

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

Université BLIDA 1

Faculté des Sciences

Département de Chimie



Mémoire Présenté par

BOUNAAS Karima

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière
Filière : Chimie
Option : Chimie des Substances Naturelles

Titre

**Optimisation par plan d'expériences de l'extraction de l'huile
essentielle de *Carum carvi L.* assistée par l'enzyme. Evaluation
de son activité antimicrobienne et antioxydante**

Soutenu publiquement en Septembre 2014 devant le jury composé de :

Y. Daghbouche	Pr	Président	Université de Blida I
N. Bouzidi	MCB	Examineur	Université de Blida I
K. Boutemak	MCB	Promoteur	Université de Blida I

Promotion 2013-2014

ملخص

يتركز هذا العمل على نتائج دراسة حول تأثير المعالجة الأنزيمية لبذور كروية مع ثلاث أنزيمات (سلولاز، هميسلولاز، بكتيناز) على المحصول و الخصائص الفيزيائية و الكيميائية و النشاط البيولوجي لزيت الطياوة المستخلصة بطريقة التفطيربخار الماء

وأظهر تقييم تأثير تركيز الإنزيم، أن العائد من الزيت الطيارة الغير المعالجة قد ارتفع من 0.73 % الى (0.85%) بالنسبة لزيت الطيارة المعالجة بالبكتيناز، (0.93%) اميسلولاز و (1.01%) بالنسبة للزيت المعالجة بالسلولاز حسب التراكيز التالية 0.05، 0.1 و 0.5 (ث / ث) على التوالي. اما تأثير فترة حضانه، أعطى زيادة في الأداء لسلولاز مع فترة حضانه 30، 60، 90 دقيقة، بنسب للمحصول تقدر 93،0%، 0.97%، 0.99%، بعكس بكتيناز و هميسلولاز أعطى العائد 1.01% و 0.92% لمدة حضانه 120 دقيقة

استخدام تصميم مركب المركزي في دراسة المعالجة المسبقة لكروية بأنزيم سلولاز، كشفت أن تفاعل بسيط من "فترة حضانه"، والتفاعل بين "تأثير فترة حضانه - تركيز سلولاز" و تفاعل بسيط "تركيز سلولاز" كان له تأثير كبير على المحصول من الزيت العطري

أظهرت نتائج اختبار النشاط المضاد للجراثيم من طريقة نشر أجار فعالية عالية ضد جميع السلالات الميكروبية

وأظهر تقييم نشاط مضادات الأكسدة أن الزيت العطري لديه قدرة منخفضة المضادة للأكسدة بالمقارنة مع حامض الاسكوريك

الكلمات المفتاح : المعالجة الأنزيمية، النشاط المضادة للجراثيم والنشاط المضادة للأكسدة ، الزيوت الطيارة

Résumé

Ce travail présente les résultats d'une étude réalisée sur l'effet du prétraitement enzymatique de graines de *Carum carvi L.* avec trois enzymes (cellulase, hémicellulase et pectinase) sur le rendement, les propriétés physico-chimiques et l'activité biologique de l'huile essentielle de *Carum carvi L.* extraite par entraînement à la vapeur d'eau.

L'évaluation de l'effet de la concentration de l'enzyme a montré que le rendement en huile essentielle a augmenté de 0,73% sans prétraitement à (0,85%) pour le prétraitement avec la pectinase, (0,93%) pour l'hémicellulase et (1,01 %) pour la cellulase avec des concentrations de 0.05, 0.1 et 0.5 (w/w) respectivement. L'effet du temps d'incubation a donné une augmentation en rendement avec la cellulase pour la période d'incubation de 30,60 et 90 min de l'ordre 0,93%, 0,97%, 0,99%. Par contre, la pectinase et l'hémicellulase ont donné un rendement égale à 1,01% et 0,92% après 120min d'incubation.

L'utilisation d'un plan composite centré pour l'optimisation du prétraitement de carvi avec la cellulase a révélé que l'effet simple du « temps d'incubation », l'effet d'interaction « temps d'incubation - concentration de cellulase » et l'effet simple « concentration de cellulase » présentaient une influence significative sur le rendement en huile essentielle.

Les résultats des tests d'activité antimicrobienne effectués par la méthode de diffusion sur gélose ont montré une forte activité contre toutes les souches microbiennes.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH a montré que L'huile essentielle présente un pouvoir antioxydant faible par rapport à l'acide ascorbique.

