

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Saad Dahleb Blida**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la vie**

**Département de Biotechnologie Agro-Ecologie**

**Mémoire de Fin de Cycle en Vue de l'Obtention d'un Diplôme de Master 2**

**Spécialité : Biotechnologie Microbienne**

**Thème :**

**Etude comparative des activités biologiques de  
deux huiles végétales aromatisées avec  
trois huiles essentielles**

**(Citron, l'Ail et le Thym).**

**Présenté par :**  
**Ben Rezoug Sarah**

**Soutenu le : 20 / 07 / 2022.**

Devant le jury composé de :

- |                     |                                     |       |                 |
|---------------------|-------------------------------------|-------|-----------------|
| - Mme TOUA. D       | MAA                                 | USDB1 | Présidente.     |
| - Mme BOUCHENAK. F  | MCA                                 | USDB1 | Examinatrice.   |
| - Mme ALILECHE. KH  | MRB                                 | CRAPC | Promotrice.     |
| - Mme BENKORTEBY. H | MAA                                 | USDB1 | Co Promotrice.  |
| - Mme OURAGHI. S    | Chef de département control qualité |       | SAIDAL Invitée. |

Promotion 2021/2022.

## **Remerciements**

*Au terme de ce travail, je m'adresse mes remerciements les plus sincères à : Dieu, tout Puissant de m'avoir ouvert les portes du savoir et de m'avoir donné le courage et la volonté pour mener à terme mon travail.*

*Les travaux présentés dans ce mémoire ont été menés au Centre de recherche et Technique en Analyses physicochimiques. Nous tenons à remercier **Pr. BECHARI Khaldoun** (Directeur de Centre de recherche et Technique en Analyses physicochimiques) et **Dr. BOUDRICHE Lylia** (Directrice de la Division Produit Naturel et Science Alimentaire) pour ces contributions à la réalisation du travail.*

*Mes plus vifs remerciements s'adressent à ma Promotrice, **Dr ALILECHE. KH**, Maitre de recherche classe B au niveau de Centre de recherche et Technique en Analyses physicochimiques (**CRAPC**) pour la proposition du thème et le suivi de ce travail ; je suis honoré par son accompagnement et son aide ; je lui exprime ma gratitude pour tous ses efforts, Tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*J'adresse tous mes remerciements au Mme **BENKORTEBY.H** pour avoir accepté de co-encadrer ce travail et pour tous ses précieux conseils*

*Je tiens à remercier chacun des membres du jury, de me faire bénéficier de leur expertise en acceptant de juger ce travail et de consacrer du temps à l'examen de ce manuscrit. Mme **TOUA. D** (Université de Blida 1) de m'avoir accordé l'honneur de présider ce jury. Je tiens à remercier Mme **BOUCHENAK. F** (Université de Blida 1) de m'avoir accordé l'honneur d'examiner ce travail.*

*J'adresse mes remerciements à Mme **OURAGHI.S** et Mme **OURAK.S** La responsable du laboratoire de **Microbiologie CRD** à l'unité **SAIDAL** de **Gué de Constantine**, ainsi Madame **BEN REZOUG AICHA.**, **CHABEB FATIHA.**, **Mr LOUAFI NACER.**, Pour leur grande disponibilité, leur aide et leur gentillesse,*

*Un grand merci à **Pr. KRIMI ZOULIKHA**. A tous nos enseignants qui nous ont initiés aux valeurs authentiques, en signe d'un profond respect et d'un profond amour.*

*Je tiens à remercier aussi tous les membres du laboratoire de Chromatographie GCMS, les membres du laboratoire HPLC, laboratoire de Rancimat, laboratoire de l'infra-rouge pour leurs conseils, leurs soutiens, leurs suivis et les passionnantes discussions.*

# *Dédicace*

*Je tiens à dédier ce modeste travail avant tout,*

*A ma Mère et, mon Père*

*Aucun mot ne saurait témoigner de grands égards à mes parents.*

*Je souhaite que Dieu les préserve, je leur souhaite  
une longue vie pleine de santé et de bonheur.*

*A Mes chers frères, Sid Ali, Sid Ahmed et Zouhir*

*Pour leurs temps d'avoir a supporté ma vie et mon travail.*

*Une spéciale dédicace encore à ma deuxièmes famille Arrgoun*

*Qui font une partie de mon bonheur.*

*A Mr Arrgoun Rachid*

*Qui a su de loin m'encourager et me soutenir.*

*A mes meilleures sœurs Ben Zahi Sarah et Kenza Yasmin*

*Pour leur soutien permanent tout au long de ce travail.*

*A Mes chères amies Zaida Lina et Bouacha Sabrina*

*Pour les moments agréables que nous avons passés ensemble au CRAPC.*

*A Mes Cousines Louafi Hind et Ferial.*

*A toutes les filles d'Agro-Alimentaire Rima, Imen, Ferial.*

*A Ma chère copine Lantri Djoumana.*

*A toute l'équipe du CRAPC.*

## *Liste des Figures*

<b>Figure I.1</b> La description du <i>Citrus limon</i> L.....	12
<b>Figure I.2</b> Description de l' <i>Allium sativum</i> L.....	15
<b>Figure I.3</b> Description du <i>Thymus vulgaris</i> L .....	17
<b>Figure II.1</b> Structure de la chlorophylle a et b.....	23
<b>Figure II.2</b> <i>Olea europaea</i> L de la Région de la Soummam.....	29
<b>Figure III.1</b> La Structure d'une Bacterie.....	36
<b>Figure III.2</b> Forme principale des bacteries.....	37
<b>Figure III.3</b> Mécanismes d'action des huiles essentielles.....	43
<b>Figure III.4</b> Illustration de la méthode d'aromatogramme .....	45
<b>Figure III.5</b> Le principe de la méthode de diffusion en puits.....	45
<b>Figure IV.1</b> Montage d'hydrodistillation.....	48
<b>Figure IV.2</b> Flacons verre ambré des huiles essentielles.....	51
<b>Figure IV.3</b> Les huiles dans l'étuve et le dessiccateur.....	51
<b>Figure IV.4</b> Préparation des Extraits phénoliques.....	56
<b>Figure IV.5</b> Préparation d'acide gallique par dilution.....	57
<b>Figure IV.6</b> Préparation des extraits phénoliques .....	57
<b>Figure IV.7</b> Flacons verre ambré des huiles aromatisées.....	59
<b>Figure IV.8</b> Préparation des esters méthyliques.....	60
<b>Figure IV.9</b> Mécanisme réactionnel du DPPH.....	61
<b>Figure IV.10</b> Les milieux de cultures.....	62
<b>Figure IV.10</b> Suspensions bactériennes.....	63
<b>Figure V.1</b> Rendement d'extraction des HEs.....	66
<b>Figure V.2</b> les différentes familles de composés constituant l'huile essentielles du citron....	70
<b>Figure V.3</b> Les différentes familles de composés constituât l'huile essentielles de l'Ail....	71

<b>Figure V.4</b> Les différentes familles de composées constituant de l'huile essentielle du thym.....	<b>73</b>
<b>Figure V.5</b> Evolution de la densité des huiles végétales avant et après l'aromatisation.....	<b>76</b>
<b>Figure V.6</b> Evolution de l'Humidité des huiles végétales avant et après l'aromatisation.....	<b>77</b>
<b>Figure V.7</b> Evolution de l'acidité des huiles végétales avant et après l'aromatisation.....	<b>78</b>
<b>Figure V.8</b> Evolution de l'indice de peroxyde des huiles étudiées avant et après l'aromatisation.....	<b>79</b>
<b>Figure V.9</b> Evolution des extinctions spécifiques k232, K270.....	<b>80</b>
<b>Figure V.10</b> Evolution des pigments .....	<b>81</b>
<b>Figure V.11</b> Evolution des composés phénoliques des huiles végétales avant et après l'aromatisation.....	<b>83</b>
<b>Figure V.12</b> Superposition du spectre IR d'huile Oléastre avant et après l'aromatisation... .	<b>87</b>
<b>Figure V.13</b> Superposition des spectres IR de l'huile Elio avant et après l'aromatisation.....	<b>87</b>
<b>Figure V.14</b> Evolution de pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de l'huile essentielle.....	<b>89</b>
<b>Figure V.15</b> Evolution de pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de l'huile Elio avant et après l'aromatisation .....	<b>90</b>
<b>Figure V.16</b> Evolution de pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de l'huile d'Oléastre avant et après l'aromatisation.....	<b>90</b>
<b>Figure V.17</b> Evaluation d'activité antimicrobienne des huiles végétales et huiles essentielles .....	<b>98</b>
<b>Figure V.18</b> Evaluation d'activité antimicrobienne des huiles végétales aromatisées avec les huiles essentielles.....	<b>98</b>
<b>Figure V.19</b> Evaluation d'activités antimicrobiennes des huiles végétales.....	<b>101</b>
<b>Figure V.20</b> Evaluation d'activités antimicrobienne des huiles essentielles de l'Ail.....	<b>102</b>
<b>Figure V.21</b> Evaluation d'activités antimicrobiennes des huiles essentielles du Citron.....	<b>103</b>
<b>Figure V.22</b> Evaluation d'activités antimicrobiennes des huiles essentielles du Thym.....	<b>104</b>
<b>Figure V.23</b> Evaluation d'activités antimicrobiennes des huiles végétales avec HE Citron.....	<b>105</b>
<b>Figure V.24</b> Evaluation d'activités antimicrobiennes des huiles végétales aromatisées avec HE l'Ail.....	<b>106</b>
<b>Figure V.25</b> Evaluation d'activités antimicrobiennes des huiles végétales avec HE du Thym.....	<b>108</b>

## Liste des Tableaux

- <b>Tableau I.1</b> La classification botanique de Citron.....	13
- <b>Tableau I.2</b> La classification de l'Ail .....	15
- <b>Tableau I.3</b> La classification botanique du Thym .....	17
- <b>Tableau II.1</b> Principales classes des huiles et graisses alimentaires.....	23
- <b>Tableau II.2</b> Classification botanique de l'arbre d'olivier .....	30
- <b>Tableau III.1</b> Mécanismes d'action de quelques antioxydants .....	35
- <b>Tableau III.2</b> Classification d' <i>E.coli</i> .....	38
- <b>Tableau III.3</b> Classification de <i>P.aeruginosa</i> .....	39
- <b>Tableau III.4</b> Classification de <i>S.aureus</i> .....	40
- <b>Tableau III.5</b> Classification de <i>B.subtilis</i> .....	40
- <b>Tableau III.6</b> Classification de <i>C.albicans</i> .....	41
- <b>Tableau III.7</b> Classification de <i>S.cerevisiae</i> .....	42
- <b>Tableau IV.1</b> Echantillonnage .....	49
- <b>Tableau IV.2</b> Les souches microbiennes de références.....	50
- <b>Tableau IV.3</b> Concentration des huiles aromatisées .....	59
- <b>Tableau IV.4</b> Echelle de l'activité antimicrobienne .....	65
- <b>Tableau V.1</b> Les caractéristiques organoleptiques des HEs.....	66
- <b>Tableau V.2</b> Les différents constituant identifiés par GC-MS dans l'huile essentielle du Citron .....	68
- <b>Tableau V.3</b> les différents constituant identifiés par GC-MS dans l'huile essentielle de l'Ail.....	72
- <b>Tableau V.4</b> les différents constituant identifiés par GC-MS dans l'huile essentielle du Thym .....	74
- <b>Tableau V.5</b> Détermination des Acide Gras des huiles végétales et huiles aromatisées .....	85
<b>Tableau V.6</b> Les diamètres d'halos d'inhibition de la croissance des souches bactériennes et fongiques.....	100
<b>Tableau V.7</b> Les diamètres d'halos d'inhibition de la croissance des souches bactériennes et fongiques.....	101

## Liste des Abréviations

- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique.
- **AFNOR** : Association française de normalisation.
- **AG** : Acide Gras.
- **ATB** : Antibiotique.
- **BHT** : Le butylhydroxytoluène.
- **C**: Carbone.
- **Ca**: Calcium.
- **CFU** : Unités Formant Colonies.
- **CG** : Chromatographie gazeuse.
- **CG** : Corps Gras.
- **CMI** : Concentration minimal inhibitrice.
- **CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de Carbone.
- **COI** : Conseil Oléicole International.
- **CPG/FID** : Chromatographie en phase Gazeuse-Détecteur à Ionisation de Flamme.
- **CRAPC** : Centre de Recherche scientifique et technique en Analyses Physico-Chimique.
- **CRD** : Centre de Recherche et de Développement.
- **DPPH** : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle.
- **G** : Gramme.
- **G-** : Gram Négatif.
- **G+** : Gram Positif.
- **GN** : Gelose nutritive.
- **H** : Hydrogène.
- **HE** : Huile essentielle.
- **HEs** : Huiles essentielles.
- **IRTF** : Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier.
- **ISO**: International Organization for Standardization
- **K**: Potassium.
- **KOH** : Hydroxyde de Potassium.
- **Mg** : Magnésium.
- **MH** : Mueller Hinton.
- **NaOH** : Hydroxyde de Sodium.
- **O**: Oxygène.
- **P**: Phosphore.
- **PAM** : Plante Aromatique et médicinale.

- **R** : Rendement.
- **S** : Soufre.
- **SAB** : Sabouraud.
- **SM** : spectrométrie de masse.
- **T** : Température.
- **UFC** : Unité Formant Colonie.
- **ZI** : Zone d’Inhibition.
- **Zn**: Zinc.
- **%**: Pourcentage.
- **±** : Plus ou moins.
- **°** : Degré.
- **°C** : Degré Celsius.
- **µl** : microlitre.

## *Liste des Annexes*

**Annexe I** : Matériels biologiques.

**Annexe II** : Matériels non Biologiques.

**Annexe III** : Les plantes médicinales étudiées.

**Annexe IV** : Appareillages.

**Annexe V** : Montage de Clevenger.

**Annexe VI** : Milieux de culture.

**Annexe VII** : Profils d'analyses chimiques GC/MS des huiles essentielles étudiées

**Annexe VIII** : Profils des Acides Gras par GC/MS des huiles végétales et les huiles aromatisées.

**Annexe IX** : La courbe d'étalonnage Acide Gallique.

**Annexe X** : Le test colorimétrique de DPPH des huiles végétales.

# Glossaire

**Bactéries à GRAM négatif :** C'est à dire quelles possèdent une paroi et cette paroi est spécifiquement formé de deux élément : une membrane externe surmontant une couche de peptidoglycane qui est un composé exclusif des *Eubactéries*.

**Bactéries à GRAM positif :** Les bactéries à GRAM positif se caractérisent aussi par la présence d'une paroi cellulaire entourant leur membrane cytoplasmique. Mais elle est de structure différente de celle des bactéries à GRAM négatif. En effet, elle se compose d'un seul élément uniquement formé d'une épaisse couche de peptidoglycane et ne comporte pas la membrane externe typiquement présent chez les bactéries à GRAM négatif.

**CMI (Concentration minimale inhibitrice) :** Nous pouvons définir la concentration minimale d'un composé vis-à-vis d'une espèce bactérienne comme étant la plus petite concentration de ce composé qui empêche tout le développement de la bactérie donnée. En termes d'ordre de grandeur, les CMI correspondent à des valeurs proches du  $\mu\text{g/ml}$  : dans tous les cas plus la CMI est faible, plus l'antibactérien est actif.

**La gentamicine :** est un antibiotique de la famille des (aminosides) aminoglycosides utilisé pour traiter divers types d'infections bactériennes, en particulier celles provoquées par des bactéries à Gram négatif.

La gentamicine est utilisée sous forme de sulfate en solution injectable, par voie parentérale.

**Fluconazole :** est un antifongique apparenté à la famille des imidazolés. Traiter les *candidoses* généralisées et les mycoses de la peau et des muqueuses (*candidose* buccale, vaginale, de l'*œsophage*...) lorsqu'un traitement local n'est pas possible.

**Antiseptique :** remède contre la gangrène. Produit utilisé sur les surfaces externes du corps, qui détruit les microorganismes : bactéries. etc.

**Antibiotique :** est une substance naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries.

## Résumé

Le présent travail a pour objectif l'exploitation des huiles essentielles du citron (*Citrus limon* L), de l'ail (*Allium sativum* L), et de thym (*Thymus vulgaris* L) et leur valorisation à travers leurs activités : antioxydante et antimicrobienne, ainsi que leur utilisation comme agents naturels pour réduire l'oxydation et la conservation des huiles végétales à large consommation.

Le rendement d'extraction de ces différentes huiles essentielles est obtenu 0.19% ; 0.11% ; 0.1% (le thym, citron et l'ail respectivement). Les analyses des paramètres de qualité ont été réalisées : l'acidité libre, l'indice de peroxyde, les coefficients d'extinctions, dosage des acides gras et la teneur en pigments, des huiles fixes et huiles aromatisées sont conformes aux normes de **COI**, et **Codex Alimentarius**. L'extraction des HEs des trois plantes a été effectuée par hydrodistillation, et leur composition chimique a été identifiée (GC/MS), montre que *Citrus limon* L contient de 98.7% de monoterpènes (D-Limonene 74,39% ;  $\alpha$ -Terpinene 7,61%), *Thymus vulgaris* L de Monoterpènes de 96,316% (Thymol 42,63 % ; Carvacrol 20,24% ;  $\gamma$ -Terpinène 20,47%) et *Allium sativum* L de Sulfures de 89,714% (Diallyl trisulfide 35,39% ; Diallyl disulfide 21,85%).

L'analyse quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu a révélé une augmentation des composés phénoliques des huiles aromatisées par rapport aux huiles témoins, l'huile *Olea europaea* aromatisées avec le HE du *Thymus vulgaris* possède la teneur la plus élevée, avec une valeur de 170,23 mg EAG/kg. Les huiles ont été également soumises à un criblage pour leur activité antimicrobienne possible *in vitro*, contre quatre souches de bactéries pathogènes et deux espèces de levures, en employant la méthode de diffusion à partir d'un disque solide. Huile essentielle de l'*Allium sativum* est plus efficace sur les souches fongiques (82mm), que les bactéries varie entre (15mm, 46mm), l'HE du *Thymus vulgaris* a un effet antimicrobien très important (ZI<48mm), HE du *Citrus limon* a une activité moyenne sur les levures(<20mm) et les bactéries,<13mm). Les huiles végétales ont une activité antimicrobienne moyenne huile de Elio <11mm, huile Oléastre <12mm.

L'évaluation de la stabilité oxydative par le test DPPH, montre que les huiles aromatisées révèlent une activité de piégeage du radical DPPH relativement moins élevée que celle des huiles témoins. D'après les résultats de cette recherche, les huiles essentielles de l'ail, citron et le thym ne peuvent être utilisées pour augmenter la stabilité oxydative des huiles végétales. Les huiles végétales aromatisées favorisent l'activité antifongique que celle des huiles témoins.

**Mots clés** : Huiles essentielles, Activité antibactérienne, Activité antioxydante, Huile de table, huile *Olea europaea* L.

## Abstract

The present work has as objective the exploitation of essential oils of lemon (*Citrus limon L*), garlic (*Allium sativum L*), and thyme (*Thymus vulgaris L*) and their valorization through their activities: antioxidant and antimicrobial as well as their use as natural agents to reduce the oxidation and the conservation of vegetable oils has large consumption.

The extraction yield of these different essential oils is obtained 0.19%; 0.11%; 0.1% (thyme, lemon and garlic respectively). The analyses of the quality parameters were carried out : free acidity, peroxide value, extinction coefficients, fatty acid composition and pigment content of the fixed and flavored oils are in accordance with the standards of **COI**, and **Codex Alimentarius**. The extraction of the EOs of the three plants was carried out by hydrodistillation, and their chemical composition was identified (GC/MS), shows that *Citrus limon L* contains of 98,7% of monoterpenes (D-Limonene74,39% ;  $\gamma$ -Terpinene7,61%), *Thymus vulgaris L* of Monoterpenes of 96,316% (Thymol 42,63 % ; Carvacrol 20,24% ;  $\gamma$ -Terpinène 20,47%) and *Allium sativum L* of Sulfides of 89,714% (Diallyl trisulfide35,93%; Diallyl disulfide 21,85%). The vegetable oils have a medium antimicrobial activity Elio oil <11mm, Oleaster oil <12mm.

The evaluation of oxidative stability by DPPH assay shows that the flavored oils reveal relatively lower DPPH radical scavenging activity than the control oils. D'après les résultats de cette recherche, les huiles essentielles de l'ail, citron et le thym ne peuvent être utilisées pour augmenter la stabilité oxydative des huiles végétales. Les huiles végétales aromatisées favorisent l'activité antifongique que celle des huiles témoins.

**Key words:** Essential oils, Antibacterial activity, Antioxidant activity, Table oil,

*Olea europaea L oil.*

## ملخص

يهدف هذا العمل إلى استغلال الزيوت الأساسية من الليمون (*Citrus limon L*) والثوم (*Allium sativum L*) والزعتر (*Thymus vulgaris L*) وتعزيزها من خلال أنشطتها: مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات، وكذلك استخدامها كعوامل طبيعية لتقليل الأكسدة الزيوت النباتية والمحافظة عليها للاستهلاك الواسع.

تم الحصول على مردود استخلاص هذه الزيوت العطرية المختلفة 0.19% ؛ 0.11% ؛ 0.1% (زعتر وليمون وثوم على التوالي). تم إجراء تحليلات لمعايير الجودة: الحموضة الحرة، مؤشر البيروكسيد، معاملات الانقراض، تكوين الأحماض الدهنية ومحتوى الصباغ، الزيوت الثابتة والزيوت المنكهة التي تتوافق مع معايير **COI**، و **Codex Alimentarius**.

تم استخلاص الزيوت الأساسية من النباتات الثلاثة عن طريق التقطير المائي، وتم تحديد تركيبها الكيميائي بـ (GC / MS)، مما يدل على أن *Citrus limon L* يحتوي على 98.7% من monoterpenes

74.39 %D-Limonene ؛ 7.61 % (α-Terpinene) ، ويحتوي *Thymus vulgaris L* من Monoterpenes بنسبة 96.316 % (Thymol 42.63 ؛ Carvacrol 20.24 ؛ γ- Terpinene 20.47) و *Allium sativum L* من الكبريتيدات بنسبة 89.71% (Diallyl Disulfide 35.39 ؛ Diallyl disulfide 21.85 %).

تم فحص الزيوت أيضًا بحثًا عن نشاط مضاد للميكروبات محتمل في المختبر ضد أربع سلالات من البكتيريا المسببة للأمراض ونوعين من الخميرة باستخدام طريقة نشر القرص الصلب. يعتبر زيت *Allium sativum* (82 ملم) الأساسي أكثر فاعلية على السلالات الفطرية من البكتيريا تتراوح بين (15 ملم، 46 ملم)، ولزيت *Thymus vulgaris* الأساسي تأثير مضاد للفطريات ومضاد للميكروبات (48ملم <ZI) للزيت الأساسي *Citrus limon* نشاط مهم على الخمائر (<20ملم) والبكتيريا (<13 مم).

يحتوي زيت مائدة على نشاط مضاد للميكروبات متوسط 11 ملم ، وزيت زيتون <12 ملم.. يُظهر تقييم الثبات التأكسدي بواسطة اختبار DPPH أن الزيوت المنكهة تكشف عن نشاط إزالة جذري لـ DPPH أقل نسبيًا من تلك الموجودة في زيوت التحكم. وفقًا لنتائج هذا البحث، لا يمكن استخدام الزيوت الأساسية من الثوم والليمون والزعتر لزيادة الاستقرار التأكسدي للزيوت النباتية. تعزز الزيوت المنكهة النشاط المضاد للفطريات أكثر من زيوت التحكم.

**الكلمات المفتاحية:** زيوت أساسية، نشاط مضاد للجراثيم، نشاط مضاد للأكسدة، زيت المائدة، زيت *Olea europaea L*.

## *Table de matière*

Liste des Figures.

Liste des Tableaux.

Liste des Abréviations.

Liste des Annexe.

Glossaire.

Résumé.

### *Partie I : Revue Bibliographique*

Introduction Générales.....1

#### *Chapitre I : Généralité sur les Huiles Essentielles*

I. Les huiles essentielles.....	3
I.1 Introduction.....	3
I.2 Définition.....	3
I.3 Réparation et localisation .....	4
I.4 Classification des huiles essentielles.....	4
I.4.1 Les huiles majeures.....	4
I.4.2 Les huile médiums.....	4
I.4.3 Les huile de terrains.....	5
I.5 Caractérisation des huiles essentielles.....	5
I.5.1 Caractérisation organoleptique.....	5
I.5.2 Caractérisation physique.....	5
I.5.3 Caractérisation chimique.....	6
I.5.3.1 Terpènes.....	6
I.5.3.2 Les composés aromatiques.....	6
I.5.3.3 Composés d'origines diverses.....	6
I.6 Notion de chémotype.....	7

---

I.7 La toxicité des huiles essentielles.....	7
I.8 Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles. ....	7
I.9 Domaine d'application des huiles essentielles.....	8
I.9.1 Dans l'industrie agroalimentaire .....	8
I.9.2 En parfumerie et cosmétique.....	8
I.9.3 En pharmacie.....	9
I.9.4 En agricole.....	9
I.10 Méthodes d'extraction des huiles essentielles .....	9
I.10.1 Distillation à l'eau (Hydrodistillation).....	10
I.10.2 Distillation à l'eau et à la vapeur d'eau.....	10
I.10.3 Expression à froid.....	10
I.10.4 Extraction par les fluides supercritiques (CO <sub>2</sub> ).....	10
I.10.5 Extraction assistée par micro-ondes.....	11
I.11 Description botanique et propriétés des plantes étudiées.....	11
I.11.1 Citron ( <i>Citrus limon L.</i> ).....	11
I.11.1.1 Introduction.....	11
I.11.1.2 Répartition géographique.....	12
I.11.1.3 Description botanique.....	12
I.11.1.4 Classification.....	13
I.11.1.4 Huile essentielle du Citron.....	13
I.11.2 Ail ( <i>Allium sativum L.</i> ).....	13
I.11.2.1 Répartition géographique.....	14
I.11.2.2 Description botanique.....	14
I.11.2.3 Classification.....	15
I.11.2.4 Huile essentielle d'ail.....	15
I.11.3 Le thym ( <i>Thymus vulgaris L.</i> ).....	16
I.11.3.1 Répartition géographique.....	16
I.11.3.2 Description botanique.....	16
I.11.3.3 Classification.....	17

I.11.3 4 Huile essentielle du thym.....	17
I.12 Les analyses des huiles essentielles.....	18
I.12.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	18
I.12.2 Spectrométrie en masse SM.....	18
I.12.3 Chromatographie (GC/MS).....	19
I.12.4 Chromatographie en phase Gazeuse (CPG/DIF).....	19
I.12.5 La chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	19

## *Chapitre II : Généralité sur les Corps Gras*

II. Les Corps Gras.....	21
II.1 Définition.....	21
II.2 Composition des corps gras.....	21
II.2.1 Lipides simples.....	21
II.2.1.1 Glycérides .....	21
II.2.1.2 Acides gras.....	21
II.2.1.3 Cérides.....	21
II.2.1.4 Stérides.....	21
II.2.2 Lipides complexes.....	22
II.2.2.1 Phospholipides.....	22
II.2.2.2 Insaponifiables.....	22
II.2.2.2.1 Stérols.....	22
II.2.2.2.2 Tocophérols.....	22
II.2.2.2.3 Les cires.....	22
II.2.2.2.3 Pigments.....	22
II.3 Classification des corps gras.....	24
II.3.1 Classification selon leur origine .....	24
II.3.2 Classification des corps gras selon leur composition.....	24
II.4 Propriétés physico-chimiques des corps gras.....	24
II.4.1 Propriétés physiques.....	24

II.4.1 Propriétés chimiques.....	25
II.5 Rôles des corps gras.....	25
II.5.1 Intérêts nutritionnels des corps gras.....	25
II.2 Généralité sur Les huiles végétales.....	26
II.2.1 Introduction.....	26
II.2.2 Classes des huiles végétales.....	26
II.2.3 Qualité d'une huile alimentaire.....	27
II.2.4 Facteurs influençant la qualité d'une huile.....	28
II.2.5 Etudes de deux huiles à usage alimentaire « Huile d'oléastre et l'huile de table ELIO ».....	28
II.2.5.1 Huile Oléastre ( <i>Olea europaea L</i> ). .....	28
II.2.5.1.1 Définition de l'huile d'olive oléastre.....	28
II.2.5.1.2 Description botanique.....	29
II.2.5.1.3 Classification botanique de l'olivier.....	30
II.2.5.1.4 Composition chimique d'huile de l'oléastre.....	30
II.2.5.2 Huile de table.....	30
II.2.5.2.1 Définition.....	30
II.2.5.2.2 Propriétés physico-chimiques de l'huile.....	31
II.3 Aromatisation des huiles végétales avec les huiles essentielle .....	32

### ***Chapitre III : Les Activités Biologiques***

III. Les Activités Biologiques.....	33
III.1 Introduction.....	33
III.2 Activité antioxydante.....	33
III.2.1 Stress oxydatif.....	33
III.2.2 Origine de stress.....	34
III.2.3 Radicaux libres.....	34
III.2.4 Définition d'un antioxydant .....	35
III.2.5 Activité antioxydant des huiles essentielles.....	35
III.3 Activité antibactérienne des huiles essentielles.....	35

---

III.3.1 Définition.....	35
III.3.2 Les bactéries .....	36
III.3.3 le monde microbien et les germes pathogènes.....	36
III.3.4 Morphologie bactérienne.....	37
III.3.5 Les micro organismes testés.....	37
III.3.5.1 <i>Escherichia coli</i> .....	37
III.3.5.1.1 Définition .....	37
III.3.5.1.2 La classification.....	38
III.3.5.1.3 Pouvoir pathogène.....	38
III.3.5.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	38
III.3.5.2.1 Définition .....	38
III.3.5.2.2 La classification.....	39
III.3.5.2.3 Pouvoir pathogène.....	39
III.3.5.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39
III.3.5.3.1 Définition .....	39
III.3.5.3.2 Classification.....	41
III.3.5.3.3 Pouvoir pathogène.....	40
III.3.5.4 <i>Bacillus subtilis</i> .....	40
III.3.5.4.1 Définition .....	40
III.3.5.4.2 Classification.....	40
III.3.5.4.3 Pouvoir pathogène.....	41
III.3.5.5 <i>Candida albicans</i> .....	41
III.3.5.5.1 Définition.....	41
III.3.5.5.2 Classification.....	41
III.3.5.5.3 Pouvoir pathogène.....	41
III.3.5.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	42
III.3.5.6.1 Définition.....	42
III.3.5.6.2 Classification.....	42
III.3.6 Activité antibactérienne des huiles essentielles .....	42

<b>III.3.7</b> Activité antifongique des huiles essentielles.....	<b>43</b>
<b>III.3.7.1</b> Introduction.....	<b>43</b>
<b>III.3.7.2</b> Activité antifongique des huiles essentielles.....	<b>43</b>
<b>III.4</b> Evaluation de l'activité antimicrobienne des HES.....	<b>44</b>
<b>III.4.1</b> Méthode de diffusion en milieu solide.....	<b>44</b>
<b>III.4.2</b> Technique de diffusion en puits.....	<b>45</b>
<b>III.4.3</b> Micro-atmosphère.....	<b>45</b>
<b>III.4.4</b> Technique en milieu liquide (méthode de dilution).....	<b>46</b>
<b>III.4.4.1</b> La dilution en bouillon.....	<b>46</b>
<b>III.4.4. 2</b> La dilution en gélose.....	<b>46</b>

## ***PARTIE II : EXPERIMENTATION***

### ***Chapitre IV : Matériels et méthodes***

<b>IV.</b> Matériels et Méthodes.....	<b>47</b>
<b>IV.1</b> Contexte et démarche.....	<b>47</b>
<b>IV.2</b> Présentation d'organisme d'accueille.....	<b>47</b>
<b>IV.3</b> Choix de l'huile de table Cevital Elio.....	<b>47</b>
<b>IV.4</b> Préparation du matériel végétal.....	<b>47</b>
<b>IV.5</b> Matériels biologiques et non biologiques.....	<b>49</b>
<b>IV.5.1</b> Matériels biologiques.....	<b>49</b>
<b>IV.5.2</b> Matériels non biologiques.....	<b>50</b>
<b>IV.6</b> Rendement d'extraction.....	<b>50</b>
<b>IV.7</b> Analyses physico-chimiques.....	<b>51</b>
<b>IV.7.1</b> Analyses physiques.....	<b>51</b>
<b>IV.7.1.1</b> Humidité.....	<b>51</b>
<b>IV.7.1.2</b> La densité relative.....	<b>52</b>
<b>IV.7.2</b> Caractérisation chimique.....	<b>52</b>
<b>IV.7.2.1</b> Détermination de l'acidité.....	<b>52</b>
<b>IV.7.2.2</b> Détermination de l'indice de peroxyde.....	<b>53</b>

<b>IV.7.2.3</b> Analyse des pigments.....	<b>54</b>
<b>IV.7.2.3.1</b> Détermination de la teneur en pigments.....	<b>55</b>
<b>IV.7.2.4</b> Absorbance dans l'ultraviolet.....	<b>55</b>
<b>IV.7.3</b> Dosage des composés phénoliques.....	<b>55</b>
<b>IV.7.3.1</b> Préparation des extraits.....	<b>55</b>
<b>IV.7.3.2</b> Dosage des Composés phénoliques totaux.....	<b>56</b>
<b>IV.7.4</b> Analyse spectrale (IRTF).....	<b>58</b>
<b>IV.7.5</b> Caractérisation par GC/MS des huiles essentielles.....	<b>58</b>
<b>IV.7.6</b> Aromatisation des huiles végétales avec les trois huiles essentielles.....	<b>59</b>
<b>IV.7.6</b> Analyses des Acides Gras par (GC/MS).....	<b>59</b>
<b>IV.7.7</b> Etude de l'activité antioxydant.....	<b>60</b>
<b>IV.7.8</b> Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles extraites.....	<b>61</b>
<b>IV.7.8.1</b> Préparation de l'inoculum.....	<b>62</b>
<b>IV.7.8.1.1</b> Repiquage.....	<b>62</b>
<b>IV.7.8.1.2</b> Préparation de la suspension .....	<b>63</b>
<b>IV.7.8.2</b> Examen de l'échantillon.....	<b>63</b>
<b>IV.7.8.3</b> Dépôt des disques .....	<b>64</b>
<b>IV.8.</b> Analyses statistiques .....	<b>65</b>

## ***Chapitre V : Résultats et Discussions***

<b>V.1</b> Caractérisation des huiles essentielles extraites.....	<b>66</b>
<b>V.1.1</b> Caractéristiques organoleptiques.....	<b>66</b>
<b>V.1.2</b> Détermination des rendements d'extraction des huiles essentielles.....	<b>66</b>
<b>V.2</b> Analyse des huiles essentielles par GC-MS.....	<b>67</b>
<b>V.2.1</b> L'huile essentielle de citron ( <i>Citrus limon</i> L).....	<b>67</b>
<b>V.2.2</b> L'huile essentielle d'ail ( <i>Allium sativum</i> L).....	<b>70</b>
<b>V.2.3</b> L'huile essentielle de Thym ( <i>Thymus vulgaris</i> L).....	<b>73</b>
<b>V.3</b> Résultats de la caractérisation physicochimique des huiles végétales.....	<b>76</b>
<b>V.3.1</b> Evaluation des résultats physiques.....	<b>76</b>

V.3.1.1	Densité relative.....	76
V.3.1.2	Humidité.....	76
V.3.2	Evaluation des analyses chimiques.....	77
V.3.2.1	L'acidité.....	77
V.3.2.2	Indice de peroxyde.....	78
V.3.2.3	Extinction spécifiques.....	80
V.3.3	Résultats de la caractérisation nutritionnelle des huiles étudiées.....	81
V.3.3.1	Dosage du pigment.....	81
V.3.3.1.1	Teneur en chlorophylle.....	81
V.3.3.1.2	Teneur en caroténoïde.....	82
V.3.3.2	Dosage polyphénols.....	82
V.3.4	Composition en acides gras par GCMS.....	84
V.3.5	Analyse spectrale par infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).....	86
V.4	les activités biologiques des huiles essentielles, des huiles végétales avant et après l'aromatisation.....	88
V.4.1	Evaluation d'activité antioxydante par DPPH des huiles essentielles et huiles aromatisées.....	88
V.5	Evaluation de l'activité antimicrobienne de trois huiles essentielles et de deux antibiotiques (Gentamycine et Fluconazole) et deux huiles végétales avant et après l'aromatisation .....	91
V.5.1	Evolution de l'activité Antibactérienne des huiles essentielles.....	92
V.5.2	Evolution de l'activité antifongique des huiles essentielles.....	94
V.5.3	Evolution de l'activité Antibactérienne des huiles étudiées avant et après l'aromatisation.....	96
V.5.4	Evolution de l'activité antifongique des huiles étudiées avant et après l'aromatisation.....	97
<b>Conclusion</b>	.....	<b>109</b>

**Références bibliographiques.**

**Annexes.**

# **PARTIE I**

*Revue Bibliographique*

# *Introduction Générale*

## Introduction Générale

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable et diversifiée de métabolites secondaires qui ont plusieurs applications : pharmaceutiques, médicinales, agroalimentaires, agronomiques et biotechnologiques. Ces métabolites sont à l'origine de plusieurs activités biologiques (**Handa et al., 2008 ; Bouhareb et al., 2014**). Les nombreuses plantes aromatiques se distinguent par la biosynthèse de molécules odorantes qui constituent ce que l'on appelle les huiles essentielles (HEs) connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique et thérapeutique en médecine populaire (**Franchomme et al., 2001**). Dans notre société moderne, la médecine courante, se trouve confrontée à des problèmes majeurs, par exemple des espèces comme le citron (*Citrus limon L*), l'ail (*Allium sativum L*), et le thym (*Thymus vulgaris L*), sont décrites comme des agents antimicrobiens de large spectre (**Heinrich et al., 2004**).

De nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des ATB (**Breuil et al., 2001 ; Jeans et al., 2011**). L'inefficacité des antibiotiques face à certains germes pathogènes devenus résistants, le manque de substances antivirales, l'augmentation des déficiences immunitaires des individus, le cercle vicieux auquel aboutit la prescription continue de médicaments psychotropes (**Richard, 1992**) l'aromathérapie propose des solutions alternatives à ces problèmes. Ces huiles sont utilisées comme une source des molécules bioactives d'origine naturelle jouissant d'activités biologiques notamment l'activité antimicrobienne, antioxydante, antiseptique et anti-inflammatoire (**Garneau, 2005**).

Pour cet intérêt, les huiles essentielles considérées comme des substances naturelles bioactives occupent un bon choix dans la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques, et attirent l'intérêt de plusieurs recherches vu le nombre de leurs propriétés biologiques dénombrables (**Burt et al., 2004**). Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative des produits de synthèse dans le traitement des maladies infectieuses et dans diverses pathologies associées au stress oxydant (**Kaloustian et al., 2012**).

La consommation d'huile végétale est en perpétuelle évolution ; cet intérêt s'est fait au détriment des corps gras (CG) d'origine animale ; ce style de vie est surtout lié à la demande des consommateurs qui surveillent de plus en plus leur régime alimentaire, les huiles alimentaires comme l'huile d'olive et l'huile de table. Les olives peuvent avoir deux grandes utilisations, la première en tant que fruit entier, appelé « olive de table ». La

seconde est pour la production de l'huile d'olive (**Veillet, 2010**). Au cours des dernières années, les études décrivant les propriétés thérapeutiques de l'huile d'olive ainsi que son pouvoir antibactérien sont considérablement importantes (**Tripoli et al., 2005 ; Cicerale et al., 2010 ; Korukluoglu et al., 2010 ; Lopez et al., 2010 ; Ditano et al., 2019 ; Gaforio et al., 2019**). Cette activité antibactérienne est fortement corrélée avec la qualité de l'huile d'olive (**Romero et al., 2007**), qui à son rôle est tributaires de plusieurs facteurs pédo-climatiques, techniques de production et de stockage.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des molécules d'origines végétales jouissantes d'activités biologiques notamment les activités antibactériennes et antioxydantes.

Dans ce contexte, ce travail a pour objectif de l'étude comparative des activités biologiques de deux huiles végétales aromatisées avec trois huiles essentielles des plantes aromatiques et médicinales : **le citron, l'ail, le thym** et l'évaluation de leurs activités biologiques notamment les activités antibactériennes et antioxydantes avant et après l'aromatisation.

Notre travail est réparti en deux parties :

- ✓ La première partie est relative à l'étude bibliographique des huiles essentielles, et les huiles végétales puis les activités biologiques.
- ✓ La deuxième partie représente la partie expérimentale où nous présenterons les techniques utilisées :
  1. Extraction l'huile essentielle par l'hydrodistillation (Clevenger).
  2. Détermination de quelques caractéristiques physico-chimiques, et de la composition chimiques d'huile essentielle, par méthodes chromatographiques.
  3. Quantification des acides gras par GC/MS.
  4. Le deuxième axe consiste à déterminer l'effet Antibactérienne et antioxydant de nos huiles.

Enfin les résultats obtenus des caractéristiques physico chimiques des huiles végétales avant et après l'aromatisation ; et la composition chimique des huiles essentielles, et leur activités antibactérienne et antioxydantes sont interprétés à la lumière de la littérature. Le travail est clôturé par une conclusion générale résumera l'ensemble des résultats issus de cette étude.

# **Chapitre I**

*Généralités*

*Sur*

*Les Huiles Essentielles*

## I. Les huiles essentielles

### I.1 Introduction

Les plantes supérieures synthétisent une grande diversité de métabolites secondaires pour leur défense et leur survie. Le nombre de ces métabolites dépasse actuellement 30 000 substances identifiées à l'échelle mondiale (**Marouf et Tremblin, 2009**). Ces métabolites secondaires sont : les pigments, les polymères, les tanins, les flavonoïdes, les vitamines, les hormones et les huiles essentielles (HEs). Ces dernières sont présentes chez les végétaux dits «plantes aromatiques» (Fragrance particulière) car elles synthétisent des essences, grâce à la présence de structures histologiques sécrétrices (**Guilhem, 2006**).

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires des plantes, communément appelées essences, ce sont des odorants volatils, extraits de différentes parties des plantes (**Bonafous, 2013 ; Hilan et al., 2011 ; Tongnuanchan et al., 2014**), possèdent un indice de réfraction élevé et ont une densité plus faible que l'eau, tout en ayant plusieurs exceptions. Elles sont aussi solubles dans les alcools et la plupart des solvants organiques (**Li et al., 2014**). Les huiles essentielles sont généralement un mélange de terpènes, principalement des monoterpènes et sesquiterpènes, de composés aromatiques et de composés aliphatiques (**Ahmad et al., 2014**).

L'activité biologique des huiles essentielles dépend de leur composition chimique (**Jovanka et al., 2011**). A été reconnu dans le passé, les huiles essentielles étaient seulement utilisées à des fins thérapeutiques directes pour les humains et les animaux (**Soto Mendivil et al., 2006**). Plus récente, les pouvoirs antimicrobiens des huiles essentielles sont également utilisés dans l'industrie agroalimentaire pour prolonger la durée de vie des produits alimentaires et pour aromatiser les aliments et les boissons. Elles sont utilisées en cosmétiques et en parfumerie pour préparer des savons, des désinfectants, des antioxydants. (**Hesham et al., 2016 ; Soto Mendivil et al., 2006**).

### I.2. Définition

Les huiles essentielles (HE) aussi appelées huiles volatiles, sont des métabolites secondaires produits par les plantes aromatiques pour combattre les infections et les parasites, elles sont synthétisées en réponse à des conditions de stress. Selon les normes de l'International Standards Organization on Essential Oils, **ISO 9235** et celle de l'Association de Normalisation Française, **AFNOR NF T 75-006 (octobre 1986)**,

une huile essentielle est définie comme : «Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation à sec».

### I.3. Répartition et localisation

Les H.E n'existent quasiment, que dans les végétaux supérieurs. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme produits du métabolisme secondaire (**Sanon et al., 2002**). Elles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graine (**Bouaine, 2017**).

La synthèse et l'accumulation d'une huile essentielle sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, le plus souvent situées sur ou à proximité de la surface du végétal. Il existe en fait quatre structures sécrétrices (**Ghenaiet, et al., 2016**) :

- ✓ Les cellules sécrétrices : Chez les Lauracées et les Zingibéracées.
- ✓ Les poils glandulaires épidermiques : Chez les Lamiacées, Géraniacées.
- ✓ Les poches sphériques schizogènes : Les glandes de type poche se rencontrent chez les familles des : Astéracées, Rosacées, Rutacées, Myrtacées.
- ✓ Les canaux glandulaires lysigènes : Chez les Conifères, Ombellifères.

### I.4. Classification des huiles essentielles

Selon la composition chimique et le pouvoir spécifique sur les germes microbiens, et grâce à l'indice aromatique obtenu par des aromatogrammes, les huiles essentielles sont classées en groupe. On peut citer les huiles majeures, les huiles médiums et les huiles terrains (**Chakou et Bassou, 2007**).

#### I.4.1. Les huiles majeures

Elles agissent aussi bien sur les bacilles à Gram(-) ou à Gram (+).ce sont des huiles dont l'action bactéricide est constante et forte. Elles sont toujours efficaces, elles servent en début de traitement et seront remplacés par les essences dites de terrains dont l'action est durable et définitive, leur indice aromatique varie entre 0,45 et 0,88 (**Jean.V, 1990**).

#### I.4.2. Les huiles médiums

Elles sont moyennement antiseptiques, elles assurent la transition entre les majeurs et les essences spécifiques nécessaires à chaque malade, elles ont une

contribution efficace en cas de thérapie de relais, leur indice aromatique varie entre 0,10 et 0,45 (**Jean.V, 1990**).

#### **I.4.3. Les huiles de terrains**

Seul l'aromatogramme pourra nous renseigner sur leur pouvoir bactéricide ou bactériostatique, elles sont donc différentes d'un individu à l'autre. Il n'est pas du tout exclu que les huiles majeures agissent également comme les huiles terrains, leurs indices aromatiques à 0,10 (**Jean , 1990**).

### **I.5. Caractérisation des huiles essentielles**

#### **I.5.1. Caractérisation organoleptique**

Liquides à température ambiante, rarement visqueuse, certaines cristallisent partiellement ou totalement à plus faible température. Les huiles essentielles sont volatiles et n'ont pas le toucher gras et onctueux, ce qui les différencie des huiles fixes (**Franchrome, 2001 ; Kaloustian et al., 2012**). La plupart d'entre elles sont incolores ou jaune pâle lorsqu'elles viennent d'être préparées à l'exception des essences à azulènes qui sont bleues (ex : camomille allemande), de l'essence d'absinthe qui est verte, de celle de girofle qui est brune et de celle de wintergreen (Gaulthérie couchée) qui est rougeâtre. D'odeur agréable, aromatique. Pour la saveur, elle peut être douce, piquante, caractéristique, fruité, fraîche, e c t (**Haddad et al., 2016**).

#### **I.5.2 Caractérisation physique**

Les huiles essentielles (HE) possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques :

- ✓ Elles sont solubles dans : l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiants et dans la plupart des solvants organiques.
- ✓ La densité est généralement inférieure à celle de l'eau
- ✓ Elles ont un indice de réfraction élevé
- ✓ Elles sont très altérables et sensibles à l'oxydation
- ✓ Elles sont liquides à la température ambiante
- ✓ Elles sont incolores sauf dans quelque cas où on trouve des huiles en jaune, en bleu (huiles essentielles de camomille), en vert (huile d'absinthe) et en rouge (huile volatile de cannelle).
- ✓ Elles sont volatiles ce qui différencie des huiles fixes (**Benabderrahmane et al., 2009**).

### I.5.3. Caractérisation chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces composés sont des molécules volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille de terpènes (**Boutarfaia et Benyahia, 2015**).

#### I.5.3.1. 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<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). Les huiles essentielles contiennent particulièrement des monoterpènes, des sesquiterpènes et peu souvent de diterpènes (**Finar, 1994**). Les terpènes sont de structures très diverses (acycliques, monocycliques, bicycliques,...) et contiennent la plupart des fonctions chimiques des matières organiques.

#### I.5.3.2 Les composés aromatiques

Cette classe comporte des composés odorants connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole, le carvacrol. Les composés sont davantage fréquents dans les huiles essentielles d'Apiaceae (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, de la vanille, de la cannelle, du basilic, de l'estragon, et (**Bouaine, 2017**). Les dérivés du phénylpropane sont moins abondants que les terpénoïdes, ce sont des arènes issues d'une voie métabolique secondaire dite de l'acide shikimique lui-même intermédiaire de la synthèse de la lignine à partir du phénylpropane. Les dérivés phényl propanoïques et les terpénoïdes sont associés en nombre et en proportions très variables de telle sorte que le produit est hétérogène et complexe sur le plan chimique. Ils sont biosynthétisés au sein des mêmes organes sécréteurs où ils forment l'essence naturelle (**Hellal, 2011**).

