme libre et réduite du DPPH

¹⁶⁰Frankel, E.N. « *Lipidoxidation* ». The Oily Press (vol. 10). Dundee, Scotland, **1998**.

¹⁶¹Hussain, A.I.; Anwar F.; Sherazi, S.T.H.; Przybylski, R. *Food Chemistry* **2008**, *108*, 986-995.

¹⁶²a)Wang, H.F.; Yih, K.H.; Huang, K.F. *Journal of Food and Drug Analysis* **2010**, (18) 1, 24-33; b) Nikhat, F.; Satynarayana, D.; Subhramanyam, E.V.S. *Skeel. Asian J. Research Chem.* **2009**, (2)2, 218-221

La capacité de donation des électrons par les H.Es est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique contenant le radical libre DPPH[•] (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle).

La diminution de l'intensité de la coloration est suivie par mesure colorimétrique à 517 nm.

3.2.2. Mode opératoire

Le test de DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par Bucar et Burits¹⁶³, où 50µL de chacune des solutions méthanoliques des H.Es testées à différentes concentrations sont mélangées avec 1mL d'une solution méthanolique de DPPH à 0,004%. Après une période d'incubation de 30 minutes à la température de laboratoire, l'absorbance est lue à 517nm. L'inhibition du radical libre DPPH[•] par la vitamine C a été également analysée à la même concentration. La cinétique de la réaction à 0, 30 et 60 minutes a été déterminée, ainsi que les paramètres de calcul de l'activité antioxydante pour la vitamine C et l'H.E.

3.3. Détermination du pourcentage d'inhibition

D'après Khodashenas¹⁶⁴, l'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée selon la formule de suivante :

$$I\% = \frac{A(\text{blanc}) - A(\text{échantillon})}{A(\text{blanc})} * 100$$

A (blanc) : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol).

A (échantillon) : Absorbance du composé d'essai.

Le pourcentage du DPPH inhibé en fonction des concentrations en H.Es et en vitamine C a été tracé à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC₅₀. Ce paramètre est défini comme étant la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH[•] initiale de 50%¹⁶⁵.

4. Résultats et discussion

4.1. Effet antioxydant de l'acide ascorbique et des H.Es des feuilles et des graines de coriandre

Les mesures de l'inhibition d'absorbance du DPPH[•] provoquée par la présence de l'acide ascorbique (comme un puissant antioxydant naturel) ou par la présence des H.Es des feuilles ou des graines de coriandre après 30 minutes d'action ont permis de déterminer le pourcentage d'inhibition (% I) de chaque dilution. Les essais ont été répétés trois fois et le pourcentage d'inhibition est calculé en appliquant la formule donnée ci-dessous (Figure III'-2).

¹⁶³ a) Burits, M.; Bucar, F. *Phytotherapy Research* **2000**, 14(5), 323-328; b) Ozcelic, B.; Lee, J.H.; Min, D.B. *Journal of Food Science* **2003**, 68(2), 487-490.

¹⁶⁴ Sharififar, F.; Moshafi, M.H.; Mansouri, S.H.; Khodashenas, M. *Food Control* **2007**, 18,800-805.

¹⁶⁵ Sanchez-Moreno, C.; Larrauri Jose, A.; Saura-Calixto, F. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1998**, 76(2), 270-276.

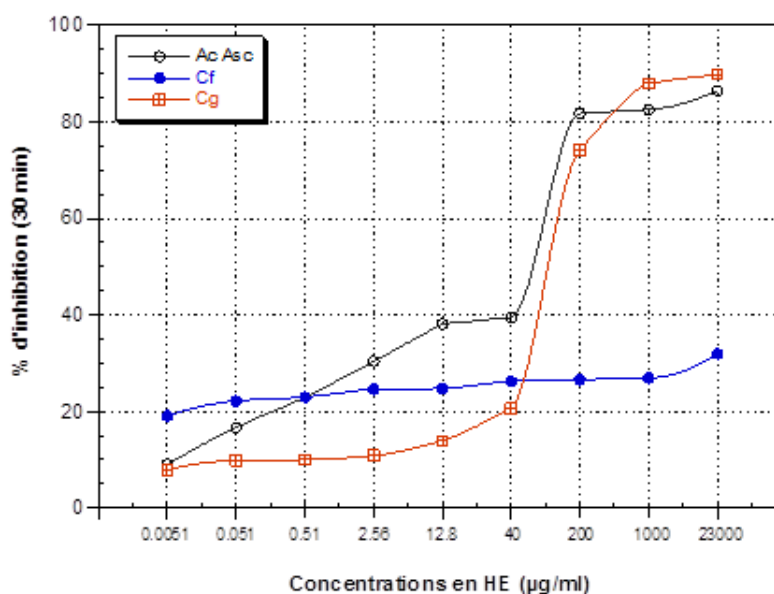


Figure III'-2 : Pourcentage d'inhibition après 30 minutes d'action de l'acide ascorbique et des H.Es des feuilles et des graines de coriandre à différentes concentrations

Le pourcentage d'inhibition provoqué par l'acide ascorbique est très élevé (autour de 80%) avec des concentrations supérieures à 200 µg/mL. L'augmentation de la dose d'acide ascorbique à des valeurs supérieures à 200µg/mL ne modifie pas le taux d'inhibition.

Pour la coriandre, la capacité de réduction du radical DPPH[•] par les H.Es des graines est très élevée et peut se mesurer et même dépasser la capacité de l'acide ascorbique pour les fortes doses. En effet, à partir d'une concentration de 200 µg d'H.E/mL, le pouvoir d'inhibition est de l'ordre de 76% et augmente jusqu'à 85%. Ceci confère aux H.Es extraites à partir des graines de coriandre un fort effet scavenger vis-à-vis des radicaux DPPH[•].

Concernant les feuilles de coriandre, la force de réduction du radical DPPH exercée par ces H.Es est très faible et même stable quel que soit la concentration utilisée et se fixe à des pourcentages d'inhibition autour de 25%.

Pour se renseigner sur la vitesse de réduction du radical libre DPPH[•] par l'acide ascorbique et les H.Es des feuilles et graines de coriandre, nous avons réalisé un suivi cinétique (trois répétitions) de la réaction de réduction par l'évaluation du pourcentage d'inhibition en fonction du temps à 0, 30 et 60 minutes (Figures III'-3-5).

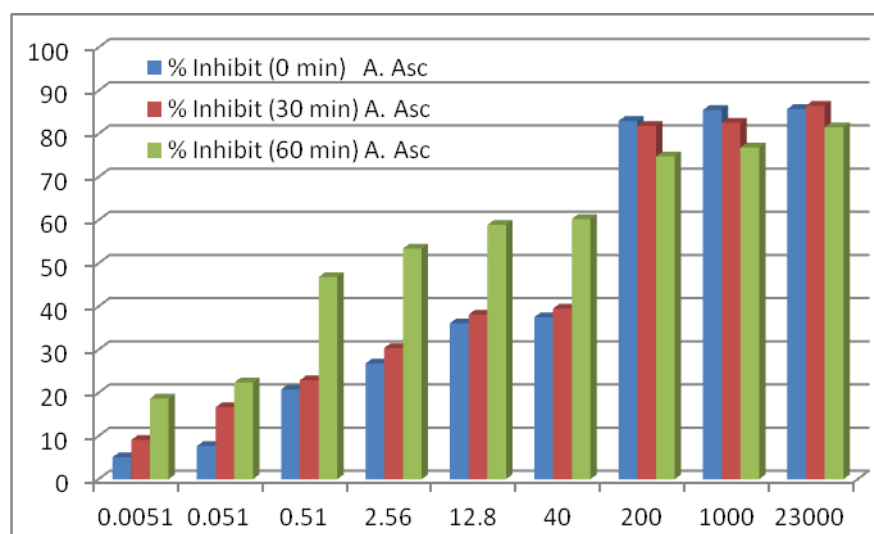


Figure III'-3 : Cinétique de la réaction de réduction de DPPH par l'acide ascorbique à 0,30 et 60 minutes et pour différentes concentrations

Pour l'acide ascorbique et à de faibles concentrations de 0,0051 jusqu'à 40 µg/mL, l'augmentation de la durée d'action de 30 à 60 minutes augmente la capacité du piégeage du radical DPPH. Alors que pour les fortes concentrations dépassant les 200 µg/mL l'effet scavenger est élevé dès le contact de l'acide ascorbique avec le radical DPPH[•] puis diminue légèrement avec l'augmentation du temps d'action.

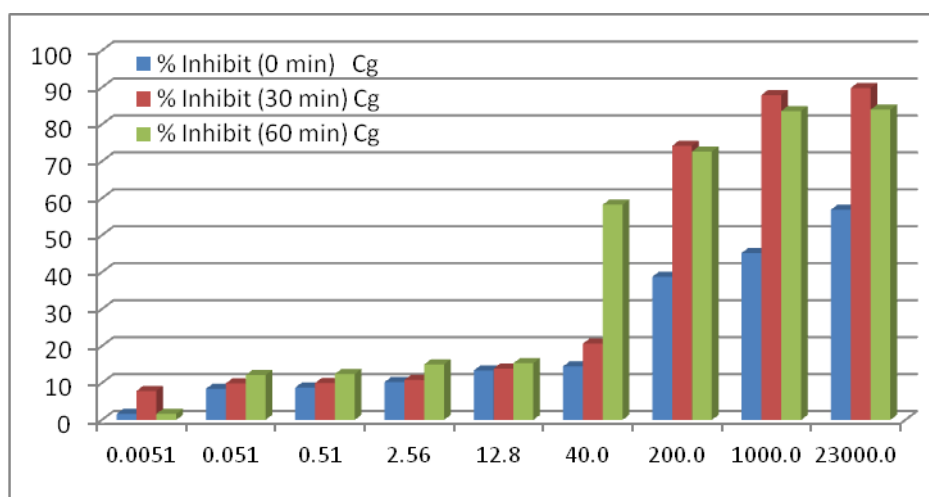


Figure III'-4 : Cinétique de la réaction de réduction du DPPH par l'H.E des graines de coriandre à 0, 30 et 60 minutes et pour différentes concentrations

Concernant les H.Es des graines de coriandre, l'effet inhibiteur augmente avec l'augmentation de la concentration de l'essence et du temps de contact. Pour les fortes concentrations (supérieures à 200 µg/mL), le pourcentage d'inhibition est élevé pour des temps d'action de 30 et 60 minutes.



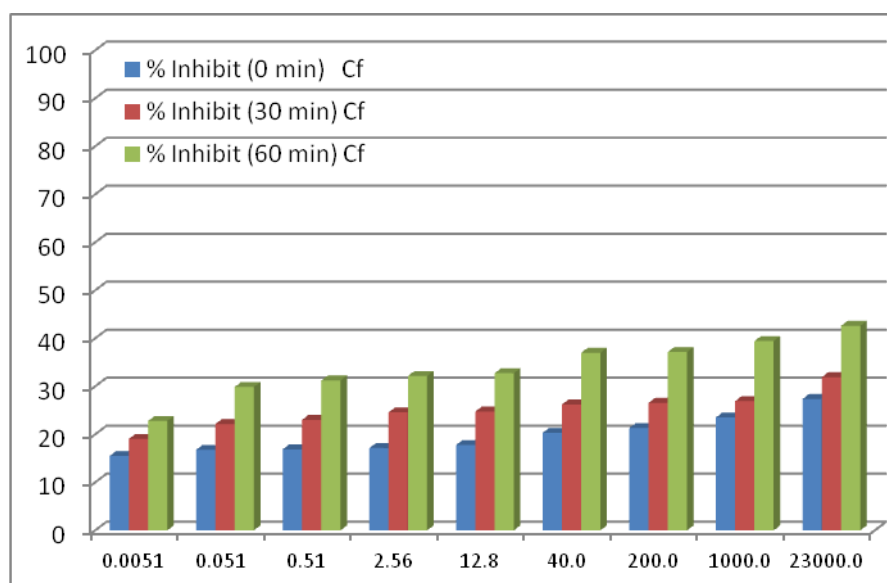


Figure III'-5 : Cinétique de la réaction de réduction de DPPH par l'H.E des feuilles de coriandre à 0, 30 et 60 minutes et pour différentes concentrations

Les H.Es des feuilles de coriandre manifestent un faible pouvoir inhibiteur quel que soit la concentration utilisée. L'augmentation de la durée de contact augmente légèrement le pouvoir inhibiteur.