Mots clés : Huile essentielle, *Carum carvi L.*, prétraitement enzymatique, activité antimicrobienne, activité antioxydante.

Abstract

This work has the results of a study carried out on the effect of enzymatic pretreatment on *Carum carvi L. seed*, with three enzymes (cellulase, hemicellulase and pectinase) on the yield, the physicochemical properties and biological activities of the *Carum carvi L essential oil*. extracted by steam distillation.

Evaluation of the effect of enzyme concentration showed that essential oil yield increased from (0,73%) without pretreatment to (0,85%) with pectinase pretreatment, (0,93%) for hemicellulase and (1,01 %) for cellulase with concentrations of 0,05, 0.1 and 0,5 (w/w) respectively. The effect of incubation time gave an increase in yield with cellulase for incubation period of (30,60 and 90 min) in the order of (0 ,93%, 0,97 %, 0,99%). On the other hand, the pectinase and hemicellulase gave a yield equal to(1,01%) and (0,92%) after 120min of incubation.

The use of composite centered design for caraway pretreatment optimization with cellulase revealed that simple effect of "incubation time", the interaction between "incubation time-cellulase concentration" and the simple effect" cellulose concentration "presented a significant influence on the essential oil yield.

The results of antimicrobial activity were carried out using agar diffusion method showed a strong activity against all the microbial strains.

The evaluation antioxidant activity by DPPH radical screening assay showed that essential oil presents a low antioxidant capacity compared to the ascorbic acid.

Key words: Essential oil, *Carum carvi L.*, enzymatic pretreatment, antimicrobial activity, antioxidant activity.

Dédicaces

A la mémoire de ma mère

A mon père

A mon frère

A toute ma petite famille

Nesrine ; Nassiba ; Imad Eddine ; Walid ; Inasse

A tous ceux que j'aime

*A tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la
réalisation de ce travail.*

*Avec l'expression de tous mes sentiments de respect,
Je dédie ce modeste travail.*

Remerciements

Avant tout je remercie mon cher père qui ma entouré de son amour, ses sacrifices, sa protection et de sa générosité durant toute la durée de mes études « Que dieu le protège ».

Mes sincères remerciements à ma promotrice Mme k. BOUTEMAK pour les enseignements qu'elle m'a prodigué, pour son encadrement et les conseils apportés tout au long de ce travail ainsi que pour la confiance qu'elle m'a témoignée au cours des manipulations.

Je remercie également Mr. M. EL HATTAB , professeur à Université de Blida I de m'avoir offert la possibilité de travailler dans un domaine qui me passionne.

Je désire aussi remercier Mme S. KASM , responsable du Master chimie des substances naturelles pour toute sa disponibilité et son aide et son soutien sur le plan scientifique et humain.

Un merci spécial pour tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.

Je remercie Mme Y.DEGHBOUCHE, professeur à l'Université de Blida I, d'avoir accepter de présider le jury de soutenance.

Je remercie également Mme N. BOUZIDI, maitre de conférences à l'Université de Blida d'avoir accepter de juger ce modeste travail.

Mes sentiments de reconnaissances et mes remerciements vont également à toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail, en particulier :Mr A.Barber ; Mr M. Lafri ;Mr R . Belala ; A Yahimi

Mme F. Zerman ; Mr S.Merdja ; H.khaled ; Mme K. Aouina ; Mme Z. Boumahdi ; Mr R .Belabbas ; Melle A. Mekerkeb ;Melle N.Ouakli .

Je n'oublie surement pas mes collègues et amies qui ont contribué par leur soutien et amitié, chacun par sa façon à la progression de mon travail dans une ambiance toujours amicale et stimulante.

Sommaire

Introduction générale	1
Partie théorique	
Chapitre I : Présentation de la plante	
I.1 Introduction	4
I.2. Systématique	4
I.3. Noms vernaculaires	5
I.4. Description botanique	5
I.5. Répartition géographique	7
I.6. Parties utilisées	7
I.7. Composition chimique de <i>Carum carvi L.</i>	7
I.8. Usages de <i>Carum carvi L.</i>	8
I.9. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés des graines de <i>Carum carvi L.</i>	9
I.9.1. Les huiles essentielles	9
I.9.2. Les extraits	13
Partie expérimentale	
Chapitre II : Matériel et méthodes	
II.1. Matériel	15
II.1.1. Matière végétale	15
II.1.2. Réactifs	15
II.2. Extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau	16
II.2.1. Détermination de la durée d'extraction de l'huile essentielle des graines de <i>Carum carvi L.</i>	16
II.2.2. Détermination de l'influence de la masse végétale à traiter	16
II.2.3. Protocole expérimental d'extraction de l'huile essentielle	17
II.3. Prétraitement enzymatique	17
II.3.1. Mode opératoire	18
II.4. Calcul du rendement en huile essentielle	19