#### I.5.3.3 Composés d'origines diverses

Selon le mode de récupération utilisé, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire entraînable lors de l'hydro distillation, on peut citer :

- ✓ Les carbures linéaires et ramifiés, saturés ou non.
- ✓ Les acides de C<sub>3</sub> à C<sub>10</sub> : ce sont les composés les plus anti inflammatoires du règne végétal ; ils sont hypothermiques, hypotenseurs.
- ✓ Les alcools.
- ✓ Les aldéhydes.
- ✓ Les esters acycliques.

- ✓ Les lactones : elles agissent avec effet hypothermiques, et ont une action fongicide plus puissante que celle des cétones.

Dans les concrètes, il n'est pas rare de trouver des produits de masse moléculaire plus importante, non entraînés à la vapeur d'eau, tels que :

- ✓ Les homologues des phényles propanes.
- ✓ Les diterpènes.
- ✓ Les coumarines : neuro-sédatives, anticoagulantes (**Chanchal, 2001**).

### I.6. Notion de chémotype

Le chémotype d'une H.E est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'H.E. C'est l'élément qui permet de distinguer de l'huile essentielle extraite d'une même variété botanique mais, d'une composition biochimique différente. Cette classification permet de sélectionner les H.Es pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Ce polymorphisme chimique existe chez certaines espèces : *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*. Il est important de noter que les H.Es à chemotypes différents présentent non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables (**Pibiri, 2005**). Les composés chimiques ayant une efficacité à large spectre antibactériens et antifongiques sont les phénols et les aldéhydes, les alcools, les cétones, les terpéniques (**Valnet, 2005**).

### I.7. La toxicité des huiles essentielles

La majorité des intoxications connues par les plantes sont la cause d'un surdosage ; car leur accumulation dans l'organisme crée des conditions dégénératives et des effets secondaires encore plus banals (**Chemloul, 2014**). (**Menaceur, 2015**) rapporte que les huiles essentielles, ont une composition chimique très variable, dont certains composants (linalol, composant de l'huile essentielle de thym) ont un effet toxique sur les cellules de la peau humaine et ce même à faible dose.

### I.8. Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles

La constitution chimique, la quantité et la qualité extraites d'une huile essentielle dépend de plusieurs paramètres :

- ✓ Intrinsèques : les facteurs génétiques, la localisation, le degré de maturité (**Moderres et Aichouni, 2018**)
- ✓ Extrinsèques : le sol, le climat, l'environnement (**Moderres et Aichouni, 2018**).
- ✓ Technologiques : type de culture, mode de récolte, mode d'extraction.

## **I.9. Domaine d'application des huiles essentielles**

En raison de leurs diverses propriétés, les huiles essentielles 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, antispasmodique, antidiabétique, analgésique, apéritif, antiseptique..., en alimentation par leur activité antioxydante et leur effet aromatisant, en parfumerie et en cosmétique par leur propriété odoriférante, d'infections alimentaires. Ceci est dû à la présence dans ces derniers de composés aux propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (**Moderres, et al., 2018**).

### **I.9.1 Dans l'industrie agroalimentaire**

Les huiles essentielles jouent un rôle capital dans l'aromatisation des aliments. En effet, elles donnent la saveur aux condiments (poivre, gingembre) et aux aromatisants (menthe, anis, oranger, thym, laurier). A faible dose, certaines substances ont un effet favorable sur la digestion, ce qui explique leur utilisation en liquoristerie (essence d'anis ou de badiane). Les huiles essentielles entrent donc, pour leurs diverses propriétés, dans la composition des arômes employés de manière fréquente aujourd'hui dans tous les produits alimentaires comme les plats cuisinés ou prêts à l'emploi (**Porter, 2001**). Maintenant, l'industrie agroalimentaire utilise les HEs dans les préparations surgelées non seulement pour rehausser le goût mais aussi pour empêcher les contaminations alimentaires qui se développent (effet antimicrobien).

### **I.9.2 En parfumerie et cosmétique**

Les propriétés odoriférantes des huiles essentielles confèrent à ces dernières une consommation importante en parfumerie et en cosmétique. Elles présentent environ 60% des matières premières de l'industrie des parfums synthétiques, du par fumage, des savons et des cosmétiques. A la cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène on notera la présence des HEs dans les préparations dermo- pharmacologique, baies « calmant » ou « relaxant », et leur emploi dans les rouges à lèvres, les shampoings, les dentifrices, se sont surtout les huiles essentielles de lavande, de citron, de citronnelle, qui sont utilisées. On notera qu'il y a une possibilité d'adsorption percutanée des constituants terpéniques (**Bouamer et al, 2004 ; Bouanane et Boussehel, 2005**). Actuellement, on préfère utiliser des produits naturels qui sont

censés ne pas avoir d'effets secondaires graves par rapport aux produits de synthèse. En effet, il ne faut pas oublier que « naturel » ne signifie pas non toxique.

### **I.9.3 En pharmacie**

L'industrie pharmaceutique utilise les huiles essentielles dans le domaine des antiseptiques externes ; elle tire parti des propriétés bactériostatiques, bactéricides, antifongiques, protectrices, etc., des essences naturelles. Les huiles essentielles constituent le support d'une pratique de soins particulière l'aromathérapie. Elles ont grande intérêt en pharmacie, elles s'utilisent sous la forme de préparations galéniques, et dans la préparation d'infusion (verveine, thym, menthe, mélisse, fleurs d'orange...etc.). Tout fois, il faut souligner que la majorité des constituants de ces derniers sont lipophiles, et de ce fait, rapidement absorbés que ce soit par voie pulmonaire, par voie cutanée ou par voie digestive. Elles sont également utilisées pour l'obtention des huiles essentielles dans un intérêt médicamenteux (en particulier dans le domaine des antiseptiques externes). Plus de 40% du médicament sont à base de composants actifs de plants. De nombreuses huiles essentielles se trouvent dans la formule d'un très grand nombre de spécialités pharmaceutiques : sirop, goutte, gélules pommade ...etc.

### **I.9.4 En agricole**

Les huiles essentielles sont actuellement testées sur différentes cibles : les insectes, les champignons, les bactéries les adventices et également pour la conservation des semences.

Les huiles essentielles de Clou de girofle (*Syzygium aromaticum L.*) est par exemple proposée pour lutter contre les maladies de conservation des pommes et des poires, la menthe verte (*Mentha spicata L.*) est utilisée pour inhiber la germination des pommes de terre, l'orange douce (*Citrus sinensis L.*) est proposée contre de nombreuses maladies et insectes mildiou, oïdium, rouille blanche, cicadelles, aleurodes...).

### **I.10. Méthodes d'extraction des huiles essentielles**

De nombreuses méthodes sont utilisées pour extraire les huiles essentielles des plantes et préserver leurs composés volatils. Ces méthodes d'extraction sont en constante évolution afin de permettre d'améliorer le rendement d'extraction et la qualité des huiles essentielles produites (**Nguemtchouimbouga, 2012**). Le choix de la technique dépend principalement de la matière première : son état d'origine et ses

spécificités, sa nature même. Ce choix détermine les propriétés de l'HE, à savoir : viscosité, couleur, solubilité, volatilité, enrichissement ou appauvrissement en certains composants, usages et utilisations (**Afssaps, 2008**).

#### **I.10.1. Distillation à l'eau (Hydrodistillation)**

Cette méthode comprend l'immersion de la matière première dans un bain d'eau. Le tout est porté à ébullition et l'opération est habituellement conduite à la pression atmosphérique. Lors de la distillation des huiles essentielles, plusieurs mécanismes sont à la base des échanges de matière entre les phases solide, liquide et vapeur, d'où l'influence d'un grand nombre de paramètres sur la production et la qualité et le rendement (**Touahri et al., 2014**).

#### **I.10.2. Distillation à l'eau et à la vapeur d'eau (Distillation à la vapeur humide)**

Le matériel végétal est posé sur une grille percée à travers laquelle la vapeur d'eau passe. La vapeur endommage la structure des cellules de la plante et libère les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le refroidisseur. Cette méthode augmente la qualité de l'huile essentielle en réduisant au minimum les altérations hydrolytiques (**Moderres et Aichouni, 2018**).

#### **I.10.3. Expression à froid**

L'expression à froid est réservée à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes chargées en cellules sécrétrices (**Chemloul, 2014**).

#### **I.10.4. Extraction par les fluides supercritiques (CO<sub>2</sub>)**

Les fluides supercritiques peuvent être définis comme toute substance se trouvant dans des conditions de température et de pression supérieures à sa température critique et sa pression critique. Ils possèdent certaines propriétés physico-chimiques typiques des gaz, et d'autres proches de celles des liquides. Les propriétés du dioxyde de carbone en font le fluide le plus utilisé car remplissent toutes les conditions nécessaires à une utilisation en extraction en phase supercritique.

Le CO<sub>2</sub> est inerte, non toxique et accessible à un prix raisonnable pour un degré de pureté élevé. De plus, il est gazeux à température ambiante, ce qui facilite la récupération de l'extrait final en ne laissant aucun résidu toxique (**Muther, 2015**). Le dioxyde de carbone est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Il est ensuite injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, puis le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant.

### 1.10.5. Extraction assistée par micro-ondes

Cette méthode consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajouter ni eau ni solvant organique. Les parties du végétal les plus riches en eau, comme les vacuoles, absorbent les ondes puis les convertissent en chaleur, engendrant une augmentation rapide et soudaine de la température au sein de ces structures.

Ces dernières éclatent sous la pression régnant dans l'extracteur, libérant ainsi les molécules olfactives. Puis les vapeurs d'eau entraînent l'HE. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation de façon continue du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, et le retour de l'excès d'eau à l'intérieur du ballon afin de maintenir le taux d'humidité propre au matériel végétal. Pour les plantes aromatiques, après seulement 30 minutes d'extraction, les rendements en huiles essentielles obtenus sont identiques à ceux obtenus après 6 heures d'hydrodistillation (**Grunwald et al., 2006**).

## I.11 Description botanique et propriétés des plantes étudiées.

### I.11.1 Citron (*Citrus limon* L)

#### I.11.1.1 Introduction

D'après **Dubois (2006)**, le citron est d'abord appelé « *limon* », le ; mot citron est apparu dans la langue française en 1351, il est d'origine latine *citrus* il a graduellement remplacé dans la langue populaire française. Selon le même auteur cette plante est l'une des agrumes les plus vigoureuses, et croissance rapide, elle produit de nombreuses branches et fructifie abondamment. La fructification de l'hiver est plus importante et représente de 60 à 70 % de la production annuelle de l'arbre.



Figure I.1: La description du *Citrus limon L.*

#### I.11.1.2 Répartition géographique

Originaires de régions tropicales (l'union indochinoise) où la pluviométrie atteint 1000 à 2000 mm/an, les citronniers aiment un sol toujours frais mais bien drainé. Leurs racines sont la plupart superficielles, et ils n'apprécient pas la présence d'herbe ou d'autres plantes qui leur font concurrence. Ils affectionnent les sols légèrement acides, ou neutres, certains porte-greffes tolèrent les sols calcaires.

Leur gourmandise en eau peut accélérer le visage des sols, il faut alors fertiliser. Les citronniers affectionnent particulièrement le plein soleil. Ils ne craignent pas d'être exposés plein sud même par forte canicule. En revanche, ils redoutent alors le vent qui pourrait les dessécher.

#### I.11.1.3 Description botanique

Le citronnier, *Citrus limon L.* est un arbre qui appartient à la famille des *Rutacées* et aromatique et atteint 2,5 à 3 m de haut. Son fruit est jaune et ovoïde. Ses feuilles sont oblongues lancéolées de couleur verte. Ses fleurs ont des pétales blancs, à teinte violacée, axillaires, réunis en petits groupes. Son fruit est oblong, ovoïde, pointu, de 8 à 12 cm de long. Sa couleur verte vire au jaune à la maturité. Sa pulpe est acide, son écorce (zeste riche en huiles essentielles) épaisse contenant une essence à odeur caractéristique. Les graines qu'il contient ont des cotylédons blancs (Goetz, 2014).

Le plus caractéristique est la présence de glandes à huiles essentielles visibles sur les feuilles sous la forme de points translucides.

#### I.11.1.4 Classification

**Tableau I.1** La classification botanique de Citron est comme suit (Kehal, 2013)

Classification	
Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Eudicotylédones</i>
Sous classe	<i>Archichlomydeae</i>
Ordre	<i>Sapindales</i>
Famille	<i>Rutaceae</i>
Sous famille	<i>Aurantoideae</i>
Tribu	<i>Citreae</i>
Sous tribu	<i>Citrineae</i>
Genre	<i>Citrus</i>
Espèce	<i>Citrus limon L</i>

#### I.11.1.4 Huile essentielle du Citron (*Citrus limon L*)

L'huile essentielle de *Citrus limon L*, possède de nombreuses propriétés : elle nettoie le foie, aide à purifier le système digestif, calme les nausées de la femme enceinte, aide au déstockage des graisses, renforce les vaisseaux sanguins et favorise la circulation. Elle favorise la mémoire et la concentration ; elle purifie l'air grâce à ses qualités antiseptiques et bactéricides elle est également diurétique, anticellulite et anti couperose ; elle donne aussi un teint plus frais, lumineux et éclatant ; en revanche elle aide à éliminer certaines taches de rousseur (Festy, 2010). L'huile essentielle de *Citrus limon* possède notamment une double action, tonifiante en début de journée et calmante en fin de journée. Les huiles essentielles du *Citrus limon* peuvent être stockées dans (les zestes) poches sécrétrices.

#### I.11.2 Ail (*Allium sativum L*)

L'ail est une plante aromatique connue depuis l'antiquité. Bien que de nos jours elle soit principalement utilisée pour ses vertus culinaires, en prêtant sa saveur piquante à divers mets, on lui a attribué diverses fonctions au cours du temps. Bon nombre de propriétés pharmacologiques et thérapeutiques lui sont encore aujourd'hui

attribuées. C'est une plante largement utilisée en médecine traditionnelle pour ses vertus médicinales. Elle est communément appelée ail localement appelée toum ou bien teskart (**Beloued, 2001**). La partie utilisée en phytothérapie est le bulbe cru ou cuit mais aussi en sirop, en décoction et en solution alcoolique (**Gerges Geagea, 2015**).

#### **I.11.2.1 Répartition géographique**

L'ail provient à l'origine des montagnes de Tian Shan d'Asie centrale (**Lim, 2015**), est cultivé sur presque tout type de sol, notamment dans les régions du pourtour méditerranéen. L'ail préfère les sols argileux, profonds, riches en humus et en nutriments, situés dans des endroits ensoleillés. Sa multiplication se fait par voie végétative grâce à ses caïeux plantés de septembre à mi-octobre (**Goetz et Ghedira, 2012**). L'ail s'adapte à tous les climats, mais, il donne les meilleures récoltes dans les pays tempérés (**Cavagnaro et al., 2007**).

#### **I.11.2.2 Description botanique**

L'ail cultivé est une plante monocotylédone, herbacée, vivace, pouvant atteindre 25-90 cm, glabre ; le bulbe est formé de caïeux (gousses d'ail, bulbilles) à tunique membraneuse, insérés sur un plateau aplati, entourés d'une tunique commune blanchâtre ; la tige est cylindrique, feuillée jusqu'au milieu, enroulée en cercle avant la floraison; les feuilles sont linéaires, engainantes planes, lisses mesurant 2.5 cm de large et 30 à 60 cm de long; les fleurs blanches ou rougeâtres, en ombelle hémisphérique, de 2.5 à 5 cm de diamètre, comprenant de nombreux bulbilles et quelques fleurs. Les fleurs sont variables en nombre et parfois absentes. Le fruit abortif et sans graines. L'odeur est faible et se développe (forte et soufrée) dès que les tissus sont lésés (**Goetz et Ghedira, 2012 ; Lim, 2015**).

Le bulbe est de forme arrondie ou ovale, d'un diamètre d'environ 4 cm, constitué d'un plateau dur formé de caïeux (gousses) en nombre de 8 à 20, disposés en deux cercles concentriques, allongés, légèrement courbés et anguleux. Il est aussi enveloppé de minces feuilles ou tuniques membraneuses, blanches, mauves, rouges ou violettes selon les variétés. Chaque Cailleu est formé d'une seule gaine foliaire charnue, entourée de plusieurs ébauches de feuilles superposées (**Goetz et Ghedira, 2012**).

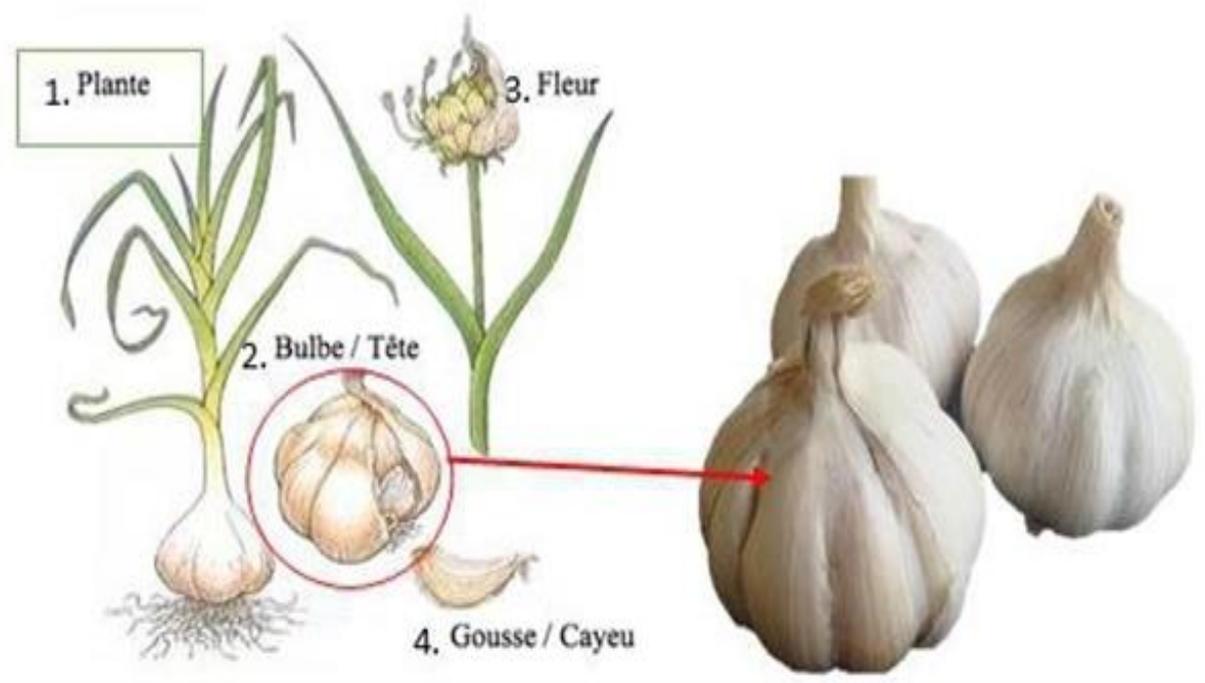


Figure I.2: Description de l'Ail. (Gambogou et al., 2019).

#### I.11.2.3 Classification

Tableau I.2 : La classification de l'Ail : est présentée ci-dessous (Goetz et Ghedira, 2012).

Classification	
Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous-embranchement	<i>Magnoliophytina</i>
Classe	<i>Liliopsida</i>
Sous-classe	<i>Liliidae</i>
Genre	<i>Allium</i>
Espèce	<i>Allium sativum L.</i>
Ordre	<i>Liliales (Asparagales)</i>
Famille	<i>Aliaceae (ex Liliaceae)</i>

#### I.11.2.4. Huile essentielle d'ail

La gousse d'ail contient des polysaccharides de réserves (Fructanes), des acides aminés, des enzymes (l'alliinase, la peroxydase et la catalase) ainsi que des composés soufrés responsables de la majorité de ses propriétés thérapeutiques telles que l'aliine.

L'ail est riche en éléments minéraux: P, K, S, Zn, Ca, Cu, Mg et en oligo-éléments comme le sélénium et le germanium. Cette plante renferme aussi des vitamines A, B1, B2, PP et C et des acides gras essentiels (Vitamine F) **(Meddeb, 2008)**.

### **I.11.3 Le thym (*Thymus vulgaris* L)**

Le thym est une plante condimentaire qui appartient à la famille des Labiées.

Le thym (*Thymus vulgaris* L) est une importante plante médicinale appartenant à la famille *Lamiaceae* ; Il a été utilisé pendant des siècles comme épice, remède à la maison, drogue, parfum et insecticide **(Dauqan et Abdullah, 2017)**.

#### **I.11.3.1 Répartition géographique**

**Selon Heni (2016)**, le *Thymus* de la famille des *Lamiaceae* ou *Labiatae*, regroupe plusieurs espèces botaniques distribuées sur tout le littoral et même dans les régions intérieures jusqu'aux zones arides. Elle est représentée en Algérie par de multiples espèces qui ne se prêtent pas facilement à la caractérisation en raison de leur variabilité et de leur capacité à s'hybrider facilement.

#### **I.11.3. 2 Description botanique**

*Thymus vulgaris* L est un arbuste aromatique aux tiges ramifiées, qui peut atteindre 40 cm de hauteur. Le thym est une plante ligneuse, les branches blanchâtres portant des feuilles opposées, lancéolées ou linéaires, les feuilles sont verdâtres sur le dessus, gris blanc sur le dessous et les fleurs sont rassemblées en grappe à la pointe des branches et la floraison a lieu de juin à octobre. **(Goetz et Ghedira, 2012)**.

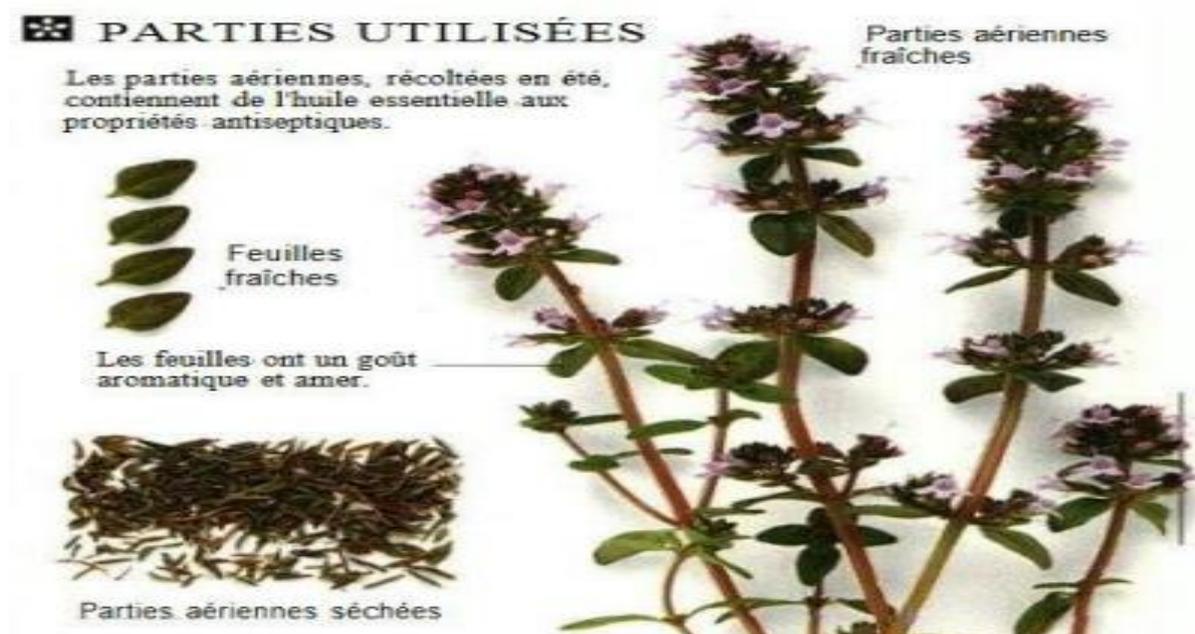


Figure I.3 Description du Thym. (Iserin, 2001).

### I.11.3 3. Classification

Tableau I.3 : La classification botanique du Thym

	Classification
Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus vulgaris L</i>

### I.11.3 4. Huile essentielle du thym

L'HE de thym est principalement extraite des feuilles et des sommités fleuries. La tige fleurie du thym contient des flavonoïdes et des acides phénoliques, des tanins et de la résine. Toutes les HE de thym ont des vertus antibactériennes et antifongiques. L'huile essentielle de cette plante entre dans la formulation de diverses spécialisations telles que les pommades antiseptiques et cicatrisantes, les sirops pour le traitement des maladies des voies respiratoires, les préparations pour inhalation (**Ait D et Ait H,**

**2017).** Les huiles essentielles du thym situent dans les poils glandulaires sécréteurs on les trouve au niveau des feuilles.

### **I.12 Les analyses des huiles essentielles**

Bien que de nombreux extraits de plantes aient déjà démontré des effets anti-biofilm, les molécules ou les composants bioactifs sont encore inconnus et doivent être soumis à un certain nombre de recherches analytiques afin d'obtenir plus d'informations sur leurs propriétés. L'étude de la composition chimique des huiles essentielles, en vue de leur commercialisation, de leur contrôle ou de leur valorisation, nécessite une analyse par des techniques avancées telles que la chromatographie, la spectrométrie et la résonance magnétique nucléaire. Cependant, l'analyse peut se faire avec une seule technique, mais lorsqu'il s'agit de mélanges complexes ou de constituants très proches, dont la séparation et l'identification sont difficiles, on procède au couplage de deux ou plusieurs techniques (**Bouyahaoui, 2017**).

#### **I.12.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

La Chromatographie en phase gazeuse ou CPG est une méthode développée pour l'analyse des mélanges très complexes dont les conditions sont différentes par leurs natures et leurs propriétés physiques.

Un appareil de chromatographie en phase gazeuse comporte trois parties : injecteur, colonne, et détecteur à travers lesquelles un gaz vecteur entraîne les substances d'un mélange à séparer. Le gaz vecteur le plus utilisé est l'hélium, les autres sont l'hydrogène, l'azote ou l'argon. Il doit être très pur et surtout ne contenir ni oxygène, ni eau. Le débit du gaz est ajusté par un régulateur. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide de gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules (**Boukabache et Boudjef, 2016**).

#### **I.12. 2. Spectrométrie en masse SM**

Le spectromètre de masse permet l'identification et la quantification des composés. Il existe de nombreux types de spectromètres de masse ; tous ont en communs trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur. La source est la partie du spectromètre de masse où sont produits des ions gazeux à partir des molécules

introduites. En couplage avec le chromatographe en phase gazeuse, où les composés sont élués arrivent au spectromètre à l'état gazeux, les sources utilisées sont dites à "ionisation électronique" (IE) ou à "ionisation chimique" (IC). La source est maintenue à une température élevée (généralement comprise entre 100 et 250°C) pour éviter la condensation des substances (**Bouchennet et Libong, 2002**).

Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil. Dans le spectromètre de masse, les ions sont séparés selon leur ratio « masse/Charge », à l'aide d'un champ magnétique ou électrique (**Besombes, 2008**). Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse est détecté et transformé en un signal utilisable.

### **I.12. 3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à une Spectrométrie de masse (GC/MS)**

La CG-SM est une méthode qui permet d'analyser des molécules petites et volatiles telles que les alcools, les molécules aromatique, et les molécules simples comme les acides gras, les hormones...etc. En effet, la CG-SM combine deux techniques pour former une seule méthode d'analyse des mélanges de produits chimiques organiques.

La chromatographie en phase gazeuse sépare les composants d'un mélange, elle s'applique sur des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Et la spectrométrie de masse caractérise chacun des composants individuellement par la mesure de leur masse et identifier ainsi leurs structures. La combinaison des deux techniques permet des évaluations à la fois qualitatives et quantitatives d'un échantillon contenant un certain nombre de composés organiques (**Medirios, 2018**).

### **I.12. 4. Chromatographie en phase Gazeuse (CPG/DIF)**

Cette technique permet l'analyse qualitative des mélanges très complexes de composés gazeux ou susceptibles d'être vaporiser par chauffage sans décomposition.

La CPG repose sur le principe de migration différentielle des constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire. Elle est basée sur la partition des composés injectés entre une phase stationnaire (liquide ou solide) et une phase mobile gazeuse (**Castello, 1999**).

### **I.12.5. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une technique séparative utilisée en analyse quantitative et qualitative. Cette technique a de nombreuses applications et est couramment utilisée en biochimie et en chimie

analytique. Mais c'est aussi un outil crucial pour évaluer la qualité de plantes utilisés pour leurs propriétés médicinales. Sa popularité résulte de sa séparation pratique d'une large gamme de types d'échantillons d'une puissance de résolution exceptionnelle. Elle est utilisée pour purifier les produits synthétiques ou naturels, caractériser des métabolites et le dosage des ingrédients actifs d'un mélange.

Pour cela l'échantillon à analyser est associé à un solvant puis traverse sous pression une colonne contenant un gel qui est la phase stationnaire, qui a la propriété de retenir les molécules qui le traversent. En fonction de l'affinité qu'il y'a entre les composés de l'échantillon à analyser et la phase stationnaire, ces composés seront retenus plus ou moins longtemps dans la colonne avant d'en sortir et d'être mesurés. Un détecteur suit en continu le liquide à la sortie de la colonne afin de détecter la présence des composés. Différents types de détecteurs peuvent être utilisés, le plus courant étant un spectrophotomètre UV-visible, qui mesure l'absorption de la lumière par le produit.

Une bonne chromatographie fera sortir les composés les uns après les autres avec assez d'espace entre eux pour qu'ils soient bien repérables. En traçant dans le temps les résultats du détecteur à la sortie de la colonne, on obtient ainsi un graphique sur lequel apparaissent différents pics représentant chacun un composé donné et renseigne sur la concentration des composés présents dans le mélange. L'ensemble des pics constituent ainsi un « empreinte digitale » du produit analysé (**Bensakhria, 2016**).

# **Chapitre II**

*Généralités*

*Sur*

*Les corps Gras*

## II. Les Corps Gras

### II.1 Définition

Les corps gras sont des aliments dont le pourcentage en lipides est très élevé. Ils comprennent les huiles et les graisses d'origine végétale ou animales, les beurres et les margarines ; les premières sont composées uniquement de triglycérides et quelques constituants mineurs, tandis que les beurres et les margarines sont des émulsions d'une phase aqueuse dans une phase grasse douées de propriétés plastiques (**Uzzan, 1992 ; Vierling, 2003**). La distinction entre huile et graisse repose sur le point de fusion. Les huiles sont fluides à la température de 15°C tandis que les graisses sont solides ou concrètes à la même température (**Frenot et Vierling, 2001**).

### II.2 Composition des corps gras

Les corps gras alimentaires comprennent les huiles et les graisses d'origine végétales ou animales. Un corps gras brut, à l'état naturel, est constitué essentiellement de lipides environ 99%, de phosphatides et des insaponifiables. Les lipides sont des dérivés naturels, qui résultent de l'estérification d'acide gras avec un alcool ou une amine (**J.Graille 2003**).

#### II.2.1 Lipides simples

##### II.2.1.1 Glycérides

Les glycérides sont des esters d'acides gras et de glycérol, ils sont très hydrophobes insolubles dans l'eau. L'estérification des trois groupements hydroxyles du glycérol avec les acides gras forme des triglycérides, y a également les diglycérides, et les mono-glycérides (**François, 1974**).

##### II.2.1.2 Acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique hydrophobe saturée ou insaturée. Ce sont les composants majoritaires des glycérides sur le plan pondéral, les acides gras connus sont extrêmement nombreux, en particulier dans le règne végétal (**Linden et Lorient, 1994**).

##### II.2.1.3 Cérides

Ce sont des esters d'acides gras et de mono (éventuellement di) alcools.

##### II.2.1.4 Stérides

Ce sont des esters d'acides gras et de stérol (**M.Frenot, 2001**).

## II.2.2 Lipides complexes

### II.2.2.1 Phospholipides

Les phospholipides sont des esters du glycérol dont les positions sn-1 et sn-2 sont estérifiées par des AG et la fonction alcool en sn-3 est naturellement estérifiée par un acide phosphorique, lui-même associé à un sucre (inositol) ou une amine (choline, éthanolamine, sérine), (**Linden et Lorient, 1994**).

### II.2.2.2 Insaponifiables

L'insaponifiable est constitué de composés qui, après hydrolyse basique (saponification), sont très peu solubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques (tel l'hexane) des corps gras.

#### II.2.2.2.1 Stérols

Les stérols constituent la fraction la plus importante de l'insaponifiable de 30 à 60%. Ce sont des composés tétracycliques le plus souvent de 27 ou 28 atomes de carbones, ils sont présents sous formes libres ou estérifiés. Les deux stérols les plus importants du règne végétal sont le  $\beta$ -sitostérol et le sigma-stérol.

#### II.2.2.2.2 Tocophérols

Les tocophérols sont au nombre de 4 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tocophérols), ils jouent le rôle d'antioxydants naturels, ce qui explique la bonne résistance des huiles végétales au phénomène de rancissement. Parmi les tocophérols, l' $\alpha$ -tocophérol ou vitamine E est doté de l'effet antioxydant le plus puissant.

#### II.2.2.2.3 Les cires

Les cires sont des acides gras et alcools gras, chez les végétaux, elles contribuent à la formation de pellicules protectrices des graines et des fruits. Dans les huiles, surtout le Tournesol, leur présence est responsable de l'apparition de trouble par début de cristallisation à basse température ou à température ambiante.

#### II.2.2.2.3 Pigments

Les principaux pigments naturels appartiennent à trois grandes catégories

##### 1- Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments naturels, largement répandus dans la nature. Ils sont à l'origine de teintes brillante, jaune, orange et rouge. Ce sont des tétra-

terpènes provenant de l'évolution du lycopersène, ils comprennent les carotènes et les xanthophylles.

## 2- Chlorophylles

Les chlorophylles font partie d'un groupe de pigments tétra-pyrroliques avec des fonctions et des éléments structuraux communs. Elles sont caractérisées par un iso-cycle à cinq membres et par la présence d'un atome de magnésium complexé à leur centre. Les plus répandues et également les plus étudiées sont les chlorophylles "a" et "b". Le maximum d'absorption des chlorophylles a et b se situe respectivement à 660 nm et 643 nm (Ketsia raynal, 2001).

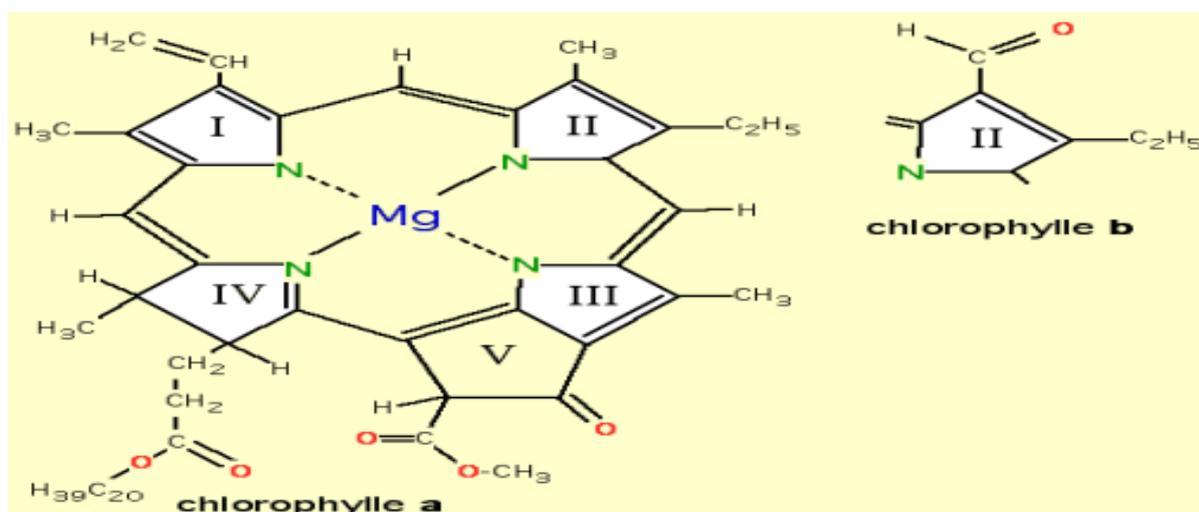


Figure II.1: Structure de la chlorophylle a et b.

## II.3 Classification des corps gras

### II.3.1 Classification selon leur origine :

Tableau II.1 Principales classes des huiles et graisses alimentaires. (Karleskind A, 1992).

Les huiles végétales fluides.	Huile d'arachide, de colza, de germe de maïs, de tournesol, de soja, d'olive, de noix, de pépins de raisin.
Les huiles végétales concrètes (graisses).	Coprah (provenant de la noix de coco), huiles de palme et de palmiste.
Les huiles et graisses d'origine animale terrestre.	Saindoux (graisse de porc), suif (graisse de bœuf et de mouton), huile de cheval, graisse d'oie.
Les huiles et graisses marines.	Baleine, cachalot, poisson (sardine...).
Les corps gras élaborés.	Beurres, margarines.

### II.3.2 Classification des corps gras selon leur composition

Selon leurs compositions en acides gras, les corps gras d'origine végétale « huiles, graisses, beurres, végétaux » se répartissent entre différentes familles, et selon les critères de caractérisation de ces familles, elles peuvent être plus ou moins nombreuses (**Dubois et al., 2008**), mais il en existe quatre principales (**Pagès et al., 2012**) :

- Famille oléique ou les acides gras mono-insaturés (AGMI), sont majoritaires : huiles d'olive, d'arachide, de noisette, les variétés de tournesol et de colza riches en acide oléique et l'huile de colza elle-même ;
- famille linoléique ou cet acide gras (C18:2 oméga-6), les acides gras polyinsaturés (AGPI), sont majoritaires : huiles de soja, de tournesol, de germe de maïs et de pépins de raisin ;
- Famille  $\alpha$ -linoléique ou cet acide gras (C18:3 oméga-3/AGPI) est présent en quantité significative : huiles de colza, de soja, de noix et de lin ou cet acide gras est majoritaire ;
- Famille des corps gras riches en acides gras saturés (AGS) avec leurs principaux représentants (C12:0, C16:0, C18:0) présents en quantité moyenne: les huiles de palme, les huiles de palmiste et de coprah riches en acide laurique (C12:0)...etc

## II.4. Propriétés physico-chimiques des corps gras

### II.4.1 Propriétés physiques :

#### 1) Etat naturel et aspect :

On sait que les corps gras sont liquides ou solides à la température ambiante suivant leur composition chimique.

#### 2) Densité :

C'est la masse de l'unité de volume exprimée en grammes par à la température T°. La densité des huiles végétales varie de 0.915 à 0.964. La densité des corps gras animaux varie de 0.866 à 0.933.

#### 3) Le point de fusion et le point de solidification :

Ils permettent d'apprécier le degré de pureté d'un corps gras.

#### 4) Solubilité

Tous les acides gras dont le nombre de carbone est supérieur à 8 sont insolubles dans l'eau, et sont généralement solubles dans les solvants organiques tels que l'éther, le chloroforme et le benzène (**Frenot et Vierling, 2001**).

### 5) La viscosité

La viscosité des acides gras et des triglycérides est liée à leurs structures à la longueur de la chaîne et à leur saturation. Elle augmente avec le poids moléculaire et diminue avec l'augmentation de l'insaturation. La viscosité des huiles est relativement très élevée (**Alton J, 1992**).

## II.4.1 Propriétés chimiques

Les propriétés chimiques des glycérides dépendent essentiellement de celle des acides gras qui les constituent

### 1) Hydrolyse et saponification

L'hydrolyse des triglycérides libère un ou plusieurs AG. La réaction peut se faire par l'acide sulfurique ou par voie enzymatique. La saponification est une hydrolyse alcaline par KOH ou NaOH.

### 2) Hydrogénation :

En présence d'hydrogène et d'un catalyseur (nickel finement divisé), les doubles liaisons des AG insaturés des triacylglycérols sont saturées. Le point de fusion du produit et les huiles deviennent solides (**F. Marlene ; V. Elisabeth, 2001**).

### 3) Trans estérification :

La Trans estérification vise à modifier la structure glycéridique des matières grasses par réarrangement intra- et intermoléculaire des AG sur le glycérol (**Charles et al., 2003**).

## II.5 Rôles des corps gras

### II.5.1 Intérêts nutritionnels des corps gras

L'intérêt nutritionnel des corps gras est directement lié aux quatre principaux rôles physiologiques des lipides (**Pagès et Morin, 2012**) :

- **Reserve d'énergie** : stockés sous forme de triglycérides dans les tissus adipeux, les lipides constituent ainsi une réserve énergétique mobilisable (1g de lipides donne environ 9,3 Kcal par contre les hydrates de carbone (les sucres) fournissent 4Kcal).
- **Un rôle structural** : les acides gras servent à la synthèse d'autres lipides, notamment les Phospholipides qui forment les membranes autour des cellules

et des organelles. La composition en acides gras de ces phospholipides donne aux membranes des propriétés physiques particulières (élasticité, viscosité).

- **Un rôle de messenger** : les acides gras sont les précurseurs de plusieurs messagers intra et extracellulaires. Par exemple, l'acide arachidonique est le précurseur des eïcosanoïdes, hormones intervenant dans l'inflammation et la coagulation sanguine.
- Un rôle de transport de vitamines : les corps gras alimentaires véhiculent quatre vitamines liposolubles : À, D, E et K .

## II.2 Généralité sur Les huiles végétales

### II.2.1 Introduction

Les huiles grasses végétales sont principalement des triglycérides d'acide gras sous forme solide ou liquide. Elles peuvent contenir de petites quantités d'autres lipides tels que des cires, des acides gras libres, des glycérides partiels ou des substances insaponifiables. Elles sont obtenues à partir des graines, du fruit ou du noyau de plantes diverses par pression et/ou extraction au moyen de solvants, puis sont éventuellement raffinées et hydrogénées.

Les huiles végétales comestibles sont consommées directement sous forme d'huiles raffinées ou bien indirectement à partir des produits de l'agroalimentaire (**Pagès, 2008**), elles ont en effet une température critique ou « point de fumage » au-dessus de laquelle il ne faut pas la chauffer sinon il va y avoir formation de composés toxiques.

### II.2.2 Classes des huiles végétales

Dans les huiles végétales, les acides gras insaturés « mono- et poly-insaturés » sont généralement prédominants, ce qui explique, qu'elles soient liquides à température ambiante (**Mendy., 2016**). On trouve plusieurs classes des huiles et des graisses alimentaires :

- ✓ Huiles végétales fluides : Dont l'état est liquide à température ambiante «huile d'arachide, de colza, de germes de maïs, de tournesol, de soja et d'olive».
- ✓ Huiles végétales concrètes « graisses » : Dont l'état est solide à température ambiante coprah « provenant de la noix de coco », huile de palme.

- ✓ Huiles et graisses d'origine animale : « animaux terrestres » : saindoux « graisse de porc », suif « graisse de bœuf ou de mouton », huile de cheval et graisse d'oie (**Uzzan, 1992**).

### II.2.3 Qualité d'une huile alimentaire

La qualité des huiles alimentaire est caractérisée par leurs propriétés physiques (**Shahidi et al., 2005**), nutritionnelles, organoleptiques parmi les aspects qualitatifs d'une huile les plus importants sont sa composition et sa stabilité oxydative. Du fait de leur richesse en acides gras mono insaturés et /ou polyinsaturés, les huiles sont sujettes à des réactions chimiques telles que l'isomérisation et l'oxydation (**Cuvelier et Maillard, 2012**) responsables d'odeurs et composés indésirables rendant l'huile impropre à la consommation (**Choe et Min, 2006**). Elles peuvent aussi subir des dégradations par hydrolyse chimique et/ ou enzymatique, par polymérisation (dans le cas des huiles de friture) et plus rarement par isomérisation ou cyclisation. (**Itegr, 2018**).

La vitesse d'oxydation dépend de la qualité initiale de l'huile, en particulier de sa concentration en hydroperoxydes qui réduira d'autant plus le temps d'induction qu'elle est élevée (**Marie-Elisabeth Cuvelier et Marie-Noëlle Maillard, 2012**). Les huiles végétales alimentaires peuvent être différenciées suivant le procédé d'obtention des huiles et leur degré de raffinage. On distingue ainsi selon le **Codex Alimentarius (1999)**, (**Bodjolle D'Almeida., 2018**).

- L'huile vierge est une huile obtenue à partir des matières premières d'une qualité particulière par des moyens mécaniques (par exemple, pression à froid, centrifugation).
- L'huile raffinée est une huile obtenue par pression et/ou extraction au moyen de solvants, suivie soit d'un raffinage alcalin puis d'une décoloration et d'une désodorisation éventuelle, soit d'un raffinage physique.
- L'huile hydrogénée est une huile obtenue par pression et/ou extraction au moyen de solvants, suivie soit d'un raffinage alcalin soit d'un raffinage physique, puis d'une décoloration éventuelle, suivi d'un séchage, d'une hydrogénation puis encore d'une décoloration et d'une désodorisation.

### II.2.4 Facteurs influençant la qualité d'une huile

- Présence des acides gras libres et la chlorophylle : Ces composés présents dans l'huile ont un effet promoteur de l'oxydation (**Choe et Min, 2006**)
- Le degré d'insaturation des acides gras : Plus les huiles sont riches en acides gras insaturés, plus l'huile sera sensible à l'oxydation (**Parker et al., 2003**) ce qui peut limiter la durée de conservation de l'aliment (**Sekour, 2012**).
- Les composés antioxydants : la présence des antioxydants « ex vitamine E appelée tocophérol » ralenti la vitesse d'oxydation (**Choe et Min, 2006**).
- La présence de beta-carotènes : En captant l'énergie lumineuse elle aide à protéger l'huile contre l'oxydation.
- La concentration en hydro-péroxydes affecte directement la qualité de l'huile car plus la concentration sera élevée plus le temps d'induction sera réduit et par conséquent la vitesse d'oxydation augmentera (**Marie-Elisabeth Cuvelier et Marie-Noëlle Maillard, 2012**).
- l'exposition de l'huile à la lumière : Elle favorise la formation de radicaux libres, initiateurs de réactions radicalaires en chaîne.
- la température de conservation de l'huile : Elle joue un rôle majeur dans la dégradation de l'huile. En effet, une augmentation de la surface d'huile disponible à l'oxygène engendre une augmentation linéaire de l'indice peroxyde (**Going, 1968**). Ainsi, une augmentation de la température de l'huile de 21°C à 49°C, au terme de revue bibliographique, 11 semaines de stockage induit une augmentation de l'indice peroxyde de 8 à 100 Mécq O<sub>2</sub>/kg d'huile pour l'huile de soja raffinée.
- Présence de corps étrangers dans les récipients et particulièrement les métaux comme le fer et le cuivre.

### II.2.5. Etudes de deux huiles à usage alimentaire « Huile d'oléastre et l'huile de table ELIO »

#### II.2.5.1 Huile Oléastre (*Olea europaea L.*)

##### II.2.5.1.1 Définition de l'huile d'olive oléastre

L'huile d'olive est l'huile provenant uniquement de fruit de l'olivier (*Olea europaea L.*) à l'exclusion des huiles obtenus par solvant ou par des procédés de ré-estérification et de tout mélange avec des huiles d'autre nature (**COI, 2011**).

### III.2.5.1.2 Description botanique

- ✓ Petit arbre émettant de nombreux rejets, au tronc souvent court, trapus et irrégulier, se divisant en grosses branches tortueuses aux rameaux gris blanchâtre.
- ✓ Ecorce verdâtre et lisse d'abord, puis gris brun et profondément crevassée.
- ✓ Bourgeons petits, grisâtres et velus.
- ✓ Feuilles persistantes, de 2 à 8 cm, opposées, simples et entières, ovales lancéolées, a pétiole court, a bordure légèrement enroulée, vert foncé et luisantes dessus, blanchâtres dessous.
- ✓ Fleurs petites, blanches, en petites grappes odorantes à l'aisselle des feuilles.
- ✓ Fruits (olives) verts, virant au violacé, puis noirs à maturité, de tailles et de forme variables suivant les variétés (**Jean-Marie.2010**).

L'oléastre (olivier sauvage) est un arbrisseau buissonnant, mais l'arbre cultivé a un tronc typiquement noueux. Il préfère un climat chaud et tolère les sécheresses périodiques. Longé vif, peut vivre jusqu'à 500ans. , il fut répandu dans toute la méditerranée. (**Carol et al., 2008**).