4.2. Effet antioxydant des H.Es des feuilles et des graines de persil¹⁶⁶

L'H.Es des graines de persil manifeste une augmentation du pourcentage d'inhibition avec l'augmentation de la concentration de l'essence utilisée. Le même taux d'inhibition (60%) est obtenu avec des concentrations allant de 200 à 1000 µg/mL. Une concentration de 23000 µg/mL permet l'obtention d'un pourcentage d'inhibition similaire à celui obtenu par l'acide ascorbique.

Les faibles doses de l'H.E des feuilles de persil semble avoir un effet minime sur la réduction du DPPH contrairement aux fortes doses 1000 et 23000 µg/mL où le pourcentage d'inhibition est presque similaire à ceux obtenus par l'acide ascorbique et par les H.Es des graines de persil (Figure III'-6).

¹⁶⁶Ouis, N.; Hariri, A. et El Abed, D. « Evaluation de l'effet antioxydant de l'huile essentielle de persil *Petroselinum crispum* », 1^{er} Colloque International sur les substances naturelles et Innovations thérapeutiques : Université de Mascara 22 et 23 Avril 2008.

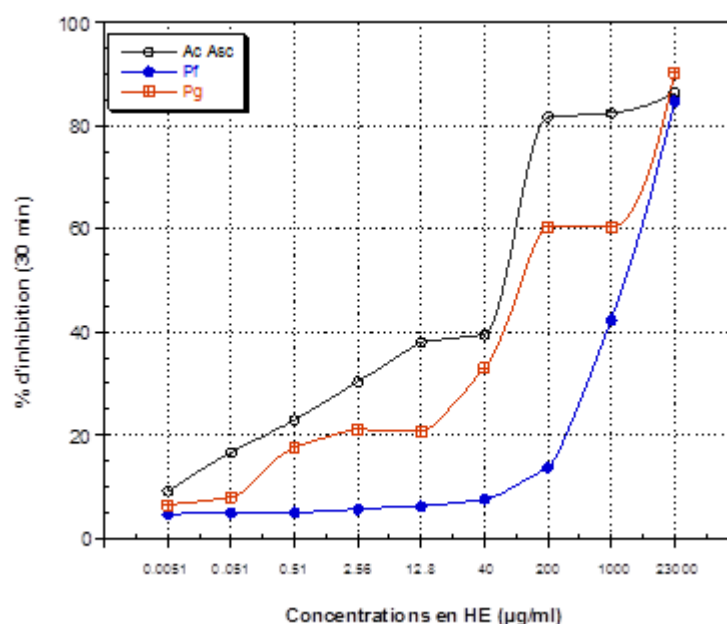


Figure III'-6 : Pourcentage d'inhibition après 30 minutes d'action des H.Es des feuilles et des graines de persil à différentes concentrations

Pour les H.Es des graines de persil, l'effet inhibiteur augmente avec l'augmentation de la concentration de l'essence et du temps de contact sauf pour la concentration de 23000 µg/mL où l'effet inhibiteur est très élevé dès le premier contact de l'essence avec le DPPH. Pour se renseigner sur la vitesse de réduction du radical libre DPPH^{*} par l'acide ascorbique et les H.Es des feuilles et graines de persil, nous avons réalisé un suivi cinétique (trois répétitions) de la réaction de réduction par l'évaluation du pourcentage d'inhibition en fonction du temps à 0,30 et 60 minutes (Figures III'-7 et 8).

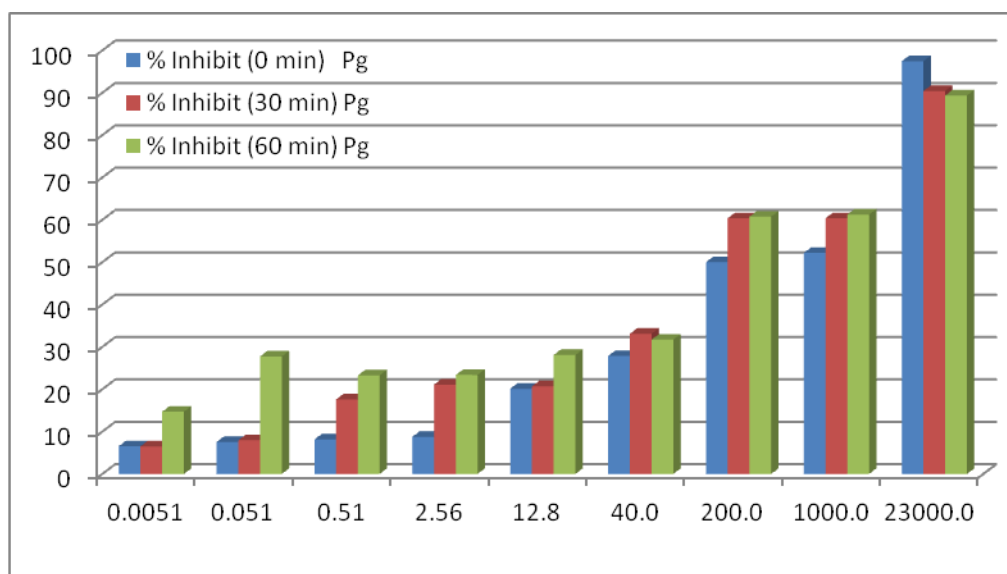


Figure III'-7: Cinétique de la réaction de réduction de DPPH par l'H.E des graines de persil à 0,30 et 60 minutes et pour différentes concentrations

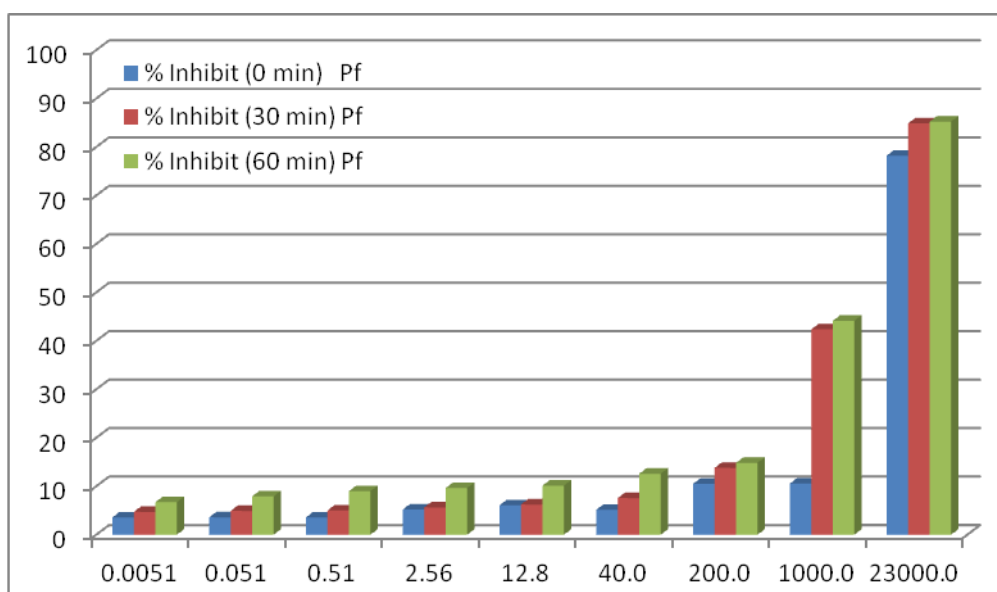


Figure III'-8: Cinétique de la réaction de réduction de DPPH par l'H.E des feuilles de persil à 0,30 et 60 minutes et pour différentes concentrations

L'augmentation du temps de contact de 30 à 60 minutes de l'H.E des feuilles de persil avec le DPPH pour les fortes concentrations semble avoir peu d'influence sur l'effet inhibiteur.

4.3. Effet antioxydant des huiles essentielles des graines de fenouil

La capacité de réduction du radical DPPH par les H.Es des graines de fenouil est faible pour les faibles concentrations (de 0,0051 à 200 µg/mL) ne dépassant pas les 20% mais l'augmentation de la dose de l'huile au-delà de 200 µg/mL augmente nettement le pourcentage d'inhibition (Figure III'-9).

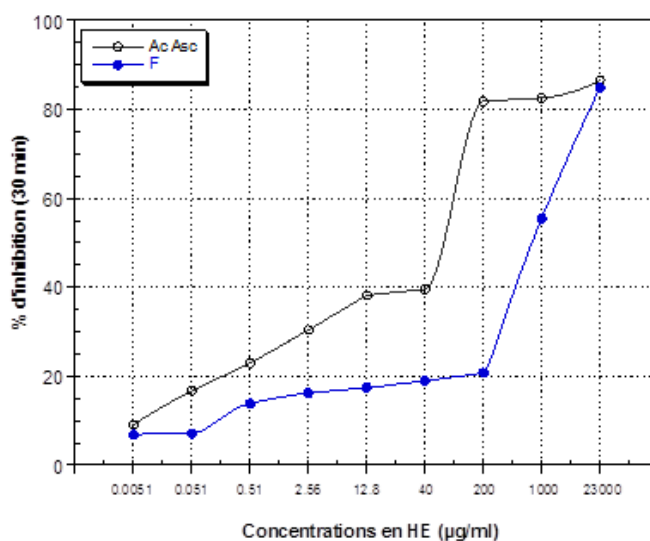


Figure III'-9 : Pourcentage d'inhibition après 30 minutes d'action des H.Es des graines de fenouil à différentes concentrations

Concernant la cinétique de réduction du DPPH, pour les très faibles concentrations de 0,0051 à 2,56 $\mu\text{g/mL}$, l'augmentation du temps de contact de 0 à 60 minutes augmente légèrement le pourcentage d'inhibition mais cette inhibition diminue après 30 minutes d'action pour les fortes concentrations de l'H.E de 1000 et 23000 $\mu\text{g/mL}$ (Figures III'-10).

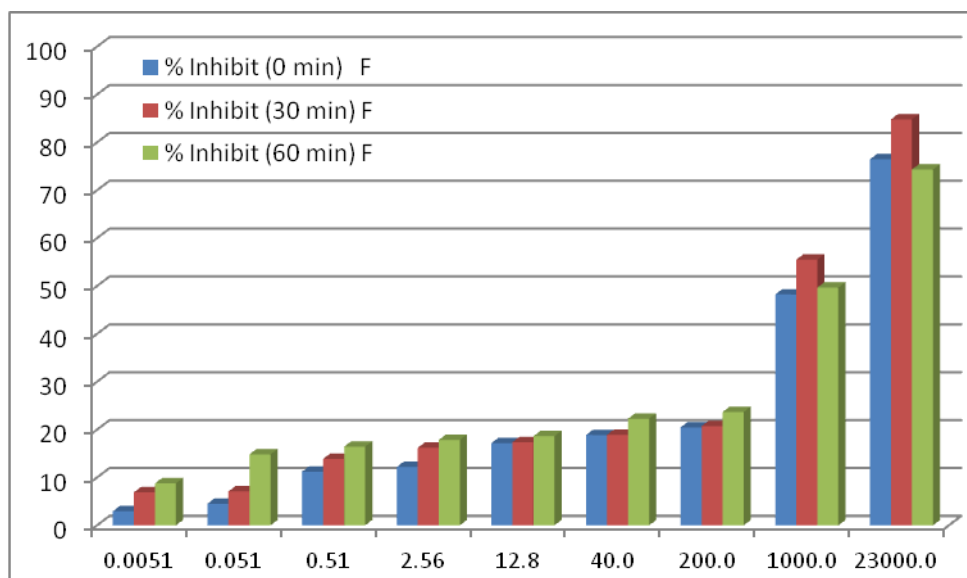


Figure III'-10 : Cinétique de la réaction de réduction de DPPH par l'H.E des graines de fenouil à 0,30 et 60 minutes et pour différentes concentrations

4.4. Détermination de l'index IC_{50}

L'index IC_{50} ou concentration inhibitrice est la concentration de l'échantillon testé (H.E) nécessaire pour réduire l'activité du $\text{DPPH}^\bullet$ initiale de 50% après 30 minutes d'action. . Le pourcentage d'inhibition permet de calculer le paramètre IC_{50} . Les IC_{50} sont calculées graphiquement par régressions linéaires des graphes tracés (pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des H.Es testées : Figures III'1, III'6 et III'9). Le tableau suivant regroupe les valeurs de cet indice pour l'acide ascorbique et les H.Es étudiées :

Tableau III'1 : Valeurs de IC_{50} de l'acide ascorbique et des H.Es étudiées

	Huiles essentielles			
	Acide ascorbique	Coriandre graines	Fenouil graines	Persil graines / Persil feuilles
$\text{IC}_{50} \mu\text{g/mL}$	73,9	126	872	145,5 / 1199,4

Au vu des résultats de la détermination des valeurs de IC_{50} , on peut déduire que l'H.E des graines de la coriandre détient la capacité antioxydante la plus élevée par rapport aux autres essences étudiées. Cela est directement lié à sa plus grande teneur en agents piégeurs de radicaux libres agissant comme antioxydant notamment le linalol.