II.5. Optimisation de l'extraction assistée par l'enzyme	19
II.5.1. Optimisation de la concentration et du temps d'incubation des enzymes dans le Prétraitement	19
II.5.2. Optimisation par plan d'expériences de l'extraction assistée par la cellulase	20
II.5.3. Choix du domaine expérimental	23
II.6. Propriétés physico-chimiques et organoleptiques	24
II.7. Activités biologiques	24
II.7.1. Activité antimicrobienne	24
II.7.1.1. Aromatogramme	24
II.7.1.2. Microorganismes utilisés	25
II.7.1.3. Milieux de culture	26
II.7.1.4. Protocole expérimental	26
II.7.2. Activité antioxydante	27
II.7.2.1. Méthode au DPPH	27
II.7.2.2. Mode opératoire	28

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1 Extraction de l'huile essentielle des graines de <i>Carum carvi L.</i> par entraînement à la vapeur d'eau	30
III.1.1. Les paramètres influençant le rendement en huile essentielle	30
III.1.1.1. Influence du temps d'extraction	30
III.1.1.2. Influence de la masse végétale	30
III.1.1.3. Evolution du rendement en HE en fonction du temps	32
III.1.1.4. Influence de prétraitement enzymatique	34
III.1.1.4.a. Influence de la concentration d'enzyme	34
III.1.1.4.b. Influence du temps d'incubation	36
III.1.2. Optimisation des conditions expérimentales par la méthodologie des plans d'expériences	38
III.1.2.1. Expérimentation	38
III.1.2.2. Etude des effets du temps d'incubation et de la concentration de la cellulase sur le rendement en huile essentielle	39
III.1.2.2.1. Analyse de la variance « ANAVAR »	39
III.1.2.2.2. Analyse graphique des résultats	40
III.1.2.2.2 a. Diagramme de Pareto	40

III.1.2.2.2 b. Les effets simples	41
III.1.2.2.3. Modèle mathématique	42
III.1.2.2.4. Définition des conditions optimales	43
III.1.2.2.4. a. surface de réponses	43
III.1.2.2.4. b. Conditions optimales	44
III.2.Caractérisation de l'huile essentielle de <i>Carum carvi</i> L. sans et avec Prétraitement enzymatique	44
III.2.1. Propriétés organoleptiques	45
III.2.2. Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Carum carvi</i> L	45
III.3.Activités biologiques	
III.3.1. Activité antimicrobienne	47
III.3.2.Activité antioxydante	52
Conclusion	58
Références bibliographiques	60

Liste des tableaux

Tableau 1 : Effet du déficit d'eau sur la composition chimique de l'huile essentielle de graines de <i>Carum carvi L</i>	10
Tableau 2 : La teneur (%) des principaux composés de l'huile essentielle de <i>carum carviL</i> . avec ou sans traitement	11
Tableau 3 : Comparaison des constituants des huiles essentielles de <i>Carum carviL</i>	12
Tableau 4 : Plan d'expérience de Box -Wilson à 2 facteurs	22
Tableau 5: Domaine d'étude des facteurs	23
Tableau 6 : Liste des souches microbiennes testées	26
Tableau 7 : Variation du rendement en fonction du temps d'extraction	30
Tableau 8: Influence de la masse de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle	31
Tableau 9 : L'évolution du rendement en fonction du temps	32
Tableau 10 : Influence de la concentration de l'enzyme	34
Tableau 11 : Influence du temps d'incubation	36
Tableau 12 : Expériences réalisées dans le plan expérimental et réponses obtenues	38
Tableau13 : Analyse de la variance du rendement en huile essentielle	40
Tableau 14 : Effets estimés de coefficients	43
Tableau 15 : Les conditions optimales	44
Tableau16 : Propriétés organoleptiques de l'HE de <i>Carum carvi L</i>	45
Tableau17 : Propriétés physico-chimiques de l'HE de <i>Carum carvi L</i>	45
Tableau18: Résultats de l'activité antimicrobienne des quatre échantillons	47
Tableau 19a: Pourcentage de réduction du DPPH en fonction des concentrations des HES avant et après traitement enzymatique	53
Tableau 19b: Pourcentage de réduction du DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique	54
Tableau20 : EC50 et puissance antioxydante (ARP) des échantillons et standard	56