**Figure II.2 : *Olea europaea* L de la Région de la Soummam (Bejaia)  
(Photo originale 2022).**

### III.2.5.1.3. Classification botanique de l'olivier

**Tableau II.2** Classification botanique de l'arbre d'olivier selon **Ghedira (2008)**, est la suivante

Classification	
Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Spermaphyte</i>
Sous embranchement	<i>Angiosperme</i>
Classe	<i>Dicotylédones</i>
Sous classe	<i>Astérides</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Oléacées</i>
Genre	<i>Olea</i>
Espèce	<i>Olea europaea L</i>

### II.2.5.1.4 Composition chimique d'huile de l'oléastre

Huile d'olive est un système chimique complexe constitué plus de 250 composés. la composition de huile d'olive dépend de la variété du fruit, de la région de culture, et des conditions climatiques (**Angerosa et al., 2004**).

Les composés peuvent être classés en deux grands groupes :

-les fractions saponifiables (triglycérides, acides gras, de 99% de huile) (**Ruiz et al., 2000**).

-les substances insaponifiables (les stérols, les tocophérols (Vitamine E), les pigments colorants, les composés phénoliques (de 1 à 2% de huile) (**Servili et al., 2004**).

### II.2.5.2 Les huiles de table

#### II.2.5.2.1 Définition

Les huiles de table sont des huiles végétales à des substances insolubles dans l'eau, mais dans les solvants organiques constituées en majeure partie d'esters de glycérol et d'acides gras. Elles sont extraites des graines, des amandes et des fruits. Les oléagineux sont ceux qui servent à produire industriellement de l'huile et qui sont cultivés dans ce but. Parmi les plantes cultivées pour leur huile, en citant : l'arachide, l'olivier, le colza, le ricin, le soja et le tournesol. En général toutes les graines contiennent de l'huile (**Chaib et Khenfer, 2013**).

## II.2.5.2.2 Propriétés physico-chimiques de l'huile

### II.2.5.2.2.1 Propriétés physiques

#### ✓ Densité

Les huiles et les lipides flottent sur l'eau (**Ferenot et Vierling, 2001**). Elle diminue au fur à mesure que le poids moléculaires des AG diminue et que leur insaturation augmente (**Uzzan, 1992**).

#### ✓ Solubilité

Les lipides sont insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques (éther éthylique, essence, chloroforme, hexane). La solubilité est une propriété employée pour l'extraction des lipides dans la fabrication des huiles (**Gralle, 2003**).

#### ✓ Point de fusion

Le point de fumée est la température à laquelle une huile chauffée commence à dégager de la fumée et le point d'éclair est la température à laquelle une huile chauffée s'enflamme au contact d'une flamme (**Prior, 2003**).

### II.2.5.2.2.2 Propriétés chimiques

Les propriétés chimiques des AG sont liées d'une part au groupement carboxylique et d'autre part à la chaîne carbonée

#### a. Propriétés liées au groupement carboxylique

##### ✓ Formation d'esters

L'estérification est la condensation d'une fonction carboxylique avec une fonction alcool selon la réaction suivante :

##### ✓ Formation de sels (savon)

La saponification est une réaction de neutralisation des AG par des bases (KOH et NaOH). L'indice de saponification est inversement proportionnel à la longueur des AG (**Masson, 2002**).

##### ✓ Formation des acides gras libres

Les AGL sont issus de l'hydrolyse des triacylglycérols (**Alias et al., 2003**).

#### b. Propriétés liées à la chaîne hydrocarbonée

La présence de doubles liaisons dans la chaîne carbonée confère aux AG une certaine réactivité. En effet, les liaisons éthyléniques peuvent faire l'objet des réactions d'additions (**Masson, 2002**).

##### ✓ Fixation d'hydrogène

L'hydrogénation permet la diminution de l'insaturation des CG par fixation d'hydrogène sur les doubles liaisons de la chaîne hydrocarbonée, sous l'action de la

chaleur, de la pression et en présence d'un catalyseur tel que le Nickel (**Vierling, 2003**).

✓ **Fixation d'halogène**

La réaction d'addition peut avoir lieu avec les halogènes, comme l'iode. Cette réaction est utilisée pour définir l'indice d'iode ; celui-ci augmente avec le nombre d'insaturation (**Masson, 2002**). La réactivité des doubles liaisons des chaînes carbonées peut aussi être à l'origine de réaction d'oxydation, de polymérisation et de cyclisation (**Masson, 2002**).

### **II.3. Aromatisation des huiles végétales avec les huiles essentielles**

Aromatisation naturels, avec les huiles essentielles, trouvent la plus large application et sont utilisées entre autres comme conservateurs alimentaires. Ceci est dû aux inquiétudes des consommateurs concernant la sécurité et les effets négatifs de l'utilisation d'additifs alimentaires synthétiques (**Bruneton et al., 2004**). L'ajout d'une huile essentielle à une huile végétale peut ainsi conférer un effet combiné en tant qu'antioxydant naturel en prolongeant la durée de conservation et assurée de la qualité des huiles végétales ainsi qu'en tant qu'agent antimicrobien et un additif de conservation pour les aliments (**Taghvaei et Jafari 2015 ; Sadeghi et al., 2016**). Plusieurs études ont rapporté que les HEs de certaines plantes aromatiques comme le romarin, (*Rosmarinus officinalis*) le thym (*Thymus vulgaris*), le laurier (*Laurus nobilis*), et le fenouil (*Foeniculum vulgare*) sont capables de protéger l'huile d'olive de l'oxydation (**Ayadi et al., 2009 ; Sousa et al., 2015 ; Keramat et al., 2016 ; Chang et al., 2017**).

# Chapitre III

*Les activités Biologiques*

*Des*

*Huiles essentielles*

### III. Les Activités Biologiques

#### III.1 Introduction

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant l'efficacité et la sécurité des produits chimiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire. En effet, le développement de la résistance des micro-organismes aux divers antibiotiques préoccupent les spécialistes en médecine. D'un autre côté, l'utilisation des additifs tels que les antioxydants est suspectée d'avoir des effets négatifs sur la santé du consommateur. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre les phénomènes de la résistance bactérienne et de l'oxydation des aliments. Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances à pouvoir antimicrobien et antioxydant. Ainsi les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives (**Bruneton, 1999 ; Teuscher et al., 2005**). Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses (**Chalchat et al., 1997 ; Baser et al., 2001**) et pour la protection des aliments contre l'oxydation (**Deans et al., 1994 ; Miguel et al., 2003**).

L'activité biologique d'une HE est liée à sa composition chimique et aux effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires (**Boulechfar, 2014**). Ces HEs peuvent être utilisées directement comme agents thérapeutiques, ou comme matières premières pour la synthèse de principes actifs (**Bessah et Benyoussef, 2015**).

#### III.2 Activité antioxydante

##### III.2 1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre les systèmes et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou peut suivre la voie de l'apoptose ou de la sénescence. Il est aisé de détecter un stress oxydant provoqué par une élévation aiguë des espèces réactives de l'oxygène (ERO). La situation est plus complexe lorsque l'on recherche un stress oxydant chronique au cours duquel, d'une part les élévations des ERO sont atténuées par des boucles de régulation (**Barouki et al., 2006**).

Plusieurs études épidémiologiques et cliniques suggèrent que le stress oxydant joue un rôle important dans la genèse et l'entretien de nombreuses pathologies

humaine (diabète ; maladies cardiovasculaires cancer ; allergies ; maladies neuro dégénératives) ainsi que le vieillissement.

### III.2.2. Origine de stress

Le stress oxydatif peut avoir diverse origines telles que surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire ; un déficit nutritionnel en antioxydant ou même une exposition environnemental a des facteurs pro-oxydants (tabac, Alcool, médicament, rayon UV, pesticide, ozone, métaux toxiques..) (**Magder et al., 2006**).

### III.2 3. Radicaux libres

Un radical libre peut être défini comme toutes espèces moléculaires capables d'existence indépendante qui contient un électron non apparié dans une orbite atomique. La présence d'électron non apparié résulte dans certain propriétés communes qui sont partagées par la plupart des radicaux. De nombreux radicaux sont instables et très réactifs. Ils peuvent soit donner un électron à ou accepter un électron d'autres molécules, se comportant donc comme des oxydants ou des réducteurs. Les radicaux libres attaquent les macromolécules importantes menant à la cellule dommage et perturbation homéostatiques. Cible le radicaux libres inclure toute sorte de molécules dans le corps. Parmi eux les lipides, les acides nucléiques et les protéines sont les principales cibles (**Labo et Chandra at al., 2010**).

Les radicaux libres sont convertis en formes non réactives par les défenses enzymatiques et non enzymatiques dans les cellules et par les molécules antioxydantes fournies par le régime alimentaire. Parmi celles-ci, les huiles essentielles de plantes ont été largement étudiées. Ces dernières ont la capacité de piéger les radicaux libres, inhiber la peroxydation lipidique et stimuler l'activité des enzymes antioxydantes (**Guo Xu, 2018**).

### III.2 4. Définition d'un antioxydant

Les antioxydants sont des substances qui protègent les cellules contre les effets néfastes des radicaux libres en offrant leurs propres électrons. Il a été rapporté que plusieurs huiles essentielles ont des fonctions antioxydantes capables d'éliminer les radicaux et l'inhibition du cycle d'oxydation des lipides (**Khayyat et Roselin, 2018**).

Les antioxydants sont des substances qui peuvent protéger les cellules des dégâts causés par des radicaux libres. Les antioxydants interagissent et stabilisent des

radicaux libres et peuvent empêcher certains des radicaux libres de dégâts pourrait autrement causer (Shinde *et al.*, 2012).

### III.2 5. Activité antioxydant des huiles essentielles

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Leur activité est en relation avec leur structure phénolique car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrices et jouent ainsi un rôle important en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes (Tableau III.1) (Boucekrit, 2018).

Ce sont surtout les phénols qui sont responsables de cette activité (Zhiri et Baudoux, 2005). Les propriétés antioxydants des huiles essentielles de citrus sont depuis peu massivement étudiées. En effet, elles se sont avérées être de très bon antioxydants, donc peuvent être utilisées dans le traitement de pathologies liées au stress oxydatif telles que l'Alzheimer, l'artériosclérose et le cancer ainsi que dans les pathologies dégénératives associé au vieillissement. Une façon de prévenir ce stress oxydatif qui endommage et détruit les cellules est de remplacer dans l'alimentation les apports supplémentaire en antioxydants classiques (vitamine C, a-tocophérol, BHT, etc.) par les huiles essentielles (Pincemail *et al.*, 2002).

**Tableau III.1** Mécanismes d'action de quelques antioxydants (Ghayati, 2019).

	<b>Nature</b>	<b>Mode d'action</b>
<b>Propriétés non enzymatiques</b>	<b>Vitamine E</b>	Neutralise les radicaux libres.
	<b>Vitamine C</b>	Participe aux réactions d'oxydoréduction.
	<b>B-carotène</b>	Fixation des métaux de transition.
<b>Propriétés enzymatiques</b>	<b>Superoxyde dismutase</b>	Catalyse la dismutation de l'anion.
	<b>Catalase</b>	Métabolise H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .
	<b>Glutathion peroxydase</b>	Action réductrices sur H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et les hydroperoxydes.

### III.3 Activité antibactérienne des huiles essentielles

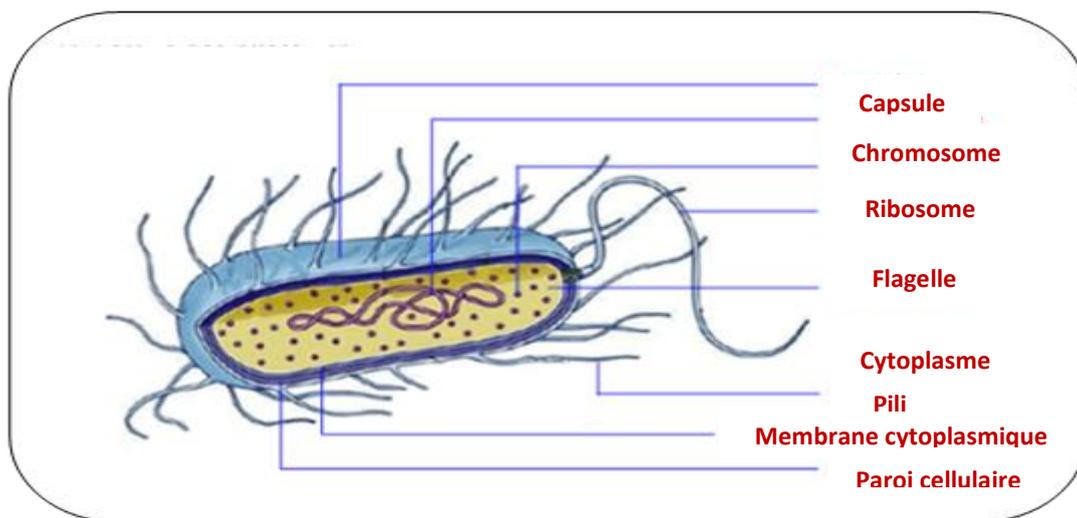
#### III.3.1 Définition

Un agent antimicrobien, est un agent qui tue les micro-organismes ou inhibe leur croissance. Celui qui les tue est appelé « microbicide » et celui qui inhibe seulement leur croissance est appelé « microbiostatique » L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement liée à leur composition chimique, en particulier de leurs

composés volatils majeurs. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude pouvant nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des HEs. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HEs ait son propre mécanisme d'action (**Samah, 2012**).

### III.3.2 Les bactéries :

Les bactéries sont des micro-organismes remarquablement adaptables. Elles sont capables de survivre et se multiplier dans l'environnement. Ont un important potentiel d'adaptation génétique. Elles contiennent souvent de l'ADN plasmidique, capable de transférer du matériel génétique au sein de l'espèce ou vers des espèces différentes (**Pandey et Singh, 2011**). Cette adaptabilité génétique peut accroître à la fois leur pouvoir pathogène et leur résistance aux antibiotiques. (**Bouyahya et al., 2017**).



**Figure III.1 : La Structure d'une Bactérie**

(<http://www.google.dz/search?q=structure+de+la+bacterie&source>)

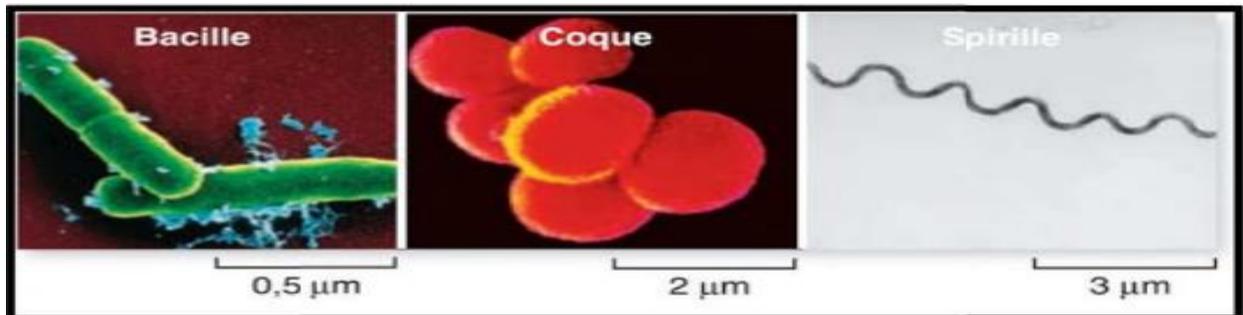
### III.3.3 le monde microbien et les germes pathogènes

Les microorganismes responsables des infections microbiennes sont rarement des protozoaires, quelques fois des champignons (**Aspergillus, Cryptococcus**) des levures (**Candida**) et parfois des virus (Virus de l'hépatite, de herpes, et de la grippe). On retrouve très souvent des bactéries ou leur formes altères, dont l'apparition est favorisé par l'usage des antibiotiques : bactéries à Gram positif tel que *Staphylococcus*, *Enterococcus* et bactéries à Gram négatif comme les

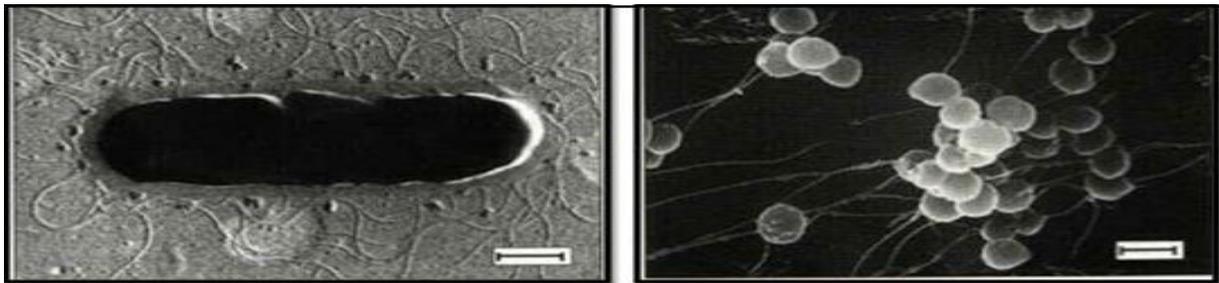
*Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Klebsiella* sp.,...),  
*Pseudomonadaceae* (Haxhe et zumofen,1999).

### III.3.4 Morphologie bactérienne

Taille des bactéries de l'ordre du micromètre : de 0,5  $\mu\text{m}$  à plus de 10  $\mu\text{m}$ , la grande majorité mesurant de 1 à 4  $\mu\text{m}$  (Troglia, 2014). A titre d'exemple, *Escherichia coli* a la forme d'un bâtonne *Staphylococcus aureus* a forme cocci et s'assemble en amas (Bouyahya et al., 2017).



**Figure III. 2 :** Forme principale des bactéries (Johnson, Raven, Losos, Bouharmont, et Singer,2011).



**Figure III. 3 :** Forme Batonnet (*Escherichia coli*) et cocci (*Staphylococcus*) (Hart et Shears, 1997).

### III.3.5 Les micro organismes testés

#### III.3.5.1 *Escherichia coli*

##### III.3.5.1.1 Définition

*Escherichia coli* (ou *E. coli* ou *colibacille*) est une bactérie, organisme procaryote appartenant à la famille des *Entérobactéries*. Le *colibacille* est un bacille, bactérie en forme de bâtonnet, Gram négatif, possède un génome à ADN double brin circulaire de 4,6 millions de paires de bases, qui est entièrement séquencé. *E.coli* se réplique rapidement à 37°C, toutes les 20 minutes et ce qui permet de multiplier facilement de l'ADN ou des protéines d'intérêt (Buagnicont, 1995). *E. coli*, hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux souvent retrouvé en petit nombre dans les urines saines.

*E.coli* une bactérie largement répandue dans le milieu extérieur, sa présence en quantité importante témoigne d'une contamination fécale récente (**Nauciel et Vildé, 2005**).

### III.3.5.1.2 La classification d'*E. coli*

Tableau III.2 : Classification d'*E.coli* selon (**Pillet et al., 1986**).

Classification	
Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>Escherichia coli</i> (pillet et al., 1986)

### III.3.5.1.3 Pouvoir pathogène :

Le pouvoir pathogène d'*E. coli* chez l'homme peut être extrêmement varié. D'un point de vue clinique, on distingue au sein de l'espèce les souches pathogènes intestinales et les souches pathogènes extra-intestinales. *E.coli* est une bactérie communément trouvée dans les intestins des mammifères et des humains. Il en existe différentes formes dont certaines sont pathogènes et provoquant de gastro-entérites ayant des traductions cliniques variables, comme les diarrhées d'allure banale, diarrhée sanglante. Chez le nourrisson la diarrhée peut entraîner assez rapidement un état de déshydratation (**Nauciel et Vildé, 2005**). *E.coli* peut causer des infections de méningites ou une septicémie (**Eyquen et Montgner, 2000**), infections urinaires (chez les femmes). Elle peut aussi également se transmettre via contact direct par les mains avec des animaux contaminés ou avec des personnes infectées.

### III.3.5.2 *Pseudomonas aeruginosa*

#### III.3.5.2.1 Définition

Il s'agit d'un bacille Gram négatif aérobie, *saccharolytique* et non sporulant mesurant de 0,5 à 0,8 µm sur 1,5 à 3,0 µm<sup>5</sup>. La majorité des souches de *P. aeruginosa* peuvent posséder un seul flagelle polaire utilisé pour la motilité qui joue un rôle important dans la pathogénicité. *Pseudomonas aeruginosa* produit généralement deux pigments solubles : la pyocyanine, qui donne aux colonies une couleur bleue et la pyoverdine, et également connue sous le nom de pigment fluorescent, qui est un

pigment jaune-vert ou jaune-brun. Lorsqu'une souche de *P. aeruginosa* produit à la fois de la pyoverdine et de la pyocyanine, les colonies résultantes ont une couleur bleu-vert.

*P. aeruginosa* est une bactérie ne fermentant pas le glucose et le lactose fréquemment isolée chez les patients hospitalisés. *P. aeruginosa* est une aérobie obligatoire, bien qu'elle puisse utiliser le nitrate et l'arginine comme accepteur final d'électrons lorsque l'O<sub>2</sub> n'est pas disponible, ce qui permet à l'organisme de se développer de manière anaérobie. (Todar's, 2010).

### III.3.5.2.2 La classification

Tableau III.3 : Classification de *Pseudomonas aeruginosa*

Classification	
Règne :	<i>Bacteria</i>
Division :	<i>Proteobacteria</i>
Classe :	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre :	<i>Pseudomonadales</i>
Famille :	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre :	<i>Pseudomonas</i>
Espèce :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pillet et al., 1986)

### III.3.5.2.3 Pouvoir pathogène

*P. aeruginosa*, l'un des principaux agents pathogènes d'origine alimentaire et suscite des inquiétudes importantes en matière de sécurité alimentaire car *P. aeruginosa* est une source de contamination, provoquant une intoxication alimentaire et une résistance aux antimicrobiens chez les animaux, formant des biofilms et des difficultés à prévenir les biofilms. *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie ubiquiste, qui vit normalement à l'état saprophytique dans l'eau, l'air, le sol humide et sur les végétaux. *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie pathogène opportuniste capable d'infecter un large spectre d'hôtes comme les amibes, les nématodes, les insectes, les plantes et les animaux et l'homme (Silby et al., 2011).

### III.3.5.3. *Staphylococcus aureus*

#### III.3.5.3.1 Définition

*S. aureus* est une souche bactérienne constituée de cocci à Gram positif d'un diamètre environ 0,1 à 1 µm de diamètre, au microscope optique elles apparaissent

isole en diplocoque, immobile non sporulant. aéro-anaérobie facultative qui produit une catalase et une coagulase.

*S.aureus* sur milieux solides des colonies de tilles moyennes plus ou moins pigmentées en jeune d' où le nom *staphylocoques dore*.

### III.3.5.3.2 Classification

**Tableau III.4** : Classification de *Staphylococcus aureus* Selon **Schleifer et Bell (2009)**, *S.aureus* est classé comme suit :

Classification	
Domaine	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Eubacteria</i>
Phylum	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèces	<i>Staphylococcus aureus</i> .

### III.3.5.3.3 Pouvoir pathogène

*S.aureus* provoque des infections superficielles cutanées, sous-cutanées et muqueuses comprennent les furoncles, anthrax, panaris, impétigos, abcès, cellulites, lymphangites (**Perez, 2013**).

### III.3.5.4 Bacillus subtilis

#### III.3.5.4.1 Définition

*Bacille* à Gram positif, mobile par des cils péritriche, capsulé, en forme de bâtonnets de 2µm de diamètre et dont la longueur peut atteindre 7µm, formant des spores ellipsoïdales ou cylindrique, Elle est aérobie stricte, et capable de former des endospores.

#### III.3.5.4.2 Classification

**Tableau III.5** : Classification de *Bacillus subtilis*

Classification	
Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Bacillaceae</i>
Genre	<i>Bacillus</i>
	Espèce
	<i>Bacillus subtilis</i>

### III.3.5.4.3 Pouvoir pathogène

Responsable d'intoxications alimentaires spontanément résolutive (24-48 heures) de deux types (syndrome diarrhéique et syndrome émétique) ainsi que d'infections opportunistes. La principale voie de transmission de cette bactérie à l'Homme est alimentaire. En effet, de par son abondance dans le sol et la résistance de ses spores, peut contaminer pratiquement toutes les catégories d'aliments et particulièrement les végétaux.

### III.3.5.5 *Candida albicans*

#### III.3.5.5.1 Définition

Le *Candida albicans* est un organisme mycotique, il fait partie de la famille des champignons *Candida albicans* est un champignon diploïde et encapsulé classé parmi les polymorphes car il peut prendre l'aspect de levures ou l'aspect de pseudo-hyphes selon la température, le pH et les nutriments du milieu (**Ryan, 2004**). Il est présent depuis toujours sur les muqueuses, la peau, ou bien encore dans les intestins. Lors d'un déséquilibre immunitaire ou hormonal, il prolifère et devient pathogène en libérant des toxines.

#### III.3.5.5.2 Classification

La Classification de *Candida albicans* (**Jones et al., 2004**).

**Tableau III.6** : Classification de *Candida albicans*

Classification	
Empire	<i>Eukaryota</i>
Règne	<i>Fungi</i>
Embranchement	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Saccharomycetes</i>
Ordre	<i>Saccharomycetales</i>
Famille	<i>Saccharomycetaceae</i>
Genre	<i>Candida</i>
Espèce	<i>Candida albicans</i>

#### III.3.5.5.3 Pouvoir pathogène

*Candida albicans* est un *saprophyte*, se dérive à un pathogène après sa grande multiplication dans un environnement. elle provoque un érythème cuisant recouvert par fois de dépôts blanchâtre crémeux (**Bouvenot et al., 1996**).

### III.3.5.6 *Saccharomyces cerevisiae*

#### III.3.5.6.1 Définition

*Saccharomyces cerevisiae* est un eucaryote unicellulaire (champignon ascomycète) ubiquitaire longues de 6 à 12 µm et larges de 6 à 8 µm, ovoïdes à arrondies. C'est une levure qui est retrouvée chez l'homme sous forme commensale (Pillai, 2014). Cette espèce, longtemps considérée comme non pathogène, peut aussi être retrouvée sous forme saprophyte dans l'environnement.

#### III.3.5.6.2 Classification

Tableau III.7 Classification de *Saccharomyces cerevisiae*.

Règne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Ascomycota</i>
Sous-embranchement	<i>Saccharomycotina</i>
Classe	<i>Saccharomycetes</i>
Sous-classe	<i>Saccharomycetidae</i>
Ordre	<i>Saccharomycetales</i>
Famille	<i>Saccharomycetaceae</i>
Genre	<i>Saccharomyces</i>
Espèce	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

### III.3.6 Activité antibactérienne des huiles essentielles

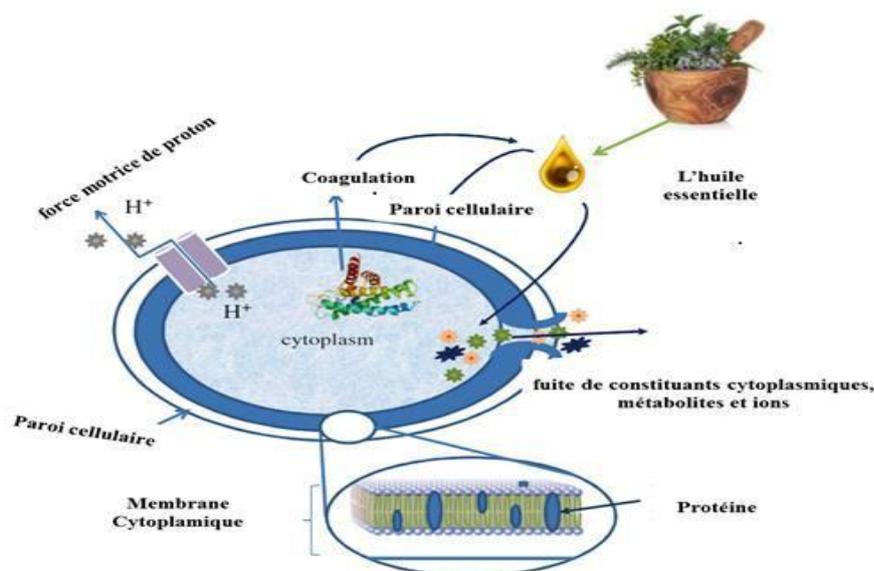
Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles sont bien connues et bien documentées. En effet, de nombreux travaux de recherche ont mis en évidence leur puissante activité antiseptique agissant aussi bien sur les bactéries, les champignons pathogènes que les virus.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles est la plus étudiée. On distingue deux sortes d'effets des huiles essentielles sur ces microorganismes :

- Effet bactéricide (bactéricide) : exerçant une activité mortelle
- Effet bactériostatique (bactériostase) : entraînant une inhibition de la croissance.

D'une manière générale, l'action des huiles essentielles se déroule en trois phases :

- ✓ Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ;
- ✓ Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- ✓ Destruction de matériel génétique, conduisant la mort de la bactérie.



**Figure III.4 :** Mécanismes d'action des huiles essentielles au niveau de la cellule bactérienne (Li *et al.*, 2014).

### III.3.7 Activité antifongique des huiles essentielles

#### III.3.7.1 Introduction

Les *mycètes* (champignons) sont des organismes *eucaryotes*, appartenant au règne *Fungi*. Ils sont hétérotrophes, se nourrissent par absorption à partir du mycélium (réseau de filaments). Les *mycètes* vivent en commensaux (à l'exemple du *Candida sp*) chez l'homme sans occasionner de lésions ; parfois en parasites d'où le terme « *mycoses* » pour les lésions qu'ils occasionnent. Selon l'état immunitaire du patient, ils peuvent passer du commensalisme au parasitisme. On distingue trois types : les champignons filamenteux, les levuriformes et les di morphiques.

#### III.3.7.2 Activité antifongique des huiles essentielles

Elles agissent à différents niveaux :

- ✓ Sur la paroi.
- ✓ Sur la membrane.
- ✓ Sur la synthèse des acides nucléiques.
- ✓ Sur la synthèse des stérols

L'activité antifongique est estimée selon la durée d'inhibition de la croissance du champignon déterminée par simple observation macroscopique, elle décroît selon le type de fonction chimique : Phénols› Alcools› Aldéhydes› Cétones› Ethers› Hydrocarbures.

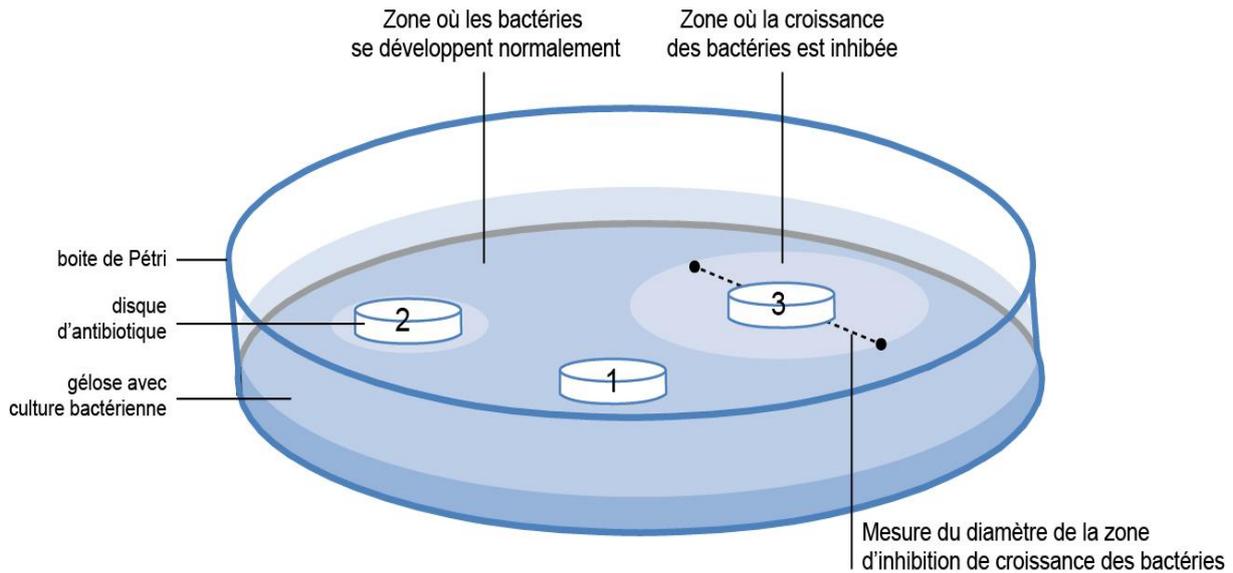
### III.4 Evaluation de l'activité antimicrobienne des HES

La technique de détermination de l'activité antimicrobienne des HE et des extraits a une grande influence sur les résultats. Les difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants de ces huiles dans l'eau, de leur volatilité, de la nécessité de les tester à des faibles concentrations et des problèmes de standardisation des méthodes (**Hulin et al., 1998**).

L'insolubilité des huiles essentielles dans l'eau et d'une manière générale dans les milieux aqueux largement utilisés en microbiologie, est une des explications de la variété des techniques d'évaluation. Selon la souche microbienne, l'huile essentielle et l'application choisie, divers milieux de culture peuvent être mis en œuvre. A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne in vitro d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide.

#### III.4.1 Méthode de diffusion en milieu solide

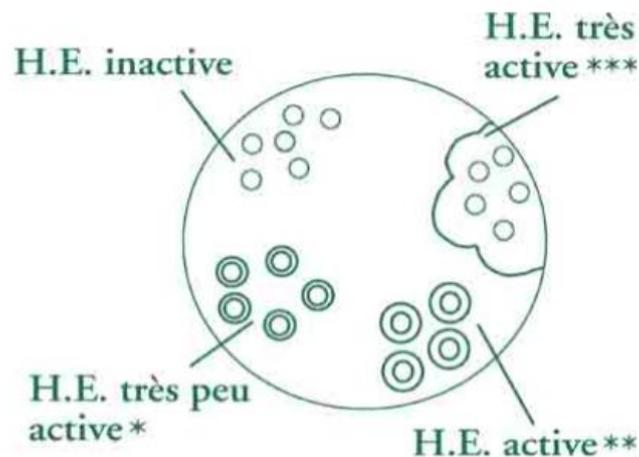
La méthode de diffusion sur disque, appelée aussi méthode de Vincent ou technique de l'aromatogramme mise au point par **Schroeder et Messing en 1949**. Cet examen se fait de la même manière qu'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences aromatiques, préalablement sélectionnées et reconnues (**Bachiri et al., 2016**). Dans cette méthode, les disques de papier filtrant stérilisés de 6 mm ou 9 mm sont saturés avec un extrait de plante stérilisé filtré de la concentration souhaitée. Les disques imprégnés sont ensuite placés sur la surface d'un milieu d'agar solide approprié comme Mueller Hinton. Les médias ont été pré inoculés avec des organismes d'essai. La taille standard de l'inoculum est de  $1 \times 10^8$  UFC / ml de bactéries pour les plaques de diffusion d'inoculation qui est égale à la norme de turbidité McFarland 0.5. Certains chercheurs imprègnent le disque en papier avec l'extrait végétal avant de mettre les plaques inoculées tandis que d'autres préfèrent après. Les plaques sont ensuite incubées pendant 24 h à 37 ° C (bactéries) et 48 h à 25 ° C (champignons). Après l'incubation, le diamètre de la zone est mesuré au millimètre entier le plus proche au point où il y a une réduction importante de la croissance de 80% (**Das et al., 2010**).



**Figure III.5 :** Illustration de la méthode d'aromatogramme

#### III.4.2 Technique de diffusion en puits

Le principe de cette technique est similaire à celui de la diffusion sur disque. Elle consiste à creuser un trou de 6 à 8 mm de diamètre dans la gélose. Un volume fixe d'extrait végétal est ensuite introduit dans le puits d'agar perforé et incubé à une température et une durée optimales en fonction du microorganisme testé (**Das et al., 2010**).



**Figure III.6 :** Le principe de la méthode de diffusion en puits

#### III.4.3 Micro-atmosphère

Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Il se produit alors une évaporation des substances volatiles dans la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum sont inhibées. La lecture du test porte donc sur la croissance ou non de

l'inoculum (**Hulin *et al.*, 1998**). L'inconvénient de cette méthode c'est qu'elle ne montre que l'activité des constituants volatils à température d'incubation, et non de l'HE elle-même.

#### **III.4.4 Technique en milieu liquide (méthode de dilution)**

Le but des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI, habituellement exprimée en mg/mL ou mg/litre). Cependant, la CMI ne représente pas toujours une valeur absolue. La « véritable » CMI est un point entre la plus basse concentration qui empêche la croissance de la bactérie et la concentration inférieure immédiate.

##### **III.4.4.1 La dilution en bouillon**

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 ml (macrodilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de microtitration (microdilution). L'utilisation de ces plaques avec un protocole documenté, y compris les précisions sur les micro-organismes de référence approprié, peut faciliter la comparaison des résultats entre analyses.

##### **III.4.4.2 La dilution en gélose**

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte.

***PARTIE II***  
***EXPREMENTATION***

*Matériels*

*Et*

*Méthodes*

## IV. Matériels et Méthodes

### IV.1. Contexte et démarche

L'objectif de cette présente étude est la caractérisation physico chimique et étude des activités biologiques de deux huiles végétales (huile de Table et huile d'Oléastre) très consommés en Algérie, aromatisées avec trois huiles essentielles qui peuvent être valoriser dans le domaine pharmaceutique, agro-alimentaire et cosmétique.

Pour atteindre cet objectif, nous nous somme focaliser sur les deux sous objectifs suivants :

- Extraction des huiles essentielles de trois plantes médicinales et aromatiques (le Citron, l'Ail, et le Thym) et l'huile d'oléastre avec une caractérisation physico chimique de la qualité des huiles extraites.
- Tester l'effet antimicrobien et antioxydant des huiles végétales (huile de Table et huile d'Oléastre) avant et après l'aromatisation avec trois huiles essentielles.

### IV.2 Présentation d'organisme d'accueille

Les travaux de ont été réalisés d'une part au niveau du laboratoire de l'agroalimentaire du CRAPC, Centre de recherche scientifique et technique en analyse physico-chimiques de Bou-Ismaïl, Tipaza, dirigé par **Dr. ALILECHE KHOUKHA** et, d'autre part au niveau de Unité Biotic SAIDAL , le laboratoire microbiologie CRD, Route de Baraki Gué de Constantine Alger dirigé par **Mme. Ouraghi Sonia**.

### IV.3 Choix de l'huile de table Cevital Elio

Notre choix a porté sur l'huile « **Elio** » c'est une huile largement utilisée en raison de sa disponibilité et de son coût raisonnable par rapport aux autres huiles en usage dans notre pays. Cette huile est produite dans la raffinerie « **Cevital** » en formats 1litre. Les caractéristiques portées sur l'étiquette de l'emballage sont résumé dans le **(Tableau I.1)**

### IV.4 Préparation du matériel végétal

L'étude a été effectuée sur trois plantes aromatiques d'origine Algérienne à savoir : le citron (*Citrus limon L*), l'ail (*Allium sativum L*), le thym (*Thymus vulgaris L*). Les HES utilisées dans cette étude sont des huiles d'une pureté de 100 % naturelles, Ces

dernières ont été extraites par hydro distillation. Pour chaque prélèvement végétal, (500 g) ont été hydro distillées pendant 5h à l'aide d'un appareil de type Clevenger dans le respect du procédé validé par la pharmacopée européenne Ces HEs sont conservées, à l'abri de la lumière et de l'oxygène à une température de  $3 \pm 1$  °C, dans des flacons opaques fermés hermétiquement en vue de leur analyse.



**Figure IV.1** : Montage d'hydrodistillation type Clevenger.  
(Photo originale 2022).

La présente étude porte sur un échantillon d'huiles d'olives de la campagne **oléicole 2021/2022**. Un échantillon est issue des fruits d'un olivier sauvage de la région de Soummam ; La récolte des olives est réalisée à la main sur différents arbres, choisis au hasard à hauteur d'homme et aux quatre points cardinaux. Le transport des échantillons est effectué dans des caisses en plastiques aérées. Les olives sont effeuillées et bien homogénéisées puis lavées. L'extraction de l'huile est effectuée au niveau du laboratoire de **I.T.A.F.V de Takerietz** au moyen d'un **oléodoseur (Levi-Dilon-Lerogsame)**, selon les étapes suivantes :

- Le broyage est réalisé par un broyeur à marteau .
- Le malaxage est effectué en deux temps : 15 minutes sans eau et 15 minutes après ajout de 50 ml d'eau à 30°C pour 920g de pates d'olives.

- La centrifugation pendant une minute de la pâte malaxée est réalisée à l'aide d'une centrifugeuse verticale ayant une vitesse de 4845 tours /min; qui sépare la phase liquide de la phase solide. Après décantation, les huiles sont recueillies dans des flacons en verre fumé, remplis, étiquetés et conservés à une température de 4°C.

Tableau IV.1 : Echantillonnage

Espèce végétale	Provenance et date de récolte	Système et date d'extraction	Conditionnement
<i>Citrus limon L</i>	Région de <b>Fouka</b> willaya « <b>Tipaza</b> » (09/03/2022).	Hydrodistillation (clevenger) <b>10/03/2022</b>	Flacon En verre ambré « 1ml »
<i>Allium sativum L</i>	Région de <b>Tablat</b> willaya de « <b>Médéa</b> »Prélevé (09/03/2022).	Hydrodistillation (clevenger) <b>10/03/2022</b>	Flacon En verre ambré « 1ml »
<i>Thymus vulgaris L</i>	Région d' <b>Aïn Boucif</b> willaya de « <b>Médéa</b> » Prélevé le (03/03/2022).	Hydrodistillation (clevenger) Date : <b>10/03/22</b>	Flacon En verre ambré « 1ml »
<i>Olea europaea L</i>	Région de la <b>Soummam</b> willaya de « <b>Bejaia</b> » en début <b>Novembre 2021.</b>	Extraction à froid	Flacon en verre ambré « 80ml »
<b>Huile de table</b> <i>ELIO</i>	Achat superette EL Harrach Alger Le <b>07/04/2022</b>	Lot n : A	Bouteille en plastique « 01L »

## IV.5.Matriels biologiques et non biologiques

### IV.5.1.Matriels biologiques (Annexe I).

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des huiles végétales avant et après aromatisation avec des trois huiles essentielles nous avons utilisé les souches microbiennes suivantes :

**Tableau IV.2** : Ces souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) ont toutes été fournies par le laboratoire de microbiologie **CRD de Biotic-SAIDAL**.

Les souches	La famille et Classification	Référence	Milieux de culture
<b>-Escherichia coli.</b>	- <i>Enterobacteriaceae</i> . -Bacilles à Gram négatif.	ATCC8739.	Mueller Hinton.
<b>-Pseudomonas aeruginosa.</b>	- <i>Pseudomonadaceae</i> . -Bacilles à Gram négatif.	ATCC9027.	Mueller Hinton.
<b>-Staphylococcus aureus.</b>	- <i>Staphylococcaceae</i> . -Coques à Gram positif.	ATCC6538.	Mueller Hinton.
<b>-Bacillus subtilis</b>	- <i>Bacillaceae</i> . -Bâtonnets à Gram positif.	ATCC6633.	Mueller Hinton.
<b>-Candida albicans</b>	- <i>Saccharomycetaceae</i> . -Des colonies qui sont grandes rondes de couleur blanche ou crème ( <i>albicans</i> ) signifie « blanchâtre ».	ATCC10231.	Sabouraud.
<b>-Saccharomyces cerevisiae.</b>	- <i>Saccharomycetaceae</i> . - <i>Eucaryote</i> unicellulaire, cellules isolées, ovoïdes à arrondies.	ATCC9763.	Sabouraud.

#### IV.5.2.matriels non biologiques

Le matériel non biologique utilisé dans le laboratoire de l'unité de CRAPC est représenté en **Annexe II**

#### IV.6. Rendement d'extraction

Le rendement en huile essentielle est la première quantification à faire ; il est exprimé en millilitre pour 100 grammes de matière végétale sèche. Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal à traiter. Les huiles essentielles sont recueillies et conservées au réfrigérateur à 4°C dans des bouteilles sombres pour les préserver de la chaleur

$$REH\% = \frac{MHE}{MS} \times 100$$

D'où :

**R** : Rendement en huile essentielle en pourcentage (%).

**MHE** : quantité d'extraite récupérée exprimée en g.

**MS** : quantité de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.



**Figure IV.2** : flacons verre ambré des huiles essentielles  
(Photo originale 2022).

## IV.7 Analyses physico-chimiques

### IV.7.1. Analyses physiques

#### IV.7.1.1. Humidité (ISO 662, 1996)

Cette méthode consiste en une dessiccation du produit après chauffage à une température de  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  dans une étuve isotherme et à pression atmosphérique jusqu'à obtention d'une masse constante. Les échantillons séchés sont refroidis dans un dessiccateur puis pesés. Le taux d'humidité est exprimé en pourcentage selon la formule suivante :

$$H\% = \frac{P1 - P2}{P1 - P0} \times 100$$

**Sachant :**

**H (%)** : l'humidité est exprimée en pourcentage de masse.

**P** : le poids de la capsule vide (g).

**P1** : le poids de la capsule et la prise d'essai avant séchage (g).

**P2** : le poids de la capsule et la prise d'essai après le séchage (g).



**Figure IV.3** : Les huiles dans une étuve pendant 1 heure Après dans le dessiccateur 30mins. (Photo originale 2022).

### IV.7.1.2 La densité relative

#### ➤ Définition

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20°C, et la masse d'un volume égal d'eau distillée à la même température.

#### ➤ Principe

À l'aide d'une balance analytique, effectuer de pesées successives de volume égal d'huile et d'eau à la température de 20°C.

#### ➤ Mode opératoire

- Nettoyer soigneusement le pycnomètre et le sécher.
- Déterminer la masse  $m_0$  du pycnomètre vide.
- Remplir le pycnomètre avec de l'eau distillée jusqu'à le trait de jauge et laisser 30 mn dans un bain marie à 20°C.
- Déterminer la masse  $m_1$  de pycnomètre rempli d'eau distillée.
- Nettoyer et sécher le pycnomètre.
- Remplir le pycnomètre avec de l'huile jusqu'à le trait de jauge.
- Déterminer la masse  $m_2$  de pycnomètre contenant l'huile.

Méthode de calcul La densité relative est donnée par la formule ci-dessous.

$$D^{20} = \frac{(M_2 - M_0)}{(M_1 - M_0)}$$

Ou :  $m_0$  : Masse (g) du pycnomètre vide.

$m_1$  : Masse (g) du pycnomètre rempli d'eau.

$m_2$  : Masse (g) du pycnomètre rempli d'huile.

### IV.7.2. Caractérisation chimique :

#### IV.7.2.1. Détermination de l'acidité :

#### ➤ Principe

Il consiste à mettre en solution une prise d'essai dans un mélange de solvants, puis titrage des acides gras libres présents à l'aide d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (**ISO 660, 2012**) selon la réaction suivante :



➤ **Mode opératoire**

Dans une fiole (250ml), on introduit une prise d'essai (P) de 2,5 g de l'huile d'olive dissoute successivement dans 50 ml du mélange d'oxyde diéthylique/éthanol (25 ml diéthylique : 25 ml éthanol), préalablement neutralisé. On ajoute ensuite quelques gouttes de phénolphtaléine et on titre sous agitation avec la solution d'hydroxyde de potassium à 0,1 mole par litre jusqu'au virage de l'indicateur (coloration rose de la phénolphtaléine persistant durant au moins 10 secondes). En parallèle, on réalise un essai à blanc dans les mêmes conditions en absence de l'huile d'olive.

➤ **Expression des résultats**

L'acidité d'une huile est exprimée en gramme d'acide oléique par 100g d'huile, selon l'équation suivante :

$$A\% = \frac{V \cdot C \cdot M}{10 \cdot P}$$

**V** : Volume en millilitre de la solution titrée de KOH utilisée pour l'échantillon.

**C** : Concentration en moles/litre, de la solution titrée de KOH utilisée à 0,1 N.

**M** : Masse molaire de l'acide oléique (282 g/mole).

**P** : Prise d'essai en grammes. 10 : Facteur de conversion.

#### **IV.7.2.2 Détermination de l'indice de peroxyde**

➤ **Principe**

L'indice de peroxyde représente la quantité des substances de l'échantillon (exprime en milliéquivalents d'oxygène actif par Kg de matière grasse) qui oxydent l'iodure de potassium. Indice de peroxyde est déterminé selon la méthode décrite dans le règlement **CEE/2568/91**. Le principe repose sur la prise d'essai est traitée par l'iodure de potassium en présence de chloroforme et acide acétique. L'iode libéré est titré en retour par une solution de thiosulfate de sodium.

➤ **Protocole expérimental**

La méthode utilisé est celle **d'ISO 3960, 2007**. - 5g d'huile pesées dans une fiole et mélangés avec 12ml de chlorophorme ; le tout est agité. - 18ml d'acide acétique glacial ainsi que 1ml d'Iodure de potassium (KI) (solution aqueuse saturée) sont ajoutés. - Le mélange est agité pendant 1mn et laissé reposer pendant 5mn à l'abri de la lumière et à une température de 15 à 25°C. - 75ml d'eau distillée sont additionnés suivi d'un

titrage de l'iode libéré avec une solution de thiosulfate de sodium [C (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)] à 0,01N en agitant vigoureusement et en employant la solution d'amidon (1g/100ml) comme indicateur jusqu'à disparition de la couleur. - Un essai à blanc est effectué simultanément.