5. Conclusion

L'activité antioxydante *in vitro* des H.Es de coriandre, de fenouil et de persil a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Cette méthode est l'une des méthodes des plus simples, des plus rapides et des plus efficaces grâce à la grande stabilité du radical DPPH.

Les résultats obtenus avec ce test indiquent que l'H.E des graines de coriandre a manifesté un effet antioxydant remarquable et presque similaire à celui obtenu par l'acide ascorbique avec un IC₅₀ faible comparé à celui des H.Es de fenouil et de persil et un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 85% pour les fortes doses. En revanche, cet effet est insignifiant pour l'H.E des feuilles de coriandre.

La grande proportion de linalol dans l'H.E des graines de coriandre, associée aux autres composants de l'essence est responsable de l'activité antioxydante observée.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

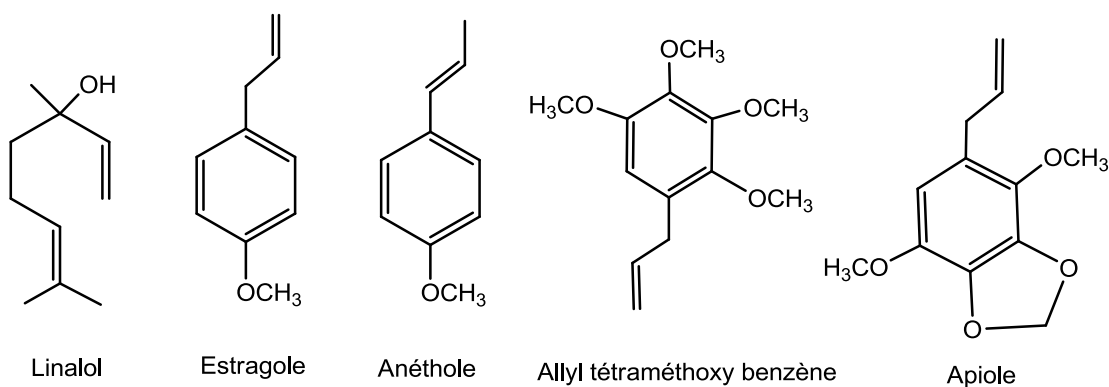
Le travail que nous avons entrepris porte sur l'étude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil, plantes appartenant à la famille des *Apiaceae*.

Les huiles essentielles sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe, ce qui leur confère des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes très intéressantes à mettre à profit dans la préservation des produits alimentaires.

Les H.Es des graines de coriandre, de fenouil et de persil et de la partie aérienne de la coriandre et du persil ainsi que les bulbes de fenouil ont été obtenues par hydrodistillation avec des rendements qui varient de 0,14 à 1,00% . La détermination des propriétés physico-chimiques (densité, indice de réfraction, indice d'acide,...) des essences recueillies nous a conduit à des valeurs conformes aux normes de commercialisation des H.Es établies par les différentes pharmacopées et proches de certains travaux antérieurs.

La composition chimique des essences isolées, a été établie à l'aide des méthodes chromatographiques (CPG et GC/MS-EI, en mode ionisation chimique ICP) et spectroscopiques. Ces techniques révèlent que les essences étudiées sont constituées principalement de dérivés du phényl propane et de monoterpènes.

Ainsi, l'H.E des graines de coriandre se caractérise par une forte teneur en un alcool monoterpénique, le linalol (63,5%), celle de sa partie aérienne contient 26,02% du 2-décénal en stade de floraison et 34,52% en stade de maturité. Le produit majoritaire des graines de fenouil est l'estragole (83,28%), celui des bulbes est l'anéthole avec un pourcentage de 74,63%. Quant au persil, ses graines sont constituées de 27,78% d'allyltétraméthoxybenzène, suivi par l'apiole (23,55%). Néanmoins, le constituant majoritaire de l'H.E de persil frais est l'apiole (78,13%).



Les tests d'activité antimicrobienne réalisés *in vitro* ont permis d'évaluer l'activité des essences des graines de coriandre, de fenouil et de persil, ainsi que de la partie aérienne du persil sur trois souches bactériennes et trois souches fongiques par les méthodes de diffusion en milieu solide, de la micro-dilution et des micro-atmosphères.

Les résultats, obtenus par la technique de diffusion des disques, ont montré une grande sensibilité d'*E.coli* vis-à-vis de toutes les H.Es étudiées. Un effet antibactérien envers *P. aeruginosa* a été exercé par les huiles de coriandre et de fenouil. Aussi, une intéressante activité antibactérienne a été observée pour l'H.E de persil à l'égard de *S.aureus*.

Ceux de la micro-dilution ont permis de déterminer les valeurs de la CMI et la CMB; ce qui a conduit à un effet bactéricide pour l'H.E des graines de coriandre face à *P. aeruginosa* et *E.coli* et à un effet bactériostatique pour l'essence des graines de fenouil face aux trois souches bactériennes testées. Par contre l'H.E des graines du persil a montré un effet stimulateur de croissance envers les trois souches étudiées

L'activité antifongique des composés volatils des H.Es testée par la méthode des micro-atmosphères a révélé que les H.Es des graines de coriandre, de fenouil et des feuilles du persil ont été actifs contre *A. fumigatus*, *Fusarium sp.* et *P. notatum*. Cependant, l'essence des graines de persil n'a présenté aucun effet vis-à-vis d'*Aspergillus fumigatus*.

Les résultats de l'action des H.Es des graines de fenouil et de persil sur l'activité acidifiante des bactéries lactiques révèlent l'effet inhibiteur de l'H.E de fenouil sur la cinétique de croissance et d'acidification de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus rhamnosus*. En revanche, La croissance cellulaire et la synthèse d'acide lactique ont été favorisées par l'H.E de persil.

Par ailleurs, l'influence de l'ajout des essences de fenouil et de persil sur la qualité du yaourt étuvé grâce à l'action combinée sur les germes pathogènes et d'altération, ainsi que sur les ferments lactiques du yaourt au cours du stockage a permis de prolonger sa durée de conservation.

En outre, l'activité antioxydante des essences étudiées par la méthode de piégeage des radicaux libres (DPPH) a montré que l'H.E des graines de coriandre a un effet antioxydant important par rapport à celles du fenouil et du persil, et comparable à celui obtenu par l'acide ascorbique avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 85% pour les fortes doses.

Enfin, nos résultats indiquent que les H.Es étudiées peuvent être considérées comme agents conservateurs promoteurs pour l'industrie agro-alimentaire capable d'empêcher la prolifération des bactéries et de réduire la croissance mycélienne.

En perspectives, il serait intéressant d'innover de nouvelles méthodes de décontamination des fruits et légumes par l'action des vapeurs des H.Es des graines de coriandre et de persil et d'utiliser des films d'emballage naturels biodégradables et bioactifs après incorporation d'extraits de ces graines pour assurer l'innocuité et augmenter significativement la durée de conservation des aliments à la place des conservateurs de synthèse.

Annexes

Annexe 1 : Chromatogrammes et spectres de masse des produits de référence

Annexe 2 : Co-injection des H.Es avec les échantillons de référence

Annexe 3 : Composition des milieux de culture utilisés

Annexe 4 : Tests d'identification des souches bactériennes et fongiques

Annexe 5 : Résultats de caractérisation de *Streptococcus thermophilus*
et *Lactobacillus bulgaricus*

Annexe 6 : Tests biochimiques

Annexe 7 : Résultats d'analyse de variance des yaourts étuvés

Annexe 8 : Glossaire

Annexe 1 : Chromatogrammes et spectres de masse des produits de référence

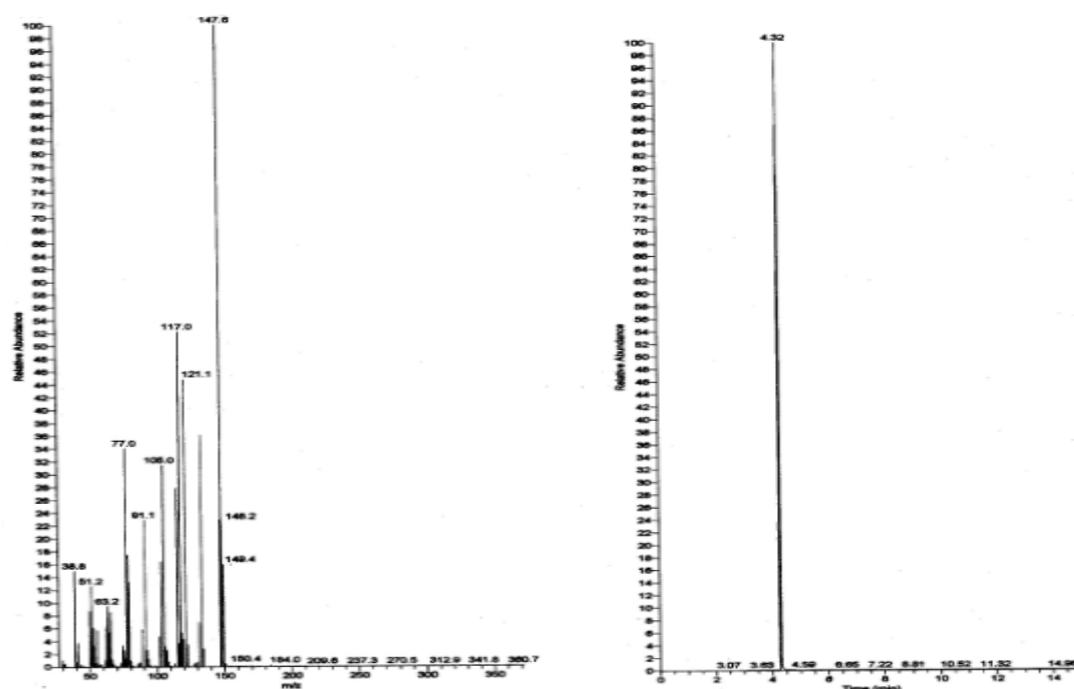


Figure 1 : Chromatogramme et spectre de masse en EI+de RT= 4,32min de l'estragole

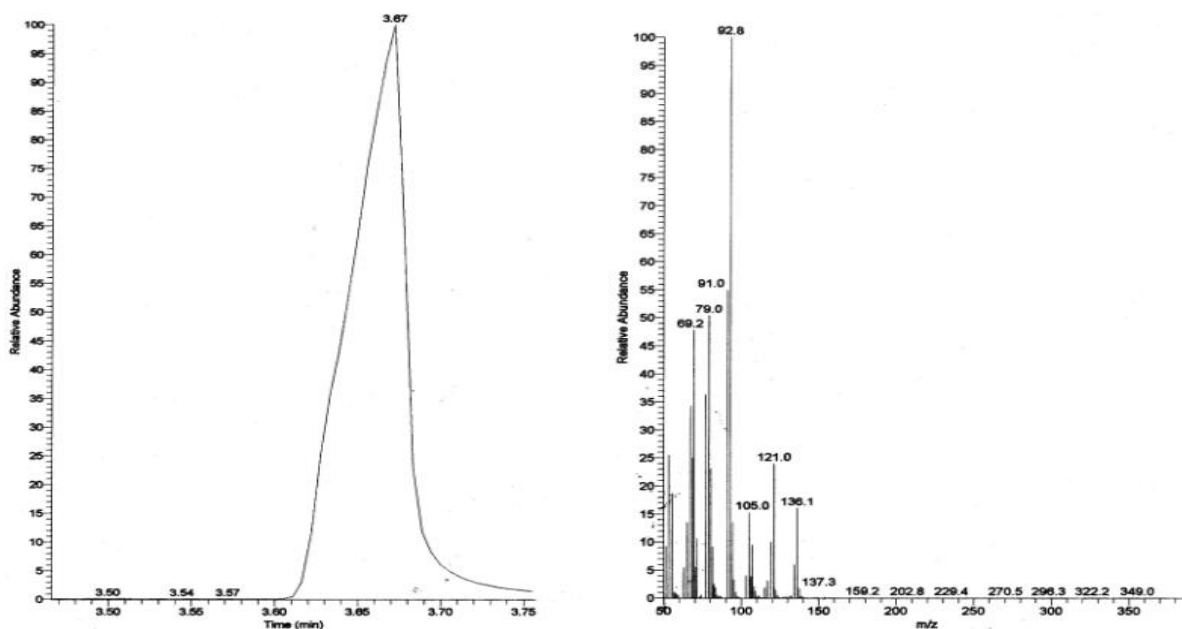


Figure 2 : Chromatogramme et spectre de masse en EI+de RT= 3,67min du linalol



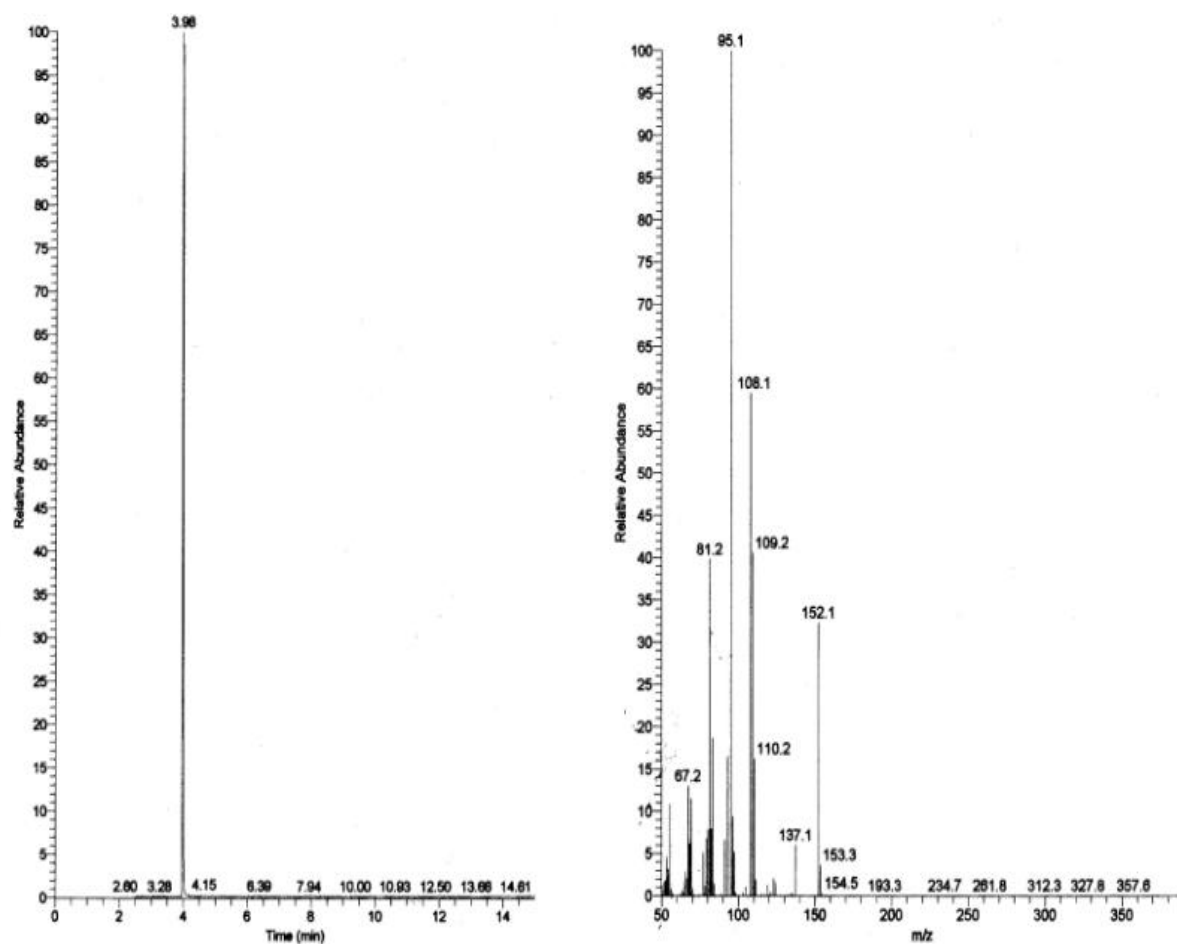


Figure 3 : Chromatogramme et spectre de masse en EI+ de RT= 3,98 min du camphre

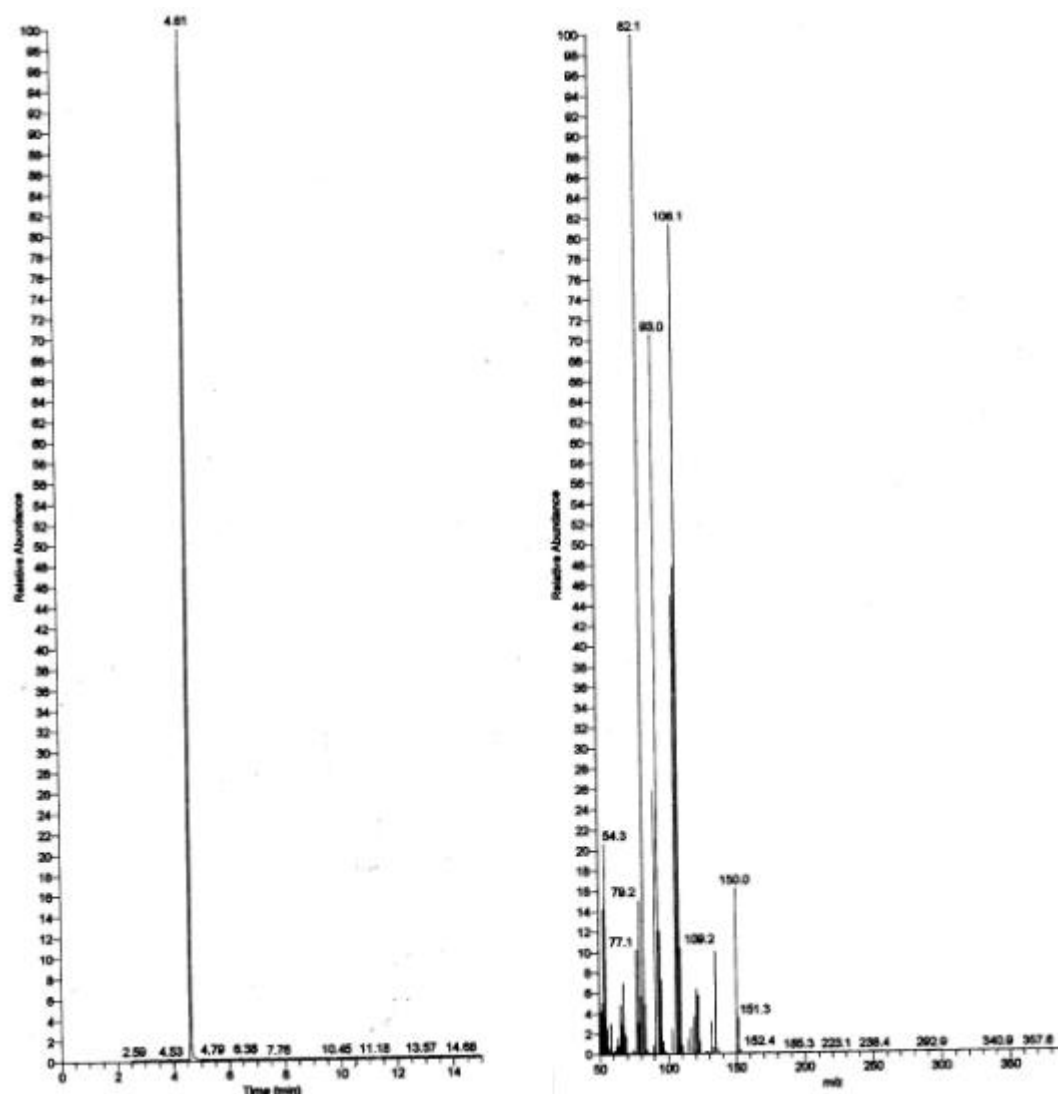


Figure 4 : Chromatogramme et spectre de masse en EI+ de RT= 4,61 min de la carvone

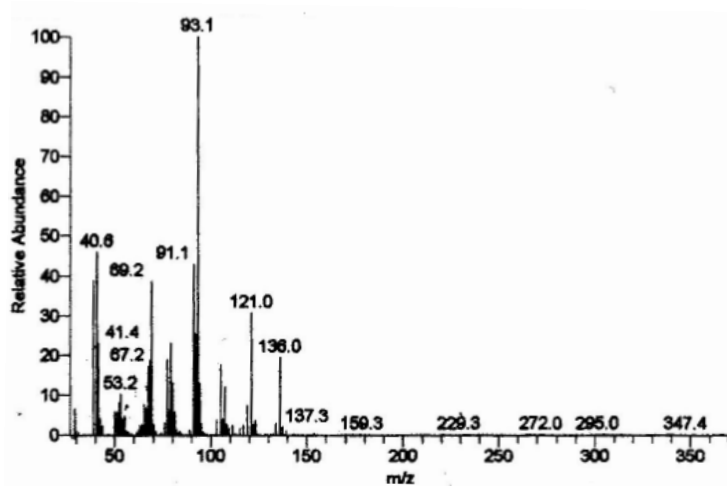
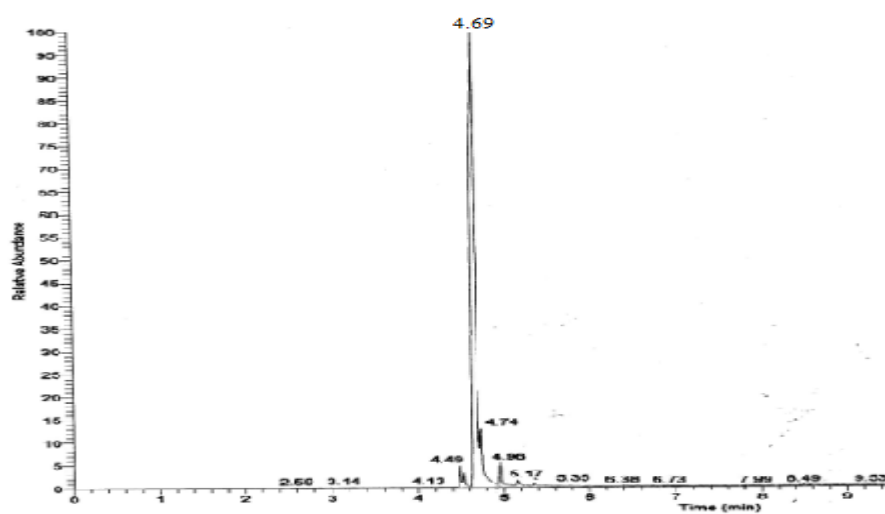
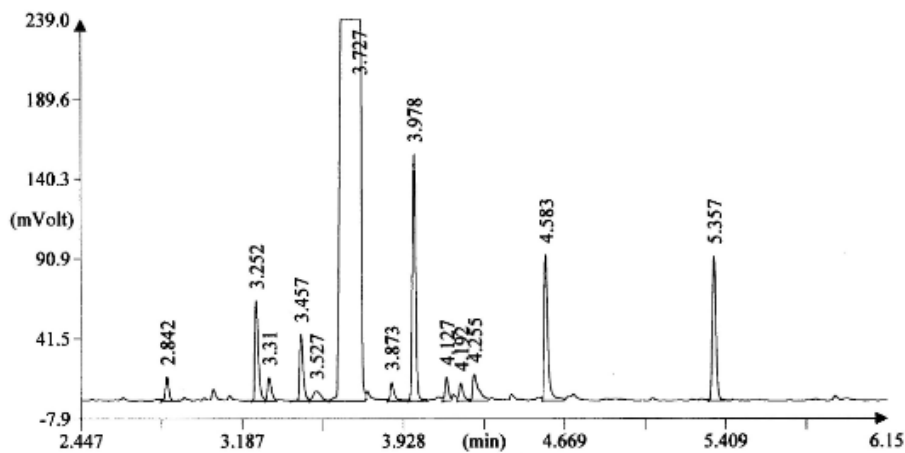
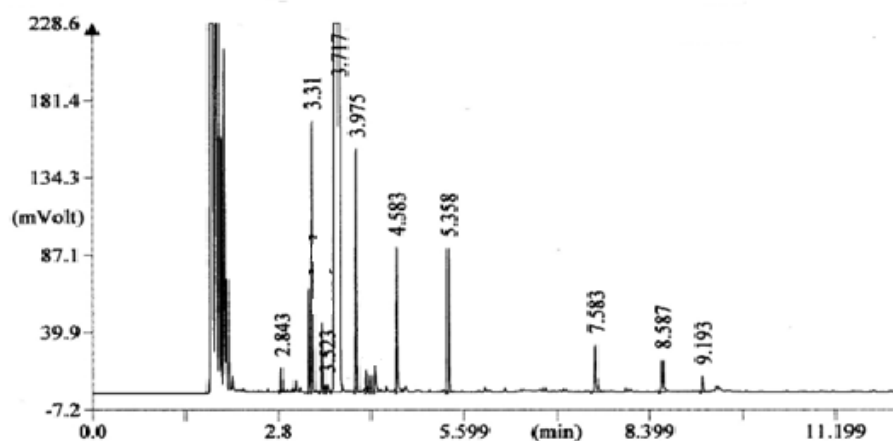
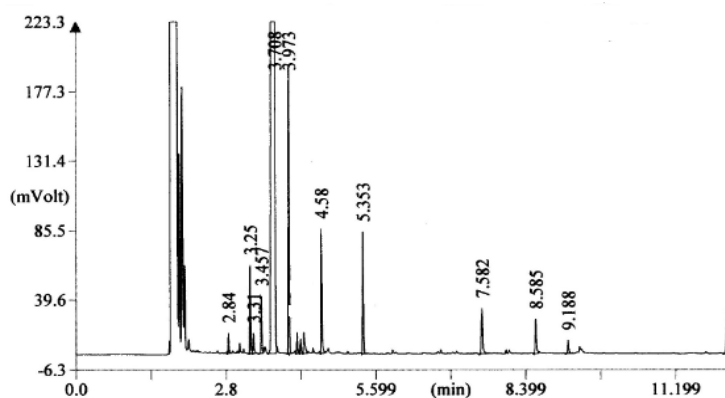