L'indice de peroxyde en milliéquivalent d'O<sub>2</sub>/kg est calculé selon l'équation :

$$IP = N \frac{(V - V_0)}{M} \cdot 1000$$

Ou

**N** : Normalité de thiosulfate de sodium (0.01).

**V, V<sub>0</sub>** : Volume en ml de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nécessaire pour le titrage de l'échantillon et de l'essai à blanc respectivement.

**M** : masse en gramme de la prise d'essai.

#### IV.7.2.3. Analyse des pigments

##### IV.7.2.3.1. Détermination de la teneur en pigments (chlorophylle et caroténoïde)

Le protocole du dosage des caroténoïdes et de la chlorophylle utilisé est celui de (Minguez *et al.*, 1991):

- Une prise d'essai de 3 g d'huile est ajustée jusqu'à 10 ml de cyclohexane dans une fiole jaugée.
- Les absorbances maximales à 670 nm et à 470 nm nous renseignent sur la fraction chlorophyllienne et les caroténoïdes respectivement.
- La valeur du coefficient d'extinction spécifique utilisée :

E<sub>0</sub> = 613 pour la Phéophytine (composant majeur des chlorophylles).

E<sub>0</sub> = 2000 pour la Lutéine (composant majeur des caroténoïdes).

$$\text{Chlorophylle (mg/kg)} = \frac{A_{670} \cdot 10^6}{613 \cdot 100 \cdot T}$$

$$\text{Caroténoïdes (mg/kg)} = \frac{A_{470} \cdot 10^6}{2000 \cdot 100 \cdot T}$$

**A** : absorbance.

**T** : trajet optique (épaisseur de la cuve 1 cm).

#### IV.7.2.4. Absorbance dans l'ultraviolet

Les extinctions spécifiques mesurées par spectrophotométrie aux longueurs d'ondes 230 nm et 270 nm nous renseigne sur la possibilité de détérioration d'huile par le phénomène d'oxydation. Ce dernier engendre des systèmes diéniques et triéniques dont les maximums d'absorption sont aux alentours de 230 nm et 270 nm respectivement (**Yadav et al., 2004**), (**Annexe IV**). L'absorbance, exprimée comme extinction spécifique, est déterminée selon la méthode décrite par le **COI (1996)**. Une masse de 0,25g d'huile filtrée est diluée dans 25ml du cyclohexane. L'absorbance est mesurée aux deux longueurs d'ondes 232 nm et 270 nm. Les extinctions spécifiques à ces longueurs d'ondes sont exprimées comme suit :

$$E = \frac{A\lambda}{C.L}$$

**Où** : E : Extinction spécifique à la longueur d'onde  $\lambda$ .

**A $\lambda$**  : la densité optique à la longueur d'onde  $\lambda$ .

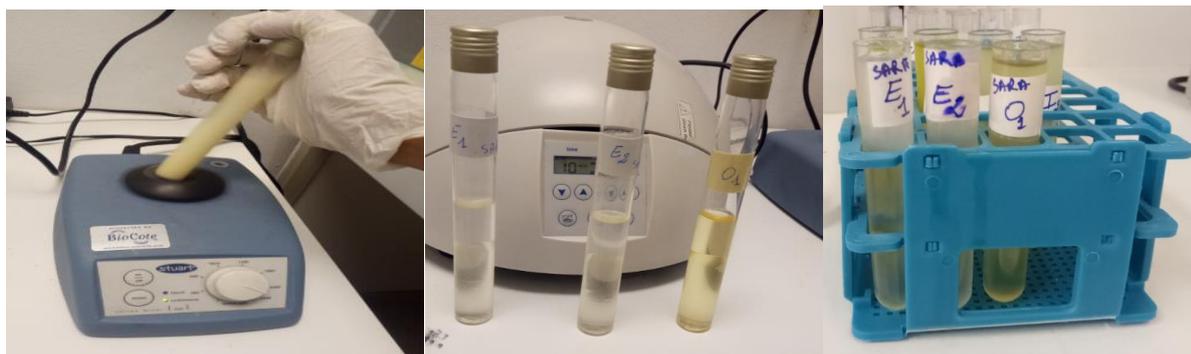
**C** : la concentration de la solution en g/100ml.

**L** : Longueur de la cuve en centimètre.

#### IV.7.3 Dosage des composés phénoliques

##### IV.7.3.1 Préparation des extraits

La méthode adoptée est basée sur l'extraction liquide-liquide décrite par (**Pirisi et al., 2000**). Une masse de 4 g d'huile est solubilisée dans un mélange constitué de 4 ml de n-hexane et 4 ml du méthanol 60%. Après agitation pendant 2 min, le mélange est centrifugé (3000 rpm/5 min). Les deux solvants se séparent et la phase méthanolique est récupérée ; l'opération est répétée trois fois et les extraits méthanoliques ainsi obtenus sont combinés (**figure IV.4**).



1 : Agitation avec le vortex

2 : présentation de deux phases

3 : récupère le surnageant  
(Après trois extraction)**Figure IV.4 : La préparation des extraits (Photo originale 2022).**

#### IV.7.3.2 Dosage des Composés phénoliques totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans l'huile d'amande amère a été effectué par colorimétrie en utilisant le réactif de Folin – Cicalteu.

- **Principe :**

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) de couleur jaune. Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans l'huile.

- **Mode opératoire**

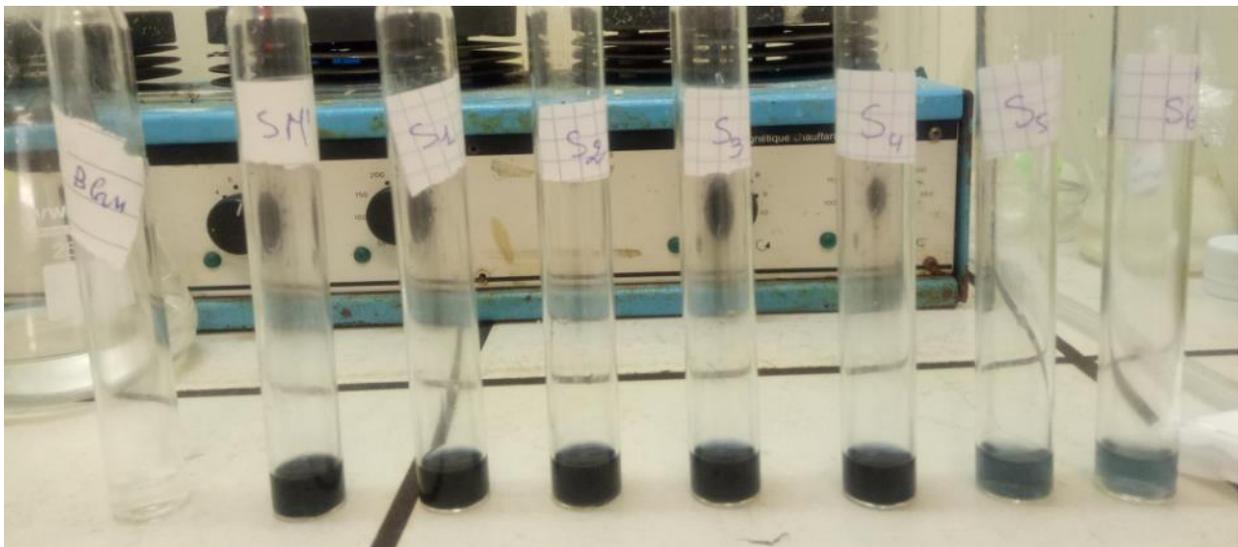
Diluer une prise de 1ml de chaque échantillon d'huile d'amande dans 5ml de méthanol.

- Peser 200mg d'acide gallique, les dissoudre dans 100ml d'éthanol, soit une solution (S1) avec une concentration de 2mg/ml.
- Diluer la solution mère comme suit :
- Prélever 5ml de la solution mère puis ajouter 5ml d'eau distillée et l'on obtient la dilution (S/2).
- Prélever 5ml de la solution (S/2) puis rajouter 5ml d'eau distillée et soit la dilution S/4.
- Refaire la même procédure pour les autres dilutions.

- **Dosage proprement dit :**

- Prélever 0.5 ml de chaque dilution d'échantillon dans les tubes à essais, ajouter 5ml d'eau distillée dans chaque tube.

- Ajouter 0.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3mn, ajouter 0.5ml de carbonate de sodium à 20%.
- Laisser incuber pendant 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Mesurer la densité optique de ces solutions avec un colorimètre à 760 nm contre un blanc.
- Le blanc est représenté par 5ml d'eau distillée, additionnée de 0.5ml de Folin et 0.5ml de carbonate de sodium à 20%.
- Effectuer les mêmes opérations pour réaliser une gamme d'étalonnage utilisant l'acide gallique à des concentrations de 0 à 2 mg/ml.
- La lecture des absorbances est faite à partir d'un spectrophotomètre à 760nm (Vasquez *et al.*, 1973 ; Mohamed Ali *et al.*, 2008).



**Figure IV.5 :** Montre la préparation d'acide gallique par dilution.



**Figure IV.6 :** Montre la préparation des échantillons. (Photo originale 2022).

#### IV.7.4 Analyse spectrale par infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

L'analyse par spectrophotométrie infrarouge permet de distinguer les bandes caractéristiques des principales fonctions chimiques d'un aliment ; il s'agit d'un outil indispensable au suivi des modifications chimiques induites. Ainsi, un échantillon irradié par un faisceau infrarouge subit des vibrations moléculaires et absorbe une partie de l'énergie incidente. Son spectre infrarouge présente donc des bandes d'absorption dont les fréquences sont caractéristiques en fonction de la nature chimique du composé.

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre à Transformée de Fourier de marque Alpha de la maison Bruker. L'interprétation des spectres est effectuée dans la zone 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  de nombre d'onde (64 scans, résolution  $1\text{cm}^{-1}$ ) (voir l'Annexe IV Fig 2).

#### IV.7.5 Caractérisation par GC-MS des huiles essentielles :

##### ➤ Condition opératoire

##### 1. Injecteur :

- Température  $250^{\circ}\text{C}$ .
- Mode d'injection : Split.1 ; 80.
- Volume injecté : 0,2  $\mu\text{l}$ .

##### 2. Colonne :

- Type : HP-5MS
- Dimensions : long 30 m \* D int 0.25 mm \* épaisseur film 0.25  $\mu\text{m}$ .
- Phase stationnaire : 5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane. (Autre : Spécifier).
- Température du four :  $60^{\circ}\text{C}$  pendant 8min,  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  jusqu'à  $250^{\circ}\text{C}$ , isotherme pendant 10 min..
- Durée d'analyse : 113 min
- Gaz vecteur : Hélium pureté : N6.0, Débit GV : 0.5 ml/min.

##### 3. Détecteur de masse :

- Mode d'analyse : Scan TIC (de 30 à 550)
- Délai du solvant : 3.5min
- Température de l'interface :  $280^{\circ}\text{C}$
- Type d'ionisation : Impact électronique
- Intensité du filament : 70 év

-Type de l'analyseur de masse : Quadripôles Température de la source : 230 °c

#### 4. Equipement :

-Chromatographe : Hewlett Packard Agilent 6890 plus

-Spectromètre de masse : Hewlett Packard Agilent 5973, (voir l'Annexe IV.Fig).

#### IV.7.6 Aromatisation des huiles végétales avec les trois huiles essentielles

L'aromatisation a été réalisée par la méthode directe en ajoutant des petites quantités d'huiles essentielles pour l'huile d'oléastre et huile de table Elio. Les concentrations des différentes Les concentrations des différentes solutions préparées sont portées sur le tableau ci-dessous.

On prend les mesures :

**Tableau IV.3** : résume les concentrations

Huiles Végétales	Concentration (µl/ml).		
	Solution mère.	Solution Fille 1.	Solution fille 2.
<b>Aromatisée avec l'AIL</b>	5	2.5	1.25
<b>Aromatisée avec le Citron</b>	5	2.5	1.25
<b>Aromatisée avec le Thym</b>	5	2.5	1.25

Les huiles sont conservées dans des flacons verre ambré de 10 ml avec bouchon dans le frigidaire 4°C jusqu'à l'utilisation.



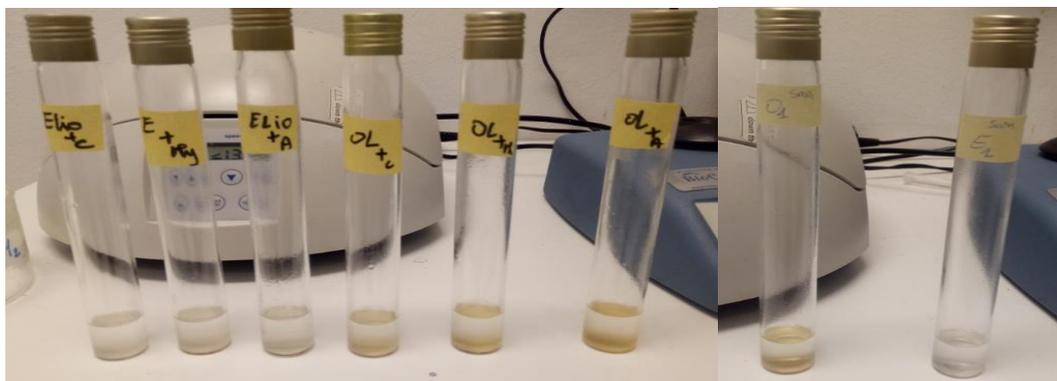
**Figure IV.7** : Flacons verre ambré des huiles aromatisées

#### IV.7.6 Analyse des acides gras par GC-MS

Les esters méthyliques de l'huile ont été préparés, dans le n-heptane (0,12g/2ml), avec une solution froide de KOH (2M) selon la norme **NF EN ISO 5509..**

Ces esters d'acides gras obtenus ont été analysés selon la norme **NF EN ISO 5508** à l'aide d'un spectromètre de masse, HP 5973A à quadripôle est couplé à un chromatographe en phase gazeuse HP 6890 SERIES. La colonne capillaire 5 % Phényl Méthyl Siloxane possède les caractéristiques suivantes (longueur : 30 m ; diamètre interne : 0,25 mm ; épaisseur du film : 0,25  $\mu\text{m}$ ).

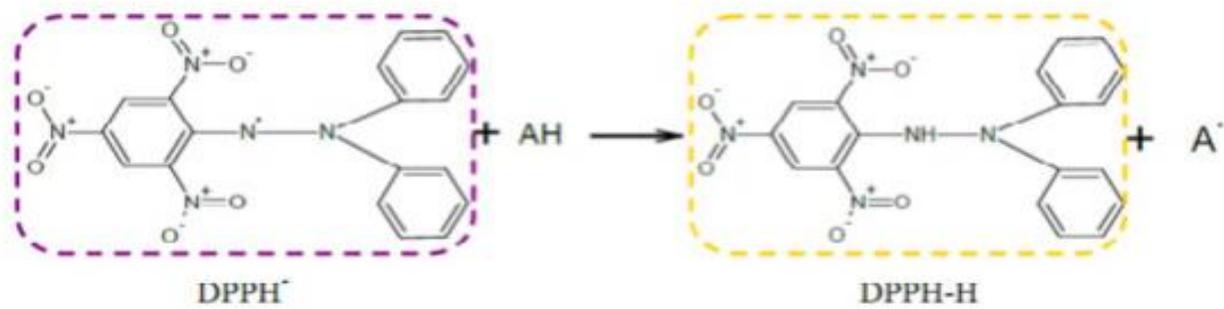
Les conditions opératoires sont : Mode d'injection : splittes 1/20, Température de l'injecteur : 250 °C ; Programmation de température : 60°C (8 min), puis élévation jusqu'à 250°C à raison de 2 °C/min et en isotherme (250°C) pendant 10 min. Gaz vecteur : He à 0,5 ml/min ; Volume injecté : 0.2 $\mu\text{l}$  ; Vitesse de balayage : 2,83 scan/s. Les températures de la source et du quadripôle sont fixées à 230 °C et 150 °C respectivement ; énergie d'ionisation 70 eV, gamme de masse m/z: 29 à 550.



**Figure IV.8** : Préparation des esters méthyliques.  
(Photo originale 2022).

#### IV.7.7. Etude de l'activité antioxydant

Le réactif DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un composé chimique qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. Il est réduit par un transfert d'hydrogène qui provient des différents antioxydants qui se trouvent dans le milieu réactionnel à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie à une absorbance de 517 nm. **Figure IV.9.**



**Figure IV.9 :** Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire (DPPH•) et un antioxydant (AH).

Un volume 0,975 ml de la solution méthanolique de DPPH fraîche (0,0024g/100 ml méthanol) est ajouté à 0,25 ml de l'extrait méthanolique de chaque échantillon à différentes concentrations (2 - 100 µg/ml). Le mélange est fortement agité, incubé pendant 30 min à l'obscurité. L'absorbance a été mesurée à 517 nm contre un blanc méthanol avec un spectrophotomètre UV-visible. Le contrôle négatif est composé de 0,25 ml d'éthanol et de 0,975 ml de la solution de DPPH•. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard. Le pourcentage d'activité anti radicalaire (AA%) est calculé selon la formule suivante :

$$AA\% = \frac{A_0 - A_S}{A_0} \times 100$$

Avec : **AA** : activité antioxydante (%). **A<sub>0</sub>** : densité optique du contrôle (nm). **A<sub>S</sub>** : densité optique de l'échantillon (nm).

Les antioxydants synthétiques, le BHT (hydroxytoluène butylé) et la vitamine C (acide ascorbique) sont utilisées comme standards à différentes concentrations. Le résultat est exprimé en mg de vitamine C équivalent (mg E VC) par ml de l'extrait.

#### IV.7.8.Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles extraites

L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile extraite est généralement réalisée par la méthode de diffusion sur des disques stériles et déterminer la zone d'inhibition de la croissance des germes étudié (bactéries, levures) (méthode d'aromatogramme (**Ozcan et al., 2003**). Elle permet d'étudier la sensibilité des germes aux huiles végétales et les huiles essentielles extraites, avant et après l'aromatisation. Les tests réalisés sont validés par le laboratoire de microbiologie **CRD de Biotic-SAIDAL**. (**Pharmacopée Européenne, 2020**).

➤ **préparation du milieu de culture :**

Pour les bactéries ———➔ milieu Mueller Hinton(MH).

Pour les levures ———➔ milieu Sabouraud(Sab).

Protocole pour la préparation d'1L de milieu de culture (pour environ 15 boîtes de Pétri). On est besoin d'un matériel Physiques et chimiques (**Voir Annexe VI**).

Les deux milieux ont été coulés dans des boites de stériles de 90mm de diamètre.

Ces dernières doivent êtres séchées 30 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.



**Figure IV.10 :** Les milieux de culture préparés (**Photo originale 2022**).

➤ **Préparation des disques :**

Les disques de 9 mm de diamètre, stériles (stérilisation par Ultraviolet pendant 30min), (**Annexe IV**).

**IV.7.8.1.Préparation de l'inoculum :**

➤ **Pour les bactéries :**

**IV.7.8.1.1.Repiquage**

Les différentes souches bactériennes et fongiques on était repique par la méthode de stries sur le milieu gélose nutritive (**GN**), puis incubées à 37°C pour les bactéries et 26°C pour les levures afin d'obtenir des colonies isolée qui vont servir à la préparation de inoculum.

**IV.7.8.1.2. Préparation de la suspension**

- à partir d'une culture et pure jeune de 18h à 24h, l'isolement se fait à l'aide d'une pipette de Pasteur stérile on raclant 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques, et les mettres dans 05 ml d'eau physiologiques stériles.

- On agite au vortex pendant quelques secondes dans opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Ferland.

- on réalise une lecture de la transmittance avec le spectromètre à une longueur d'onde de 620nm et qui doit être entre (0.2-0.3%), ce qui correspond à une concentration de  $10^7$ -  $10^8$  germes/ml.

➤ **Pour les levures :**

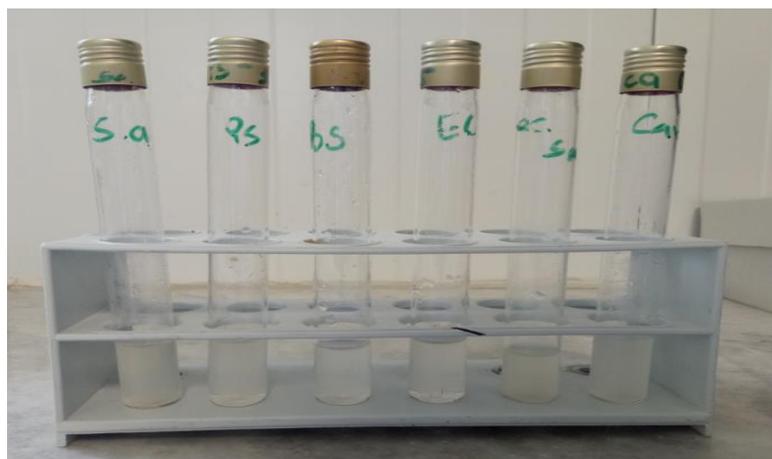
-A partir d'une culture jeune 48h, on réalise des suspensions en prélevant colonies bien isolées et identiques, et les mettre dans 05ml l'eau physiologique stériles.

-On agite au vortex pendant quelques secondes.

- on réalise une lecture de la transmittance avec le spectromètre à une longueur d'onde de 620nm et qui doit être entre (0.2%-0.3%), ce qui correspond à une concentration de  $10^7$ -  $10^8$  germes/ml.

**Remarque :**

Si la valeur obtenue de la première lecture pour les bactéries et les levures n'est pas comprises dans les intervalles voulus, les concentrations doivent être ajustées en ajoutant soit l'eau physiologique ou les colonies, et l'inoculum doit être utilisé dans les 15minites qui suivent sa préparation.



**Figure IV.11 :** Préparation des suspensions bactériennes.  
(Photo originale 2022).

**IV.7.8.2. Examen de l'échantillon :**

➤ **Préparation de la 1<sup>ère</sup> couche de milieu :**

- Nous fondons le milieu gélosé Muller Hinton (**Bactéries**) et Sabouraud (**les levures**), dans un bain-marie à 95°C.
- On verse aseptiquement dans la zone sterile une 1ère couche dans les boîte de petri à raison de 15 ml par boîte avec 2 répétitions par souches.
- On laisse refroidir et solidifier sur la pailleasse.
  - **Préparation de la deuxième couche du milieu :**
- nous somme remplis les flacons en verre sterile avec 50 ml de Muller Hinton (pour les bactéries) et Sabouraud (pour les levures), pour chacun des souches.
- On a ensemence les milieux de culture avec 200µl de chaque suspension.
- On agite manuellement les flacons.
- On transverse rapidement 4ml de chaque milieu inoculé en 2eme couche sur la sur la surface des boîte contenant déjà la 1ère couche de gélose.

### **2ème méthode d'ensemencement par écouvillonnage :**

Le même principe de la 1ère méthode on a réalisé cette méthode uniquement sur les levures *S.cerevisiae* pour s'assurer que les deux méthodes donnent des résultats.

#### ➤ **Principe**

- Dans un champ sterile
- A partir d'une culture pure, de 18h sur milieu d'isolement on racle à l'aide d'une anse de platine sterile 2 a 3 colonies de *S.cerevisiae* bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 ml d'eau physiologique sterile à 0.9% de sel (NaCl).
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne par agitation.
- On trempe un écouvillon sterile dans la suspension bactérienne et l'essorer en le pressant sur la paroi interne du tube afin de décharger au maximum.
- On ensemence la totalité de la surface gélosée (Gélose Sabouraud), en stries serrées.
- On a répété l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

### **IV.7.8.3. Dépôt des disques :**

- A l'aide d'une pince sterile, les disques stérilises sont imbibés et imprégnés par les huiles extraites à testées et sont déposés sur la surfaces de gélose inocules avec les souches testées. Pour certain extrait on a déposé deux disques sur une boîte.

- Les boîtes de Petri ont été incubées, inversées à l'obscurité dans une étuve à une température de 37°C durant 24 h pour les bactéries et à 26°C durant 48 h pour la levure

➤ **La lecture :**

Le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné a été déterminé à l'aide d'un pied à coulisse.

- Présence de zone claire autour du disque : Présence d'activité inhibitrice.
- Absence de zone claire autour du disque : Absence d'activité inhibitrice.

La présence ou l'absence d'un halo permet d'expliquer la sensibilité ou la résistance des germes vis-à-vis des échantillons testés (huiles essentielles et huiles végétales), selon une échelle de notation symbolique allant de 10mm à 25mm (**Sadou et al., 2015**).

**Tableau IV.4 :** échelle de l'activité antimicrobienne en fonction de diamètre de la zone d'inhibition

Activité d'inhibition	Diamètre de la zone d'inhibition
Action inhibitrice très efficace	ZI ≥ 25 mm (+++)
Action inhibitrice importante	16 ≤ ZI < 25mm (++)
Action inhibitrice intermédiaire	10 ≤ ZI < 16 mm (+)
Sans action inhibitrice	ZI < 10 mm (-)

Deux témoins positifs contenant chacun un antibactérien de référence la gentamycine et un antifongique de référence le fluconazole.

Témoin positif un antibactérien de référence. —————> **Gentamycine (T+).**

Témoin positif, un antifongique de référence. —————> **Fluconazole (T+).**

### III.8. Analyses statistiques

Toutes les données obtenues représentent la moyenne de trois essais. L'analyse statistique a été effectuée selon les méthodes standards de l'analyse de variance à un critère ANOVA 1 suivie par le test Fischer LSD en utilisant le programme informatique XLSTAT 14, après vérification préalable de l'homogénéité des variances et de la normalité des données à analyser. Des seuils de probabilité significatifs de 5 et 1 % ont été utilisés.

*Résultats*

*Et*

*Discussion*

## V. Résultats et discussion

Les principaux résultats obtenus au cours de cette présente étude ainsi que les interprétations et discussion feront l'objet de ce chapitre.

### V.1. Caractérisation des huiles essentielles extraites

#### V.1.1. Caractéristiques organoleptiques

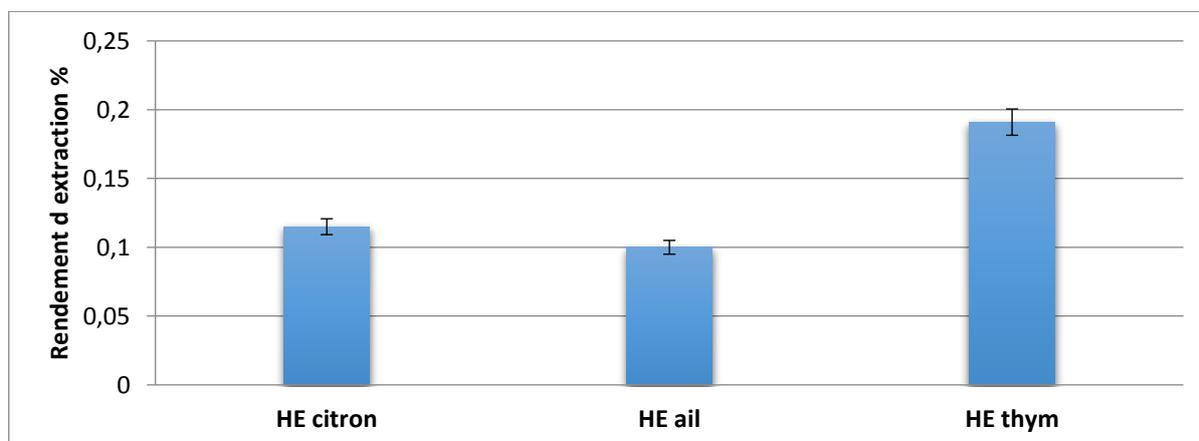
Les caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles des plantes étudiées (Ail, thym et Citron) issues de la méthode d'hydrodistillation ayant un aspect liquide limpide et d'une couleur jaune clair à jaune foncé. Le caractère organoleptiques de ces trois espèces végétales sont reportés dans (**le tableau V.1**).

**Tableau V .1:** Les Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles (HEs).

HEs	Couleur	Odeur	Aspect
<i>Thymus vulgaris L</i>	Jeune claire	Forte odeur	Liquide limpide
<i>Citrus limon L</i>	Bleu claire	Forte odeur	Liquide limpide
<i>Allium sativum L</i>	Jeune foncé	Très puissante	Liquide limpide

#### V.1.2. Détermination des rendements d'extraction des huiles essentielles

Les résultats révèlent (**Figure V.1**) que les échantillons de *Thymus vulgaris L* ont fourni un taux important d'environ 0.191% relativement plus élevé que celui obtenu à partir de *Citrus limon L* et qui est de 0.115% et *Allium sativum L* 0.1%. L'ordre de grandeur des rendements en huile essentielle, se présente comme suit : HE de *Thymus vulgaris L* > *Citrus limon L* > *Allium sativum L*.



**Figure V.1 :** Rendement d'extraction des HEs exprimés en % (ml/100g de MV).

Selon **Bousbia et Chikhoun(2004)**, ces différences de rendement sont dues au plusieurs facteurs à savoir : l'origine géographique, l'écologie, température, l'humidité, espèce végétale, stade de croissance, période de cueillette, conservation du matériel végétal et la méthode d'extraction.

## **V.2. Analyse chimique des huiles essentielles par GC-MS**

Les différents constituants des huiles essentielles ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux des composés des bases de données internes (HP chemstation Wily 07et Nist 02) du spectromètre de masse GC/SM et ceux de la base de données spectrales externe **Nist 2020**.

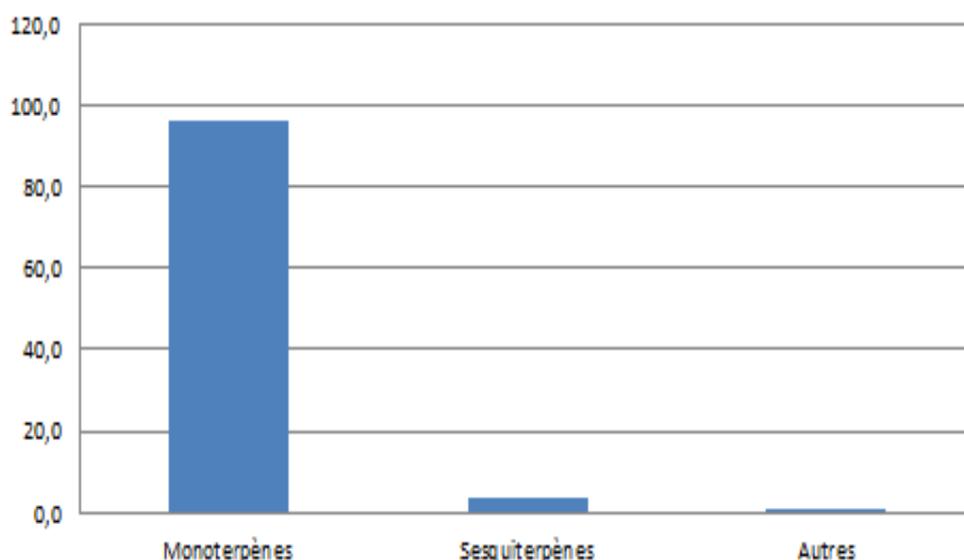
### **V.2.1 L'huile essentielle de citron *Citrus limon* L**

La composition chimique de l'HE de citron est illustrée par le chromatogramme de la (**Fig 2 Annexe VII**), et les composés identifiés sont reportés dans le (**Tableau V.2**). L'analyse des huiles essentielles du citron *Citrus limon* a révélé la présence de plusieurs monoterpènes à des quantités très élevée. Les monoterpènes sont des composants majeurs avec 98.7%, suivi de Sesquiterpènes (0.9%) tres faible quantités et autres composants avec un tres faible pourcentage de 0.4%.

**Tableau V.2** : Les différents constituants identifiés par GC-MS dans l'huile essentielle du citron.

RT	KI	Composé	%
3,97	-	Dihydrotoluene	0,223
9,2	923	$\alpha$ -Thujene	0,160
9,57	929	$\alpha$ -Pinene	1,001
10,39	943	Camphene	0,111
11,9	969	Sabinene	0,372
12,1	973	$\beta$ -Pinene	2,770
13,1	990	$\beta$ -Myrcene	1,604
13,9	1003	$\alpha$ -Phellandrene	0,265
14,73	1015	$\alpha$ -Terpinene	0,566
15,29	1023	para- cymene	0,805
16,12	1034	D-Limonene	74,399
16,44	1039	(Z)- $\beta$ -Ocimene	0,131
17,05	1048	(E)- $\beta$ -Ocimene	0,253
17,82	1059	$\gamma$ -Terpinene	7,618
18,43	1068	<i>P</i> -Mentha-3,8-diene	0,011
19,73	1086	Terpinolene	1,324
20,76	1101	Linalool	0,466
21,09	1105	<i>Cis</i> -Thujone	0,112
21,34	1109	p-1,3,8-Menthatriene	0,114
21,55	1112	Endo-Fencho	0,014
23	1132	Allo-ocimene	0,101
23,67	1142	Camphor	0,053
23,82	1144	<i>Cis</i> - $\beta$ -terpineol	0,185
24,09	1147	3-thujanol	0,040
25,44	1166	p-Mentha-1,5-dien-8-ol	0,251

26,1	1176	Terpin-4-ol	0,692
26,82	1186	p-Cymenene	0,091
27,18	1191	$\alpha$ -Terpineol	2,123
27,61	1197	$\gamma$ -Terpineol	0,158
29,97	1231	Citronellol	0,127
30,68	1241	Neral	0,646
32,78	1272	Geranial	1,188
35	1304	Carvacrol	0,049
37,59	1344	1-Phenyl pentan-3-one	0,134
38,99	1365	Neryl acetate	0,308
40,23	1385	Geranyl acetate	0,139
42,1	1414	(E)-caryophyllene	0,182
43,24	1467	$\alpha$ -Acoradiene	0,291
47,75	1506	$\beta$ -Bisabolene	0,436
<b>Total identifié 99,510</b>			
<b>Monoterpènes : 98,7%,</b>			
<b>Sesquiterpènes :0,9%,</b>			
<b>Autres :0,4%</b>			



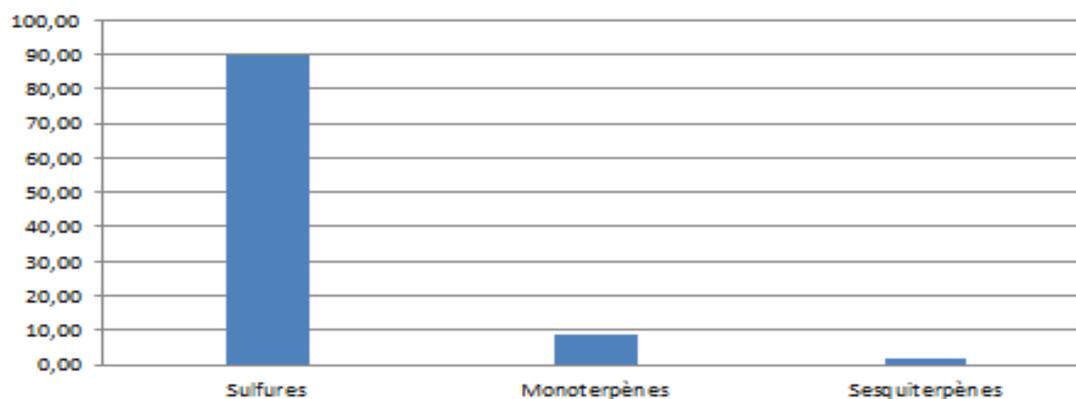
**Figure V.2** : Les différentes familles de composés constituant l'huile essentielle du citron (*Citrus limon L*) extraite par hydrodistillation.

L'huile de citron est connue d'être riche en monoterpènes tel que limonène linalool, terpinéol, géraniol. Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature. Récemment, **Misharina et al. (2011)** ne sont arrivés à identifier que 13 constituants dans l'huile essentielle du citron dont le Limonène est le composant majeur (82.30%) suivi par  $\gamma$ -Terpinene (5.98 %) et  $\beta$ - Myrcene avec une valeur de 1.48 %. Ces résultats sont inférieurs des résultats trouvés dans notre travail.

### V.2.2 L'huile essentielle d'ail

La composition chimique de l'HE de l'ail est illustrée par le chromatogramme de la (**Fig 1 Annexe VII**) et les composés identifiés sont reportés dans le **Tableau V.3**

Nous avons identifié 22 composés représentant 93,311% de l'huile essentielle brute de l'ail. L'huile essentielle de l'ail est riche avec de nombreux composés soufrés comme le disulfure de diallyle (21,585%) ou le trisulfure de diallyle (35,935%). Ces derniers proviennent essentiellement de la dégradation de l'alliine et l'allicine.



**Figure V.3 :** Les différentes familles de composés constituant l'huile essentielle de l'ail extraite par hydrodistillation

Nos résultats montrent que les sulfures dominent dans la composition des huiles essentielles de l'ail (89,714%). Cela est en accord avec la littérature (**Dethier, 2009; Minker, 2012; Santhosha et al., 2013**), *Allium sativum* possède des composants majoritaires de Sulfures (89,714%) et minoritaires Monoterpènes (8,627%), Diallyl tetrasulfide (2,14%), Diallyl trisulfide (35,935), (E)-1-Propenyl 2-propenyl disulfide (5,020%) Allyl methyl trisulfide (6,787%) D-Limonene (7,311) Diallyl disulfide (21,585%), nos résultats sont supérieurs à celle de l'huile *A. sativum* étudiée par (**Moumen et al., 2016**) de variétés Ouest Algérien.

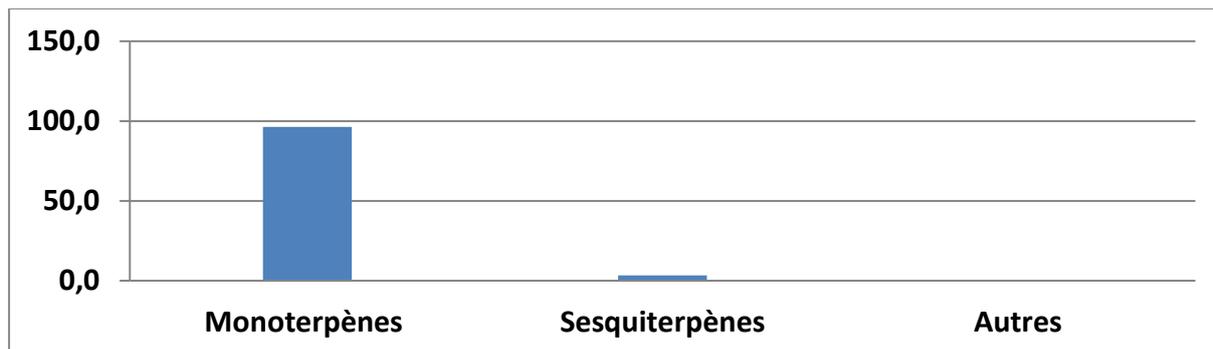
**Tableau V.3** : les différents constituants identifiés par GC-MS dans l'huile essentielle de l'ail.

<i>RT</i>	<i>KI</i>	<i>Composé</i>	<i>%</i>
5,12	826	1,2-Dithiolane	0,170
5,37	852	Diallyl sulfide	0,686
7,79	918	Allyl methyl disulfide	1,423
8,43	929	Methyl(Z)-1-Propenyl disulfide	0,125
8,91	937	Methyl(E)-1-Propenyl disulfide	0,270
10,29	961	1,2-Dithiolene	0,563
10,86	971	Dimethyl trisulfide	0,462
14,51	1028	D-Limonene	7,311
16,37	1055	γ-Terpinene	0,739
18,94	1091	Diallyl disulfide	21,585
19,5	1099	(Z)-1-Propenyl 2-propenyl disulfide	1,994
20,01	1106	(E)-1-Propenyl 2-propenyl disulfide	5,020
22,86	1146	Allyl methyl trisulfide	6,787
26,17	1191	3-Vinyl-1,2-dithi-4-ene	1,229
27,04	1203	4H-1,2,3-Trithiine	0,788
28,26	1221	2-Vinyl-1,3-dithi-4-ene	2,381
34,8	1316	Diallyl trisulfide	35,935
35,5	1326	Allyl (E)-1-propenyl trisulfide	0,631
38,65	1374	5-Methyl-1,2,3,4-tetrathiane	0,865
40,87	1409	Z)-caryophyllene	1,548
49,2	1545	Diallyl tetrasulfide	2,141
75,06	2041	Cyclooctasulfur	0,657
<b>Total identifié</b>			<b>93,311</b>
<b>Sulfures : 89,714%</b>			
<b>Monoterpènes : 8,627%</b>			
<b>Sesquiterpènes : 1,659%</b>			

### V.2.3 L'huile essentielle de Thym (*Thymus vulgaris* L)

La composition chimique de l'HE de thym est illustrée par le chromatogramme de la (Fig 3 Annexe VII) , et les composés identifiés sont reportés dans le **Tableau 4**.

Nous avons identifié 30 composés représentant 99,208% de l'huile essentielle brute de thym, l'huile essentielle de thym est composée majoritairement de monoterpènes (96,316%).



**Figure V.4** : les différentes familles de composés constituant l'huile essentielle du thym.

Huile essentielle montre par GC/MS des composants majoritaire et minoritaire de pourcentage de Monoterpènes (**96,316%**), Sesquiterpènes (**3,313%**), Thymol 42,634 Carvacrol 20,248%,  $\gamma$ -Terpinene 20,427% , para- cymene 6,802%. Nos resultat sont superieure de celle HE du *T.vulgaris* identifie par (**Bouhdid et al., 2006**),de variété Maroc.

**Tableau V.4** : les différents constituants identifiés par GC-MS dans l'huile essentielle du thym.

<b>RT</b>	<b>KI</b>	<b>Composé</b>	<b>%</b>
4,11	-	Methyl isovalerate	0,036
9,21	923	$\alpha$ -Thujene	0,472
9,57	929	$\alpha$ -Pinene	0,340
10,42	944	Camphene	0,027
12,45	979	Oct-1-en-3-ol	0,221
12,85	985	Octan-3-one	0,111
13,13	990	$\beta$ -Myrcene	0,899
13,9	1003	$\alpha$ -Phellandrene	0,146
14,73	1015	$\alpha$ -Terpinene	2,057
15,33	1023	para- cymene	6,802
15,55	1026	D-Limonene	0,317
15,78	1030	Eucalyptol	0,011
16,27	1037	(Z)- $\beta$ -Ocimene	0,023
17,05	1048	(E)- $\beta$ -Ocimene	0,038
17,85	1059	$\gamma$ -Terpinene	20,427
19,7	1086	Terpinolene	0,022
20,76	1101	Linalool	0,382
26,1	1176	Terpin-4-ol	0,253
27,42	1194	Myrtenol	0,231
30,15	1234	Thymol methylether	0,120
30,77	1243	Carvacrol methylether	0,085
34,76	1301	Thymol	42,634
35,3	1309	Carvacrol	20,248
38,21	1354	Thymol acetate	0,021
42,2	1416	(E)-caryophyllene	1,442
44,24	1449	$\alpha$ -Humulene	0,036

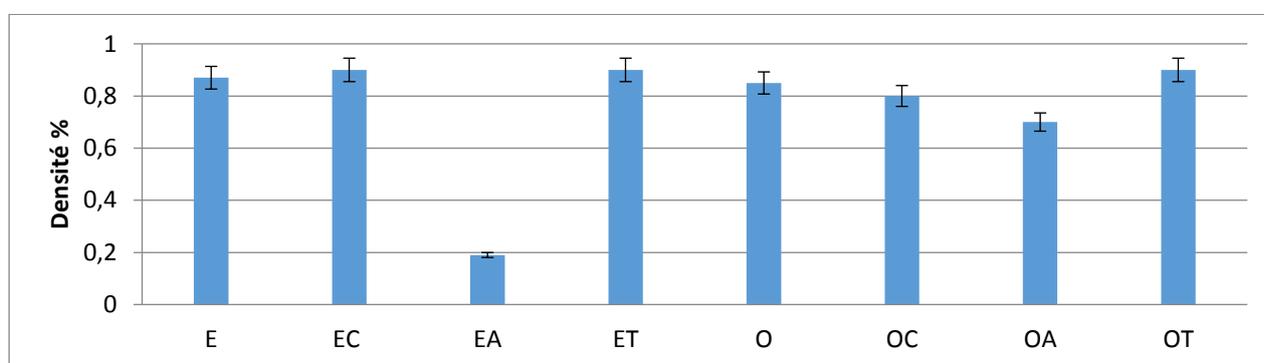
<b>47,75</b>	<b>1506</b>	$\beta$ -Bisabolene	0,738
<b>48,55</b>	<b>1520</b>	$\delta$ -Cadinene	0,140
<b>49,8</b>	<b>1541</b>	E- $\alpha$ -Bisabolene	0,900
<b>51,97</b>	<b>1579</b>	Caryophyllene oxide	0,031
<b>Total identifié</b>		<b>99,208</b>	
<b>Monoterpènes</b>	<b>96,316%</b>		
<b>Sesquiterpènes</b>	<b>3,313%</b>		
<b>Autres</b>	<b>0,371%</b>		

### V.3. Résultats de la caractérisation physicochimique des huiles végétales

#### V.3.1 Evaluation des résultats physiques

##### V.3.1.1 Densité relative

Les résultats obtenus pour la densité des huiles sont inférieurs à 0,9 pour les huiles d'oléastre et d'Elio et pour les huiles aromatisées, les résultats montrent une valeur comprise entre 0,19% et 0,9%. La densité est l'une des caractéristiques importantes d'une huile végétale. Ce paramètre dépend du taux d'acides gras polyinsaturés, du niveau d'oxydation et de polymérisation (**Sadoudi et Ali Ahmed, 2017**). Les résultats obtenus sont conformes à la tranche 0,912- 0,925 établie par la norme **COI (2019)** et le **Codex Alimentarius (1998)**.



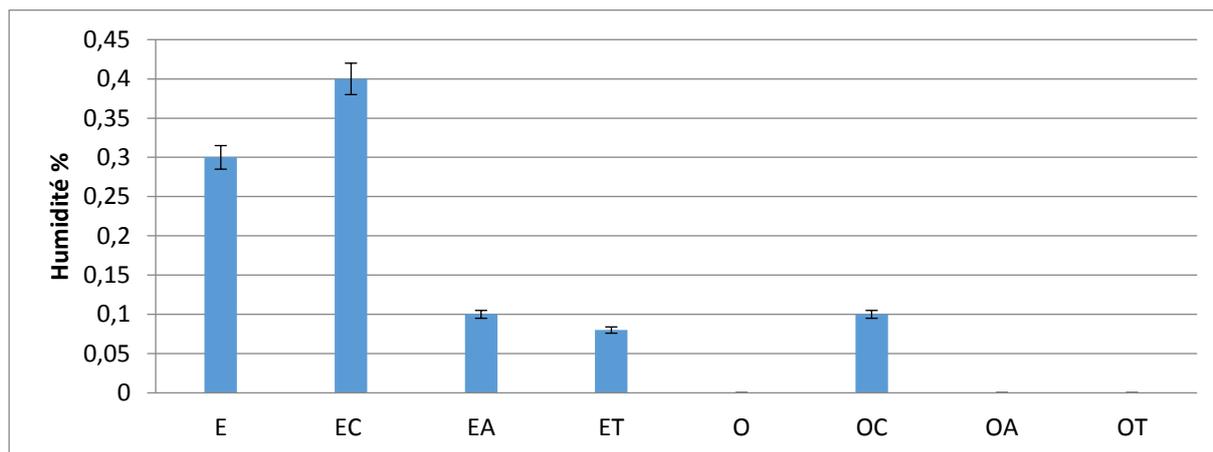
**Figure V.5 : Evolution de la densité des huiles étudiées avant et après l'aromatization**

E : Huile Elio, O : huile d'oléastre, EC : Huile Elio + HES citron EA : Huile Elio + HES ail, ET : Huile Elio + HES thym, OC : Huile oléastre + HES citron, OA : Huile oléastre + HES ail OT : Huile oléastre + HES thym.

##### V.3.1.2 Humidité

Les huiles raffinées fraîches ne doivent pas contenir de traces d'eau (**Codex Alimentarius, 1999**). Les valeurs de l'humidité de l'huile Elio, testée dans notre étude expérimentale de 0.3%, avant l'aromatization. Ces valeurs sont supérieures à la norme établie par le **Codex Alimentarius (1999)** qui exige un taux d'humidité inférieur à 0.2% pour les huiles raffinées et le **COI (2019)** dont fixe une humidité inférieure à 0.2% pour une huile d'olive vierge. Nous remarquons également que l'humidité des huiles végétales après aromatization, le pourcentage de variation pour l'huile d'oléastre aromatisée à l'huile essentielle de citron est égale à 0,1% et pour les deux autres (huile d'oléastre + thym) et (huile d'oléastre + ail) sont toujours de 0%.