Figure 5 : Chromatogramme et spectre de masse en EI+ de RT= 4,69 min du géraniol

Annexe 2 :*Co-injection des H.Es avec les échantillons de référence***Figure 6 :** Chromatogramme de la co-injection de l'H.E des graines de coriandre avec le linalol**Figure 7 :** Chromatogramme de la co-injection de l'H.E des graines de coriandre avec le limonène**Figure 8 :** Chromatogramme de la co-injection de l'H.E des graines de coriandre avec le camphre

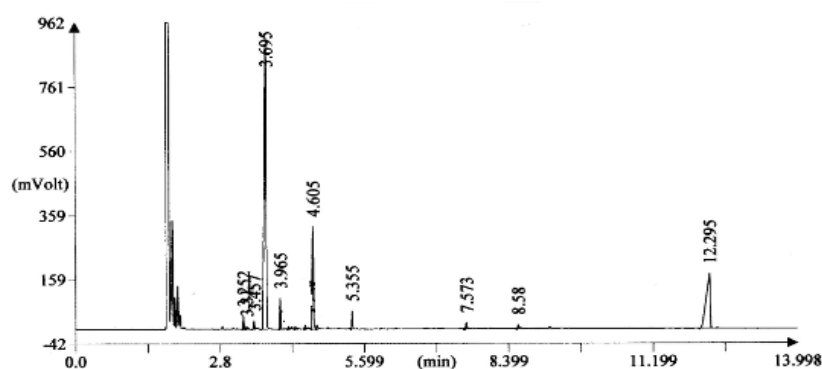


Figure 9 : Chromatogramme de la co-injection de l'H.E des graines de coriandre avec le géraniol

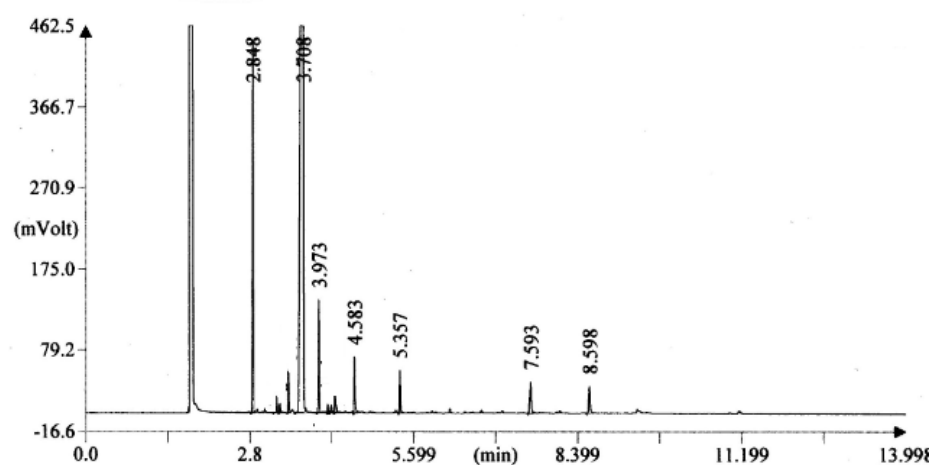


Figure 10 : Chromatogramme de la co-injection de l'H.E des graines de coriandre avec l' -pinène

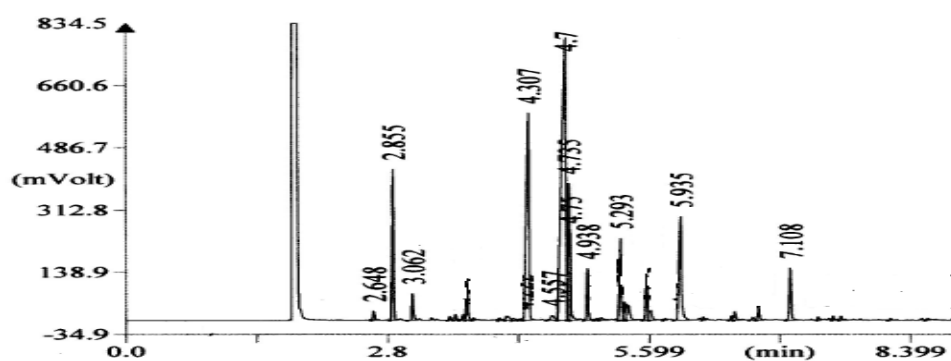


Figure 11: Chromatogramme de la co-injection de l'HE de la coriandre en stade de maturité avec l' -pinène

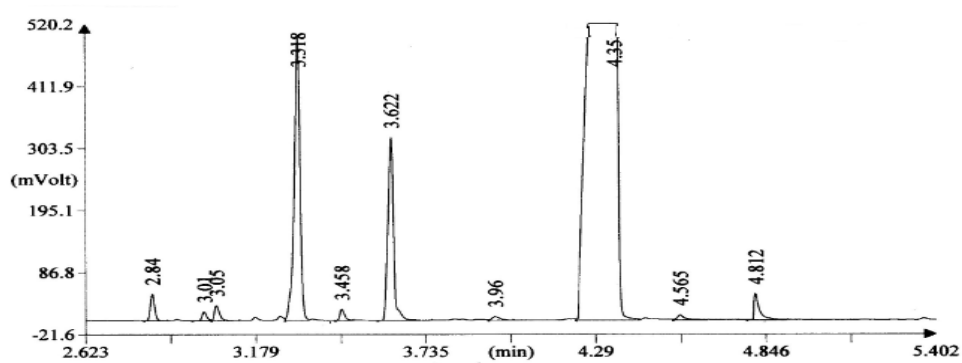


Figure 12: Chromatogramme de la coinjection de l'HE du fenouil avec l'estragole

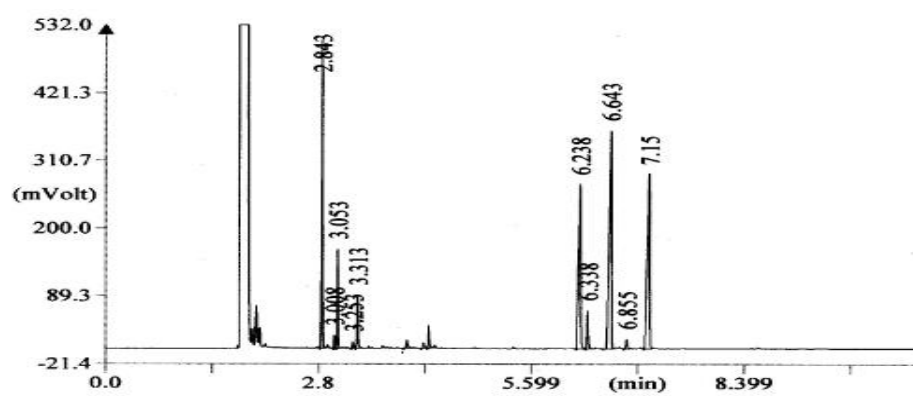


Figure 13 : Chromatogramme de la co-injection de l'HE des graines de persil avec l' α -pinène

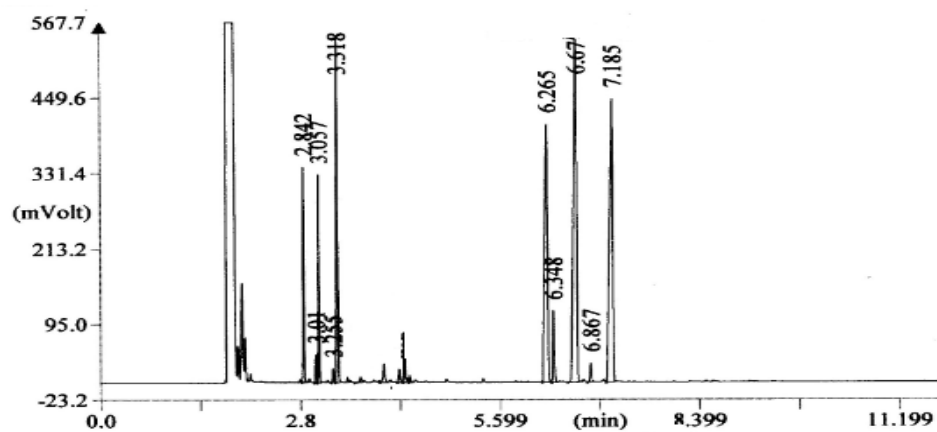


Figure 14 : Chromatogramme de la co-injection de l'H.E des graines de persil avec le limonène

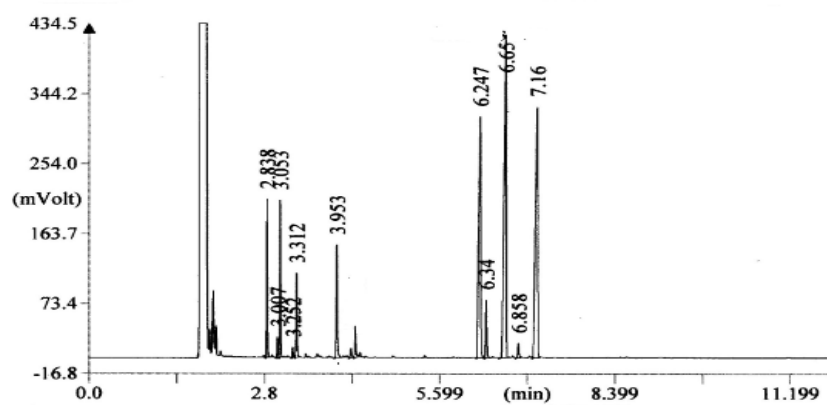


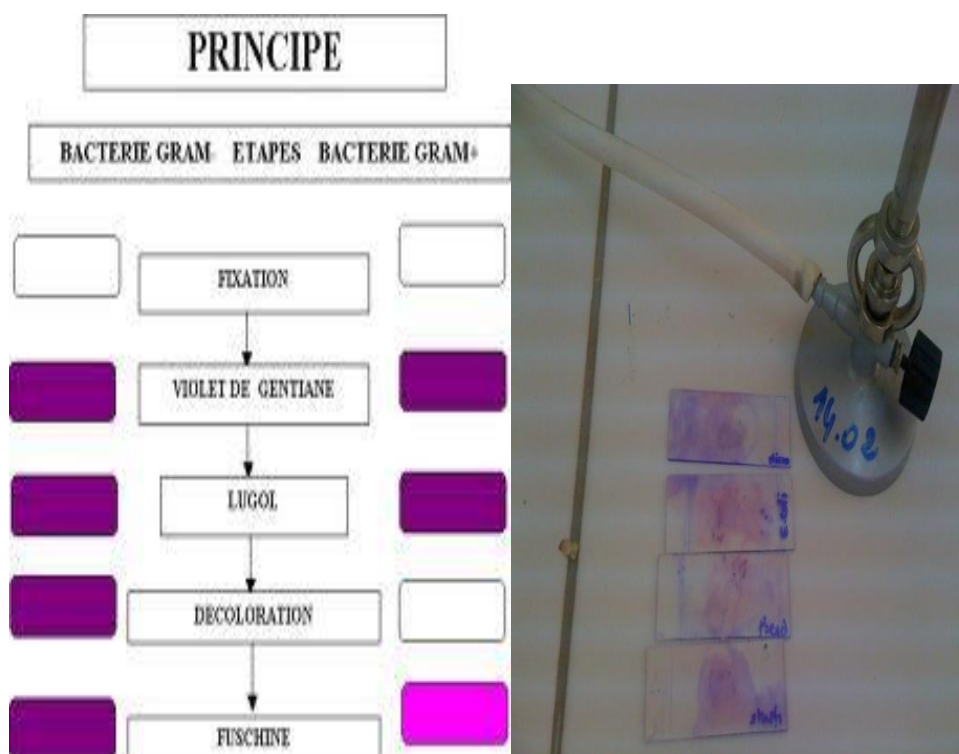
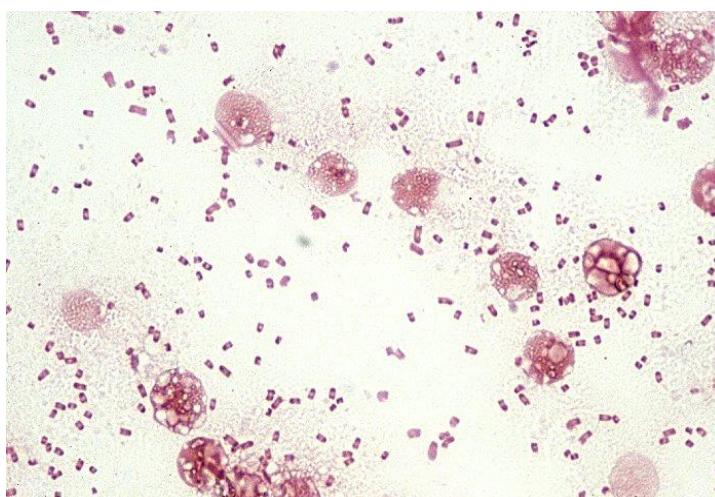
Figure 15 : Chromatogramme de la co-injection de l'HE des graines de persil avec le camphre

Annexe 3 :*Composition des milieux de culture utilisés*

Nom	Composition
<i>Gélose Hektoen</i> (en grammes par litre d'eau purifiée filtrée)	Peptone de viande 12g Extrait de levure 3g Lactose 12g Salicine 2g Sels biliaires 9g Chlorure de sodium 5g Citrate ferrique d'ammonium 1,5g Thiosulfate de sodium 5g Fuchsine acide 0,1g Bleu de bromothymol 0,065g Gélose 14g
<i>Gélose Chapman</i>	Peptone 10g Extrait de viande de boeuf 1g Chlorure de sodium 75g Mannitol 10g Rouge de phénol 0,025g Ag 15g
<i>Agar Mueller Hinton</i>	Eau distillée 1000 mL Infusion de viande de bœuf 02.0g Hydrolysate de Caseine 7,5g Amidon 1,5g Agar 10g
<i>Gélose au cétrimide</i>	Peptone de gélatine 16,0 g Peptone de caséine 10,0 g Bromure de tétradonium 0,2 g Acide nalidixique 15,0 mg Sulfate de potassium 10,0 g Chlorure de magnésium 1,4 g Agar 10,0 g
<i>Potatoes</i> <i>Dextrose Agar (PDA)</i>	Eau distillée 1000 mL Filtrat de pomme de terre 200g Glucose 20g Agar 15g pH 4,5
<i>Bouillon de Rothe</i> (Présomption des Streptocoques)	Polypeptone 20g Glucose 5g Chlorure de sodium 5g Phosphate monopotassique 2,7g Phosphate dipotassique 2,7g Azide de sodium 0,2g pH final 6,8± 0,2 Stérilisation : 120°C/ 20mn.

Nom	Composition	
<i>Bouillon Eva Litsky</i> (Confirmation des Entérocoques)	Polypeptone	20g
	Glucose	5g
	Chlorure de sodium	5g
	Phosphate monopotassique	2,7g
	Phosphate dipotassique	2,7g
	Azide de sodium	0,3g
	Ethyl violet	0,5mg
	pH final	6,8± 0,2
	Stérilisation	120°C/ 20mn.
<i>Bouillon de Giolitti Cantoni</i> (Enrichissement sélectif des Staphylocoques)	Tryptone	10g
	Extrait de viande	5g
	Extrait de levure	5g
	Glycine	1,2g
	Mannitol	20g
	Chlorure de sodium	5g
	Chlorure de lithium	5g
	Tween	1g
	Pyruvate de sodium	3g
	pH final	6,8± 0,2
	Stérilisation :	120°C/ 20mn
Avant emploi ajouter à chaque tube de milieu 0,1 mL d'une solution de tellurite de potassium à 0,5% stérilisée par filtration.		
<i>Gélose Chapman</i> (Isolement des Staphylococcus)	Peptone	10,0g
	Extrait de viande de boeuf	1,0g
	Chlorure de sodium	75,0g
	Mannitol	10,0g
	Rouge de phénol	0,025g
	Ag	15,0g
	pH final	7,4 ± 0,2
	Stérilisation :	120°C/ 20mn
<i>Gélose de Man Rogosa et Sharpe</i> (<i>MRS</i>) (Sélectif pour le dénombrement des lactobacilles)	Peptone	10g
	Extrait de viande	10g
	Extrait de levure	5g
	Glucose	10,0g
	Tween 80 (polysorbate 80)	1mL
	Phosphate dipotassique	2g
	Acétate de sodium	5g
	Citrate triammonique	2g
	Sulfate de magnésium	200mg
	Sulfate de manganèse	50mg
	Agar	15g
	pH final	6,5± 0,2
	Stérilisation :	120°C/ 20mn

Nom	Composition	
<i>Gélose d'Elliker</i> (Isolement surface des lactobacilles et streptocoques)	Tryptone	20g
	Extrait de levure	5g
	Gélatine	2,5g
	Glucose	5g
	Lactose	5g
	Saccharose	5g
	Chlorure de sodium	4g
	Acétate de sodium	1,5g
	Acide ascorbique	0,5g
	Agar	15g
	pH final	6,8± 0,2
	Stérilisation :	120°C/15mn.
<i>GéloseM17</i> (Terzaghi et Sandine, 1975) (Isolement de <i>St. thermophilus</i>)	β-Glycérophosphatde sodium	19g
	Peptone papainique de soja	5g
	Peptone pepsique de viande	2,5g
	Peptone trypsique de caseine	2,5g
	Extrait de viande	2,5g
	Extrait de levure	5g
	Lactose	2,5g
	Acide ascorbique	5g
	Sulfate de magnésium	0,25g
	Agar	15g
	pH final	7,0 ± 0,2
	Stérilisation :	120°C/ 20mn
<i>Oxytetracycline</i> <i>glucoseagar</i> :(O.G.A) (Pour la recherche des levures et moisissures)	Extrait de levure	5g
	Glucose	20g
	Agar	15g
	Eau distillée	1000mL
	pH	6,6
	Stériliser à l'autoclave	121°C ± 1°C pendant 20mn
<i>Milieu sabouraud</i>	Eau distillée	1000mL
	Peptone	10g
	Glucose	20g
	Agar-agar	15g
	pH	6,3

Annexe 4 :*Tests d'identification des souches bactériennes et fongiques***Figure 1'**: Principe de la Coloration de Gram**Figure 2'**: Observation microscopique de la coloration de Gram pour E-coli

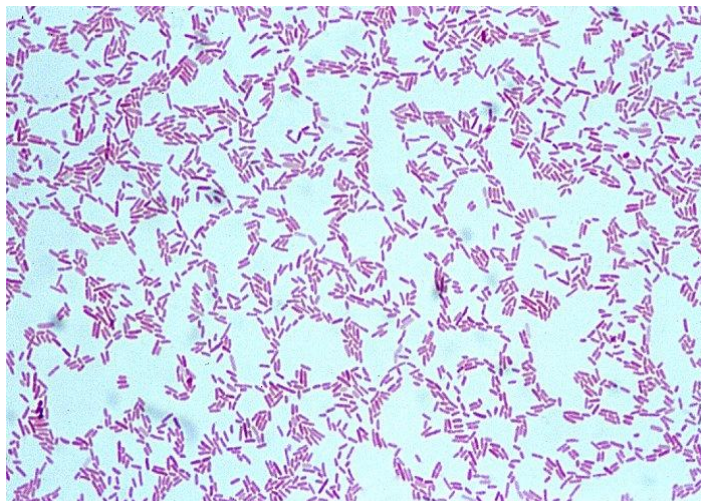


Figure 3': Observation microscopique de la coloration de Gram pour *Pseudomonas* Sp.

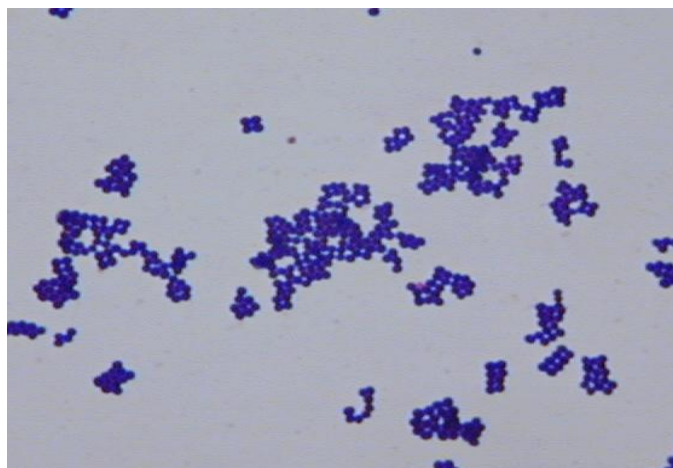


Figure 4': Observation microscopique de la coloration de Gram pour *Staphylococcus* Sp.

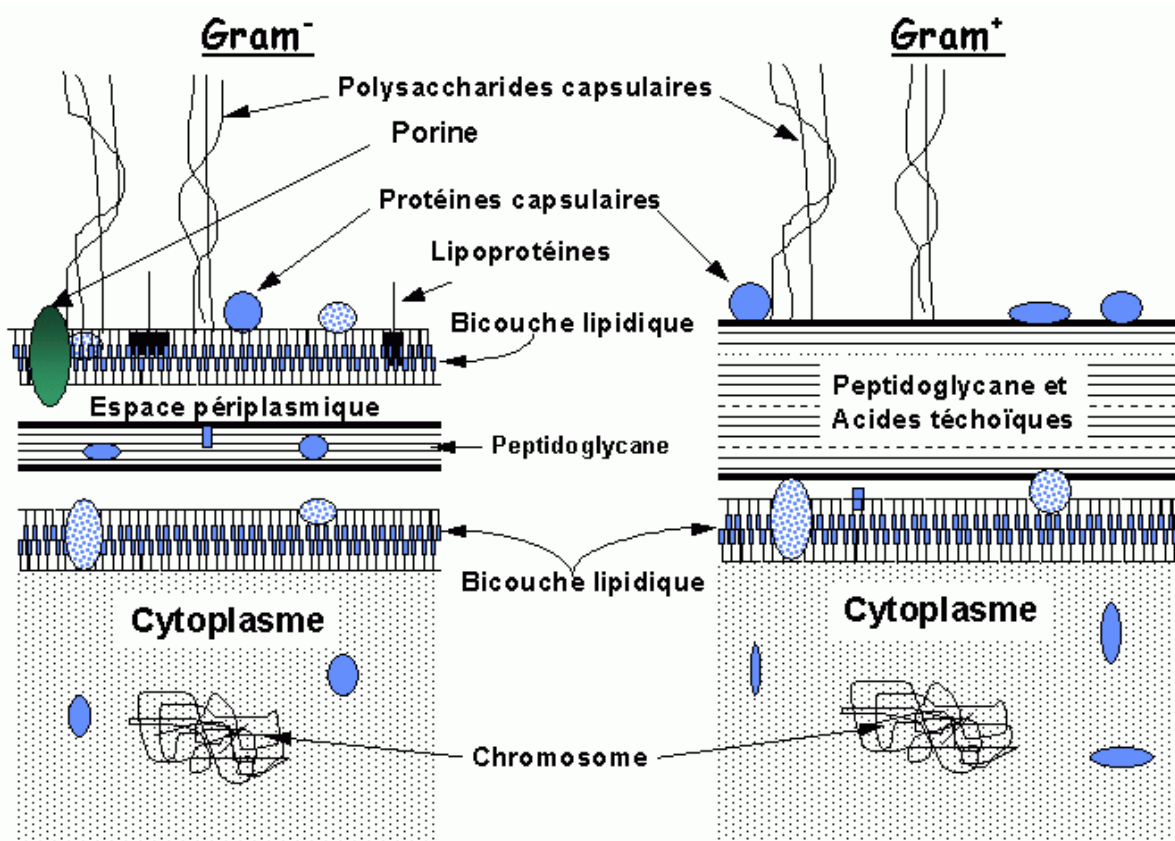


Figure 5': Parois des Gram (+) et Gram (-)



Figure 6': Test de l'oxydase

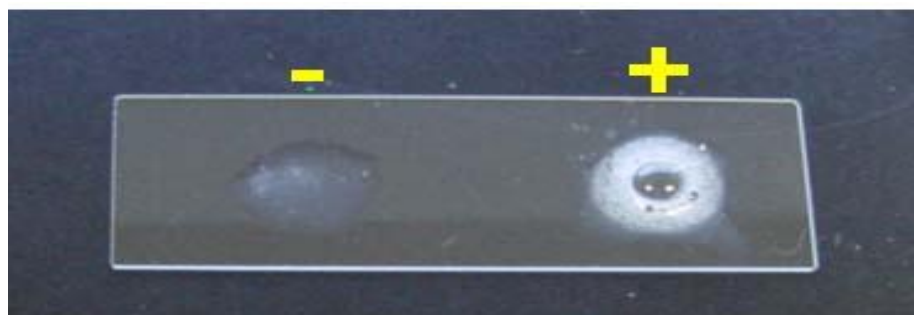


Figure 7': Résultats de la catalase.