Nous remarquons que l'humidité de l'huile Elio + HE citron (**figure V.6**), a légèrement augmentée mais que celle de l'huile Elio aromatisée avec HE thym et HE ail est abaissée à 0.08%. La teneur en eau des huiles d'Elio et d'oléastre est un paramètre de qualité important, influençant non seulement les activités de raffinage des huiles mais aussi leur conservation (**Alileche et al., 2021**). La présence d'eau peut provoquer des réactions d'hydrolyse, et rendre les acides gras libres moins stables à l'auto-oxydation, ce qui entraîne des saveurs rances (**Meng et al., 2012**).



**Figure V.6 : Evolution de l'humidité des huiles étudiées avant et après l'aromatisation**

E : Huile Elio, O : huile d'oléastre, EC : Huile Elio + HES citron, EA : Huile Elio + HES ail, ET : Huile Elio + HES thym, OC : Huile oléastre + HES citron, OA : Huile oléastre + HES ail OT : Huile oléastre + HES thym

### V.3.2. Evaluation des analyses chimiques

#### V.3.2.1 L'acidité

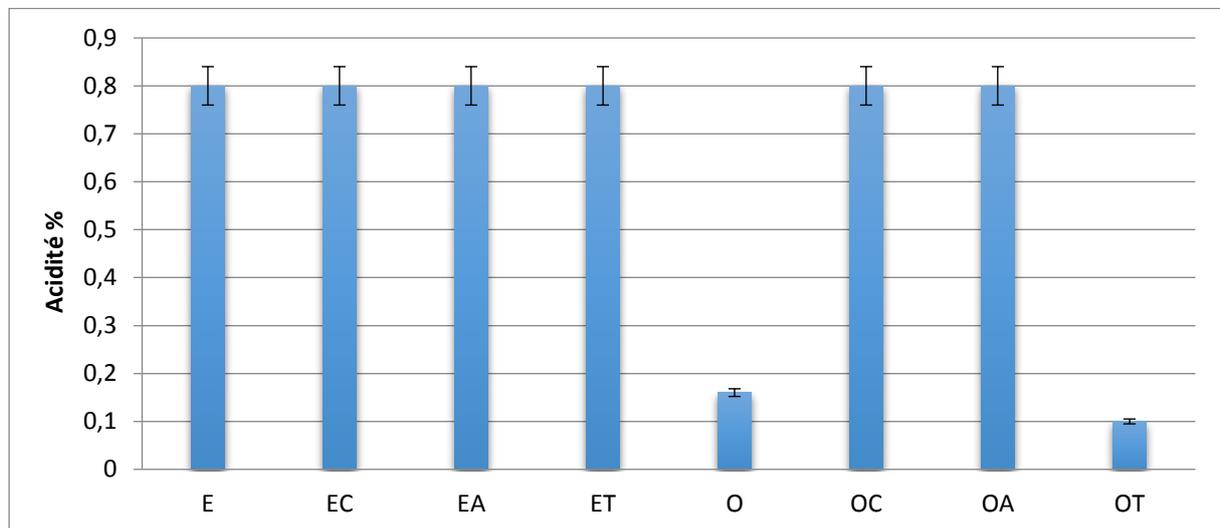
L'acidité (exprimée en % d'acide oléique) et la comparaison qualitative des échantillons d'huile d'olive analysés sont illustrés **dans la figure V.7**

On observe que l'acidité de l'huile d'oléastre est inférieure de 0,16% et celle de l'huile d'Elio de 0,8%. On note également que la valeur de l'acidité après l'aromatisation augmente pour l'huile d'oléastre + HE de citron et HE d'ail jusqu'à 0,8% par contre elle diminue pour l'huile d'oléastre + HE de thym ; en parallèle la mesure de l'acidité de l'huile d'Elio aromatisée avec les trois HE est stable à 0,8%.

En comparant nos résultats d'examen de caractéristiques avec celle de (**Ayadi et al., 2009 ; Alileche et al., 2021**), nous pouvons déduire que l'ajout de plantes médicinales (aromatiques) entraîne une légère augmentation de l'acidité cette modification est due à la migration certaine molécule des plante médicinales vers huile

d'olive pendant le processus de macération, ces molécules pourraient être des acides organiques, des composés phénoliques, et des antioxydants huile essentiels. Les résultats montrent que le pourcentage d'acidité de l'huile des différents échantillons d'huile étudiés est inférieur à 0,8%, norme fixée par le **COI (2015)** pour une huile d'olive (**Alileche et al., 2014**). Pour l'acidité des huiles (Elio), nous pouvons déduire que cette huile importée est conforme à la norme de **codex Alimentarius**.

**Juhaimi et al. (2016)** ont noté aussi une augmentation variant de 0,78 à 0,89 mg KOH/g d'huile de l'acidité dans les échantillons de l'huile d'olive enrichis par l'HE de romarin et conditionnés dans des bouteilles en verre de différentes couleurs (rouge, jaune, vert et transparent) (entre) après 90 jours de stockage.

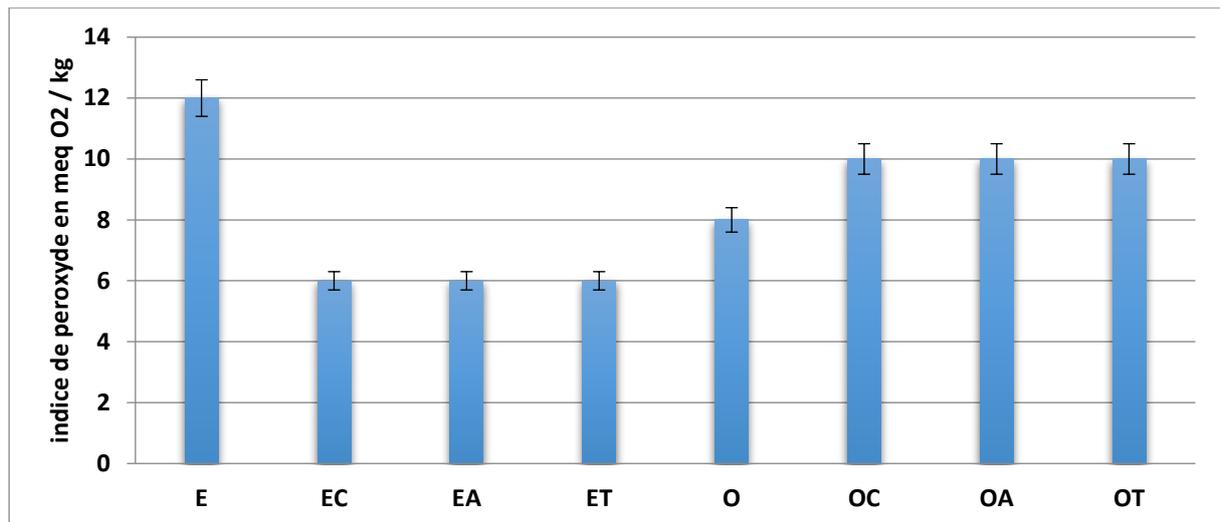


**Figure V.7: Evolution de l'Acidité des huiles étudiées avant et après l'aromatization,**

E : Huile Elio, O : huile d'oléastre, EC : Huile Elio + HES citron, EA : Huile Elio + HES ail, ET : Huile Elio + HES thym, OC : Huile oléastre + HES citron, OA : Huile oléastre + HES ail, OT : Huile oléastre + HES thym

### V.3.2.2 Indice de peroxyde

L'indice peroxyde permet d'évaluer au sein d'une huile la quantité de peroxydes et d'hydroperoxydes (produits d'oxydation primaires). L'indice de peroxyde des différents échantillons de l'huile d'olive analysés est reporté dans **la figure V.8**



**Figure V.8 : Evolution de l'Indice de peroxyde des huiles étudiées avant et après l'aromatisation**

E : Huile Elio, O : huile d'oléastre, EC : Huile Elio + HES citron EA : Huile Elio + HES ail, ET : Huile Elio + HES thym, OC : Huile oléastre + HES citron, OA : Huile oléastre + HES ail OT : Huile oléastre + HES thym.

Les résultats obtenus (**FigureV.8**), révèlent que l'indice de peroxyde reste inférieur à la limite normative indiquée par le règlement **COI 2019** pour l'huile d'olive vierge et vierge-extra (20 mEq O<sub>2</sub>/kg) (**Alileche et al., 2014**) et les normes de codex alimentarius pour une huile végétales (10 mEq O<sub>2</sub>/kg).

. On remarque une diminution de l'indice de peroxyde pour l'huile Elio aromatisée avec les trois huiles essentielles par contre une légère augmentation pour l'huile d'oléastre aromatisée avec HES

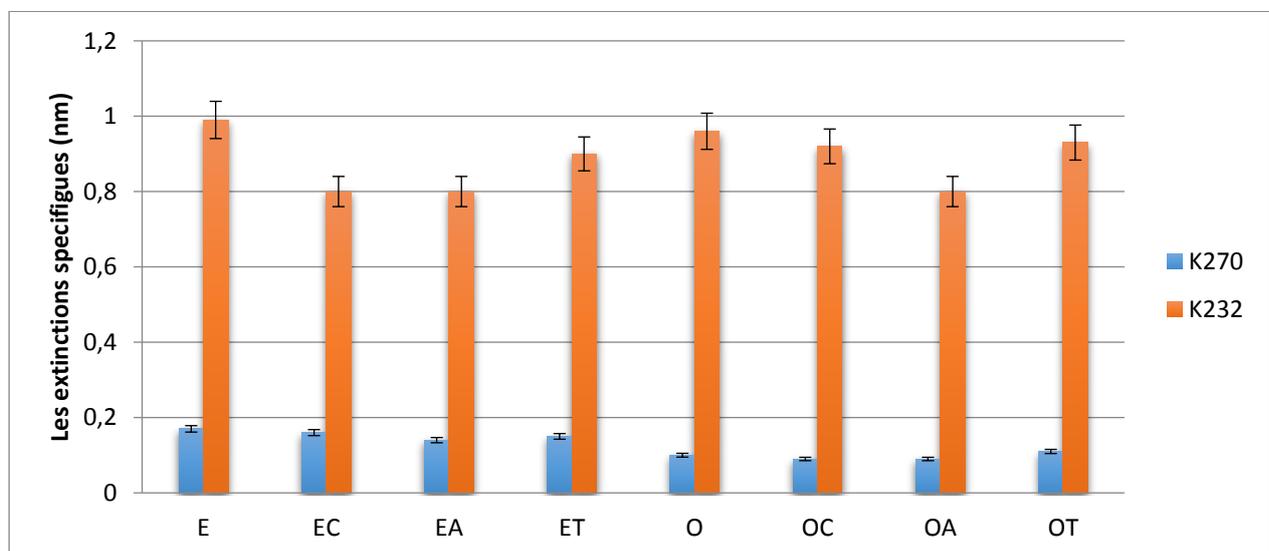
Dans des études antérieures réalisées sur l'effet d'incorporations d'extraits et des HES de plantes sur la composition chimique, la qualité et la stabilité oxydative d'autres huiles végétales, **Asnaashari et al. (2016)** et **Chandran et al. (2016)** ont montré que l'IP de l'huile de maïs et de noix de coco additionnées des HES de gingembre (*Zingiber officinale*), de poivre noir (*Piper nigrum*) et de l'extrait de la mûre (*Rudus plicates*), augmente durant la thermo-oxydation.

### V.3.2.3 Extinction spécifiques

L'extinction spécifique des huiles dans l'ultraviolet (K232 et K270) constitue un paramètre important de leur qualité. En effet, Les valeurs de l'indice de peroxyde inférieur ou égale à 20 meq O<sub>2</sub>/Kg d'huile ne signifient pas toujours l'absence du phénomène d'oxydation. Le recours à la détermination des coefficients (K232, K270)

d'absorbance dans l'ultraviolet, renseigne sur la présence ou l'absence de produits d'oxydation secondaire dans l'huile.

Les hydroperoxydes des premiers stades de l'oxydation absorbent à 232 nm, alors que les produits d'oxydation secondaires tels que les cétones insaturées-dicétones absorbent au voisinage de 270 nm. L'absorbance dans l'ultraviolet est un moyen d'évaluation de l'état de conservation de l'huile. C'est également un indicateur sur la douceur de la méthode d'extraction et sur l'oxydation par surexposition de l'huile à l'air lors de la trituration, (**Tanouti et al., 2011**).



**Figure V.9 : Evolution des extinctions spécifiques à 232 et 270 nm des huiles étudiées avant et après l'aromatisation**

E : Huile Elio, O : huile d'oléastre, EC : Huile Elio + HES citron EA : Huile Elio + HES ail, ET : Huile Elio + HES thym, OC : Huile oléastre + HES citron, OA : Huile oléastre + HES ail OT : Huile oléastre + HES thym

La formation des diènes et triènes conjugués est exprimée par l'évolution des indices K232 et K270 représentée par (**la figure V.9**). L'oxydation, indiquant la présence des diènes (K232) et des triènes (K270) conjugués et, selon **COI 2019**, ces deux indices doivent être inférieurs respectivement à 2,5 et 0,22 pour les huiles d'olive

#### ➤ L'extinction spécifique à 232 nm

A partir des résultats obtenus, il ressort que, toutes les absorbances sont conformes aux normes établies par le **COI (2019)** puisque l'extinction spécifique K232 de tous les échantillons d'huile étudiée est inférieure à 2,6.

### ➤ L'extinction spécifique à 270 nm

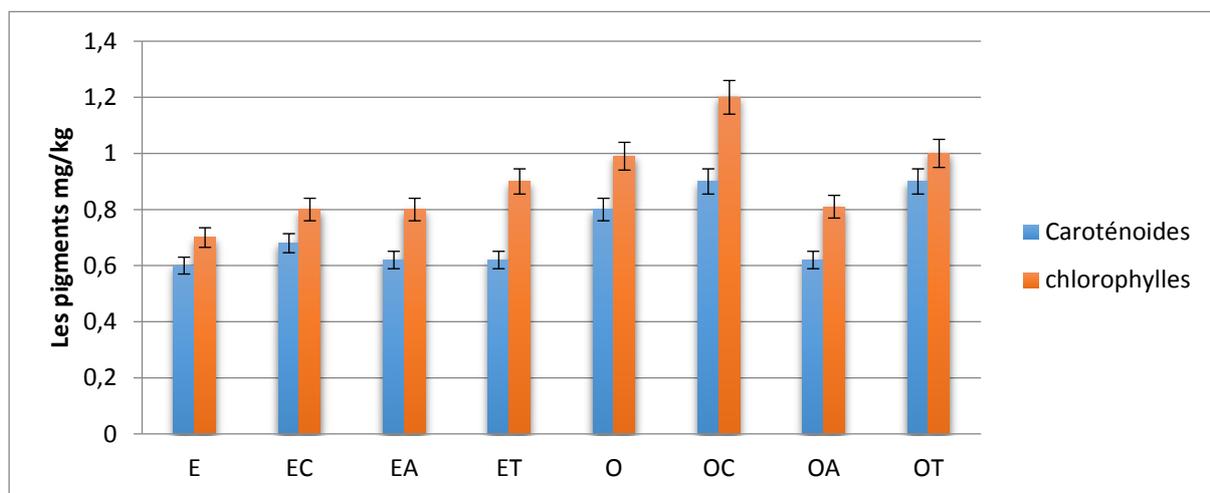
Les résultats des différents indices se situent tous dans les limites de la norme du **COI (2019)** ( $K_{270} \leq 0,25$ ) pour une huile d'olive et l'huile Elio

D'après les résultats obtenus, il ressort que l'ajout de l'HE améliore la stabilité oxydative de l'huile d'olive conservée à l'abri de la lumière. Ce résultat est en conformité avec les travaux de **Arcoleo et al. (2009)**.

## V.3.3 Résultats de la caractérisation nutritionnelle des huiles étudiées

### V.3.3.1 Dosage du pigment

L'huile d'olive contient des composés mineurs qui lui confèrent ses qualités organoleptiques et nutritionnelles. Parmi ces composés mineurs, les pigments, qui du fait de leur antioxydants à l'obscurité et pro-oxydants à la lumière, semblent jouer un rôle primordial dans la stabilité oxydative de l'huile pendant le stockage, et dans la préservation de sa qualité, (**Tanouti et al., 2011**). La teneur en pigments est influencée par le cultivar, l'indice de maturation, la zone de production, le système d'extraction et les conditions de stockage, (**Cheikh M, 2016**).



**Figure V.10 Evolution des pigments à 640 et 540 nm des huiles étudiées avant et après l'aromatisation**

E : Huile Elio, O : huile d'oléastre, EC : Huile Elio + HES citron EA : Huile Elio + HES ail, ET : Huile Elio + HES thym, OC : Huile oléastre + HES citron, OA : Huile oléastre + HES ail OT : Huile oléastre + HES.

#### V.3.3.1.1 Teneur en chlorophylle

La Teneur des chlorophylles montre des variations importantes d'un échantillon à l'autre. En effet, la valeur la plus élevée (1.20 mg/kg) est obtenue par l'échantillon

d'huile d'oléastre aromatisée avec le citron, à noter également que l'huile d'Elio contient une quantité de chlorophylles inférieure à celle de l'olive (oléastre) (0.70mg/kg 0.99mg/kg respectivement) (**figure V.10**). On note la teneur des huiles Elio aromatisées avec les différentes huiles qui passe de 0.80 à 0,90mg/kg. Les résultats enregistrés montrent qu'il y a une légère différence entre le taux de chlorophylle dans l'huile Oléastre fixe et huile après aromatisation, cependant ces résultats sont conformes aux normes par le (**COI 2019**)

La diminution de la teneur en chlorophylle de huile Elio pourrait être expliquée par la transformation de la chlorophylle a et chlorophylle b en phéophytine a et phéophytine b, qui confère à l'huile une coloration jaune, (**Hamza et Mayout, 2016**) ; pendant le stockage.

#### **V.3.3.1.2 Teneur en caroténoïde**

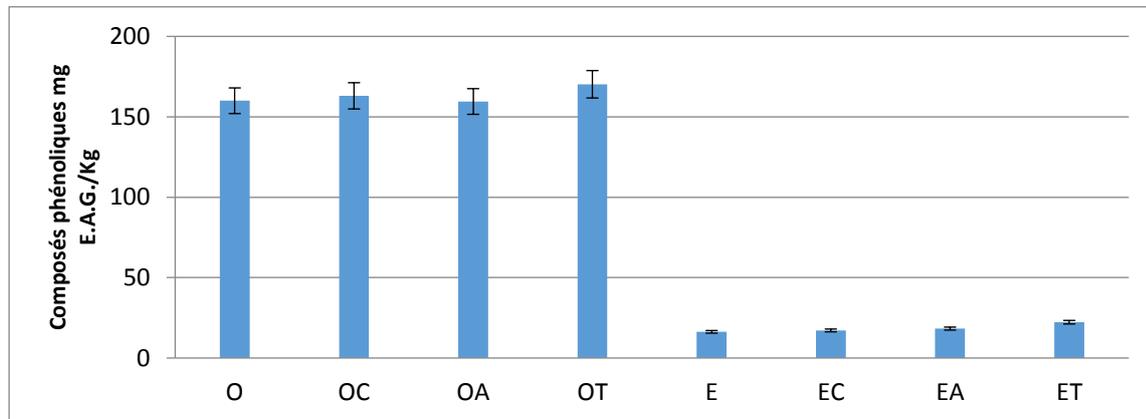
Quant aux caroténoïdes, leur détermination est considérée aussi importante en raison de leurs propriétés vitaminique, nutritionnelle et antioxydante (**Reboul et al., 2007**). Leur présence en quantité suffisante dans l'huile permet de retarder le phénomène de la photo oxydation et de préserver les paramètres de qualité de l'huile au cours du stockage, (**Benrachou, 2013**).

Selon les résultats représentés dans la (**figure V.10**), nous constatons que nos échantillons présentent des teneurs appréciables en caroténoïdes. La teneur en caroténoïdes la plus élevée est enregistrée par l'huile Oléastre aromatisée avec HE du citron et avec HE du thym de 0.90mg/kg et pour huile Elio et Oléastre fixe de 0.60mg/kg et 0.80mg/kg respectivement. Ce qui concerne les huiles aromatisées (Elio aromatisées avec les trois huiles différentes montrent des valeurs importantes de 0.62 mg/kg, et 0.68 mg/kg. Les teneurs en caroténoïdes des variétés d'huiles Oléastre avant et après aromatisation sont dans l'intervalle de la norme **COI** (2 – 14 mg/kg).

#### **V.3.3.2 Dosage polyphénols**

Les polyphénols passent dans l'huile lors de son extraction. Les ortho diphénols (comme l'hydroxytyrosol, l'acide caféique et l'oleuropéine) présents dans l'huile sont considérés comme des antioxydants naturels qui protègent l'huile contre l'oxydation, ils lui confèrent une meilleure stabilité lors du stockage, une saveur amère et une sensation de piquant (**Tanouti et al., 2011 ; Ollivier D et al., 2004**). Les teneurs en

polyphénols totaux des différents extraits méthanoliques exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique /kg sont représentées dans la (figure V.11).



**Figure V.11 : Evolution des composés phénoliques des huiles étudiées avant et après l'aromatisation**

E : Huile Elio, O : huile d'oléastre, EC : Huile Elio + HES citron EA : Huile Elio + HES ail, ET : Huile Elio + HES thym, OC : Huile oléastre + HES citron, OA : Huile oléastre + HES ail OT : Huile oléastre + HES

Les résultats de cette étude montrent que les teneurs en polyphénols totaux varient considérablement entre les huiles végétales et huiles aromatisées, en effet, l'huile *Olea europaea L* aromatisées avec le HE du *Thymus vulgaris* possède la teneur la plus élevée, avec une valeur de 170,23 mg EAG/kg, Pour les autres huile oléastre et OC et OA, les quantités des phénols totaux varient entre 159,98 à 159,51mg **figure V.11 (Annexe VIII)**. Ce qui concerne huile Elio possède la teneur faible par rapport à l'huile d'oléastre avec une quantité de 16,29mg E.A.G/Kg, et une augmentation significative après aromatisation avec les HEs, les quantités varient entre 17,14 à 22,28mg EAG/kg.

La concentration en polyphénols totaux de l'échantillon d'huile oléastre est d'environ 159,98 mg EAG/kg, est en accord de celles des variétés italiennes étudiées par **Baiano et al. (2009)**, pour lesquelles les teneurs en polyphénols sont comprises entre 133,68 et 322,18 mg/kg et celles étudiées par **Tura et al. (2007)** pour lesquelles les teneurs en polyphénols sont comprises entre 115 et 377mg/kg. La concentration en polyphénols de l'huile olive a augmenté après aromatisation OT 170,23 > OC 163,03 > OA 159,51 mg E.AG/Kg, Ceci peut s'expliquer par la richesse de l'huile essentielles en métabolites secondaires, essentiellement les polyphénols et les flavonoïdes (**Bammou et al., 2015**).

Cependant, **Ayadi et al. (2009)** ont observé que l'aromatisation de l'huile d'olive Tunisienne par le basilic (*Ocimum basilicum*) a permis une bonne protection voire même une augmentation de composés phénoliques. Même résultat a été signalé par **Khemakhem et al. (2015)** et **Yang et al. (2016)** en étudiant l'effet de l'addition du zeste du citron (*Citrus limon*) et de romarin (*Rosmarinus officinalis*) sur la teneur en composés phénoliques dans l'huile d'olive, de soja, de coton et de son de riz.

#### **V.3.4 Composition en acides gras par GCMS**

La composition en acides gras un paramètre important pour déterminer la stabilité à l'oxydation de l'huile est la composition en acides gras des triglycérides et en particulier leur degré d'insaturation, La composition en acide gras exprimée en pourcentage (%).

**Tableau V.5 :** Détermination des Acides Gras des huiles végétales et huiles aromatisées.

Pic	Acides Gras	Acides gras	AG-EAIL	AG-EC	AG-ELIO	AG-ET	AG-OAIL	AG-OC	AG-OLEST	AG-OT
1	C16	Acide palmitique	14.285	14.742	12.742	24.029	9.294	15.083	14.860	13.575
2	C16:1 ω-7	Acide palmitoléique	13.331	19.407	8.228	10.830	1.758	3.041	12.262	9.304
3	C16:1 ω-9	Acide hypogéique	9.362	9.477	8.140	8.921	1.541	0.886	0.929	0.611
4	C17	Acide margarique	5.028	16.249	14.013	14.819	6.713	2.503	2.113	5.126
5	C18:0	Acide stéarique	4.297	6.935	6.822	8.252	4.784	6.253	6.690	10.486
6	C18:1 ω-9	Acide oléique	23.586	25.333	23.266	24.910	26.428	24.892	23.790	39.196
7	C18:1 ω-7	Acide vaccénique	9.069	4.733	21.934	4.705	23.024	24.234	10.075	4.089
8	C18:2 ω-6	Acide linolique	14.280	0.842	0.690	0.781	5.449	18.380	15.936	13.142
9	C18:3 ω-3	Acide α-linolénique	4.843	0.131	0.133	4.030	1.957	3.286	2.608	3.013
10	C20	Acide arachidières	0.756	0.115	0.215	0.162	ND	ND	6.258	ND
11	C20:1 ω-9	Acide gadoléique	0.180	ND	0.209	ND	0.103	ND	3.292	ND
12	C22:0	Acide béhénique	0.144	ND	0.904	ND	3.477	ND	ND	ND
13	C22:1 ω-9	Acide erucique	ND	ND	0.859	ND	ND	ND	ND	ND
14	C24:0	Acide lignocérique	ND	ND	0.603	ND	ND	ND	ND	ND
15	C26	Acide cerotique	ND	ND	0.732	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Acide gras saturés</b>			<b>33.572</b>	<b>47.403</b>	<b>44.171</b>	<b>56.021</b>	<b>22.332</b>	<b>24.725</b>	<b>30.85</b>	<b>29.798</b>
<b>Acide gras mono-insaturés (AGMI)</b>			<b>46.166</b>	<b>49.473</b>	<b>54.496</b>	<b>40.445</b>	<b>51.313</b>	<b>52.104</b>	<b>49.419</b>	<b>52.589</b>
<b>Acide gras polyinsaturés (AGPI)</b>			<b>19.123</b>	<b>0.973</b>	<b>0.823</b>	<b>4.811</b>	<b>7.406</b>	<b>21.586</b>	<b>18.544</b>	<b>16.155</b>
<b>Acide gras insaturés (AGI)</b>			<b>65.289</b>	<b>50.446</b>	<b>55.319</b>	<b>45.256</b>	<b>58.719</b>	<b>73.69</b>	<b>67.963</b>	<b>68.744</b>

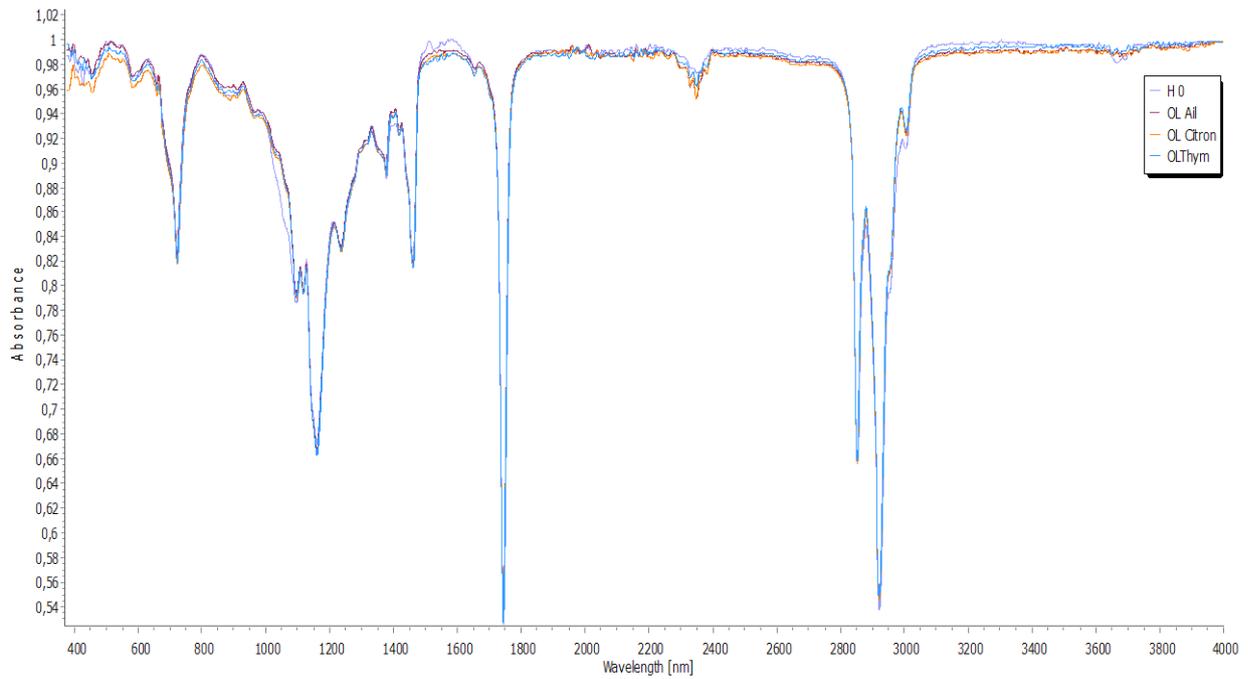
Une diminution des concentrations des AGS et AGPI a été observée (entre **0,5 à 3%**) tandis que une augmentation dans les concentrations en AGMI variant de **1 à 3%** a été observée dans tous les échantillons de l'huile d'olive étudiés et l'huile de ELIO.

Pour l'ensemble des échantillons d'huile étudiée, des taux élevés en acide gras saturés (AGS) ont été décelées. La teneur la plus élevée est obtenue chez l'huile ELIO aromatisées avec HE thym (56.02%) Pour la proportion d'acides gras mono-insaturés (AGMI), Des similarités ont été notées entre les huiles des différents échantillons malgré la diversité des récoltes et des catégories des plantes médicinales ; la grande valeur a note pour huile d'oléastre aromatisé avec HE citron. En effet, Les acides gras mono-insaturés ont une grande importance en raison de leurs implications nutritionnelles et leurs effets sur la stabilité oxydative des huiles et perturbation de la membrane bactérienne.

Nos résultats concordent avec ceux de **Sousa et al. (2015)**. Ces auteurs ont constaté une augmentation notable dans la concentration des AGMI de l'huile d'olive enrichie par le laurier et l'origan. Dans une étude réalisée par **Malheiro et al. (2012)**, sur l'huile d'olive additionnée d'un extrait du thé, il a été constaté une diminution considérable des AGPI durant le phénomène de thermo-oxydation. Cependant **Yang et al. (2016)**, ont signalé que l'addition d'extrait de romarin dans l'huile de son de riz, de coton et de soja retarde la dégradation des AGPI.

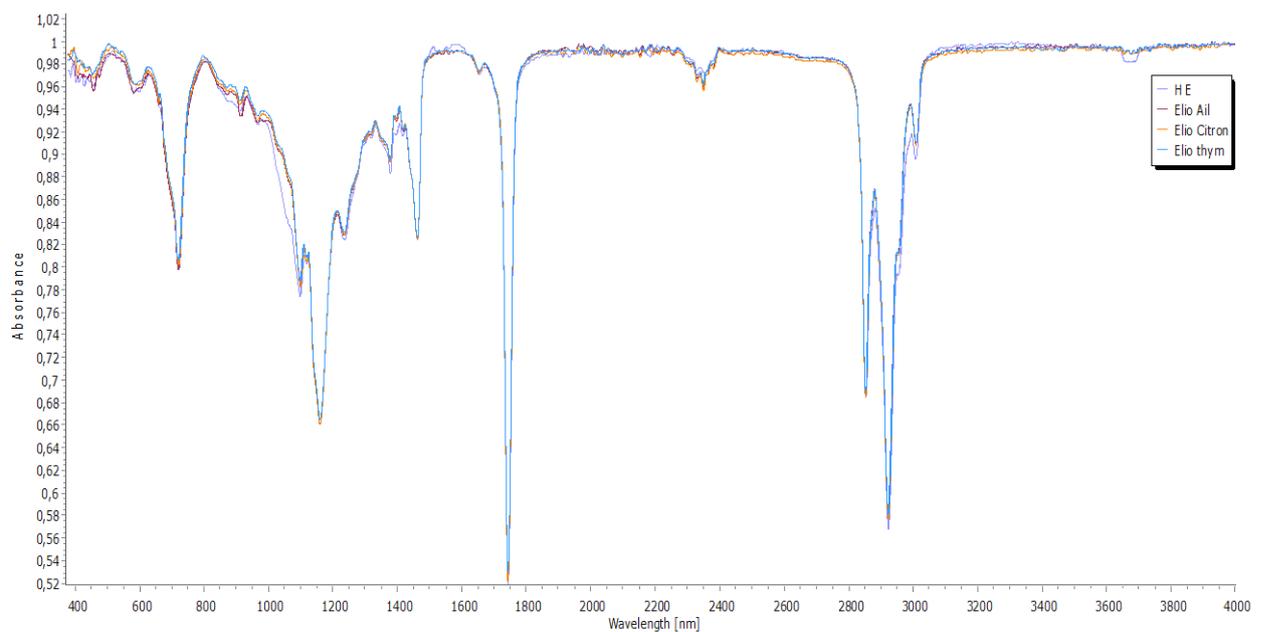
#### **V.3.5. Analyse spectrale par infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)**

Les spectres obtenus sont des spectres typiques de l'huile (**Borràs, Mestres, Aceña, Busto, Ferré, Boqué, et al., 2015**). En effet, elle est utilisée pour déterminer le degré d'insaturation, l'état d'oxydation, les acides gras libres, les doubles liaisons trans et la présence des impuretés des autres huiles végétales (**García-González, Baeten, Pierna, et Tena, 2013**).



**Figure V.12 :** Superposition des spectres IR de l'huile d'oléastre avant après l'aromatisation (ail, citron et thym).

Les huiles étudiées (huile d'oléastre et l'huile d'Elio) avant et après l'aromatisation ont été analysées par la spectrométrie IR. La figure suivante présente les spectres IR (**Figure V.12 et V.13**) montrent les bandes suivantes



**Figure V.13 :** Superposition des spectres IR de l'huile Elio avant et après l'aromatisation (ail, citron et thym).

- La bande vers 3005-3010  $\text{cm}^{-1}$ , élongation du groupement  $-\text{CH}-$  de la liaison  $-\text{C}=\text{C}-$ , l'intensité de cette bande nous renseigne sur le degré de saturation de nos huiles.
- Les bandes d'absorption relativement fortes situées vers 2925 et 2850  $\text{cm}^{-1}$  sont attribuées à l'élongation de la liaison C-H des groupements  $-\text{CH}_2-$  et  $-\text{CH}_3-$ . Qui sont les constituants des chaînes des acides gras.
- Les spectres exhibent également une bande d'absorption intense vers 1740-1750  $\text{cm}^{-1}$  caractéristique du groupement carbonyle des esters, toujours présent dans les glycérides.
- Une bande d'absorption relativement faible vers 1700-1710  $\text{cm}^{-1}$  caractéristique du groupement carbonyle des acides gras libres.
- Une bande de vibration hors plan des groupements trans  $-\text{HC}=\text{CH}-$ , située vers 960-970  $\text{cm}^{-1}$ .
- Une bande de vibration hors plan des groupements Cis  $-\text{HC}=\text{CH}-$ , située vers 720  $\text{cm}^{-1}$ .
- Une bande située autour de 1160  $\text{cm}^{-1}$ , caractéristique de la liaison C-O.

Les spectres sont presque identiques, cependant quelques petites différences sont détectables en fonction du traitement on peut citer celle de la bande des acides gras libres, et celles de la région 700-950  $\text{cm}^{-1}$  qui est modifiée en fonction du taux des AG CIS/TRANS

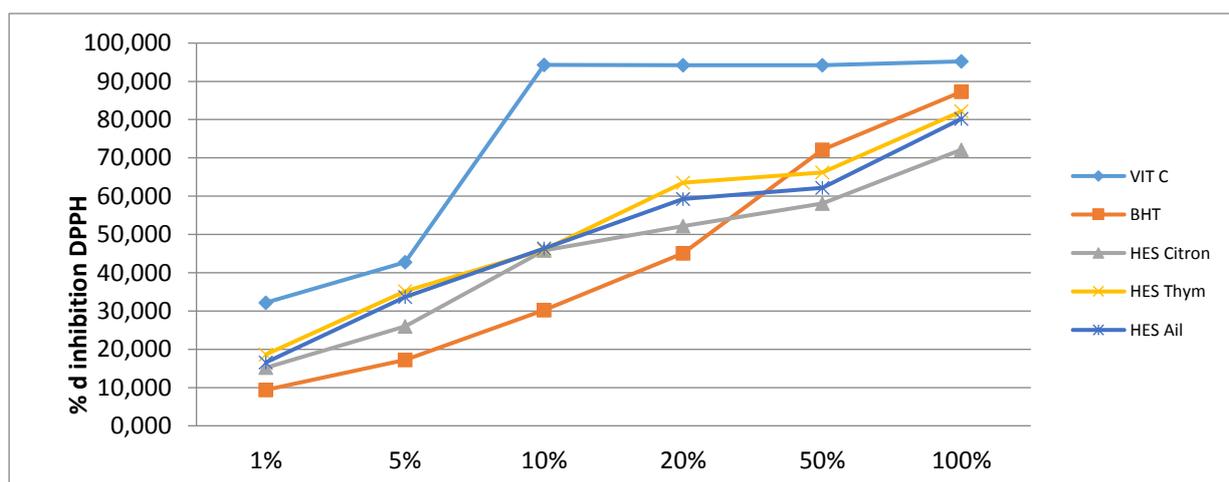
#### **V.4 les activités biologiques des huiles essentielles, des huiles végétales avant et après l'aromatisation**

##### **V.4.1 Evaluation d'activité antioxydante par DPPH des huiles essentielles et huiles aromatisées**

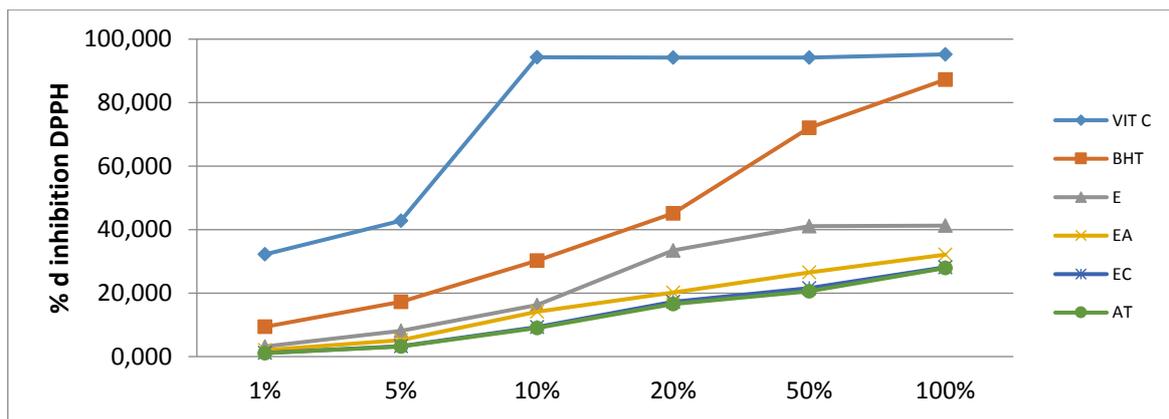
L'activité antioxydante des échantillons des huiles étudiés avant et après l'aromatisation a été évalués par le test du radical DPPH et les résultats obtenus sont représentés dans le (**Tableau 1, Annexe X**) et illustrées dans les **Figures (V.14.15.16)**. D'après les résultats obtenus, l'activité antioxydante des échantillons étudiées HO/HE et HEL/HE décroît après l'aromatisation.

Toutes les huiles essentielles ont donné des pourcentages d'inhibition différents l'un de l'autre et inférieurs aux standards, de BHT et l'acide ascorbique. En effet les pourcentages d'inhibition pour l'huile essentielle du thym, ail, citron et les standards BHT, ainsi que l'acide ascorbique sont de **82.17%**, **80, 23 %**, **72.17 %** et **87.25 %** et **95.21 %** respectivement. Les pourcentages d'inhibition estimés pour les autres huiles végétales sont inférieurs à ceux estimés pour les standards avec des valeurs de **35.21 % ± 73, 21 %** et **41.25 %** pour l'huile d'oléastre et l'huile Elio, , contre des valeurs de **53.32 % ± 45.12 %**, **49.12%**, **32.12%**, **28.15%** et **27.89%** pour les huiles aromatisées OA,OT, OC et EA, EC, ET respectivement.

D'après les figures (14.15.16), nous remarquons que l'activité anti radicalaire donnée par l'huile essentielle du thym est plus élevée que celle donnée par les autres huiles essentielles.

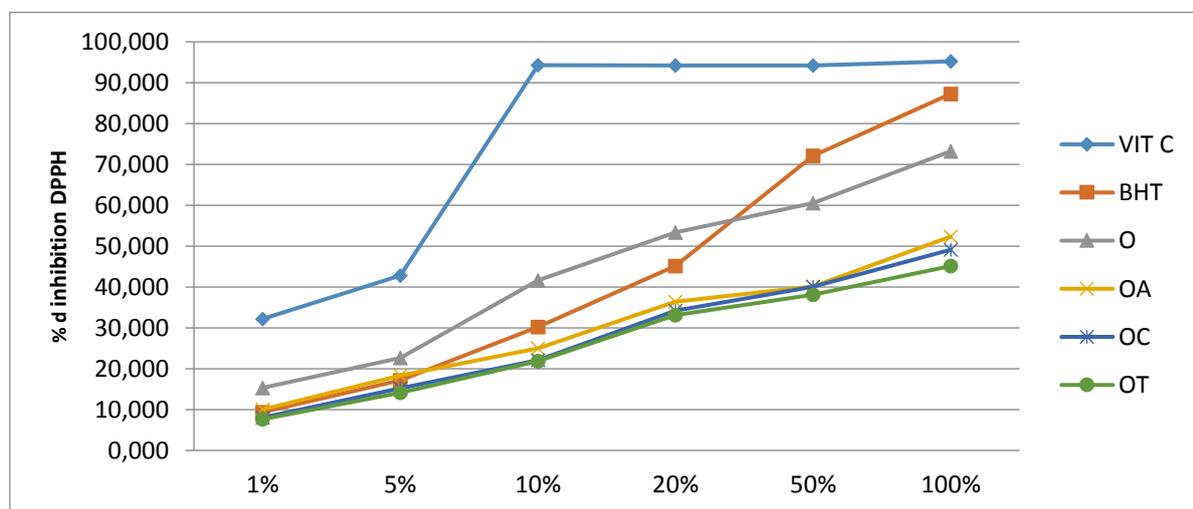


**Figure V.14 :** Evolution de pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de l'huile essentielle étudiée



**Figure V.15** : Evolution de pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de l'huile Elio avant et après l'aromatisation.

Nous avons remarqué une diminution de l'activité antioxydante de nos huiles après l'aromatisation pour l'huile d'oléastre et même pour l'huile d'Elio. Des résultats similaires ont été signalés par **Delgado-Adámez et al. (2013)**. Cependant, **Baiano et al. (2009)** ont montré que l'activité antioxydante de l'huile d'olive enrichie par différentes espèces (citron, origan, romarin et piment) et conservée dans du verre opaque à température ambiante a été réduite après 9 mois de stockage, comparativement à l'huile d'olive non enrichie et celle enrichie par l'ail.



**Figure V.16** : Evolution de pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de l'huile d'oléastre avant et après l'aromatisation.

Dans les travaux de **Sousa et al. (2015)**, réalisés sur l'huile d'olive enrichie par le laurier, une diminution de l'activité antioxydante a été constatée après 3 mois de

stockage dans l'obscurité à température ambiante. Ces auteurs ont signalé que le pouvoir d'inhibition du radical DPPH et d'ABTS a diminué de  $140,8 \pm 3$  à  $133,6 \pm 2,8$   $\mu\text{mol TE/L}$  et de  $296,3 \pm 2,8$  à  $294 \pm 2,4$   $\mu\text{mol TE/L}$ , respectivement. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Nour et al. (2018)** qui ont aussi signalé que l'activité antioxydante de l'huile d'olive extra vierge additionnée de 5% de l'extrait de résidus de tomates a été réduite de 18,9 à 9,4%.

Il est à noter que l'huile d'oléastre et l'huile Elio enrichie en HE de l'ail ont montré des activités antioxydantes les plus élevées, celles-ci sont attribuées à la présence de certains composés bioactifs dans ces HES. Selon **Tepe et al. (2005)** et **Ozen et al. (2011)**, ceci peut s'expliquer par la présence des composés phénoliques dans les HES qui peuvent interagir d'une façon synergique ou additionnelle pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres. **Ben Rached et al. (2014)** ont montré que l'aromatisation de l'huile d'olive (*zalmati*) par l'HE de romarin (*Rosmarinus officinalis L.*) a augmenté l'activité antioxydante de ce complexe.

#### **V.5 Evaluation de l'activité antimicrobienne de trois huiles essentielles (Citron, ail et thym) et de deux antibiotiques (Gentamycine et Fluconazole) et deux huiles végétales avant et après l'aromatisation.**

Cette étude vise à évaluer l'activité antibactérienne de trois huiles essentielles de thym citron et ail, de deux antibiotiques (**exemple comme référence**) et deux huiles végétales (**huile d'oléastre et l'huile d'Elio**) avant et après l'aromatisation on utilisant la méthode de diffusion sur agar. Quatre (04) souches bactériennes ont été utilisées dans cette étude deux (02) bactéries Gram + (*Bacillus subtilis*, *staphylococcus aureus*), et deux (02) bactéries Gram- (*E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) et deux levures *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*. L'utilisation des témoins a favorisé une comparaison juste et fiable de l'effet des HES et les deux antibiotiques contre ces bactéries. Les diamètres des zones d'inhibitions des bactéries testées sont mesurés et résumés dans (**Tableau V.6 ; V.7**) et les figures (**V.19 ; V.20 ;V21 ; V.22 ;V.23 ;V.24 ;V.25**).

Le contrôle positif Gentamycine est extrêmement efficace sur toutes les souches bactériennes testées, avec des diamètres d'inhibition de 28mm. Et Fluconazole efficace sur toutes les levures avec un diamètre de 46mm. D'après les résultats, qui

représentent les zones d'inhibitions des différentes souches par les trois huiles essentielles et les deux huiles végétales

### V.5.1 Evolution de l'activité Antibactérienne des huiles essentielles

D'après les résultats, l'huile essentielle de l'ail a un effet antimicrobien important. On note que l'HE de l'ail a une activité inhibitrice importante sur les bactéries à Gram négatifs *E.coli* et *P. aeruginosa* avec un diamètre de 17mm, 15mm respectivement. Ce qui concerne HE de l'ail a un effet inhibiteur très important sur les bactéries à Gram Positifs *S.aureus* et *B.subtilis* avec une zone d'inhibition de 46mm, 29mm respectivement. Nos résultats sont supérieurs par rapport au témoin Gentamycine ZI < 28mm.

Cependant, l'huile essentielle du thym a une activité antimicrobienne très importante et au-dessus de 50 mm sur la bactérie à Gram négatif *E. coli* et à Gram positif *B.subtilis* et *S.aureus* avec un diamètre de 55mm, 48mm, 70mm respectivement, et une action inhibitrice moyenne pour les souches bactériennes à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa*, avec une zone d'inhibition de 16mm (**Figure V.22**). Nos résultats sont supérieures par rapport le témoin positif Gentamycine (ZI < 28mm).

Les résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du citron (*citrus limon*), montrent une faible sensibilité sur la souche *P.aeruginosa* avec un diamètre de 13mm, et une sensibilité importante sur *E. coli* avec un diamètre de 18mm. (**Figure V.22**). On a remarqué qu'il existe une forte sensibilité sur les bactéries à Gram positifs *B.subtilis* (29mm), et *S.aureus* (31mm). Nos résultats sont supérieures que les résultats du Gentamycine (ZI < 28mm) que les bactéries à Gram positifs et inférieure que les bactéries à Gram négatifs. La différence observée dans la sensibilité des différents microorganismes à l'huile essentielle examinée est due à la différence dans la structure de la paroi cellulaire et la composition des deux groupes de bactéries. La présence d'une membrane externe chez les bactéries à Gram négatif entrave la diffusion de l'huile essentielle et à travers la membrane vers le cytoplasme de la cellule.

Concernant les activités des huiles essentielles on observe L'huile de *Thymus vulgaris* témoignent d'une activité antibactérienne très intéressante et importante par rapport à la concentration utilisée (1,5µl) surtout contre la bactérie à Gram négatifs

et à Gram positifs *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. En effet, *S. aureus* (G+) et *E.coli* (G-) et *B.subtilis*, souches hautement pathogènes, présentent une sensibilité élevées supérieure à 45 mm à cette huile. Cette grande activité antibactérienne peut être reliée dans le cas de l'huile de *thymus vulgaris* à la présence du thymol et carvacrol qui est majoritaire dans cette huile. ces deux phénoliques composants sont effet connus pour leurs propriétés antimicrobiennes (**Ettayebi et al., 1999 ; Ulte et al., 2000**).

Comme il a été rapporté dans plusieurs études précédentes (**Smith Palmer et al., 1998 ; Chao et Young 2000 ; Kalemba et Kunicka 2003**), les souches à Gram positifs ( G+) présentent souvent plus de sensibilité vis-à-vis des huiles essentielles que les souches à Gram négatif(G-), mais l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* (16mm) reste un cas particulier avec une résistance accrue aux huiles essentielles. Cette résistance intermédiaire a été expliquée par l'effet barrière de la membrane externe de nature lipopolysaccharidique, qui empêche la diffusion de l'huile essentielle à l'intérieur de la cellule (**Man et Cox et Markam 2000 ; Longbottom et Carson et Hammer et al., 2004** ).

La molécule de thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverse souches, dont *E.coli*, et *S.aureus*, *B.subtilis*, sur laquelle elle provoque des fuites d'ion potassium K+. En revanche elle n'est pas actives sur *Pseudomonas aeruginosa* (**Walsh, Maillard et al., 2003**). **Rota et al. (2008)** ont évalué l'inhibition des micro-organismes exercés par les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* chémotype thymol et carvacrol, ces derniers sont considérés comme les plus efficaces dans les pharmacopées française et européenne.

Notre étude a montré que l'HE du citron possède une activité antimicrobienne plus ou moins importante, sur la croissance de souches testées (bactéries et levures). Nos résultats sont identiques avec une étude Algérienne (**Himed, 2014**) ; a montré que les souches bactériennes testées sont sensibles vis-à-vis de l'huile essentielle étudiée, ils ont constaté aussi que les souches Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) sont les souches les plus sensibles par rapport aux souches à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Le  $\alpha$ -terpinène et le limonène affectent la perméabilité de la membrane cytoplasmique de *Candida* entraînant la perte des composants cytoplasmiques de la cellule (**Adegoke et al., 2000**). Plusieurs auteurs

ont attribué l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *C. limon* à la présence des composants volatils dans la composition de l'huile comme le limonène, linalol,  $\beta$ -Pinene, (Rodov *et al.*, 1995 ; Alma *et al.*, 2004 ; Bezic *et al.*, 2005 ; Tepe *et al.*, 2006). Cette activité peut être déterminée par l'effet d'un seul composant ou par effet synergique ou antagonique de divers composants (Deba *et al.*, 2008). Veldhuizen *et al.* (2006) ont attribué cette activité aux composés phénoliques dont l'amphipathicité de ces composés peut expliquer leurs interactions avec les constituants membranaires et ainsi l'activité antimicrobienne. Il est connu l'huile de *Citrus limon* contient de 92% à 93% de terpènes dont le d-limonène est le plus abondant (Iserin *et al.*, 2001; Ferhat *et al.*, 2010), de sesquiterpènes, d'aldéhydes (dont le citral est le plus dominant) (Iserin *et al.*, 2001). Ces composants sont responsables sur une désintégration de la membrane de la cellule bactérienne, et provoquée par ces substances, la fuite des métabolites intracellulaires provoque la mort de la cellule.

D'après les résultats qu'on a obtenu concernant HE de l'*Allium sativum* on peut l'explique des déférentes sensibilités des souches bactériennes, par les composants majeurs qui sont responsables de la perturbation de la membrane cellulaire. Plusieurs études montrent que le diallyl sulfide exerce une bonne activité antimicrobienne (Corzomartinez *et al.*, 2007; Kim et Kyung, 2004 ; Ogara *et al.*, 2000; Yin et Cheng, 2003), Dans les composants soufrés, le plus grand nombre d'atomes de soufre est associé à une meilleure activité antimicrobienne (Kim *et al.*, 2004 ; Phumkhachorn, 2008 ; Tsao et Yin, 2001).l'HE de l'ail contient aussi le diallyl trisulfide (35,93%) et le diallyl tétrasulfide (2,14%). Ces composés qui sont riches en atome de soufre peuvent contribuer aussi à cette activité.

### V.5.2 Evolution de l'activité antifongique des huiles essentielles

D'après les résultats, l'huile essentielle de l'ail à un effet antifongique supérieur à l'effet antimicrobien. On note que *S.cerevisiae* et *C.albicans* sont très sensibles et on remarque une absence de croissance des souches sur les boites avec un diamètre supérieure à 80 mm. Nos résultats sont supérieure que le témoin positif Fluconazole ZI< 46mm.

Selon l'échelle de mesure de l'activité antimicrobienne, l'H.E (*Thymus vulgaris*) possède une action inhibitrice très importante de la croissance des levures *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*, l'huile du thym a une action très forte avec une

zone d'inhibition de 55 mm et 52mm respectivement **figureV.22**. Nos résultats sont supérieures que Gentamycine ZI < 46mm. Concernant les levures l'HE *C.limon* possède une sensibilité intermédiaire pour les *S.cerevisiae* (19mm) et *C.albicans* est plus sensible avec une zone d'inhibitrice de 24mm. Nos résultats sont inférieures que les résultats de témoins antifongique Fluconazole.

En revanche, les levures *C.albicans* et *S.cerevisiae* sont sensibles avec une zone d'inhibition qui varie entre 50mm et 55mm, cette inhibition s'explique par les composants phénoliques d'HE de *Thymus vulgaris*. En effet l'efficacité de ces huiles essentielles de *thymus vulgaris* contre les levures étudiées est directement liée à leurs compositions chimiques en terpènes oxygénés. Ces résultats sont en cohérence avec des données publiées en **2020** par **Ben salha** qui indiquent que les alcools et les composés de terpènes polaires agissent en tant qu'agents antifongiques puissants qui retardent le processus de biodégradation. **Pinto et al. (2006)** ont rapporté que les HES du *Thymus vulgaris* contiennent une quantité importante en phénols, présente un large spectre d'activité sur les fongique et levures. Le thymol et carvacrol sont responsable de l'activité fongicide (**Bennis, Skandamis et al., 2004**), (**Cox, Mann et al., 2000** ; **lambert, Skandamis et al., 2001** ; **Walsh, Maillard et al., 2003**).

Les composants hydrophobes des huiles essentielles du citron peuvent augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire, en provoquant la fuite du contenu de cellules fongiques (**Cox et al., 2000** ; **Burt, 2004** ; **Cristani et al., 2007**). Nos résultats sont identiques avec une étude Algérienne (**Mohamed et al., 2007**) sur le pouvoir antifongique de huile essentielle du *Citrus limon*, cette dernière montre une activité antifongique (levures) positive établie par la présence de zones d'inhibition mesurable.

Ces résultats sont identiques aussi à celle d'une autre étude marocaine (**El Mansouri, 2013**) sur l'évaluation de l'activité antifongique.

L'ail est très riche en Diallyl disulfure (21,58%). D'après **Casella** et son équipe (**2013**), ces composés organosoufrés, confèrent à l'ail une activité antimicrobienne et antioxydante ; mais les travaux d'**Avato et al. (2000)**, avaient déterminés après avoir utilisé des concentrations différentes de Diallyl disulfure et Diallyl trisulfure, que la molécule responsable du pouvoir antifongique était le Diallyl disulfure.

### V.5.3 Evolution de l'activité Antibactérienne des huiles étudiées avant et après l'aromatisation

Les huiles végétales (Elio, Oléastre) ont une activité antimicrobienne importante. Les souches à Gram négatifs sont plus sensibles (*E.coli* 16 mm, et *P. aeruginosa* 17 mm) que les souches à Gram positifs (*B.subtilis* 12mm, *S.aureus* 15mm). Nos résultats sont inférieure par rapports les résultats du gentamycine.

Des études ont démontré que une activité antibactérienne est présente dans des huiles végétales (**Tungel et al., 1993 ; Medina et al., 2006 ; Brenes et al., 2007**). La différence des diamètres d'inhibition pourrait être due principalement à la composition chimique des huiles végétales, l'activité antibactérienne de ces dernières pourrait être essentiellement due aux composés majoritaires. La variabilité du pouvoir inhibiteur des huiles testées pourrait être due à la sensibilité des souches bactériennes aux différents composés présents dans ces huiles, à savoir : acides gras, triglycérides, composés phénoliques, composés volatils et autres composés de la phase polyphonique de l'huile.

**Tuck et Hayball (2002)** et **Cicerale et al. (2011)** ont montré l'effet inhibiteur de l'hydroxytyrosol sur les souches Gram-positives et Gram-négatives. Hydroxytyrosol a pu inhiber la prolifération de certaines souches bactériennes tell que *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*. D'autres composés présents dans l'huile de table et huile oléastre ayant une activité antibactérienne sont identifiés : les caroténoïdes (**Carvalho et Caramujo 2008**). En effet, l'oléastre se caractérise par une teneur légèrement élevée en caroténoïdes (0,57 mg /Kg), alors que l'huile d'Elio (0,25 mg /Kg), ce qui peut expliquer l'activité importante de cette huile.

D'après les résultats (**Tableau V.7**), (**figures V.23 ; V.24 ; V.25**), on remarque une chute significative de l'activité inhibitrice des huiles après l'aromatisation, concernant les bactéries. On remarque que l'huile Végétales Elio et Oléastre aromatisée avec les trois déférentes HEs ont un effet antimicrobien intermédiaire sur les bactéries à Gram négatif et à Gram positifs avec un diamètre varient de 12mm à 19mm .Nos résultats sont inférieure que l'effet du Gentamycine. Cette diminution s'explique que les activités antibactériennes testées peuvent également résulter d'une synergie entre les composés présents dans une huile.

Il est probable que la diminution de l'activité soit due à une modification des propriétés de la substance responsable de l'activité en présence d'autres composés

de l'huile. activité en présence d'autres composés de l'huile (**Pereira et al., 2007**), résultant en une association de deux composants actifs (majeurs ou mineurs) agissant en synergie (**Pereira et al., 2007**), ou de composants mineurs de l'huile qui sont également actifs à de faibles concentrations (**Lindberg et al., 2004**). Une diminution décimale faible n'indiquant pas automatiquement une absence d'activité, mais ceci pourrait être dû aux faibles volumes de l'huile.

#### **V.5.4 Evolution de l'activité antifongique des huiles étudiées avant et après l'aromatisation**

On peut voir que l'huile végétale Elio n'as pas d'une action inhibitrice pour les souches fongiques *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans* (absence de halo), et pour l'huile d'oléastre a un effet antifongique très faible avec une ZI égale à 11 mm (*C.albicans*), et une forte résistance a été notée sur *S.cerevisiae* (absence de halo) (**figure V.19**). Ceci peut expliquer que huile végétales n'ont pas une activité antifongique, on suppose que les huiles végétales contenant des composant phénoliques insuffisantes pour l'activité.

D'après les résultats (**Tableau V.7**) et les figures (**V.23 ; V.24 ; V25**), on remarque une augmentation remarquable de l'activité antifongique des huiles végétales apres l'aromatisation. On note qu'activité antifongiques importante des huiles végétales aromatisées varient entre 12mm à 45mm. On observe que la meilleure zone antifongique a note pour le huile Elio et Oléastre aromatisées avec HEs de l'ail sur la levure *S.cerevisiae* avec un diamètre de 38mm, 45mm respectivement. Ceci peut s'expliquer par la présence des composés phénoliques dans les HEs qui peuvent interagir d'une façon synergique ou additionnelle pour créer un système efficace antifongiques. On observe une sensibilité de la levure *S.cerevisiae* contre huiles végétales HVEI et HVO aromatisé *T.vulgaris* et *C.limon* .Ceci s'expliques une diminution des compose phénoliques et composé majoritaire ou une altération des composant des huiles végétales aromatisées qui sont responsable a l'activité antifongiques. Ceci s'explique que les huiles végétales aromatisées contiennent d'une faible quantité des composants phénoliques. On suppose que le dosage d'aromatisation était faible.

Toutes les huiles végétales Elio et Oléastre enrichi avec les HEs montrent une activité antifongiques moyenne sur *C.albicans* celles-ci sont attribuées à la présence de certains composés bioactifs dans ces HEs tels que thymol et le carvacrol et le limonène, p-cymène, diallyl tétrasulfide qui sont rapportés dans la littérature scientifique comme des fongiques efficaces et d'inhibiteurs naturels, **(Aeschbach et al., 1993; Maestri et al., 1997)**. Finalement on note que les huiles végétales aromatisées ont un effet antifongique important qu'un effet antibactérien.

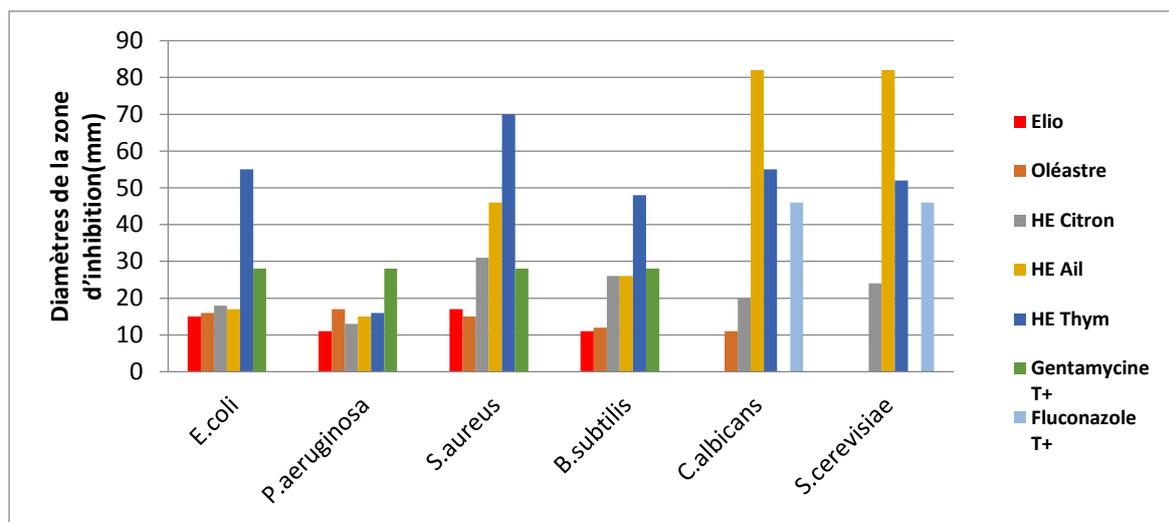


Figure V.17 : Evaluation d'activité antimicrobienne des huiles végétales et les huiles essentielles.

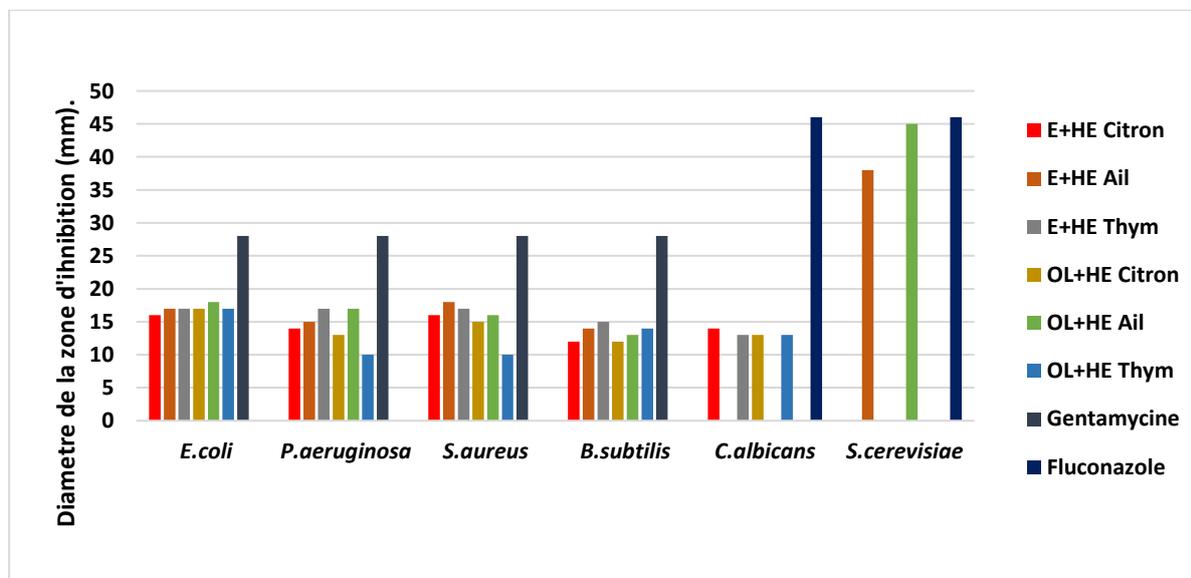


Figure V.18 Evaluation d'activité antimicrobienne des huiles végétales aromatisées avec les huiles essentielles.



**Tableau V.7 :** Les diamètres d'halos d'inhibition en (mm) de la croissance des souches bactériennes et fongiques, avec les témoins**Les huiles végétales aromatisées avec les trois huiles essentielles (Le Citron, l'Ail, et le Thym).**

Souches	Huiles Oléastre aromatisées avec			Huiles Elio aromatisées avec				
	Le Citron (OC)	L'Ail (OA)	Le Thym (Oth)	Le Citron (EC)	L'Ail (EA)	Le Thym (Eth)	Gentamycine (T+)	Fluconazole (T+)
<i>Escherichia coli</i>	ZI= 17 mm (+)	ZI= 18 mm (++)	ZI= 17 mm (++)	ZI= 16 mm (+)	ZI= 17 mm (++)	ZI= 17 mm (+)	ZI= 28 mm (+++)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ZI=13 mm (+)	ZI= 17 mm (+)	ZI=10 mm (+)	ZI= 14 mm (+)	ZI= 15 mm (+)	ZI= 17 mm (++)	ZI= 28 mm (+++)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ZI= 15 mm (+)	ZI= 16 mm (+)	ZI=17mm (+)	ZI= 16 mm (++)	ZI= 18 mm (++)	ZI= 17 mm (++)	ZI= 28 mm (+++)	
<i>Bacillus subtilis</i>	ZI=12 mm (+)	ZI= 13 mm (+)	ZI=14 mm (+)	ZI= 12 mm (+)	ZI=14mm (+)	ZI= 15 mm (+)	ZI= 28 mm (+++)	
<i>Candida albicans</i>	ZI= 13mm (+)	ZI= 14 (+)	ZI= 13 mm (+)	ZI= 14mm (+)	ZI=12 (+)	ZI= 13mm (+)		ZI= 46mm (+++)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ZI= Ø (-)	ZI= 45 mm (+++)	ZI= Ø (-)	ZI= Ø (-)	ZI= 38 mm (+++)	ZI= Ø (-)		ZI= 46 mm (+++)

- (+++) : Action inhibitrice très efficace.
- (+) : Action inhibitrice intermédiaire.
- ZI : zone inhibitrice.

- (++) : Action inhibitrice importante.
- Ø (-) : Sans action inhibitrice.
- OC : Oléastre + Citron.

- OA : Oléastre + Ail.
- Oth : Oléastre + thym.
- EA : Elio + Ail.

- Eth : Elio + thym.
- EC : Elio + Citron.

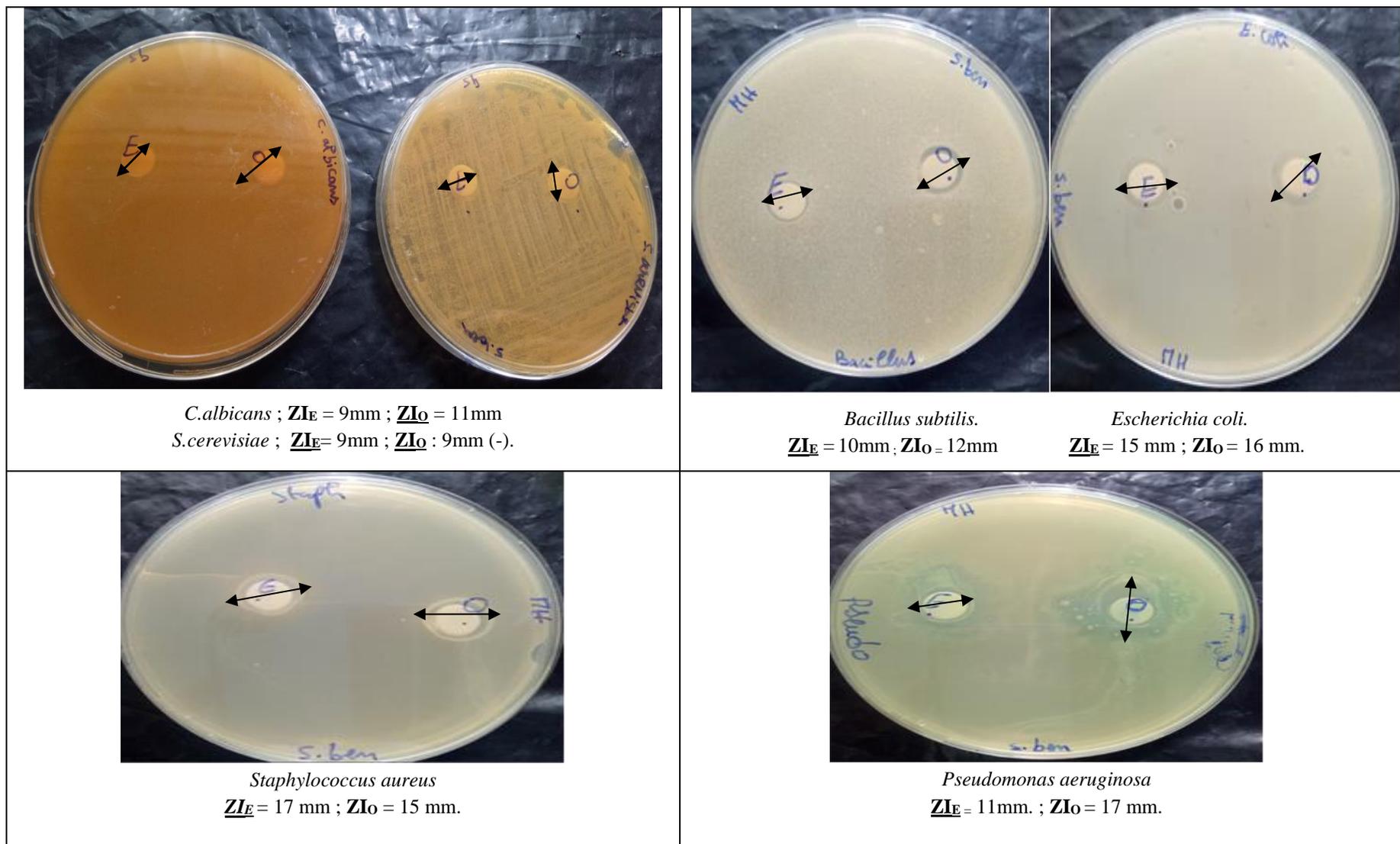
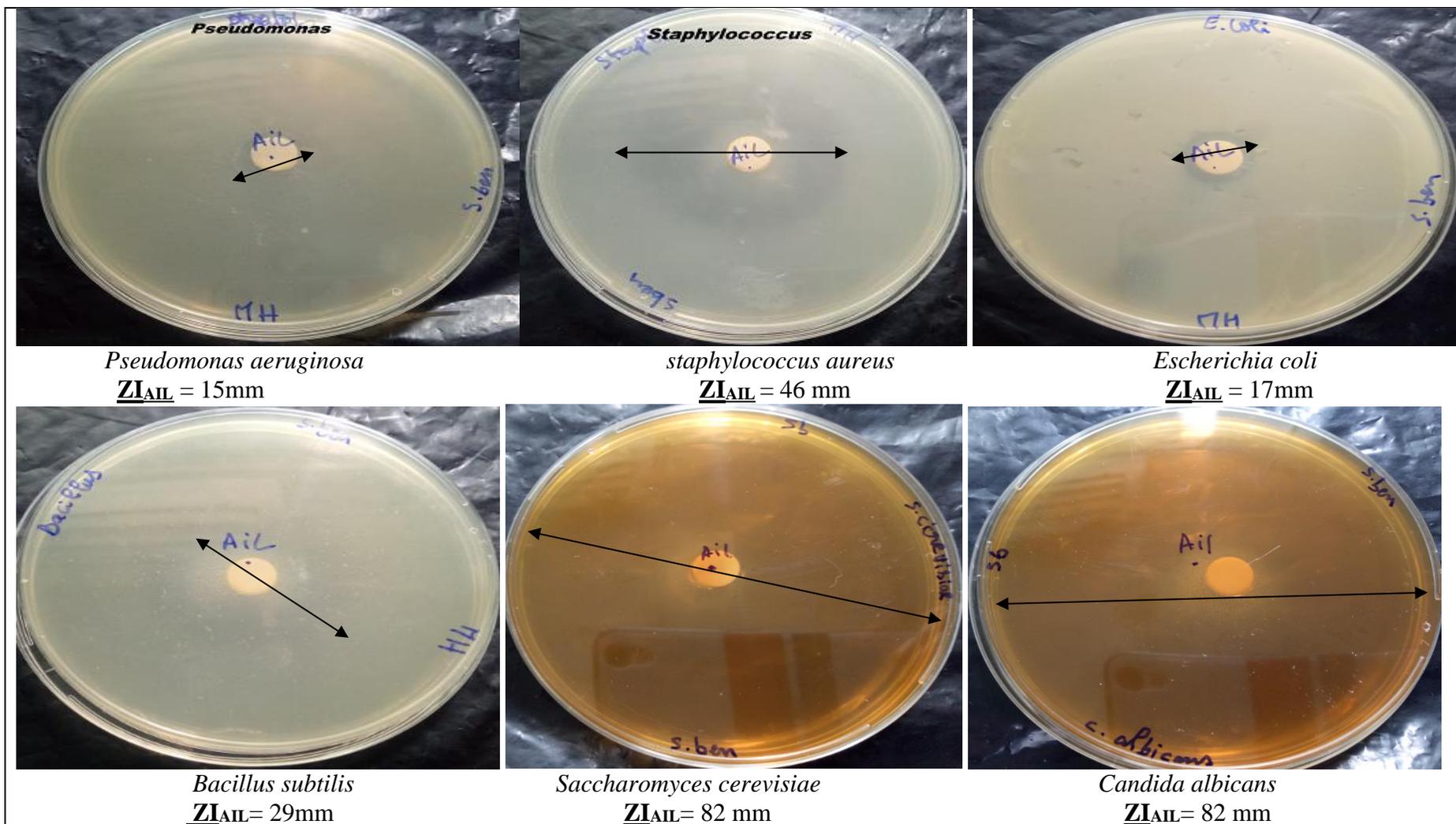
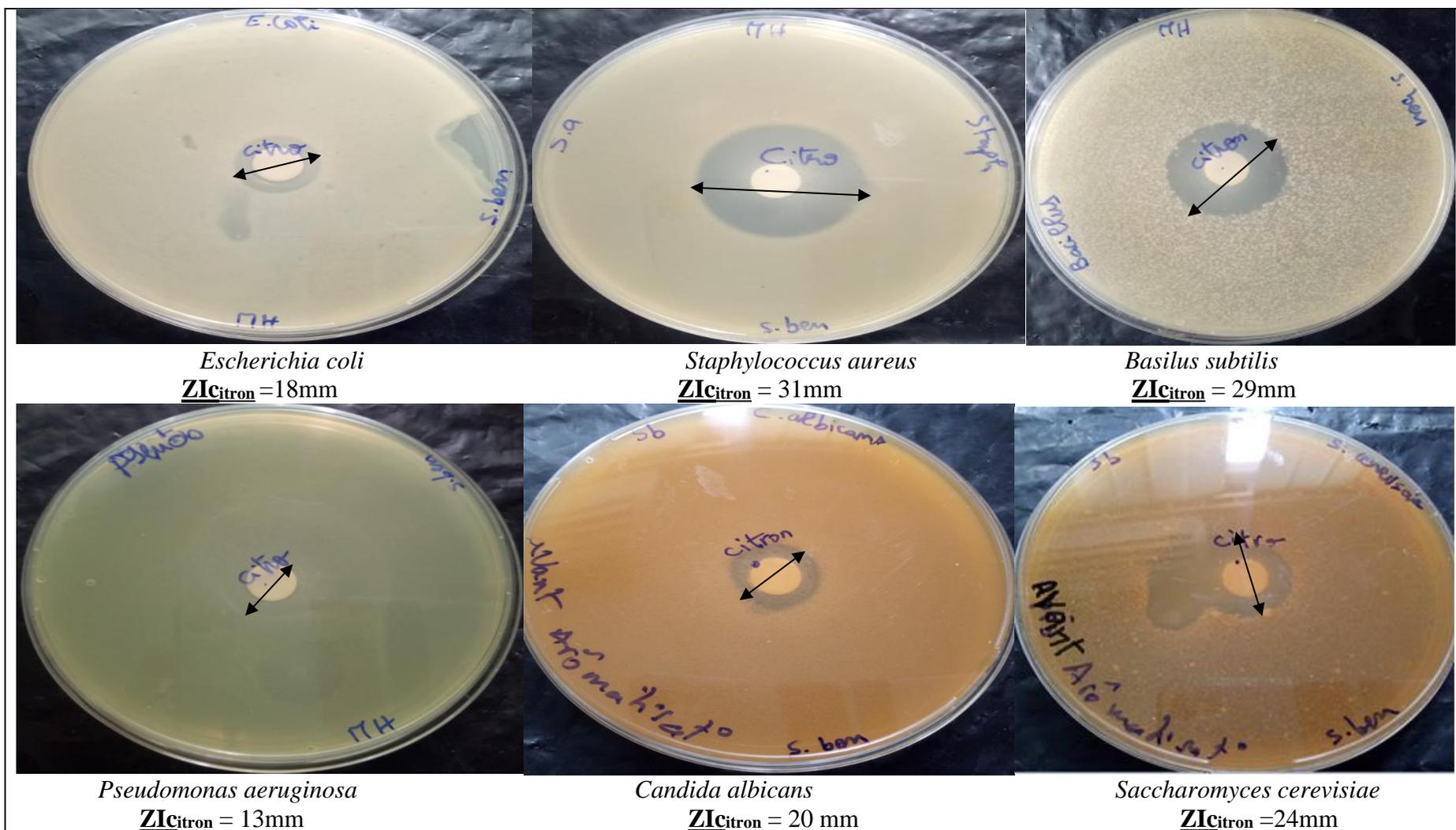


Figure V.19 : Evaluation d'activité antimicrobienne des huiles végétales (E=Elio ; O=Oléastre).



**Figure V.20** : Evaluation d'activités antimicrobienne des huiles essentielles de l'Ail.

Résultats sont les valeurs des moyennes ± ET de trois répétitions.



**Figure V.** Evaluation des activités antimicrobiennes des huiles essentielles du Citron.

Résultats sont les valeurs des moyennes  $\pm$  ET de trois répétitions.

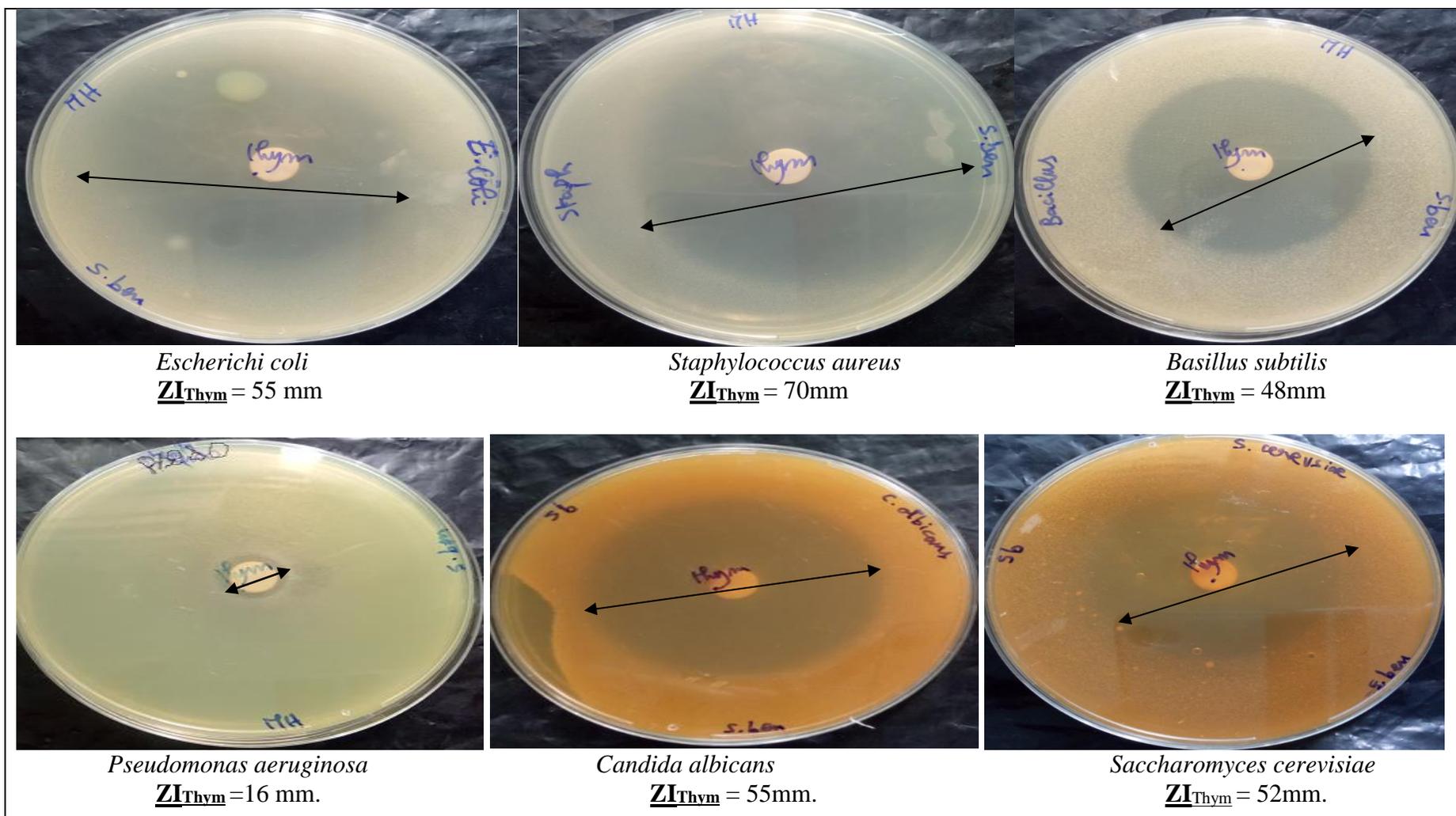
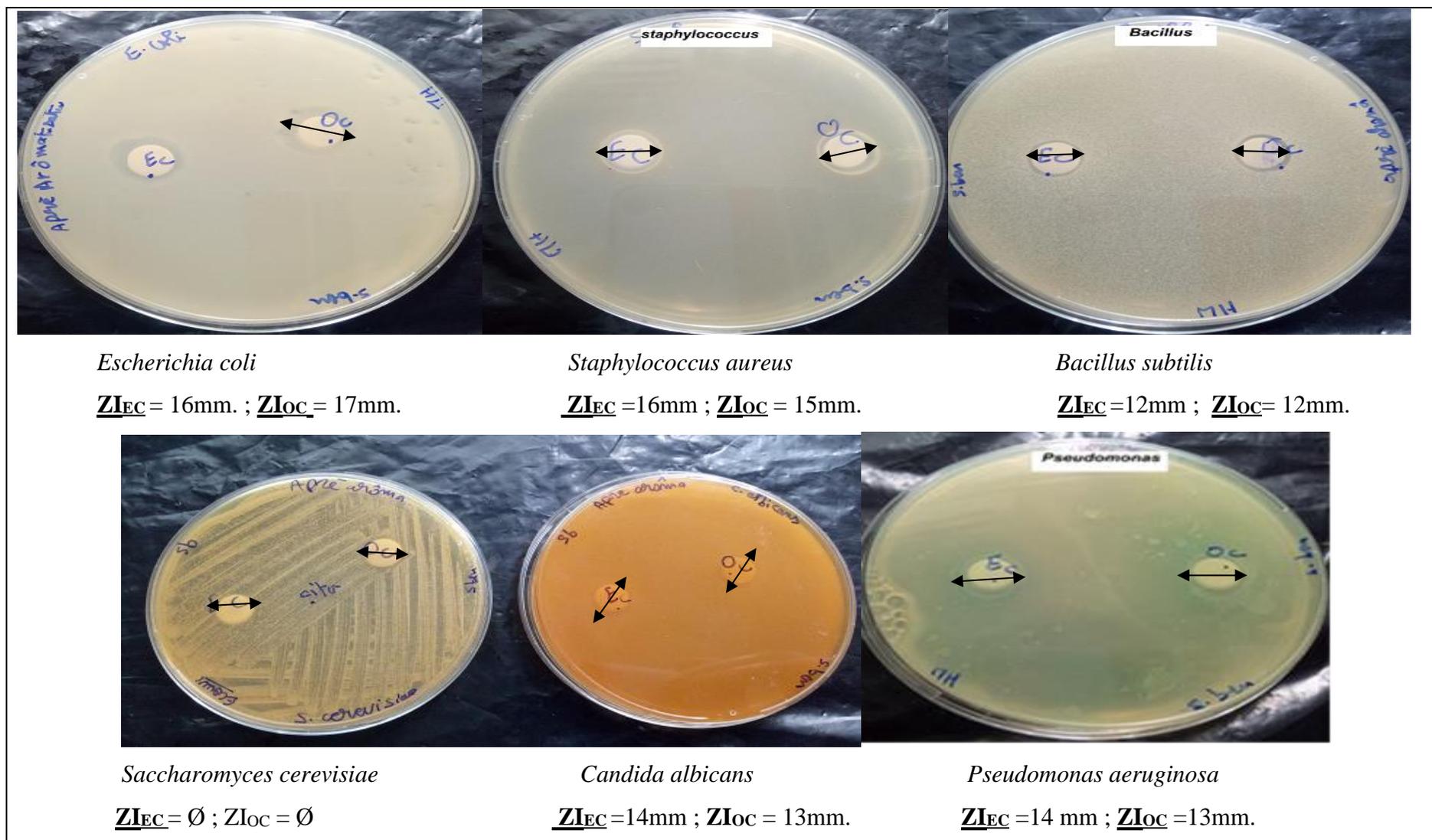


Figure V.22 : Evaluation d'activité antimicrobienne des huiles essentielles du Thym.



**Figure V.23 :** Evaluation d'activité antimicrobienne des huiles végétales aromatisées avec l'huile essentielle du Citron

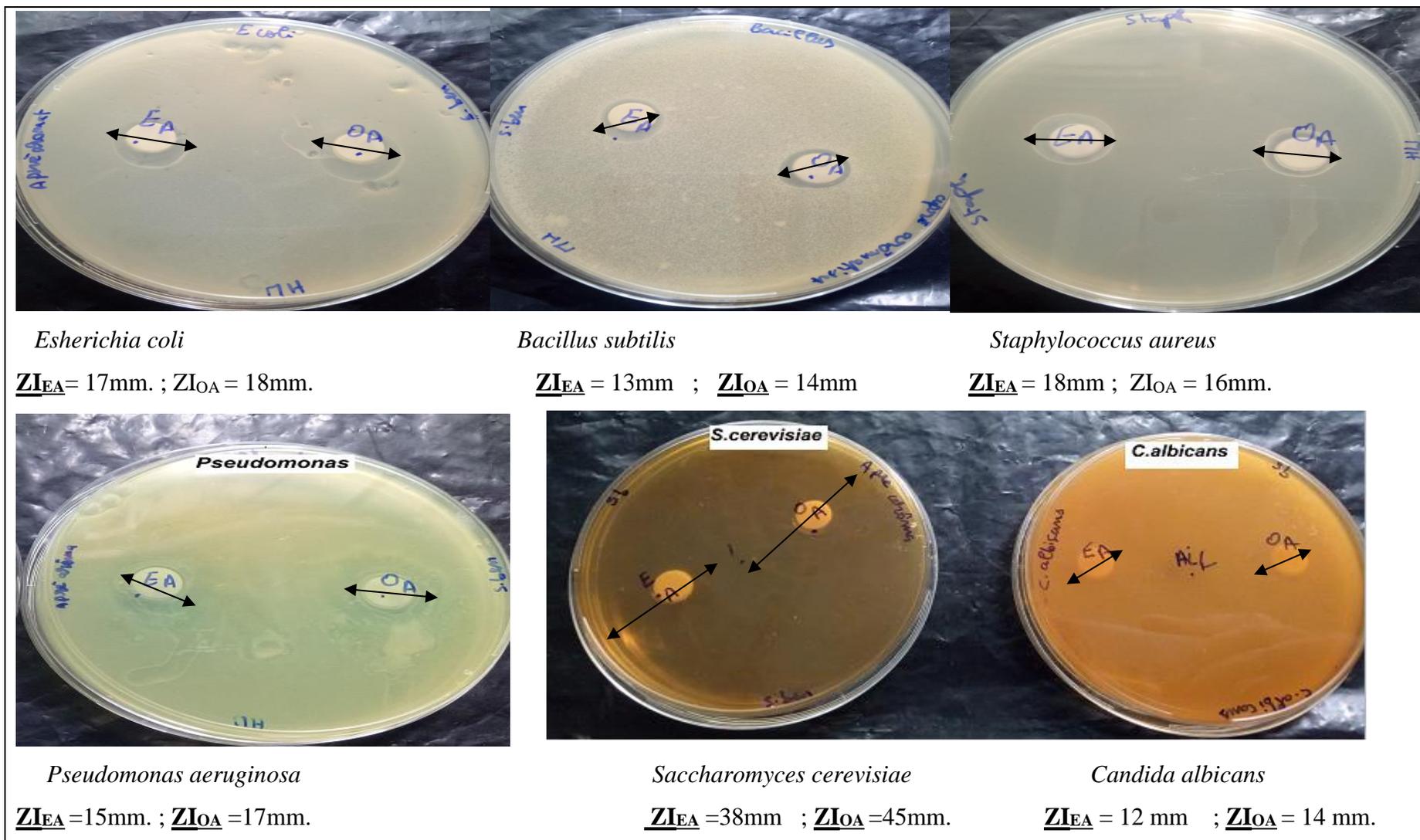
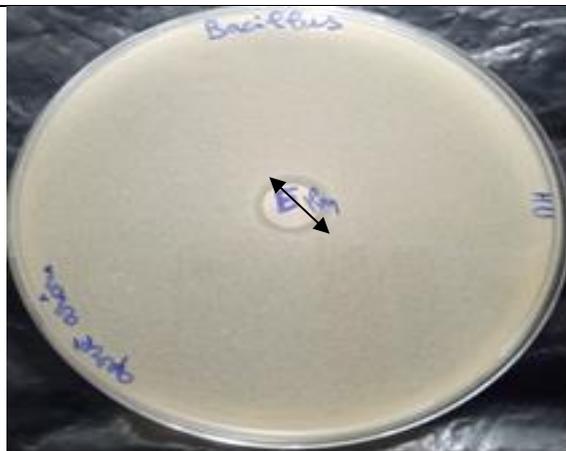


Figure V.24 : Evaluation d'activité antimicrobienne des huiles végétales aromatisées avec huile essentielle de l'Ail.



*Bacillus subtilis*

$ZI_{Eth} = 15\text{mm.}$

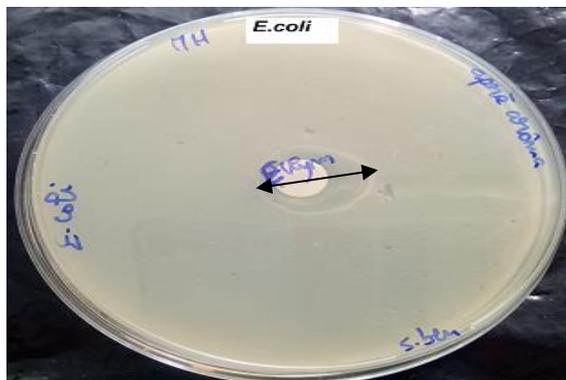


$ZI_{Oth} = 14\text{mm.}$



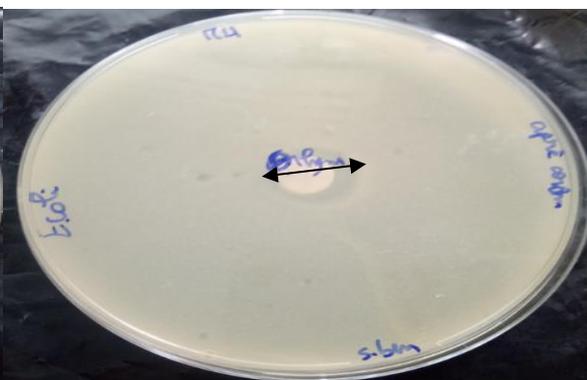
*Pseudomonas aeruginosa*

$ZI_{Oth} = 10\text{mm.}$

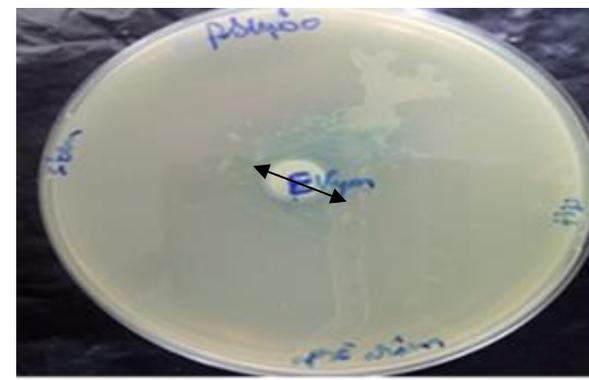


*Esherichia coli*

$ZI_{Eth} = 17\text{mm.}$



$ZI_{Oth} = 17\text{mm.}$



*Pseudomonas aeruginosa*

$ZI_{Eth} = 17\text{mm.}$



*Candida albicans*

*Saccharomyces cerevisiae* (Ecouvillonnage).

$ZI_{Eth} = 13\text{mm}$ .  $ZI_{Oth} = 13\text{mm}$ .

$ZI_{Eth} = \emptyset$  ;  $ZI_{Oth} = \emptyset$ .



*Staphylococcus aureus*

$ZI_{Eth} = 17\text{mm}$  ;  $ZI_{Oth} = 17\text{mm}$ .

**Figure V.25** : Evaluation d'activité antimicrobienne des huiles végétales aromatisées avec huiles essentielles du Thym.

# *Conclusion Générale*

## Conclusion Générale

Ce travail vise à une série d'étude et l'évaluation des activités biologiques notamment activité antioxydante et antimicrobienne in vitro des deux huiles végétales (huile de Table Elio et huile d'olive d'Oléastre) et trois huiles essentielles extraites par hydrodistillation de type Clevenger. La méthode d'aromatisation utilisée par l'ajout direct d'huile essentielle à l'huile des végétales.

Les trois plantes étudiées *Citrus limon L*, *Allium sativum L* et *Thymus vulgaris L*, ont des rendements différents sont de l'ordre de 0.19% et 0.11% 0.1% respectivement, d'où on constate que le *Thymus vulgaris L*, présente le meilleure rendement.

. Dans notre étude l'aromatisation a été réalisée par la méthode directe. Les caractéristiques physicochimiques ont été réalisées : l'acidité, l'indice de peroxyde, densité, les coefficients d'extinction (K232, K270) et la teneur en pigments, pour les huiles végétales et huiles aromatisées avec HEs, on a noté une diminution remarquable pour l'indice de Peroxyde apres l'aromatisation et une petite augmentation concernant les pigments. Les huiles fixes et huiles aromatisées sont conformes aux normes de **COI**, et **Codex Alimentarius**.

La composition chimique a été identifiée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) démontre que le huile essentielle du *C.limon* possède des composants majoritaire de Monoterpènes (98,7%) : D-Limonene (74,399%),  $\gamma$ -Terpinene(7,618),  $\beta$ -Pinene (2,770) ; et pour l'HE de l'*Allium sativum* possède des composants majoritaire de sulfures (89,71%) : Diallyl trisulfide (35,93%) Diallyl disulfide (21,58%), HE du *Thymus vulgaris* possède des composants majoritaire de Monoterpènes (96,31%) : Thymol (42,63%), $\gamma$ -Terpinene(20,42%), Carvacrol (20,24%).

Les profils d'acides gras obtenus par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) pour les huiles végétales et huiles aromatisées, montre que acide oléique présent avec une grande valeur variée entre 23 à 39,19%, les résultats ont enregistré une augmentation des acide majoritaire des huiles végétales après l'aromatisation tellque les acides linoliques, acides palmitiques. Les résultats montrent que les acides gras insaturés sont superieure que les acides gras saturés.