Figure 8': Test de la coagulase. Api staph

Principe : La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée en API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification.

Préparation de la galerie : Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum : Réaliser une pré-culture sur gélose Columbia au sang et faire une suspension bactérienne, dans une ampoule API Staph Medium, d'opacité égale à 0,5 Mcfarland.

Inoculation de la galerie : Introduire la suspension dans les tubes de la galerie en évitant la formation de bulles. Pour les caractères ADH, URE, remplir les cupules d'huile de paraffine et incubé 24 heures à 37°C.

Lecture : Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture. Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : voir tableau de résultats.

Tableau 1 : Lecture de la galerie miniaturisée Api staph.

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	-
GL	D-glucose	Témoin positif	Rouge	Jaune
FR U	D-fructose	Acidification à partir du carbohydrate		
MN	D-mannose			
MA	Maltose			
LA	Lactose			
TR	D-tréhalose			
MA	D-mannitol			
XL	Xylitol			
ME	D-melibiose			
N I	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 10 mn	
			Incolore/rose	Rouge
PA L	β -naphtyl ac.phosphate	Phosphatase alcaline	ZYM A + ZYM B / 10 mn	
			Jaune	Violet
V P	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	VP 1 + VP 2 / 10 mn	
			Incolore/ rose	Violet/rose
RA F	Raffinose	Acidification à partir du carbohydrate	Rouge	jaune
XY	Xylose			
SA	Saccharose			
MD G	α -méthyl-D- glucosamine			
NA	N-acétyl-glucosamine			
AD	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rouge
UR	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/violet



Figure 9': Observation microscopique d'*Aspergillus*



Figure 10': Observation microscopique de *Fusarium*

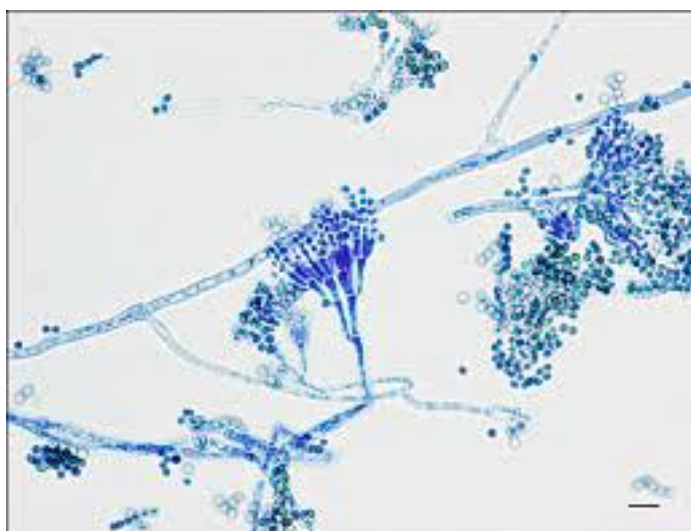


Figure 11': Observation microscopique de *Penicillium*

Annexe 5 :*Résultats de caractérisation de Streptococcus thermophilus
et Lactobacillus bulgaricus***Examens macroscopiques et microscopiques**

L'observation macroscopique des cultures bactériennes sur milieu M17 a montré que la souche *St. thermophilus* se développe en donnant des colonies rondes à contour régulier opaque de coloration blanc crème. Sur le milieu MRS, la souche *Lactobacillus bulgaricus* forme des colonies opaques blanchâtres de 1 à 4 mm de diamètre.

*Streptococcus thermophilus**Lactobacillus bulgaricus*

Planche 1 : Observation macroscopique de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*

Les *Lactobacillus* ont une forme de bâtonnet, regroupés ou séparés, d'une couleur violette tandis que les *Streptococcus* se présentent sous forme de cocci disposés en chaînette regroupées ou séparées et d'une couleur violette.

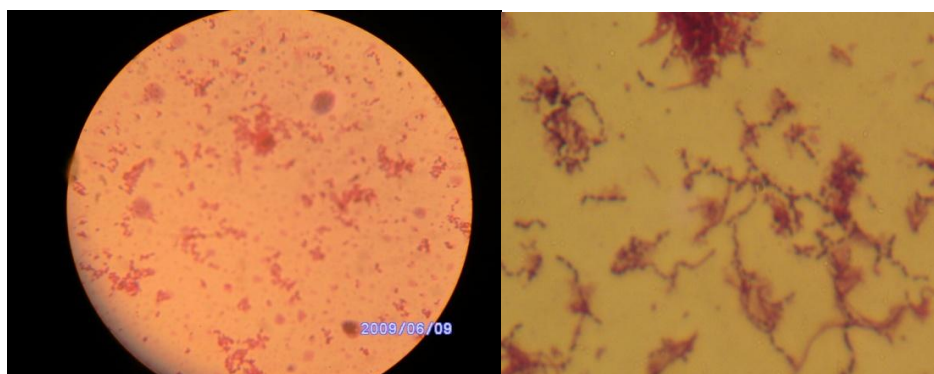
*Streptococcus thermophilus**Lactobacillus bulgaricus*

Planche 2 : Observation microscopique de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*

Annexe 6 :*Tests biochimiques*

Test de catalase : Par absence de l'activité catalytique chez les deux souches, le test de catalase s'est révélé négatif ce qui est conforme aux résultats attendus.

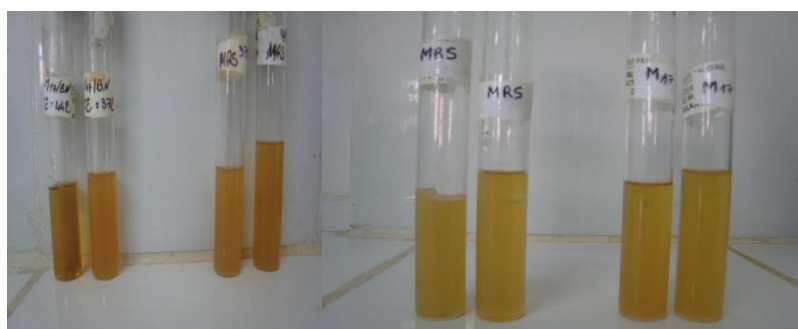
*Streptococcus thermophilus**Lactobacillus bulgaricus*

Planche 3 : Test de catalase chez *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

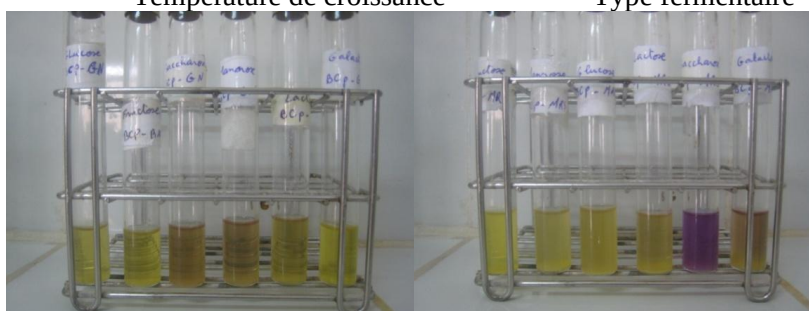
Tests de confirmation : Les résultats obtenus des autres tests d'identification ainsi que la coloration de Gram et la catalase pour les deux souches sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 2 : Résultats de l'identification biochimique des deux souches bactériennes

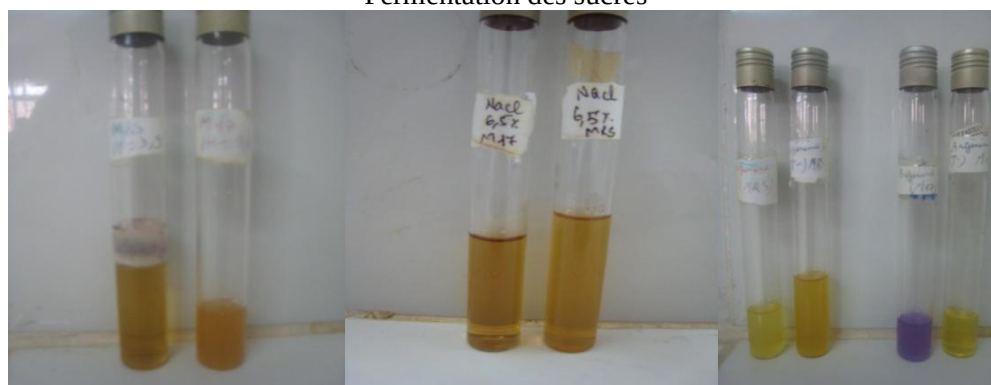
Tests	Souches bactériennes	
	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>
Gram	+	+
Catalase	-	-
Type fermentaire	Homofermentaire	homofermentaire
Croissance à 45 °C	+	+
Croissance à 10 °C	-	-
Croissance en 6,5% de NaCl	-	-
Croissance à pH 3,9	/	-
Croissance à pH 9,6	-	/
Dégradation de l'arginine	+	-
Dégradation de l'esculine	-	+
Température de croissance	45°C	37°C
Fermentation de sucre	Lactose	Saccharose -glucose



S. thermophilus *L. bulgaricus* *L. bulgaricus* *S. thermophilus*
Température de croissance Type fermentaire



Streptococcus thermophilus *Lactobacillus bulgaricus*
Fermentation des sucres



pH NaCl Lb St
Croissance en conditions hostiles Hydrolyse de l'arginine



Streptococcus thermophilus *Lactobacillus bulgaricus*
Hydrolyse de l'esculine

Planche 4 : Tests biochimiques d'identification de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*

Annexe 7 :*Résultats d'analyse de variance des yaourts étuvés*

1. Analyse de variance sur l'acidité

<i>RAPPORT DÉTAILLÉ</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
Sujet 1	3	9	3	4
Sujet 2	3	7	2,333333333	5,333333333
Sujet 3	3	11	3,666666667	1,333333333
Sujet 4	3	7	2,333333333	1,333333333
Sujet 5	3	9	3	4
Sujet 6	3	9	3	4
Sujet 7	3	9	3	4
Sujet 8	3	9	3	0
Sujet 9	3	9	3	4
Sujet 10	3	7	2,333333333	5,333333333
Contrôle	10	22	2,2	1,066666667
5µL HE F	10	46	4,6	0,711111111
5µL HE P	10	18	1,8	1,066666667

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F calculé</i>	<i>Probabilité</i>	<i>F théorique 5%</i>	<i>F théorique 1%</i>
sujets	4,8	9	0,533333333	0,461538462	0,88162961	2,456281149	3,597073914
Traitements	45,86666667	2	22,93333333	19,84615385	2,8015E-05	3,554557146	6,012904835
Erreur	20,8	18	1,155555556				
Total	71,46666667	29					