L'analyse quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu, il a été noté que l'huile *Olea europaea* riche en polyphénols que l'huile Elio avec une quantité de 159,98 mg EAG/kg, 16,29mg EAG/kg respectivement, les résultats montre que les teneurs en polyphénols totaux ont augmentée pour toute les huiles végétales enrichis en HEs, un pourcentage plus élevé a enregistré pour l'huile *Olea.europaea* aromatisé avec HEs du *Thymus vulgaris*, avec une quantité de 170,23 mg EAG/kg. Ceci signifie que l'enrichissement par l'HE favorise l'augmentation des composants phénoliques.

Activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par le test DPPH, comparés avec le standard acide ascorbique et BHT, les résultats démontrent que les huiles essentielles possèdent une activité antioxydante importante et inférieure aux standards. Les resultat montrent que l'activité anti radicalaire donnée par l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* est plus élevée (82,17%) que celle donnée par les autres huiles essentielles *Citrus limon* et *Allium sativum*, (72,17% ; 80,23% respectivement).les taux d'inhibition estimés pour les huiles végétales sont inferieure à ceux estimés pour les standards, avec des valeurs de 41,25%, 73,21% pour l'huile d'Elio et huile d'Oléastre respectivement. Les huiles végétales aromatisées possèdent une diminution de l'activité des valeurs de 53,32% ; 45,12% ; 49,12% ; 32,12% ; 28,15% et 27,89%, pour les huiles aromatisées OA, OT, OC et EA, EC, ET respectivement.

Dans notre étude, l'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée *in vitro* par la méthode d'aromatogramme diffusion sur gelose avec un disque solide de diametre de 9mm. L'efficacité de nos huiles vis à vis des germes testés aussi bien bactéries à Gram positifs *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, et Gram negatif *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* que deux levures *Candida albicans*, et *Saccharomyces cerevisiae*. Les résultats de cette étude montrent que les HEs *Thymus vulgaris* et *Allium sativum* possèdent une activité antimicrobienne importante, de diametre de 82mm (levures) et ZI≤ 52mm respectivement, et l'HE *Citrus limon* possède une activité antimicrobienne importante de 18mm à 31mm, concernant les huiles végétales ont un effet antimicrobien moyen varies entre 10mm et 17mm, et aucune activité antifongique a été signifié pour les huiles végétales.

Les résultats d'évaluation antimicrobienne montrent que les huiles essentielles de *thymus vulgaris* peuvent être de bons candidats pour explorer de nouveaux agents

antibactérien, et *Allium sativum* comme agent antifongique très efficace pour combattre les infections d'origine bactérienne ou fongique.

L'huile végétale aromatisée avec huiles essentielles favorisent l'activité antifongique contre les levures. Afin de compléter cette étude, il serait préférable de réaliser des travaux approfondis pour :

- ✓ Réalisées une étude quantitative des huiles essentielles CMI et CMB ; et évalue une étude d'association des huiles essentielles avec les ATB.
- ✓ Effectuer des essais sur d'autres souches bactériennes afin de confirmer les performances mises en évidence.
- ✓ Tester les composés identifiés individuellement en faisant appel à des tests *in vivo* complémentaires qui permettraient une meilleure évaluation de l'activité biologique des polyphénols des huiles étudiés.
- ✓ Compléter l'évaluation de l'effet anti inflammatoire, des huiles essentielles et huiles végétales, et les huiles aromatisées.
- ✓ Compléter l'évaluation d'activité anti insecticide et utilise les HEs comme un biopesticide contre les ravageurs
- ✓ Compléter l'évaluation de l'activité anti cicatrisante.
- ✓ améliorées les huiles végétales aromatisé comme agent antivirale.
- ✓ Associer les huiles essentielles aux nouvelles techniques de conservations des aliments, (Bio conservateur)
- ✓ Associer les huiles végétales aromatisé aux des préparations des pains et des aliments de base laitière et animale contre les champignons et moisissures.
- ✓ Caractériser les composants des Huiles végétales et HEs et huiles aromatisées par HPLC.

*Références*

*Bibliographiques*

## A

**Aeschbach, R., Loliger, J., Scott, B.C., Murcia, A., Butler, J. ET Halliwell, B. (1993).** Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chemistry and Toxicology*. **32**, 31-36.

**AFNOR, (2006).** Normes françaises : huile essentielle. Association Française de Normalisation. Paris (France).

**Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé).** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. AFSSAPS, 2008.

**Ahmad, S., Alam, K., Wariss, H., Anjum, S., Mukhtar, M. (2014).** Ethnobotanical studies of plant resources of Cholistan desert, Pakistan. *International Journal of Science and Research*, **3**, 1782–1788.

**Ait m'barek, L. ; Ait Mouse, H. ; Tilaoui, M. ; Jaafari, A. ; Aboufatima, R. ; Chait, A. et al.** Anti-tumoral properties of black seed (*Nigella sativa L.*) Extracts. *Braz J of Med and Biol*, 2007, **40(11)**, 893-47.

**Alais C., LINDEN G. et MICLO L., (2003).** Biochimie alimentaire. 5ème édition de l'abrégé : Dunod, paris. Pp : 51 – 71.

**Alileche Khoukha**, Analyse des caractéristiques physicochimiques et de l'activité antimicrobienne et des antioxydants des figes sèches seules et imprégnées dans l'huile d'olive, *mémoires de magister, université de Blida 1, Saad Dahleb, Alger, 2014, 216P.*

**Alileche Khoukha**, Contribution à l'étude des mécanismes de transfert de matière entre les figes sèches et l'huile d'olive en mélange: caractérisation et évaluation des intérêts nutritionnels et thérapeutiques, *thèse de doctorat, université de Blida 1, Saad Dahleb, Alger, 2021, 216P.*

**Alileche Khoukha, Hadj-ziane, zafour Amel, Megatli Smail , Djeziri Mourad , Ouali Abdelkrim**, effect of impregnation of two varieties of dry figs (abrkane and taamrioute) in olive oil to improve their physicochemical and biological properties, *AGROBIOLOGIA Volume 10, Numéro 3, pp2236-2249, 2021.*

**Alma M. H., Nitz S., Kollmannsberger H., Digrak M., Efe F. T., Yilmaz N. 2004.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52(12)**, pp. 3911–3914.

**Alton. J : Les industries des corps gras, 1992.**

**Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., EL Ajjouri M., Chaouch A. (2010).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. Et Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. Du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, **14(1)**, 141-148.

**Angerosa F., Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Esposito S., Montedoro G.F. (2004).** Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *J. Chromatogr. A* **1054**, 17-31.

**Arcoleo, G., Indovina, M. C., Varvara, G., Lanza, C. Et Mazzaglia, A. (2009).** Improving olive oil shelf life with lemon essential oil. *Chemical Engineering Transaction.* 17, 849-854.

**Asnaashari, M., Farahmandfar, R. & Kenari, R.E. (2016).** Blackberry (*Rudus plicates*) leaves extract effect on corn oil oxidation (primary and secondary products) at high temperature. *International Journal of Advances in Agricultural and Environmental Engineering.* **3**, 198-200.

**Association Française de Normalisation, 1986, Recueil de normes Françaises** “Huiles essentielles”, *AFNOR, Paris.* AFNOR NF T 75-006.

**Avato P., Tursil E., Vitali C., Mmiccolis V., Candido V. (2000).** Allylsulfide constituents of garlic volatile oil as antimicrobial agents. *Phytomedicine*,7, 239- 243.

**Ayadi, M. A., Abdelmaksoud, W., Ennouri, M., et Attia, H. (2009).** Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making. *Industrial Crops and Products*, **30(1)**, 40-47.

**Ayadi, M.A., Grati-Kamoun, N. et Attia, H., (2009).** Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by selected Tunisian aromatic plants. *Food and Chemical Toxicology.* **47**, 2613-2619.



**Bachiri L., Echchegadda G., Ibjibjen J., Nassiri L. (2016).** Etude Phytochimique Et Activité Antibactérienne De Deux Espèces De Lavande Autochtones Au Maroc : « *Lavandula stoechas L.* Et *Lavandula dentata L.* ». *European Scientific Journal.*

**Baiano A, Gambacorta G, Terracone C, Previtali M.A, Lamacchia C. and La Notte E. (2009).** Changes in phenolic content and antioxidant activity of Italian extra-virgin olive oils during storage. *Journal of Food Science.* **74**, 177-183.

**Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H., 2012.** Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts. *Food Microbiol.* **32**, 243–253.

**Bammou, M., Sellam, K., El Rhaffari, L., Bouhlali, E., Daoudi, A., Ibjibjen, J. et Nassiri, L. (2015).** Bioactivity of *Anvillea radiata* Coss. and Dur. collected from the southeast of Morocco. *European Scientific Journal* 11: 21.

**Baser K. H., Tümen G., Tabanca N. et Demirci F. (2001).** Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Satureja wiedemanniana (Lallem.)*. *Velen. Z. Naturforsch.* **56c** : 731-738.

- Beloued A., 1998.** Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires. Alger.
- Ben Rached, M., Abdallah, M. et Guerfel, M. (2014).** Compositional quality of Zalmati virgin olive oil: Effect of the aromatization process with rosemary essential oils (*Rosmarinus officinalis L.*). *African Journal of Agricultural Research*. **9**, 3276-3282.
- Ben Racho N., (2013) :** Etude des caractéristiques physicochimiques et de la composition biochimique d'huiles d'olive issues de trois cultivars de l'Est algérien. Thèse de Doctorat en Biochimie Appliqué .Université Badji Mokhtar Annaba.
- Benabderrahmane, M., Benali, M., Aouissat, H. et Jordan, M.J. (2009).** Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistacia atlantica* Desf. de l'Algérie. *Phytothérapie*. **7**, 304-308
- Bennis, S., F. S. Chami, et al. (2004).** "Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol" *Letters in Applied Microbiology* **38-** (454-458).
- Benrachou N. (2013).** Etude des caractéristiques physicochimiques et de la composition biochimique d'huiles d'olive issues de trois cultivars de l'Est algérien. (*Université Badji Mokhtar Annaba*).
- Bensakhiria A. 2016.** Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). *Analytical Toxicology*.
- Benyahia, I et Boutraifaia, A.** Contribution à l'extraction et l'activité de l'huile essentielle du *Pelargonium graveolens* de la région de Ouargla. *Mémoire de Master*, Ouargla, 2015.
- Besombes, C.** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro thermo mécanique d'herbes aromatique, Application généralisées. *Thèse de Doctorat*, Université de la Rochelle, 2008.
- Bessah, R et Benyoussef, E.L.** La filière des huiles essentielles : Etat de l'art, impact et enjeux socioéconomique. *Rev Energ Renouv*, 2015, 18 (3), 513-28.
- Bonnafous C. (2013).** Traité scientifique aromathérapie : aromatologie & aromachologie. Dangles (Ed.). *Escalquens*. P. 59.
- Borràs, E., Ferré, J., Boqué, R., Mestres, M., Aceña, L., & Busto, O. (2015). Data Fusion Methodologies for Food and Beverage Authentication and Quality Assessment – A Review. *Analytica Chimica Acta*, 891:1-14.
- Bouamer A., Bellaghit M.et Mollay Amera.,2004 :** Etude comparative entre l'huile essentielle de la menthe vert et la menthe poivrée de la région de Ouargla.mémoiredes .Unive. Ouargla, p 2-5; 10 ; 19 ; 21-22.
- Bouanane N, Boussehel N., 2005 :** contribution agroécologiqueaux essais d'introduction de la menthe poivrée (*Menthe piperata L*) dans la région de Ouargla en vue de l'utilisation de ses huiles essentielles en thérapie ; *méming.Univ*. Ouargla, p 22-23; 28.

**Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S et Abrini J. (2006).** *Thymus* essential oils : chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Congrès international de biochimie*, Agadir, Maroc .

**Boukabache, M. ; Boudjefdjouf, F.** **Extraction**, identification de l'huile essentielle par CPG-SM de l'espèce *Citrus limon* et mise en évidence de son activité antibactérienne : Fabrication du parfum. Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri, Constantine, 2016.

**Boukhatem M., Ferhat M., Kameli A., Saidi F., Taibi H., Djamel T. (2014).** Valorisation de l'essence aromatique du Thym (*Thymus vulgaris L.*) en aromathérapie anti-infectieuse. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, **8**:1418-1431.

**Bousbia N. 2004.** Extraction et identification de quelques huiles essentielles (Nigelle, Coriandre, Origan, Thym, Romarin). Etude de leurs activités antimicrobiennes. *Mémoire de magistère*. Institut National Agronomique, El Harrach – Alger. 130 p.

**Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., Dakka, N. (2017).** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 1-11.

**Bouyahyaoui, A.M.** Contribution à la valorisation des substances naturelles : Etude des huiles essentielles des Cupressacées de la région de l'Atlas Algérien. *Thèse de Doctorat*, Université de Mostaghanem, 2017.

**Brenes M., Garcia A., Rios J.J., Garcia, P. and Garrido A. 2002.** Use of 1 acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *International Journal of Food Science and Technology*, **37**: 615-625.

**Bruneton, J., (1999).** Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales. *Editions Tec and Doc*, Lavoisier, Paris, France. **2**, 278-279.

**Bruneton, J., (2002).** Plantes toxiques, végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. *Editions Tec et Doc*. Paris, France. 381-382.

## e

**C.O.I. (2001).** Norme commerciale applicable à l'huile d'olive et à l'huile de grignon d'olive. T.15/NC n°2/Rev.10. *Principe de Vergara*, 154, 28002 Madrid, Espagne. 19.

**C.O.I. (2005).** Norme commerciale applicable à l'huile d'olive et à l'huile de grignons d'olive. COI /T. 15/NC n°2/Rev.10.

**C.O.I. (2010).** Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux l'huiles de grignons d'olives conseil oléicole international, COI/T.15/NC n°3/ Rév.5

**C.O.I. Conseil Oléicole International. 1996.** Analyse spectrophotométrique dans l'ultraviolet. *T20/Doc* 19 6 juin 1996, Madrid. Espagne.

**Carol, U., (2005).** Les arbes pour l'édition française adaptation française. P 330.

**Casella S., Leonardi M., Melai B., fratini F. Et pistelli L. (2013).** The Role of Diallyl Sulfides and Dipropyl Sulfides in the *In Vitro* Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Garlic, *Allium sativum L.*, and Leek, *Allium porrum L.*, *Phytotherapy Research*, **27(3)**, 380-3.

**Casella S., Leonardi M., Melai B., Fratni F. et Pistelli L. (2013).** The Role of Diallyl Sulfides and Dipropyl Sulfides in the In Vitro Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Garlic, *Allium sativum L.*, and Leek, *Allium porrum L.*, *Phytotherapy Research*, **27(3)**, 380-3.

**Castrillo, J.I., Hayes, A., Mohammed, S., Gaskell, S. J., and Oliver, S. G. (2003).** An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry* **62**, **6**, 929-937.

**Chaib.F, khenfer A., 2013.** Synthèse de biodiesel par la trans estérification des huiles commercialisées. *Mémoire master académique*. Spécialité génie chimique. Université kasdi marbah, Ouargla. P40.

**Chakou M.et Bassou K., 2007.** Efficacité antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verte *Mentha Spicata Lisdue* de la région de Ouargla sur quelques germes pathogènes : *E.coli*, *Pseudomonas aeroginosa*, Références bibliographiques 34 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtiluis* et *Candida albicans*.

**Chalchat J.K., Carry L. P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. Et Chopineau J. (1997).** Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. *Activity of some African essential oils*. *J. Essent. Oil Res.*, **9**: 67-75.

**Chanchal, C.** Clinical aromatherapy; the medicinal value of volatile oils. MNIMH, AHG, 2001, p1-18.

**Chandra Jnns, Ponnappa Kc, Sadashiva Ct, Priya Bs, Nanda Bl, Gowda Tv, Vishwanath Bs and Rangappa Ks (2007).** Chemistry and structural evaluation of different phospholipase a2 inhibitors in arachidonic acid pathway mediated inflammation and snake venom toxicity. *Curr Top Med Chem*, **7**, 787-800.

**Chandran, J., Nayana, N., Roshini, N. Et Nisha, P. (2016).** Oxidative stability, thermal stability and acceptability of coconut oil flavored with essential oils from black pepper and ginger. *Journal of Food Science and Technology*. **54**, 144–152.

**Chang, S., Hossein, A., Mohammadi, Nafchi, A. Et hosseini, M.M. (2017).** *Iranian foeniculum vulgare* essential oil and alcoholic extracts: Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and application in olive oil preservation. *Journal of Essential Oil and Bearing Plants*. **19**, 1920-1931.

**Chao, S.C., Young, D.G. and Oberg, C.J. (2000)** Screening for inhibitory activity of essential oils on sel Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J. E., Warmington J. R., et Wyllie S.G., 2000.- The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* **88**: 170-175. ected bacteria, fungi and viruses. *J Essent Oil Res* **12**, 639– 649.

**Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J.** The complement system and innate immunity. (2001).

**Charlesa, guyl et Laurent M., (2003).** Biochimie alimentaire, 5<sup>ème</sup> édition de labrégé. Dunod, Paris.

**CHEIKH Myriam., (2016) :** (Caractérisation des Acides Gras de l'Huile d'Olive de Sabra en corrélation avec l'évaluation Sensorielle et l'Analyse Physico-chimique) *Mémoire de Master*. Université de Tlemcen faculté des sciences de la nature et de la vie.

**Chiavaro, E., Rodriguez-Estrada, M.T. et Vittadini, E., (2010).** Microwave heating of different vegetable oils: Relation between chemical and thermal parameters. *Food Science and Technology*. **43**, 1104-1112.

**Chikhoun A. 2007. Huiles essentielles de thym et d'origan : Etude de la composition chimique et de l'activité antioxydante et antimicrobienne. Mémoire de magistère. Institut National Agronomique, El Harrach – Alger. 155 p.**

**Choe, E. Et Min DB., (2006).** « Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **5 (4)**: 169-86.

**Cicerale S., Lucas L.J. and Keast R.S.J. 2011.** Antimicrobial, antioxidant and antiinflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current Opinion in Biotechnology*, **23**:1–7.

**CODEX (2009).** Codex alimentarius. Norme codex pour les huiles d'olive et les huiles de grignons d'olive, CODEX STAN 33-1981, 9 p. (Adoptée: 1981;révisions: 1989, 2003; amendée: 2009).

**Codex Alimentarius Commission. 2011.** Codex alimentarius : Standard for olive oils and olive pomace oils. (Rev. 6-2011 ed., Vol. STAN 33-1981).

**Codex alimentarius, 1999,** Lignes directrices pour l'application des principes du HACCP Alinom 93/13A 2<sup>ème</sup> session de la commission FAO/OMS du Codex Alimentarius.

**CODEX STAN 210-1999.**

**COI, (2015).** Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive. Conseil Oléicole International, COI/T.15/NC n° 3/Rév. **8**: 1- 8.

**COI, (2019).** Normes commerciales applicables aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive. COI/T.15/NC N° 3/Rév. **14** Conseil Oléicole International. En ligne <https://www.internationaloliveoil.org/wpcontent/uploads/2019/12/tradestandard-REV-14-FR.pdf>.

**Conseil Oléicole International, 1996.** Analyse spectrophotométrique dans l'ultraviolet.

**Conseil Oléicole International. 2010.** L'olivier en méditerranée.

**Conseil Oléicole International. 2011.** Normes commerciales applicables aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive. T.15/NC n°3,/ Rév. 6.

**Conseil Oléicole International/ T20/ Doc 19 6 juin 1996,** Madrid. Espagne. Conseil.

**Costerton J.W., Stewart P.S et al. 1999.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*.284, pp 1318-1322.

**Cristiani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M. G., Micieli D. (2007).** Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 6300-6308.

**Cuvelier ME, Maillard MN. (2012).** Stabilité des huiles alimentaires au cours de leur stockage. **19(2)** :125-132.

## D

**Dauqan, E. M., et Abdullah, A. (2017).** Medicinal and Functional Values of Thyme

**Deans G.C., Noble C.R., Mac Pherson A., Penzes L., Imre G.S. and Hofecker G. (1994).** Skalicky Ageing Series, *vol 4*, Facultas Press, Vienna, , p. 173.

**Deba, F., Xuan, T. D., Yasuda, M., & Tawata, S. 2008.** Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. *Food Control*. **19**, pp. 346–352.

**Delgado-Adámez, J., Baltasar, M.N.F., Concepción Ayuso Yuste, M. & MartínVertedor, D. (2014).** Oxidative stability, phenolic compounds and antioxidant potential of a virgin olive oil enriched with natural bioactive compounds. *Journal of Oleo Science*. **63**, 55- 65.

**Dethier B.** Contribution à l'étude de la synthèse de l'alliine de l'ail [*Travail de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de master bioingénieur en chimie et bio-industries*]. Université de Liège; 2009, 106p.

**Dubois. (2006).** Les arbres fruitiers. **Ed**, Rustica. Paris. 127p.

## E

**El-Mansouri, Kh. (2013).** Recherche et évaluation de l'activité antifongique des extraits de plantes médicinales. *Thèse : Faculté de médecine et de pharmacie*. Marrakech : Université Cadi Ayyad. 107p.

## F

**Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F. 2010.** *Citrus* d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions .**Ed**. Office des publications universitaires, Alger. 157 p.

**Festy, D.,** ma bible des huiles essentielles. **2017** (LEDUC.S): p. 21.

**Franchrome P, Jollois R, Pénoel D.** L'aromathérapie exactement : encyclopédie de l'utilisation des extraits aromatiques. Paris : *Edition Roger Jollois*. 2001.

**Franchrome P, Jollois R, Pénoel D.** L'aromathérapie exactement : encyclopédie de l'utilisation des extraits aromatiques. Paris : *Edition Roger Jollois*. 2001.

**François Mendy., (2016).** Un regard passionné sur les lipides et les matières grasses EDP Sciences .

**François R. (1978).** Industrie, production -environnement. 318. *Ed technique et documentation*. Paris.

**Frenot M et Vieling E, (2001)** Biochimie des aliments. Diététique du sujet bien portant. *Ed : Doin éditeurs, centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine*. Bordeaux. P297.



**Gambogou, B., Ameyapoh, Y.A., Gbekley, H.E., Djeri, B., Soncy, K., Anani, K. Et Karou, S.D. (2019).** Revue sur l'Ail et ses Composés Bioactifs. *European Scientific Journal*, 15 (6) : 74-90.

**García-González D.L., Infante-Domínguez C. et Aparicio R. (2013)** - Tables of olive oil chemical data. In: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*, second ed. (R. Aparicio & J. Harwood eds), Springer, New York, pp 739-768. doi: 10.1007/978-1-4614-7777-8\_20.

**Gemmothérapie-définition [en ligne].**consulté en février 2018. *Disponible sur :* <http://www.passeportsanté.net/fr>.

**-Gerges Geagea A. (2015).** Les Bienfaits de l'Ail sur la Santé. *Phytothérapie*, 46-47.

**GHAYATI, Z. (2019).** Antioxydants et Diabète de type 2 (*Doctoral dissertation*).

**Ghedira, K., (2008).** L'Olivier. *Phytothérapie*, 6(2), 83-89.

**Ghenaiet, I.Etaouidet, S. (2016).** Etude de l'impacte des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* Sur *Rhyzopertha dominica* : Aspect toxicologique et biomarqueur. *Memoire de Master*, Département : sciences de la nature et de la vie, Université De Larbi Tébéssi, Tébéssa : 46 p.

**Goetz P. et Ghedira K .2012** .Collection *Phytothérapie pratique*, vol. 4, *phytotérapie anti-infectieuse*. Springer, paris, 357-365p.

**Goetz P. Et Ghedira K. (2012).** *Phytothérapie anti-infectieuse*. Ed .Springer-Verlag France. Paris. Pp: 1-382.

**Goetz, P. (2014).** *Citrus limon (L.) Burm. F. (Rutacées) Citronnier*. *Phytothérapie*.

**Going, L., (1968).** Oxidative deterioration of partially processed soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45, pp 632-634.

**Graille J. (2003).** Lipides et corps gras alimentaires. **Edition** : Tec et Doc, *Lavoisier*, Paris. Pp : 1– 170.

**Grunwald J, Janicke C.** Guide de la Phytothérapie .2èmedition. **Edition Marabout.** Italie : 2006.

**Grunwald J, Janicke C.** Guide de la Phytothérapie. 2èmedition. Edition Marabout. Italie : 2006.

**Guilhem, J. (2006).** Huiles Essentielles : A tous majeurs dans le conseil à l'officine. 2ème Forum Pharmacien, France. Pp. 10. [Http://www.doc-developpement-durable.org/file/Huilesessentielles/FICHES\\_PLANTES&HUILES/HE\\_conseils-a-officine.pdf](http://www.doc-developpement-durable.org/file/Huilesessentielles/FICHES_PLANTES&HUILES/HE_conseils-a-officine.pdf).

**Guo, J.-j., Gao, Z.-p., Xia, J.-l., Ritenour, M.A., Li, G.-y., Shan, Y.,** Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of *citrus* essential oils from the main cultivated varieties in China, *LWT. Food Science and Technology* (2018), doi:10.1016/j.lwt.2018.07.060.

#

**Haddad D, Hadji D.** Contribution à l'étude des huiles essentielles de *Myrtus communis L.* [thèse]. Université Mouloud Mammeri. Tizi ousou, 2016.

**Hama Z. et Mayout N.,(2016)** : Etude des caractères physicochimique de l'huile d'olive de deux variétés algériennes à différentes stades de maturité. *Mémoire de Master.* Université de Bejaia.

**Hamza Z. et Mayout N.,(2016)** : Etude des caractères physicochimique de l'huile d'olive de deux variétés algériennes à différentes stades de maturité. *Mémoire de Master.* Université de Bejaia.

**Handa S., Khanuja S., Longo G., Rakesh D.,** Extraction technologies for aromatic and medicinal plants. *United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology* (2008).260p.

**Hart, T., et Shears, P. (1997).** Atlas de poche microbiologie : Flammarion.

**Haxhe, J. J. Et M. Zumofen (1999).** "Notions d'hygiène hospitalière", Faculté de Médecine, Université Catholique de Louvain.

**Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E. M., (2004).** Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. Churchill Livingstone. Edingburgh: pp.245-252.

**Hellal, Z. (2011).** Contribution a l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. Application sur la Sardine (*Sardina pilchardus*). *Memoire de magister en biologie*, Departement des sciences biologiques, Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou : 120 p

**Heni, S. (2016).** Sélection d'extraits bioactifs des espèces du genre *Thymus* comme conservateurs antibactériens naturel, *thèse de doctorat*, Université badji mokhtar Annaba, Algérie, 210 P.

**Hesham H.A.Rassem., Abdurahman H.Nour., Rosli M.Yunus. (2016).** Techniques for Extraction of Essential oils From Plants : A Review. *Aust. J. Basic and Appl. Sci.* **10 (16):** 117-127.

**Hilan C., Sfeir R., Aitour S. (2011).** Chimiotypes des plantes communes au Liban du genre *Origanum* et du genre *Micromeria* (Lamiaceae). *Lebanese Science Journal.* **12 (1):** 79-91.

**Himed L., Merniz S., Bnbraham M. (2014).** Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété *Lisbon*) extraite par hydrodistillation. *Algerian Journal of Natural Products.* Algeria.

**Homéopathie-Définition, avantage et controverse. [En ligne].2018 ;** consulté le 28 février 2018.disponible sur : [www.santé-medecine.journaldesfemmes.fr](http://www.santé-medecine.journaldesfemmes.fr).

**Hulin V., Mathot A.G., Mafart P., et Dufosse L., 1998.** Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments, vol.18,* p.p. 563-582.

## 7

**Information général sur les corps gras : description et nomenclature.** Composition et principale altération des corps gras. **Ed:** ITERG. Rue Monge. PESSAC.2002.

**Iserin P .2001 .** Encyclopédie des plantes médicinales. 2ème édition, Larousse, Londres, P .143.

**Iserin P., Masson M., Restellini J.P., Ybert E. et Moulard F. et al. 2001.** Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparations, soins.

**ISO, 660 (2012).** Organisation Internationale de Normalisation : Norme international. Corps gras d'origines animal et végétal - détermination de l'indice d'acidité et de l'acidité. 2eme édition 660.

**ISO/DIS 9235.2: 1997.** Aromatic and Natural Raw Materials Vocabulary. Geneva. International Standard Organisation.

**Issaoui M., Flamini, G., Ellouze Hajajj, M., Luigi Cioni, P. et Hammami, M., (2011).** Oxidative evolution of virgin and flavored olive oils under thermo-oxidation processes. *Journal of American Oil Chemists' Society.* 88, 1339-1350.

**Issaoui, M., Flamini, Gu., Brahmī, F., Dabbou, S., Ben Hassine, K., Taamali, A., Chehab, H., Ellouz M., Zarrouk, M. et Hammami, M. (2010).** Effect of the growing area conditions on differentiation between Chemlali and Chétoui olive oils. *Food Chemistry.* 119, 220-225.

**Issaouia, M., Bendini, A., Souid, S., Flamini, G., Barbieri, S., Toschi, T.G. et Hammami, M. (2019).** Flavored olive oils: focus on their acceptability and thermal stability. *Grasas y Aceites*. 70, 29.

**Iterg., (2018).** La technologie des corps gras, FRANCE.



**J. Graille. Corps gras alimentaires : aspects chimiques, biochimiques et nutritionnels. In :** lipides et corps gras alimentaires. **Ed :** *techniques et documentation*. Paris Londres New York. 2003.

**Jean.V. (1990),** Aromathérapie : traitement des maladies par les essences des plantes, 1<sup>ème</sup> édition : Maloine. Paris.

**Jean-Marie., (2010).** Arbre et arbuste de Méditerranée : dictionnaire 3eme édition .France.p 112.

**Johnson, G. B., Raven, P. H., Losos, J. B., Bouharmont, J., et Singer, S. R. (2011).** Biologieversion luxe: De Boeck Supérieur.

**Jones, T., Federspiel, N.A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B.B., Newport, G., Thorstenson, Y.R., Agabian, N. Et Magee, P.T. 2004.** The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7329-7334.



**Kalemba D, Kunicka A.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 2003; **10**:813-829.

**Kaloustian J., Hadji-Minaglou F, 2012,** La connaissance des huiles essentielles. *Qualitologie et aromathérapie*, Springer, 210p.

**Karleskind A. Manuel des corps gras. Edition :** Lavoisier Tec et Doc, Tome 1 et 2, Paris ,1992.

**Kehal, F,** «Utilisation de l'huile essentielle de *Citrus limon* comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche». *Thèse de magister en sciences alimentaires*, Constantine, Université Constantine 1, Algerie, 2013, 124p.

**Keramat, M., Golmakani, M.T., Aminlari, M. Et Shekarforoush, S. (2017).** Oxidative stability of virgin olive oil supplemented with *Zataria multiflora* Boiss. and *Rosmarinus officinalis* L. Essential oils during accelerated storage. *Journal of Food Processing and Preservation*. 41, 1-12.

**Keramat, M., Golmakani, M.T., Aminlari, M. et Shekarforoush, S.S., (2016).** Comparative effect of *Bunium persicum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their synergy with citric acid on the oxidation of virgin olive oil. *International Journal of Food Properties*. **19**, 2666-2681.

**Khayyat S A, Roselin LS., (2018).** Recent progress in photochemical reaction on main components of some essential oils. *Journal of Saudi Chemical Society*, **22**, 855-875.

**Khemakhem, I., Yaiche, C., Ayadi, M.A. Bouaziz, M. (2015).** Impact of aromatization by *Citrus limetta* and *Citrus Peels* on olive oil quality, chemical composition and heat stability. *Journal of American Oil Chemists' Society*. **92**, 701-708.

## L

**Lambert, R. J. W., P. N. Skandamis, et al. (2001).** "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol" *Journal of Applied Microbiology* **91**- 3: (453-462).

**Li, X.-Z. Et Nikaido, H. (2009).** Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* **69**, 1555–1623.

**Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S., Chemat, F. 2014.** Essential oils as green solvents, springer, pp 55- 61.

**Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S., Ginies, C., Chemat, F., 2014.** Direct green extraction of volatile aroma compounds using vegetable oils as solvents: Theoretical and experimental solubility study. *LWT. Food. Sci. Technol.* **59**: 724-731.

**-Lim, T.K. (2015).** *Allium sativum*. Edible Medicinal and Non Medicinal Plants, 9: 210-360.

**Lindberg L E, SM Willför, BR et Holmbom. (2004).** Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **31(3)**: 137-147.

**Linden G. Et Lrorient D.,(1994).** Biochimie agro industrielle; valorisation alimentaire de la Production agricole. *Masson Paris Milan Barcelone*.1994.

**Longbottom CJ, Carson CF, Hammer KA, et al. (2004)** Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. *J Antimicrob Chemother* **54**: 386–92.

## M

**Magder, S., (2006).** Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life? *Crit care*. **10**: 208-216.

**Malheiro, R., Casal, S., Lamas, H., Bento, A. & Pereira, J.A. (2012).** Can tea extracts protect extra virgin olive oil from oxidation during microwave heating? *Food Research International*. **48**, 148-154.

**Marouf A. Et Tremblin G., (2009).** Abrégé de biochimie appliquée. EDP Science. 483 P.

**Masson O., (2002).** Biochimie : Les bases biochimiques de la diététique. **Edition** : Tec et Doc, Lavoisier, Paris. Pp : 81–83.

**Meddeb V., (2008).** Etude des effets des rayonnements ionisants sur les propriétés biochimiques et biologiques de l'ail (*Allium sativum*). *Mémoire de Master*, université 7 novembre. Carthage.

**Medina E., De Castro A., Romero C. and Brenes M. 2006.** Comparison of the Concentrations of Phenolic Compounds in Olive Oils and Other Plant Oils: Correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4954-4961.

**Medirios P.M., (2018).** Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). *Encyclopedia of Geochemistry*. Encyclopedia of Earth Science Series.

**Menaceur, F. (2015).** Contribution a l'étude phytochimique et biologique de l'erigeron, du fenouil commun, de la avande et du genévrier. *These de doctorat*, ecole nationale superieure agronomique El-Harrach –Alger : 189 p.

**Miguel M.G., Figueiredo C., Costa M.M., Martins D., Duarte J., Barroso J. G. et edro L.G. (2003)** .Effect of the volatile constituents isolated from *Thymus albicans*, *T. Mastichina*, *T. Carnosus* and *T. Capiata* in sunflower oil. *Nahrung Food*, **47 (6)**: 397-402.

**Minguez-Mosquera M.I., Rijano L., Gandul B., Sanchez A.H. et Garrido J. 1991.** Colorpigment correlation in virgin olive oil. *Journal of the American oil chemests Society*, 86: 322- 337.

**Minker C.** Ail et autres *alliacées* : un concentré de bienfaits pour votre santé, votre beauté et votre jardin. Eyrolles. Paris: Eyrolles; 2012, 157p.

**Moderres, F.et aichouni, C. (2018).** Etude de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia L.* Récoltée dans deux régions mekhatria et bathia. *Memoire de mater*, département des sciences agronomiques, Djilali Bounama, Khmis Miliana : 29 p.

**Moreno. J., (2003).** Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radical Biology and Medicine* 35, 1073-1081.

**Moumen F. (2016).** Valorisation des plantes condimentaires cultivées et spontanées dans l'ouest algérien : cas du genre *Allium*. *Thèse de doctorat* ès sciences de l'environnement, Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes, Sidi Bel Abbes, 171 p.

**Muther L.** Utilisation des huiles essentielles chez l'enfant [*thèse*].Faculté de pharmacie de Clermont Ferrand, 2015.

η

**Nauciel C, Vildé J. L, (2005)** .Bactériologie médicale. Masson. 2ème édition. 257 p.

ο

**Ogara E.A., Hill D.J. et Maslin D.J. (2000).** Activités de l'huile d'ail, poudre d'ail et leurs composés diallyle contre *Helicobacter pylori*. *App. Microbiol. Environ.*, **66(5)**, 2269-2273.

**Oléicole International. 2008.** Production de l'huile d'olive.

**Ollivier D., Boubault E., Pinatel C., Souillol S., Guérère M. et Artaud J. 2004.** Analyse de la fraction phénolique des huiles d'olive vierges. *Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique*, 2ème Semestre, 965:169-196.

**Ollivier D., Boubault E., Pinatel C., Souillot S., Guerere M., Artaud J., (2004).** Analyse de la fraction stérolique des huiles d'olive vierges. *J. Annales des falsifications de l'expertise chimique et toxicologique*. N°965, p. 169 -196.

**Organisation Internationale de Normalisation : ISO 3960 : (2007).** Corps gras d'origines animale et végétale - Détermination de l'indice de peroxyde - Détermination avec point d'arrêt iodométrique.

**Ozcan M. Et Chalcha J. C., (2003).** Aroma profile of *Thymus vulgaris L* growing wild in Turkey . *Bulgarian journal of plant physiology* . **30(3-4)** : 68-73.

**Ozen, T., Demirtas, I. et Aksit, H. (2011).** Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox subsp. skorpilii var. Skorpilii*. *Food Chemistry*.**124**, 58-64.

## P

**Pagès Xatart Parès, X. (2008).** Technologies des corps gras (huiles et graisses végétales) Paris : institut national de la recherche agronomique.

**Pandey, A., Singh, P. (2011).** Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* (clove) with metal ion effect against food borne pathogens. *Asian journal of plant science and research*, 1(2), 69-80.

**Parker, T. D., Adams, D. A., Zhou, K., Harris, M., Yu, L., (2003).** Fatty acid composition and oxidative stability of cold-pressed edible seed oils. *Journal of food science*, 68, pp 1240-1243.

**Pereira AP, Ferreira IC, Marcelino F, Valentão P, Andrade PB, Seabra R, Estevinho L, Bento A et Pereira JA. (2007).** Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea L*. Cv. Cobrançosa) leaves *Molecules*. 12(5): 1153-627

**Perez, P. (2013).** Typage de *staphylococcus aureus* par MLVA : étude de faisabilité de la détection par HRM. *Thèse de doctorat*. Faculté de médecine de Nancy. Université de Lorraine, France.131p.

**Pibiri M.C. (2005).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. *Thèse de Doctoral* . Polytechniques Fédérale de Lausanne.

- Pilet C, (1987).** Bactériologie médicale et vétérinaire. Systématique bactérienne. Doin. 371p.
- Pillai U, Devasahayam J, Kurup AN, Lacasse A.** Invasive *Saccharomyces cerevisiae* infection: a friend turning foe? Saudi J Kidney Dis Transpl. 2014 Nov;**25(6)**:1266-9.
- Pincemail J., K. Bonjean, K. Cayeux et J.O. Defraigne, 2002.** Physiological action of antioxidant defences
- Prior.E., (2003).**In lipides et corps gras alimentaire, *Graille et al* ; **Ed** Tec et Doc. Lavoisier. propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens L.*) Cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Nature et Technologie* : **37-45**.
- François R.** Les industries des corps gras : biochimie-extraction-raffinagenuisances et réglementation. **Ed** : *technique et documentation-Lavoisier*. Paris. 1974.
- Raynal K., Remeuf F.,** The effects of heating on physicochemical and renneting properties of milk: A comparison between caprine, ovine and bovine milk, *Int. Dairy J.* 8 (1998) 695–706.
- Reboul E., Thap S., Tourniaire F., Andre M., Juhel C., Morange S., Amiot M. J., Lairon D. & Borel P. (2007),** Differential effect of dietary antioxidant classes (carotenoids, polyphenols, vitamins C and E) on lutein absorption. *Br J Nutr* 97, 440-446.
- Rhayour K. (2002).** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. *Thèse Doctorale*. Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Faculté des Sciences Dhar Mehraz, Fès.
- Rodov V., Ben-Yoshua S., Fang D. Q., Kim J. J., Ashkenazi R. 1995.** Preformed antifungal compounds of lemon fruit: *Citral* and its relation to disease resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, pp. 1057– 1061.
- Romero C, Medina E, Vargas J, Brenes M et De Castro A. (2007).** *In vitro* activity of olive polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (3): 680-686.
- Rota M.C., Herrera A., Martínez R.M., Sotomayor J.A., ET Jordán M.J. (2008).** Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, **19**, 681 – 687.
- Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., ET Jordán, M. J. (2008).** Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, **19(7)**, 681–687.
- Ruiz L.F., Rodriguez A.G. O., Fernandez M.H., Marquez A. J., Pozo P. L. D., Bernardino J. M., Ayuso T. R. et Ojeda M. U., (1999).** Consejería de Agricultura y pesca. 2eme Ed. *Informaciones técnicas comunidad europea*. Pp. 17-44.
- Ryan, K. J. (2004).** *Candida*, *Aspergillus*, and Other Opportunistic Fungi. In Ryan, K.J. and Ray, C.G. (Ed.), *Sherris Medical Microbiology* (4th ed., pp. 659-668). USA: mcgraw-Hill.

## S

**Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J.,**

**Sanon A. Garba M. Auger J. et Huignard J., 2002.** Activity of methylisothiocyanate on *Callosobruchus maculatus* F (Coleoptera : Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Stor. Prod. Res.* 38, PP 129-138p.

**Santhosha SG, Jamuna P, Prabhavathi SN. Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: A review. Food Biosci. 2013;3:59-74.**

**Schroeder M.P and Messing A.M.,** Methods for comparing the antibacterial activity of essential oils and other aqueous insoluble compounds, *Bull Nat. Formulary Comm*, 17, 213-218, 1949.

**Sekour B., (2012).** Phytoprotection de l'huile d'olive vierge (H.O.V.) par ajout des plantes végétales (*thym, ail, romarin*). *Mag. Université de Boumerdes*, 127 p.

**Servilli M., Selvaggini R., Esposto S., (2004).** Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography* (1054): 113-127.

**Shahidi F et Zhong Y., (2005).** Lipid oxydation: measurement methods. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, p. 357-386.

**Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L.** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five import food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 1998; 26:118-122.

**Soto Mendivil E.A., Moreno Rodríguez J.F., Estarrón Espinosa M., García Fajardo J.A., Obledovázquez E.N. (2006).** Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*. *E-Gnosis*. 4: 1- 7.

**Sousa, A., Casal, S., Malheiro, R., Lamas, H., Bento, A., & Pereira, J. A. (2015).** Aromatized olive oils: Influence of flavouring in quality, composition, stability, antioxidants, and antiradical potential. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 22-28.

**Sousa, A., Casal, S., Ricardo Malheiro, R., Hugo, L., Albino, B. Et Pereira, J.A., (2015).** Aromatized olive oils: Influence of flavouring in quality, composition, stability, antioxidants, and antiradical potential. *Food Science and Technology*. 60, 22-28.

## 7

**Tanouti K., Serghini –Cald H., Chaleb E., Benalt A., Harkous M., Elamrani A., (2011).** Amélioration qualitative d'huiles d'olive produites dans le Maroc oriental .Les technologies de laboratoires. Volume 6, n°22.

**Tanouti K., Serghini-Caid, H., Chaieb, E., Benali, A., Harkous, M. & Elamrani, A. (2011).** Amelioration qualitative d'huiles d'olive produites dans le maroc oriental : Quality

Improvement of Olive Oils Produced In The Eastern Morocco. *Les Technologies de Laboratoire*. 6, 22, 1-12.

**Tanouti, K., Elamrani, A., Serghini-Caid, H., Khalid, A., Bahetta, Y., Benali, A., Harkous, M. & Khiar, M. (2010).** Caractérisation d'huiles d'olive produites dans des coopératives pilotes (Iakrarma et Kenine) au niveau du Maroc oriental. *Les Technologies de Laboratoire*. 5, 18-26.

**Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., and Polissiou M. (2005).** Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (*Lamiaceae*). *Food Chemistry*. 90: 333-340. (cited in Yakhlaf G, 2009)

**Teuscher, E., Anton R. Et Lobstien, A. (2005).** Effets délétères de certaines plantes aromatiques et leurs huiles essentielles. In : épices, aromes, condiment et huiles essentielles. Editions Lavoisier, Tec and Doc. Paris, France. 26-32.

**Tongnuanchan P., Benjakul S. (2014).** Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*. 79 (7): R1231-R1249.

**Touahri, A. M. Et Boughari, S. K. (2014).** Action des poudres et des huiles essentielles de quelques plantes médicinales sur *Sitophilus oryzae* (Curculionidés Coléoptères). *Memoire de Master en Agronomie*, Département de biologie. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen : 47 p.

**Trogia, P. (2014).** 150 fiches visuelles de biologie. Paris: Dunod.

**Tuck K.L. et Hayball P.J. (2002).** Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(11): 636-644.

**Tungel G. and Nergiz C. 1993.** Antimicrobial effect of some olive phenols in a laboratory medium. *Letters in Applied Microbiology*, 17 : 300-302.

**Tura D , Gigliotti C , Pedo S , Failla O , Bassi D , and Serraiocco A. (2007).** Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea Europea L.*) and correlations with oxidative stability. *Scientia Horticulturae*. 112, 108–119.

U

**Uzzan A, (1992)** « Fruits oléagineux et leurs huiles : olive et huile d'olive » in Karleskind A : manuel des corps gras. Tome 1. Ed : *Technique et documentation*. Lavoisier. Paris. P 787.

**Uzzan A, (1992)** « Les corps gras » in Dupan H, Cuq J-L, Malewlak M-L, Leynaud-Rouaud C et Berthier A-M : *Alimentation et nutrition humaine*. Ed : E.S.F. Paris. P 1533.

**Uzzan A., (1992).** Les corps gras in : Dupin H, Jean-Louis C, Malewiak M-I, Leynaud-Rouaud C, Berthier A-M. *Alimentation et nutrition humaine*. Ed ESF. P 887, 906, 907, 1248.

V

**Veillet S., Tomao V., Chemat F. (2010)** Ultrasounds assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. *Food Chemistry*. Publication acceptée.

**Veldhuizen E. J., Tjeerdsma-van Bokhoven J. L., Zweijtzer C., Burt S. A., Haagsman H. P. 2006.** Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, pp. 1874–1879.

*W*

**Walsh, S. E., J.-Y. Maillard, et al. (2003).** "Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria" *Journal of Applied Microbiology* **94- 2**: (240-247).

*Y*

**Yadav M.K., Chaudasama C.D.et Jasra R.V.2004.** Isomerisation of  $\alpha$ -pinene using modified montmorillonite clays, *J.Mol. Catal. A Chem.*, **216** : 51-59.

**Yang, Y., Song, X., Sui, X., Qi, B., Wang, Z., Li, Y. et Jiang, L. (2016).** Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability. *Industrial Crops and Products*. **80**, 141-147

*Z*

**Zhiri A., Baudoux D.** Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. *Inspir développement* (2005). 80p.

**Sitographie :**

<http://www.google.dz/search?q=structure+de+la+bacterie&source>.

# ***ANNEXES***

## Annexe I

### Matériels biologiques

Matériels	Photos (originales 2022).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	 A petri dish containing a yellowish-brown agar medium. The surface shows a confluent, slightly irregular bacterial growth. The letters 'P.A.' are handwritten in green marker on the top edge of the dish.
<i>Escherichia coli</i>	 A petri dish containing a yellowish-brown agar medium. The surface shows a confluent bacterial growth. The letters 'E.C.' are handwritten in green marker on the top edge of the dish.
<i>Bacillus subtilis</i>	 A petri dish containing a yellowish-brown agar medium. The surface shows a confluent bacterial growth. The letters 'B.S.' are handwritten in green marker on the top edge of the dish.
<i>Staphylococcus aureus</i>	 A petri dish containing a yellowish-brown agar medium. The surface shows a confluent bacterial growth. The letters 'S.A.' are handwritten in green marker on the top edge of the dish.

## Annexe II

### Matériels non Biologiques

Appareillage	Les verreries et autre	Les produits chimiques et les solvants
-Balance de précision, -Clevenger. -Hôte. -Plaque chauffante. -Bain marie. -Etuve d'incubation. -Bec bunsen. -Balance. -Spectromètre. -Rota vapeur. - Autoclave. -GC/MS. -Infrarouge. -GC/FID. -UV. -Ultrasons. -Vortex. -Centrifugeur. -Distillateur.	- Eprouvette. - Chauffe ballon. - Erlen Meyer. - Fiole. - Becher. - Boite de pétri. - Disques en papier. - Fioles jaugées. - Pipettes de Pasteure. - Pipettes graduée. - Pince de laboratoire. - Pycnomètre. - Tubes en verre. - Les flacons. - La micropipette. - Entonnoir.	- Méthanol. - Ethanol. - Cyclohexane. - Chloroforme. - Acide Acétique Glacial. - Iodure de Potassium. - Diéthyle éther. - Heptane. - Hexane. - DPPH. - Folin-Ciocalteu. - Carbonate de sodium. - Hydroxyde de potassium. - Thiosulfate de sodium. - Eau distillée. - Eau de javel. - Eau physiologique.

## Annexe III

### Les plantes médicinales étudiées



*Citrus limon L.*



*Thymus vulgaris L.*



*Allium sativum L.*

## Annexe IV

### Appareillages



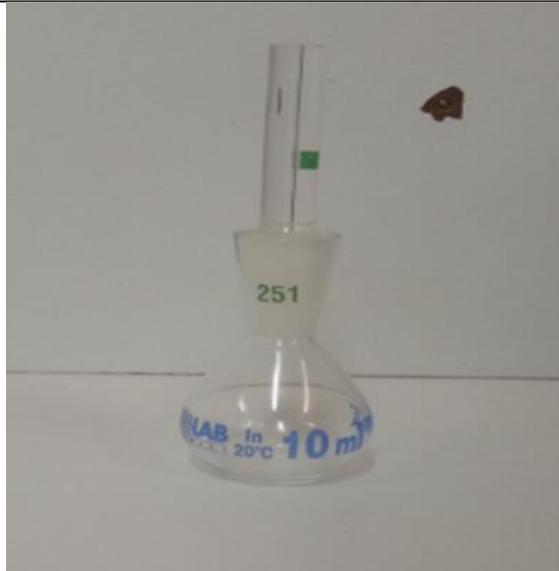
**Fig 1 : Spectromètre UV la marque Specord 210 Plus (Originale 2022).**



**Fig 2 : Spectromètre IR TF la marque ALPHA (Photo originale2022).**



**Fig 3 : Centrifuge model 2698. (Photo originale 2022).**



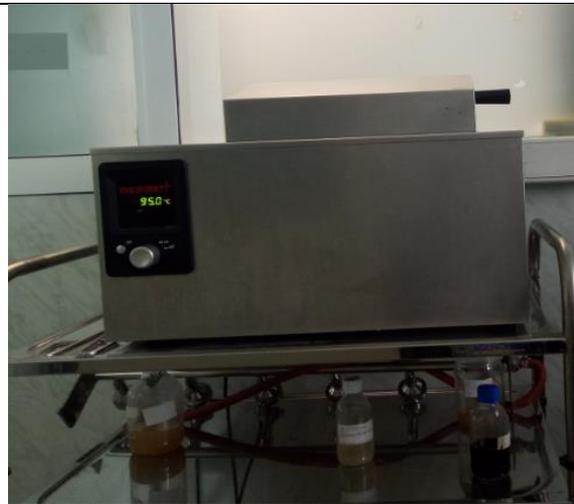
**Le pycnomètre**



**Agitateur type vortex (Stuart)**



**La balance**



**Le bain marie**



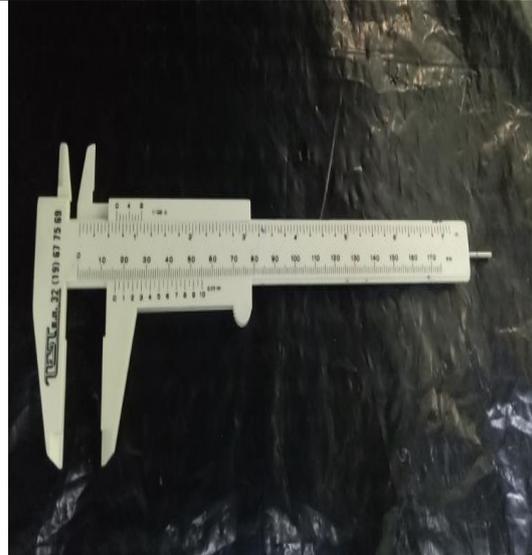
**Ultraviolet (pour la Stérilisation).**



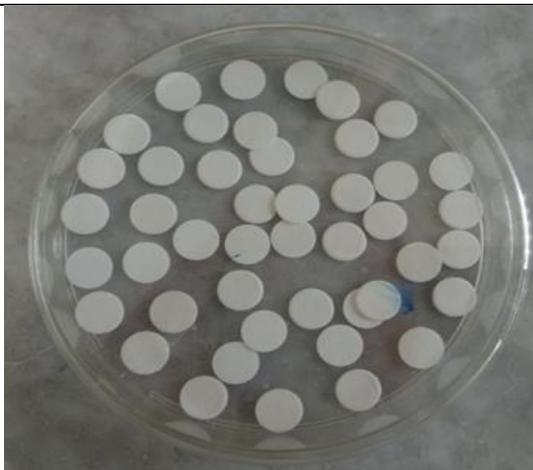
**Etuve (MEMMERT)**



**Bec bunzen.**



**Pied à coulisse.**



**Disque absorbant 9mm.**



**Milieux de culture déshydrate.**



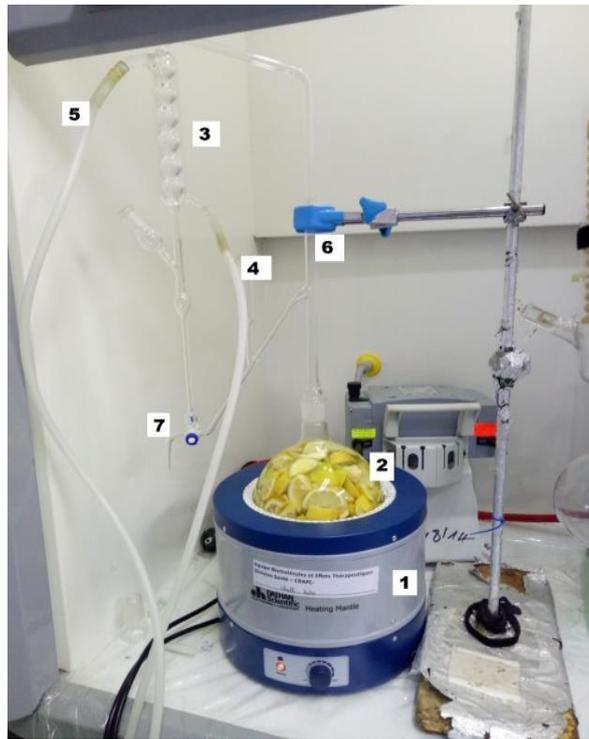
**Oléodoseur**



**GC/MS**

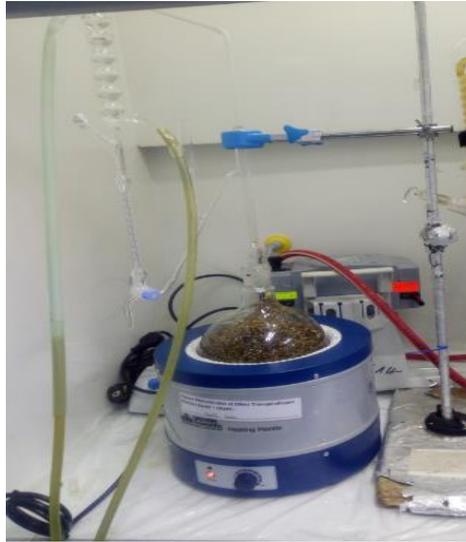
## Annexe V

### Montage de Clevenger



**Fig 1 : montre l'extraction d'huile essentielle du citron**

- 1. Le Chauffe ballon.**
- 2. Le Ballon (eau distille + citron).**
- 3. Réfrigérant.**
- 4. Entrée l'eau froide.**
- 5. Sortie l'eau chaude.**
- 6. Potence.**
- 7. Robinet pour récupérer l'huile essentielle.**



**Figure montre l'extraction d'huile essentielle du thym  
(Photo originale 2022).**



**Figure montre l'extraction d'huile essentielle de l'ail  
(Photo originale 2022).**

## Annexe VI

### Milieux de culture

#### Mueller Hinton « MH »

Mueller-Hinton (gélose) (g/l) est une gélose riche pour la réalisation d'antibiogramme standard

**Ingrédients** : Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Extrait de viande de bœuf .....2g.

Peptone de caséine .....17.5 g.

Amidon de maïs ..... 1.5 g.

Agar ..... 17 g.

pH final à 25°C : **7,3 ± 0,1**.

#### **Préparation :**

- Mettre en suspension 65 g du milieu dans un 1 litre d'eau distillée stérile.
- Mélange bien et dissoudre en chauffant avec une agitation fréquente.
- Faire bouillir pendant une minute jusqu'à dissolution complété.
- Distribuer le milieu dans des flacons en verre et stériliser en autoclave à 118°C pendant 15minutes.
- Eviter la surchauffe.
- Laisser refroidie à 40-50C°.

## Milieu Sabouraud (g/l)

La gélose Sabouraud permet la croissance et l'isolement d'une grande variété de levures et moisissures.

### Ingrédients :

Dextrose .....40g

Peptone de caséine.....10g

Chloramphénicol ..... 0.05

Agar .....15 g

pH =  $5.6 \pm 0.2$  T 25C°.

- Mettre en suspension 38 g du milieu dans un 1 litre d'eau distillée stérile.
- Mélange bien et dissoudre en chauffant avec une agitation fréquente.
- Faire bouillir pendant une minute jusqu'à dissolution complété.
- Distribuer le milieu dans des flacons en verre et stériliser en autoclave à 118°C pendant 15minutes.
- Eviter la surchauffe.
- Laisser refroidir à 40-50C°.

## **Milieu Gélose Nutritive « GN » (g/l).**

### **La gélose Nutritive pour le Repiquage les souches microbiennes**

#### **Ingrédients :**

Extrait de viande .....	01 g
Extrait de levure .....	02 g
Peptone.....	05 g
Chlorure de sodium.....	05 g
Agar-agar.....	15 g

pH=7,4 ; T 25C°.

#### **Preparation:**

- Mettre en suspension 38 g du milieu dans un 1 litre d'eau distillée.
- Mélange bien et dissoudre en chauffant avec une agitation fréquente.
- Faire bouillir pendant une minute jusqu'à dissolution complété.
- Distribuer le milieu dans des flacons en verre et stériliser en autoclave à 118°C pendant 15minutes.
- Eviter la surchauffe.
- Laisser refroidir à 40-50C°.

## Annexe VII

### Profils d'analyses chimiques GC/MS des huiles essentielles étudiées

#### ✓ *Allium sativum L*

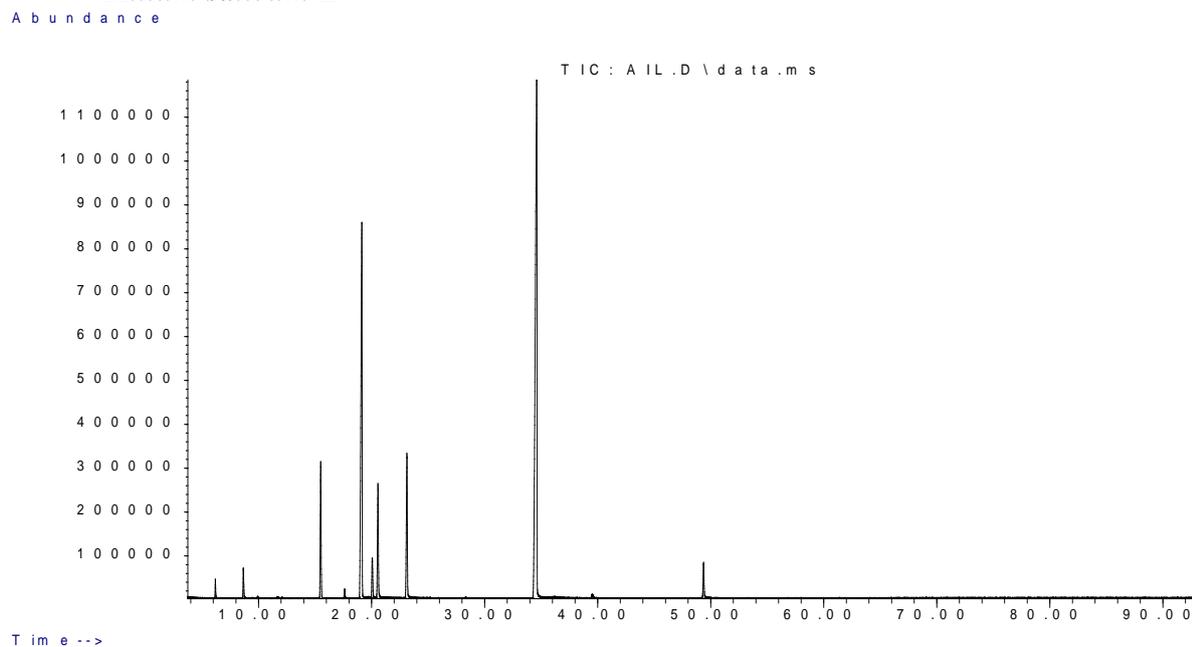


Fig 1 : Chromatogramme GC-MS de l'*Allium sativum L*.

#### ✓ *Citrus limon L*

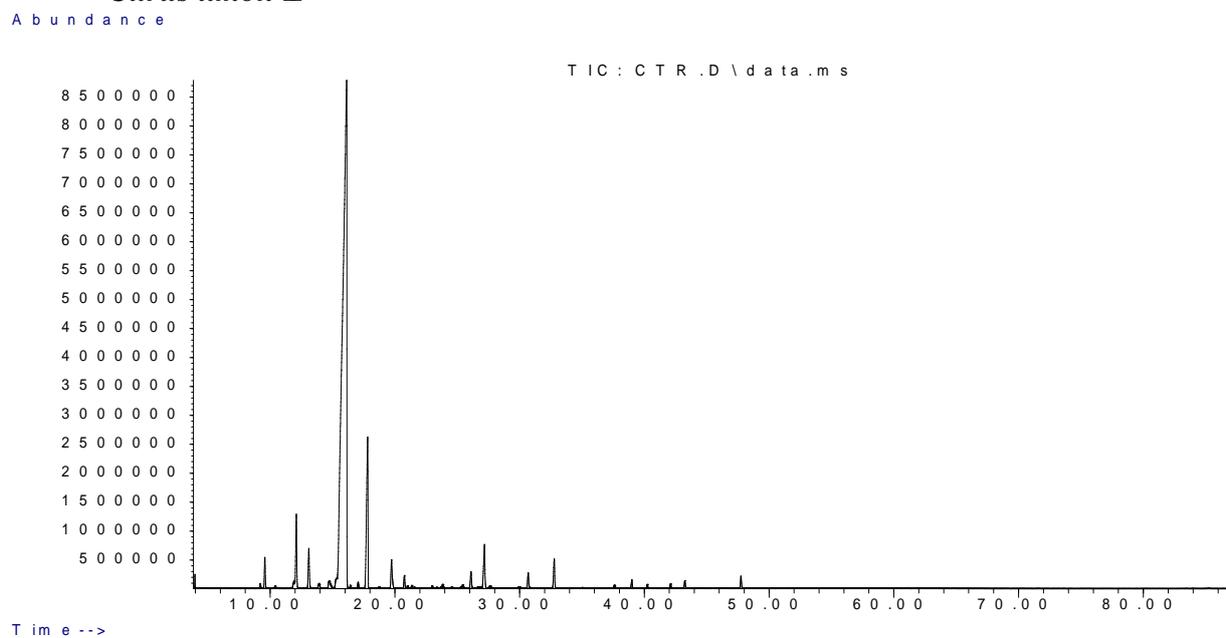
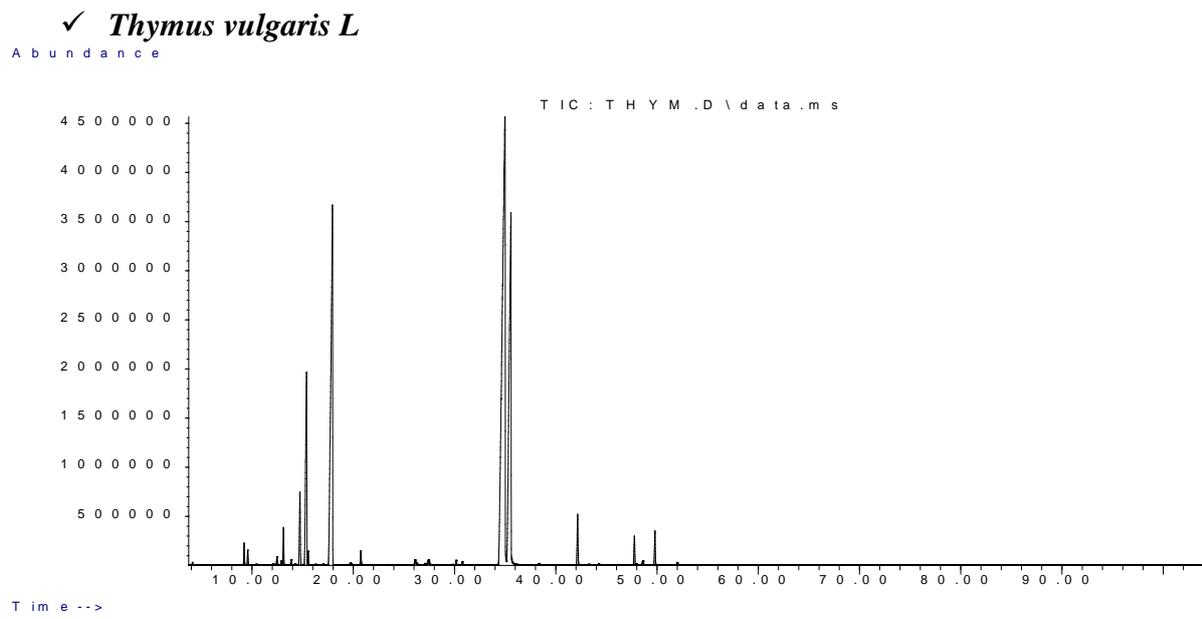


Fig 2 : Chromatogramme GC-SM de *Citrus limon L*.



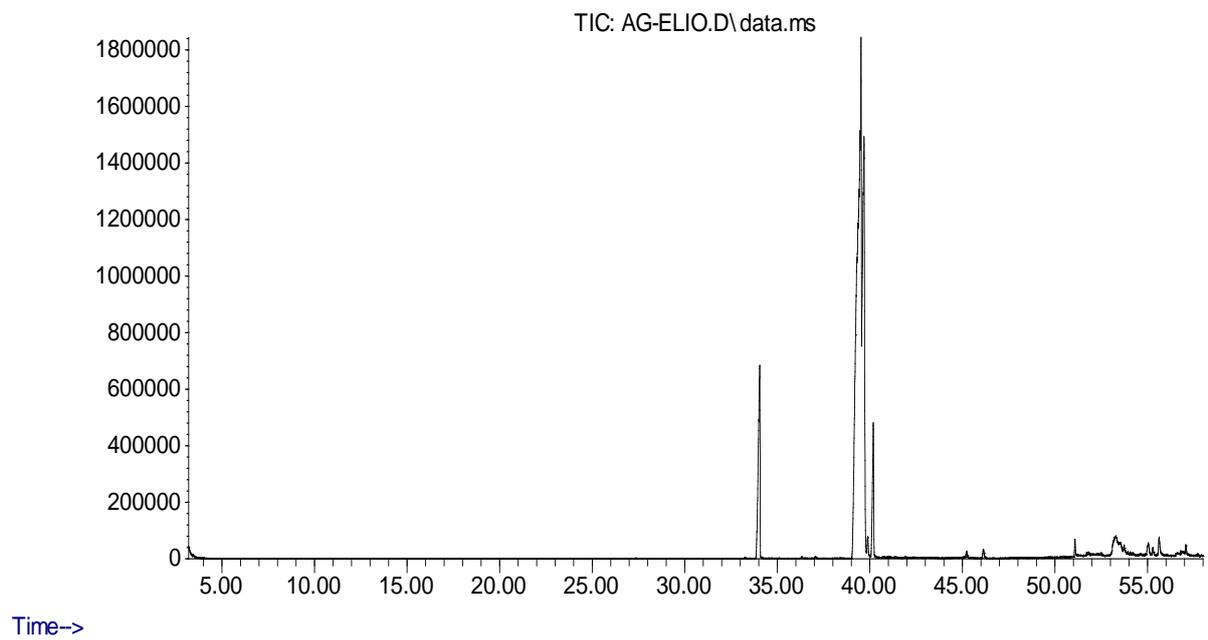
**Fig 3 Chromatogramme GC-MS du *Thymus vulgaris L*.**

## Annexe VIII

### Profils des Acides Gras par GC/MS des huiles végétales et les huiles aromatisées.

#### ✓ Huile ELIO

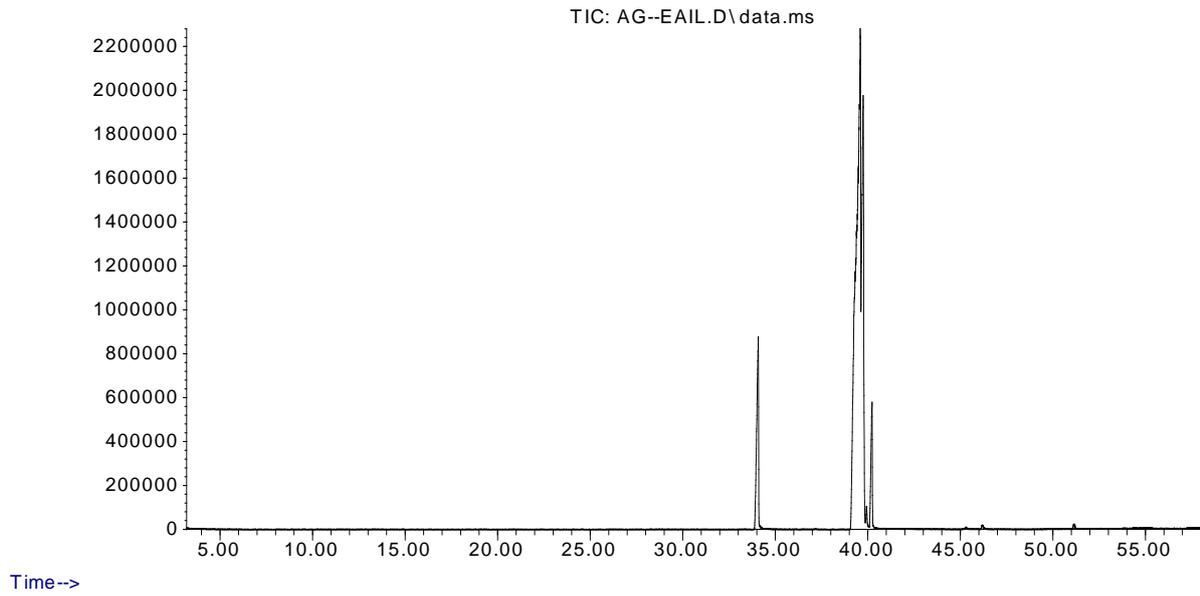
Abundance



**Fig 1 : Chromatogramme GC-MS huile Elio.**

✓ **ELIO +Ail**

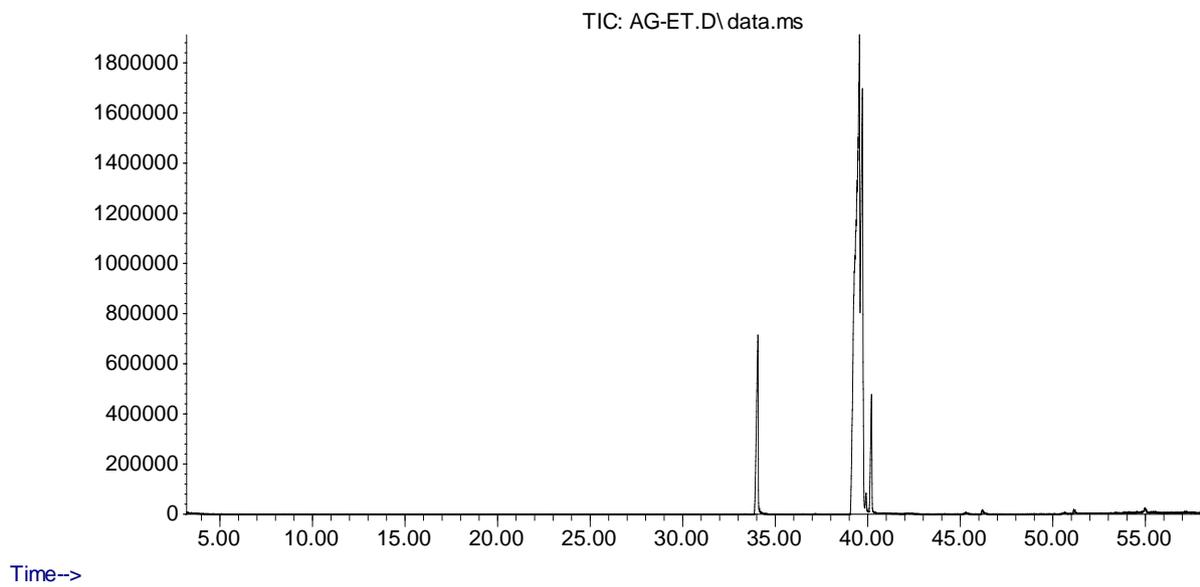
Abundance



**Fig 2 : Chromatogramme GC-MS Elio + Ail**

✓ **ELIO +Thym**

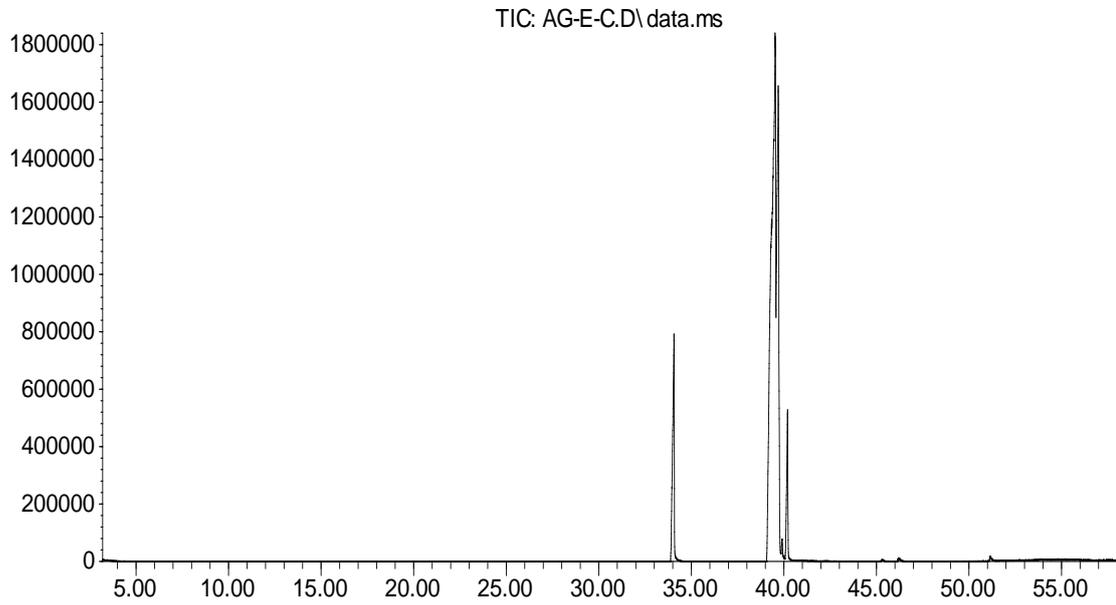
Abundance



**Fig 3 : Chromatogramme GC-MS Elio + Thym.**

✓ **ELIO +Citron**

Abundance

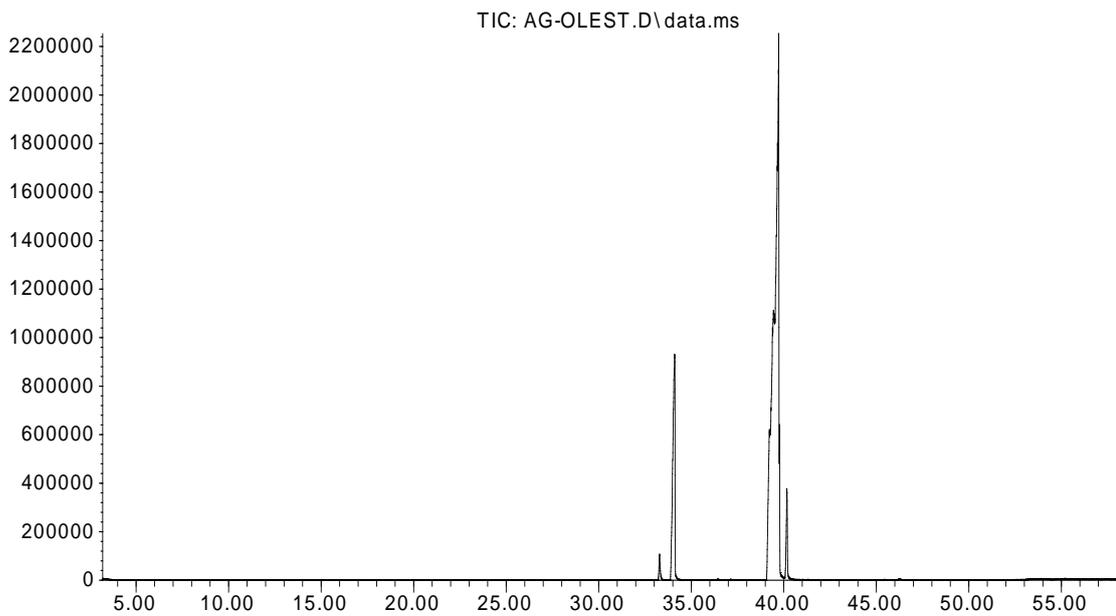


Time-->

**Fig 4 : Chromatogramme GC-MS Huile Elio +Citron**

✓ **Huile Oléastre**

Abundance

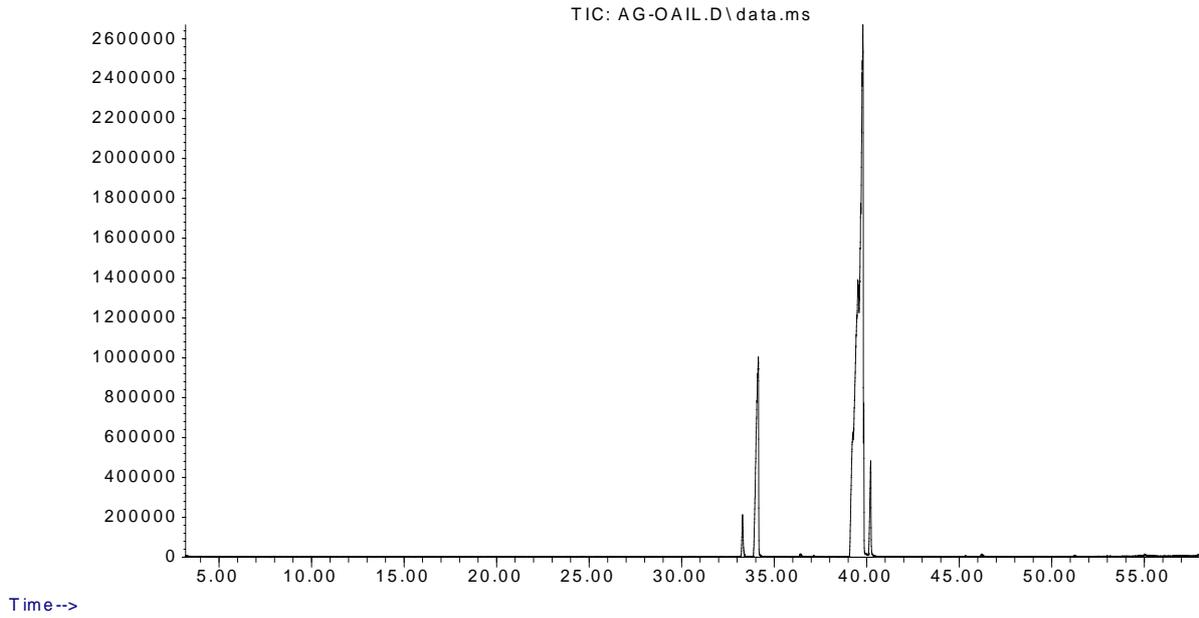


Time-->

**Fig 5 : Chromatogramme GC-MS du huile Oléastre**

✓ Oléastre + Ail

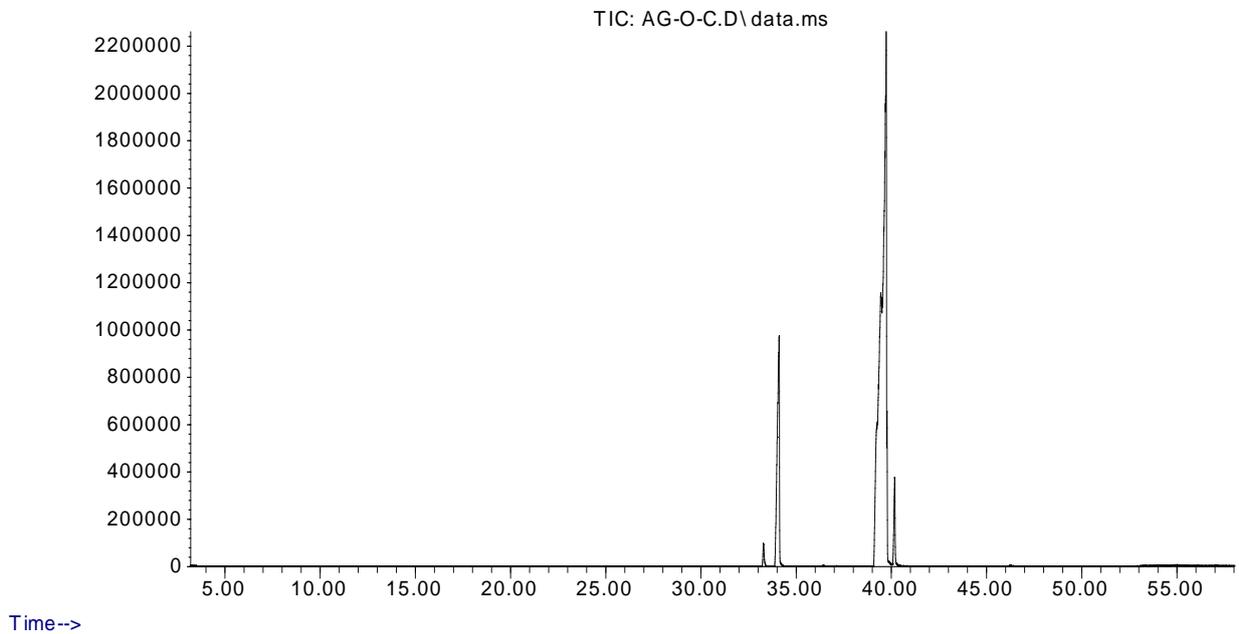
Abundance



**Fig 6 : Chromatogramme CG-MS du Oléastre + Ail**

✓ Oléastre + Citron

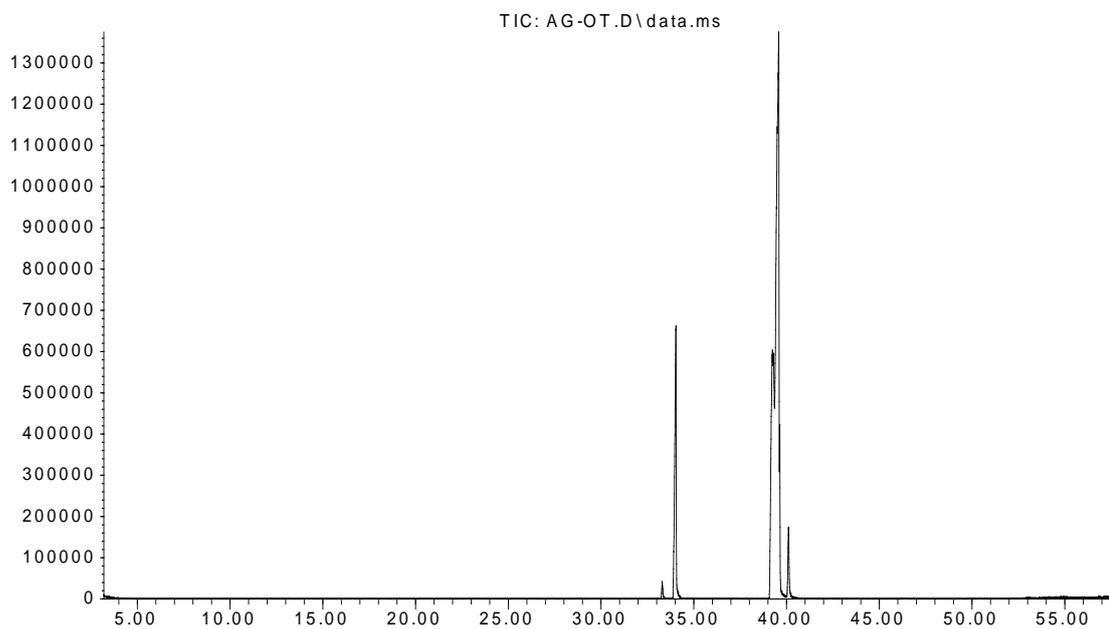
Abundance



**Fig 7 : Chromatogramme GC-MS du Oléastre + Citron.**

✓ Oléastre + Thym

Abundance

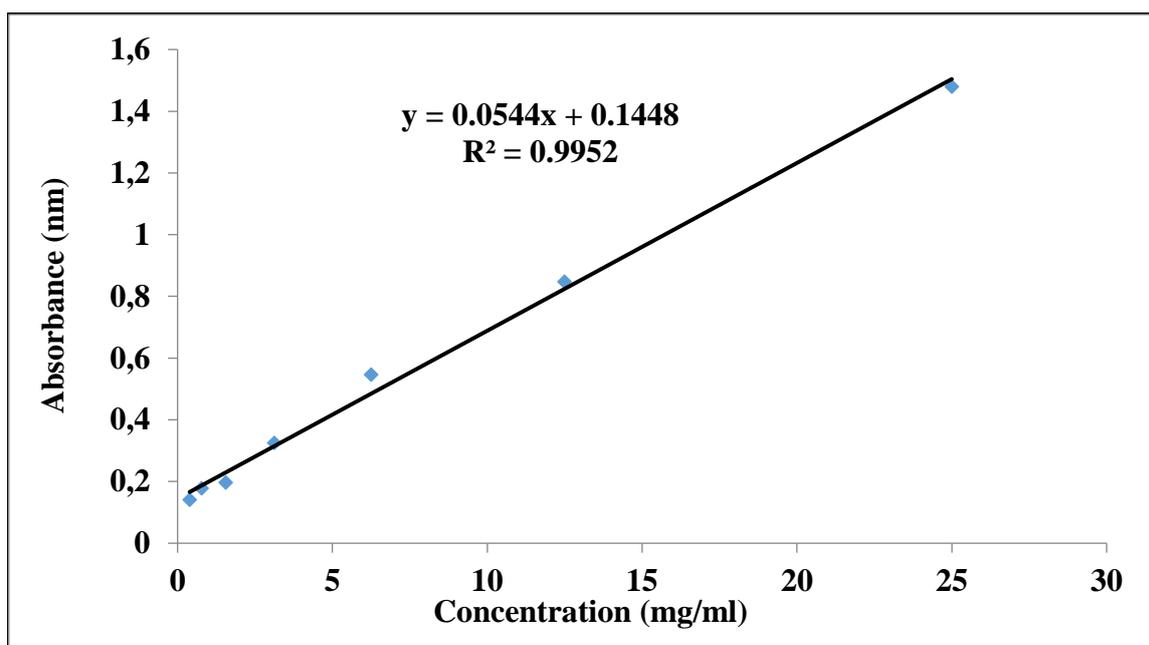


Time-->

**Fig 8 : Chromatogramme GC-MS du Oléastre + Thym.**

## Annexe IX

La courbe d'étalonnage Acide Gallique

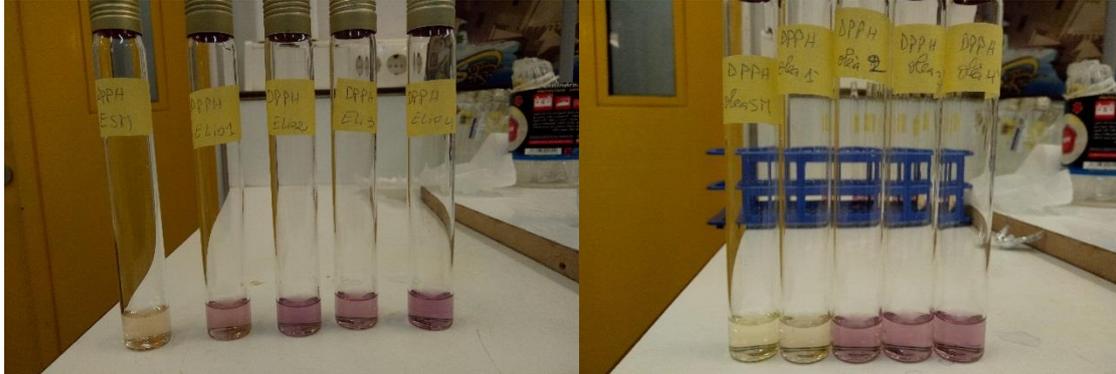


✓ (Les composés phénoliques des échantillons étudiés)

O	OC	OA	OT	E	EC	EA	ET
159,98	163,03	159,51	170,23	16,29	17,14	18,29	22,28

## Annexe X

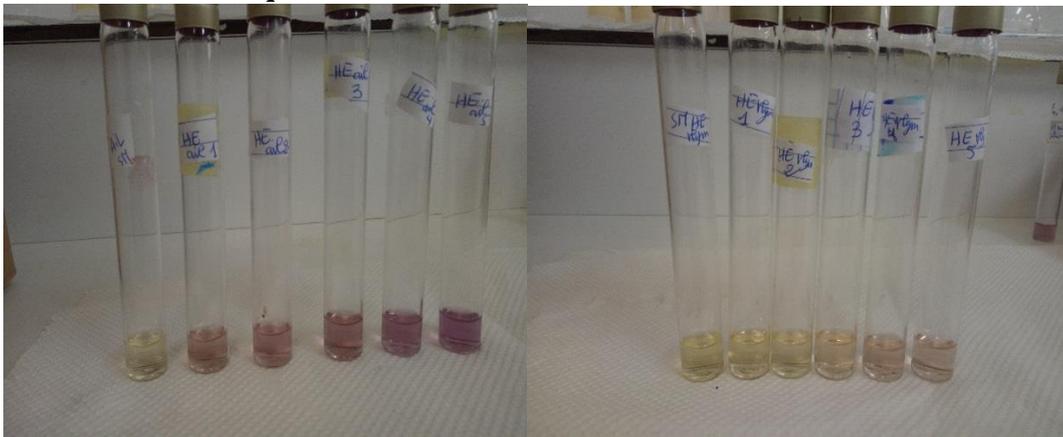
### ✓ Le test colorimétrique de DPPH des huiles végétales :



**Huile Elio.**

**Huile d'Oléastre.**

### ✓ Le test colorimétrique de DPPH des huiles Essentielles :



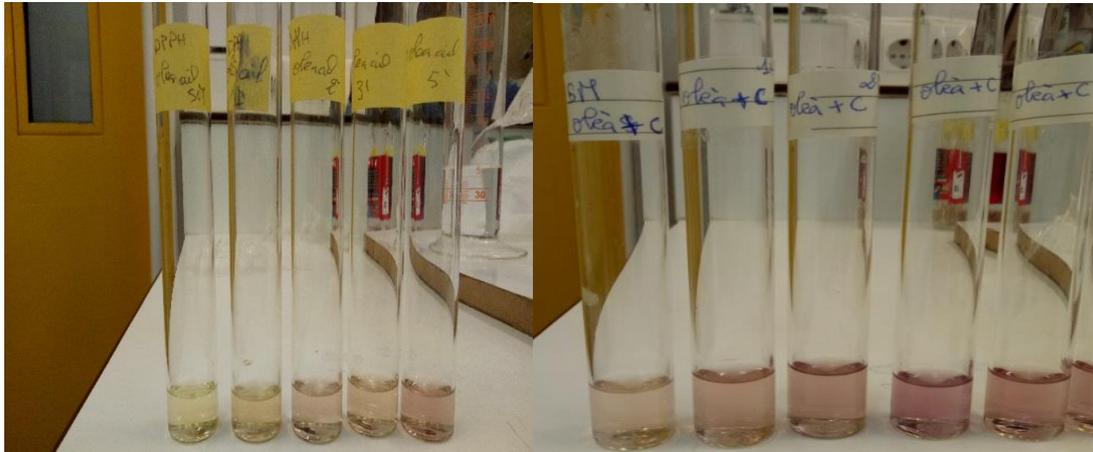
**Huile Essentielle de l'Ail.**

**Huile Essentielle du Thym.**



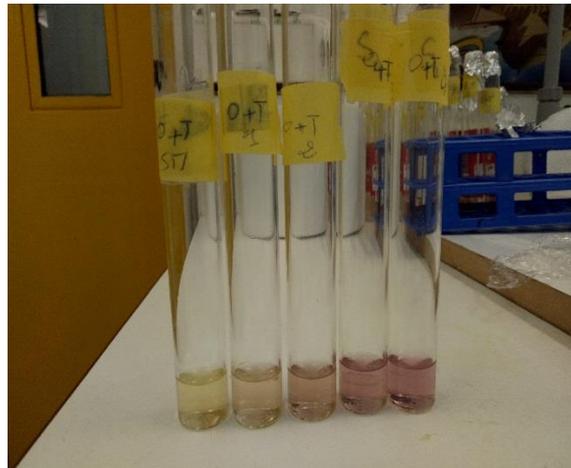
**Huile Essentielles du Citron.**

✓ **Le test colorimétrique de DPPH des huiles végétales Aromatisées :**

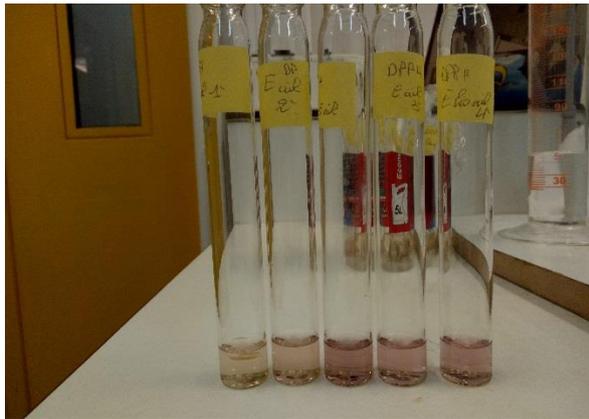


**Huile Oléastre +HEs Ail.**

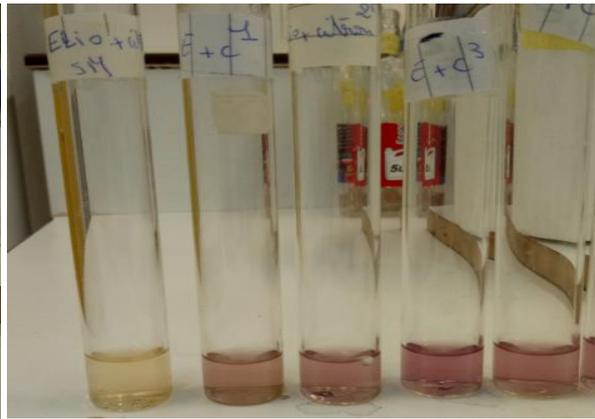
**Huile Oléastre +HEs Citron.**



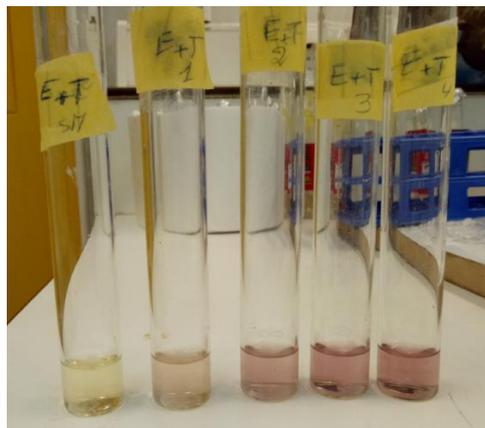
**Huile Oléastre + HEs Thym.**



**Huile Elio + HES Ail.**



**Huile Elio + HES Citron.**



**Huile Elio +HES Thym.**

✓ **Tableau.1. L'activité antioxydante des échantillons avant et après l'aromatisation**

	1%	5%	10%	20%	50%	100%
VIT C	32,190	42,780	94,270	94,200	94,211	95,211
BHT	9,380	17,210	30,210	45,121	72,120	87,250
HES Citron	15,18	25,96	45,84	52,17	58,12	72,14
HES Thym	18,64	35,14	45,98	63,52	66,15	82,17
HES Ail	16,56	33,65	46,35	59,23	62,19	80,23
E	<b>3,18</b>	<b>8,14</b>	<b>16,21</b>	<b>33,44</b>	<b>41,04</b>	<b>41,25</b>
EA	2,03	5,17	14,12	20,15	26,54	32,12
EC	1,13	3,22	9,32	17,21	21,61	28,15
ET	1,07	3,15	8,96	16,54	20,53	27,89
O	<b>15,32</b>	<b>22,63</b>	<b>41,62</b>	<b>53,36</b>	<b>60,52</b>	<b>73,21</b>
OA	10,03	18,32	25,02	36,41	40,12	52,32
OC	8,04	15,23	22,12	34,18	40,09	49,12
OT	7,65	14,12	21,84	33,12	38,14	45,12