2. Analyse de variance sur le goût

<i>RAPPORT DÉTAILLÉ</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
Sujet 1	3	11	3,666666667	5,333333333
Sujet 2	3	9	3	4
Sujet 3	3	9	3	4
Sujet 4	3	11	3,666666667	5,333333333
Sujet 5	3	11	3,666666667	5,333333333
Sujet 6	3	9	3	4
Sujet 7	3	9	3	4
Sujet 8	3	9	3	4
Sujet 9	3	9	3	4
Sujet 10	3	9	3	4
Contrôle	10	36	3,6	0,933333333
5µL HE F	10	50	5	0
5µL HE P	10	10	1	0

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F calculé</i>	<i>Probabilité</i>	<i>F théorique 5%</i>	<i>F théorique 1%</i>
sujets	4,8	9	0,533333333	0,545454545	0,82267558	2,456281149	3,597073914
Traitements	33,06666667	2	16,53333333	16,90909091	7,364E-05	3,554557146	6,012904835
Erreur	17,6	18	0,977777778				
Total	55,46666667	29					

3. Analyse de variance sur la texture

<i>RAPPORT DÉTAILLÉ</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
Sujet 1	3	9	3	4
Sujet 2	3	9	3	4
Sujet 3	3	11	3,666666667	1,33333333
Sujet 4	3	9	3	4
Sujet 5	3	11	3,666666667	1,33333333
Sujet 6	3	9	3	4
Sujet 7	3	9	3	4
Sujet 8	3	9	3	0
Sujet 9	3	11	3,666666667	1,33333333
Sujet 10	3	7	2,333333333	1,33333333
Contrôle	10	26	2,6	0,71111111
5µL HE F	10	46	4,6	0,71111111
5µL HE P	10	22	2,2	1,06666667

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F calculé</i>	<i>Probabilité</i>	<i>F théorique 5%</i>	<i>F théorique 1%</i>
sujets	2,8	9	0,311111111	1	0,47415298	2,456281149	3,597073914
Traitements	82,4	2	41,2	132,4285714	1,7114E-11	3,554557146	6,012904835
Erreur	5,6	18	0,311111111				
Total	90,8	29					

Annexe 8 : Glossaire

Aérobiose : Condition de vie des micro-organismes dont le métabolisme dépend de la présence d'oxygène ou la tolère. Aérobies : Se dit de micro-organismes qui se multiplient en présence d'oxygène. Un organisme aérobie strict a besoin d'Oxygène moléculaire (O₂) pour vivre et se développer

Akène : fruit sec au péricarpe non soudé à la graine.

Analgésique : supprime la douleur.

Anesthésique : qui provoque une privation complète ou partielle de la faculté de sentir.

Angiosperme : sous embranchement de phanérogame qui englobe les plantes à fleurs.

Apéritif : boisson le plus souvent alcoolisée prise avant le repas.

Aromate : tout parfum d'origine végétale utilisé en médecine, en parfumerie ou en cuisine.

Anti-allergique : protège contre les allergies.

Anti-arythmique : lutte contre l'irrégularité du rythme cardiaque.

Antibactérien : inhibe et détruit les bactéries.

Anticonvulsant : lutte contre les contractions spasmodiques de la musculature du corps.

Antidiabétique : protège contre le diabète.

Antidiarrhéique : lutte contre les diarrhées.

Antifongique : actif contre les champignons et les levures parasites.

Antifibriant : évite les contractions rapides et désordonnées des fibres du muscle cardiaque.

Antihypertenseur : protège contre l'augmentation de la tension vasculaire.

Anti-inflammatoire : qui combat les inflammations.

Antioxydant : permet aux aliments de résister à l'oxydation et à une détérioration graduelle.

Antipaludique : qui agit sur le paludisme : maladie parasitaire qui se manifeste par des accès de fièvres.

Antiseptique : détruit les microbes et empêche leur développement.

Antispasmodique : lutte contre les spasmes.

Antitumorale : détruit les tumeurs.

Antivirale : toute substance active contre les virus.

Aseptiques : stérile.

Bacteriocine : sont une famille de peptides ou protéines synthétisés naturellement par certaines bactéries. Elles ne sont pas des antibiotiques mais elles possèdent des propriétés antibiotiques.

Bisannuelle : plante qui effectue son cycle de croissance en deux ans.

Blastospore : spore née par bourgeonnement du filament ou d'une spore précédemment formée, pouvant rester en chaînette - levures et pseudo mycélium des levures.

Carminatif : qui a la propriété d'expulser les gaz intestinaux.

Cardiotonique : qui a une action tonique sur le cœur.

Caséines : caséines du lait représentent la principale source d'azote pour les bactéries lactiques.

Cellules procaryotes : est un organisme vivant unicellulaire qui ne possède pas de noyau.

Condiment : substance dont le parfum prononcé sert à relever la saveur des aliments.

Carpelle : chacune des parties dont l'ensemble constitue une fleur.

Cholérétique : nom donné aux substances qui stimulent la sécrétion de la bile.

Compost : mélange de matières organiques et végétales utilisé comme engrais (anglais *compost*, de l'ancien français *compost*, engrais, composé)

Conidium : structures de formes très variables portant ces spores.

Dialypétale : à pétales séparées.

Dicotylédone : plante munie de deux cotylédons.

Digestif : remède concourant à la digestion.

Diurétique : augmente la sécrétion des urines.

Dysménorrhée : menstruations douloureuses

Dyspnées : difficulté à respirer, s'accompagnant d'une sensation de gêne ou d'oppression.

Emménagogue : provoque ou régularise la menstruation (règles).

Ensilage : Procédé de conservation de végétaux frais utilisant la fermentation lactique et consistant à les placer dans un silo ou à les mettre en tas et à les presser après les avoir hachés. Produit, destiné à l'alimentation du bétail, conservé par cette méthode.

Entérobactéries : Les entérobactéries sont une famille très hétérogène à Gram négatif pour ce qui est de leur pathogénie et de leur écologie.

Entérotoxines : est une substance toxique (toxine) produite par un organisme (en particulier certaines bactéries).

Epice : substance aromatique végétale qui augmente la saveur d'un met.

Fébrifuge : qui enraye la fièvre.

Fermentation : est la transformation d'une substance organique (fruits, légumes, céréales, légumineuses, lait, poisson, viande, résidus organiques, etc.) sous l'action de ferments ou d'enzymes produits par des bactéries ou des champignons microscopiques et elle n'a pas un risque sanitaire.

Galactogogue : favorise les sécrétions lactées.

Halo translucide : Qui laisse passer les rayons lumineux mais ne permet pas de distinguer nettement les contours ou les couleurs des objets.

Hypoglycémiant : provoque la chute du taux de glucose dans le sang.

Hépatoprotecteur

Hyphe : filament mycélien, cloisonné ou non, dont l'ensemble constitue le thalle des champignons.

Hyménium : est la partie fertile d'un champignon donnant naissance aux spores, chez les basidiomycètes il est essentiellement composé de basides placées côte à côte, tandis que celui des ascomycètes comporte des asques eux aussi dressés côte à côte.

Inoculation : introduction d'un micro-organisme dans un milieu de culture.

Inappétant : qui affaiblit l'appétit

Insecticide : détruit les insectes nuisibles.

Involucelle : petit involucre.

Involucre : ensemble de bractées, d'organe foliacés situés autour d'une fleur ou d'une inflorescence, d'une ombelle ou d'un capitule.

Larvicide : produit destiné à détruire les larves des insectes.

Menstruel : relatif à la menstruation (les règles).

Mutagène : capable de provoquer les mutations.

Mycélienne : partie végétative des champignons, formée de filaments souterrains ramifiés, généralement blancs, et sur laquelle croîtront les carpophores, ou champignons au sens usuel du mot.

Mycotoxines : sont des toxines élaborées par diverses espèces de champignons microscopiques telles que les moisissures.

Ocytocique : développe l'ocytocine qui facilite l'accouchement.

Ophtalmique : traitement des affections oculaires.

Ovoïde : dont la forme ressemble à celle d'un œuf.

Pathotypes : Ensemble de micro-organismes quelquefois très éloignés les uns des autres (taxinomiquement éloignés, c'est-à-dire n'appartenant pas la même classification), mais possédant la capacité d'être à l'origine de la même maladie (pathologie identique).

Phanérogame : plante à fleurs.

Pénicilles : champignon ascomycète se développant sous forme de moisissure sur des matières alimentaires en décomposition.

Polyplœdie : se dit d'une cellule, d'un noyau, qui comporte une quantité excessive de chromosomes.

Polyphages : un organisme est qualifié de polyphages s'il se nourrit d'aliments divers et ne se restreint à une seule catégorie.

Probiotique : est tout microorganisme vivant qui, une fois ingéré en certaine quantité, exerce des effets bénéfiques sur la santé au-delà des fonctions nutritionnelles de base.

Procaryote : est un organisme unicellulaire qui ne possède pas de noyau.

Pyogènes : un micro-organisme pyogène est un micro-organisme possédant la capacité de provoquer une accumulation locale de polynucléaires neutrophiles (variété de globules blancs) augmentant en cas d'infection. Le plus qui en est la conséquence est le résultat du rassemblement de ces globules blancs altérés.

Saprophytes : est un 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.

Sclérote : amas d'hyphes mycéliens en générale à parois épaisses formant une structure homogène de taille et de forme variable pourvue d'une structure corticale différenciée.

Sédatif : qui calme l'organisme.

septicémies : est une infection généralisée de l'organisme, due à des microorganismes pathogènes de type bactérien.

Sérotypes : Catégories dans lesquelles certains virus ou bactéries sont classés selon leur réaction en présence d'un sérum (partie liquidienne du sang) qui contient des anticorps spécifiques contre les bactéries ou les virus en question.

Sporophore : est un amas condensé et structuré en une forme précise, il est un organe souvent éphémère, qui n'existe que chez les champignons les plus évolués: les ascomycètes et les basidiomycètes.

Stérigmate : dernier prolongement d'un filament ou rameau fructifère portant les spores.

Spermatoxique : détruit le sperme.

Spasmolytique : antispasmodique.

Stomachique : lutte contre les maux d'estomac.

Spores : en biologie, une spore (grec ancien, « ensemencement, semence ») est une cellule ou un organe de multiplication végétative ou de reproduction. Elle constitue une des étapes du cycle de vie de nombreuses bactéries et de plantes.

Dans le cadre de la valorisation du potentiel aromatique et médicinal des plantes algériennes, nous nous sommes intéressés à l'identification des constituants des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil, à l'évaluation de leurs activités antimicrobienne et antioxydante, ainsi qu'à leur effet sur les bactéries lactiques.

Les essences des graines de coriandre, de fenouil et de persil ainsi que la partie aérienne de la coriandre et du persil obtenues par hydrodistillation avec des rendements allant de (0,14 à 1,00)% ont été caractérisées par leurs propriétés physico-chimiques et par leur profil chromatographique.

L'application des méthodes chromatographique et spectroscopique CG/MS-IE et ICP ont permis de mettre en évidence les constituants majoritaires des essences extraites. Les résultats obtenus indiquent que les principaux composants des huiles essentielles de fenouil et de persil sont des dérivés du phénylpropane. Par contre, celle de coriandre est un alcool monoterpénique pour ses graines et un aldéhyde pour sa partie aérienne.

Le deuxième volet de notre travail a pour but de mettre en évidence le pouvoir antimicrobien des huiles végétales extraites. Pour cela, différentes techniques microbiologiques ont été utilisées. Les tests biologiques effectués *in vitro* sur quelques espèces bactériennes à Gram (+) et Gram (-) et quelques moisissures, révèlent que les essences présentent une activité antimicrobienne vis-à-vis des souches bactériennes et fongiques testées.

Par ailleurs, l'effet des huiles essentielles des graines de fenouil et de persil sur l'activité acidifiante des bactéries lactiques révèlent l'effet inhibiteur de l'huile essentielle du fenouil sur la cinétique de croissance et d'acidification de *Streptococcus thermophilus* *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus rhamnosus*. Cependant aucun effet inhibiteur de l'huile essentielle de persil sur ces deux souches n'a été observé. Aussi, l'ajout de ces deux essences a permis de stabiliser la qualité microbiologique et nutritionnelle du yaourt tout en allongeant sa durée de conservation.

En outre, l'activité antioxydante des essences évaluée par le test du radical DPPH• a montré que l'huile essentielle des graines de coriandre a un effet antioxydant important et comparable à celui obtenu par l'acide ascorbique, suivie de celle des graines de persil, de fenouil et de la partie aérienne du persil.

Mots clés : *Coriandrum Sativum*, *Foeniculum vulgare*, *Petroselinum crispum*, analyse CG /MS, chromatographie, activité antimicrobienne, bactéries lactiques, effet antioxydant.