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes parties de <i>Carum carvi L</i>	4
Figure 2 : La plante de <i>Carum carvi L</i>	6
Figure 3 : Les graines de <i>Carum carvi L</i>	6
Figure 4 : La feuille de <i>Carum carvi L</i>	6
Figure 5 : (a) Localisation des structures sécrétrices dans la graine de carvi (b) Coupe transversale d'une graine jeune	8
Figure 6 : Constituants principaux de l'huile essentielle de <i>Carum carvi L</i>	14
Figure 7 : Carte géographique de la région de Médéa	15
Figure 8 : Dispositif expérimental de l'entraînement à la vapeur d'eau	17
Figure 9 : Illustration de la méthode d'aromatogramme	25
Figure 10 : Forme libre et réduite du DPPH	28
Figure 11 : Influence de la masse de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle	31
Figure 12 : L'évolution du rendement en fonction du temps	33
Figure 13a : Effet de la concentration de la cellulase sur le rendement en HE	35
Figure 13b : Effet de la concentration de l'hémicellulase sur le rendement en HE	35
Figure 13c : Effet de la concentration de la pectinase sur le rendement en HE	35
Figure 14a : Effet du temps d'incubation sur le rendement « cellulase »	37
Figure 14b : Effet du temps d'incubation sur le rendement « l'hémicellulase »	37
Figure 14c : Effet du temps d'incubation sur le rendement « la pectinase »	37
Figure 15 : Diagramme des effets standardisés sur le rendement	41
Figure 16 : Effet simples des paramètres opératoires sur le rendement	42

Figure 17: Surface de réponses correspondant au couple temps d'incubation- concentration de cellulase	44
Figure 18 : Huile essentielle de <i>Carum carvi L</i>	45
Figure 19a: Effet inhibiteur des quatre échantillons de l'huile essentielle des graines de <i>Carum carvi L</i> . sur la souche bactérienne <i>Escherichia col</i>	48
Figure 19b: Effet inhibiteur des quatre échantillons de l'huile essentielle des graines de <i>Carum carvi L</i> . sur la souche bactérienne <i>Salmonella typhimunium</i>	48
Figure 19c: Effet inhibiteur des quatre échantillons de l'huile essentielle des graines de <i>Carum carvi L</i> . sur la souche bactérienne <i>Staphylococcus aureus</i>	49
Figure 19d: Effet inhibiteur des quatre échantillons de l'huile essentielle des graines de <i>Carum carvi L</i> . sur la souche bactérienne <i>Bacillus subtilissubspizizenii</i>	49
Figure 19e : Effet inhibiteur des quatre échantillons de l'huile essentielle des graines de <i>Carum carvi L</i> . sur la souche du champignon <i>Aspergillus brasiliensis</i>	50
Figure 20: Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes	52
Figure 21 : Réduction du radical libre DPPH	52
Figure 22a: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de l'HE extraite des graines non traitées	54
Figure 22b : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique	54
Figure 22c : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de l'HE extraite des graines traitées avec hémicellulase	55
Figure 22d: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de l'HE extraite des graines traitées avec la pectinase	55
Figure 22e: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de l'HE extraite des graines traitées avec la cellulase	56

Liste des abréviations

Abs :Absorbance

AFNOR : Association Française de Normalisation

ARP : Puissance anti radicalaire

ATCC : American Type Culture Collection

CG-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

°C: Degré Celsius

DO : densité optique

DPPH : 2,2 -Diphényl-1- picryl hydrazyl

g : gramme

GSD : Gélose Sabouraud dextrose

GN : Gélose Nutritive

HE : huile essentielle

I_A : indice d'acide

I_E : indice d'ester

I_S : indice de saponification

I_R : indice de réfraction

Km : kilomètre

l : litre

LAM : laboratoire Algérien du médicament

M : mole

MH : Mueller Hinton

ml : millilitre

mg : milligramme

min : minute

mm : millimètre

M_{HE} : masse de l'huile essentielle

M_{mV} : masse matière végétale

nm : nanomètre

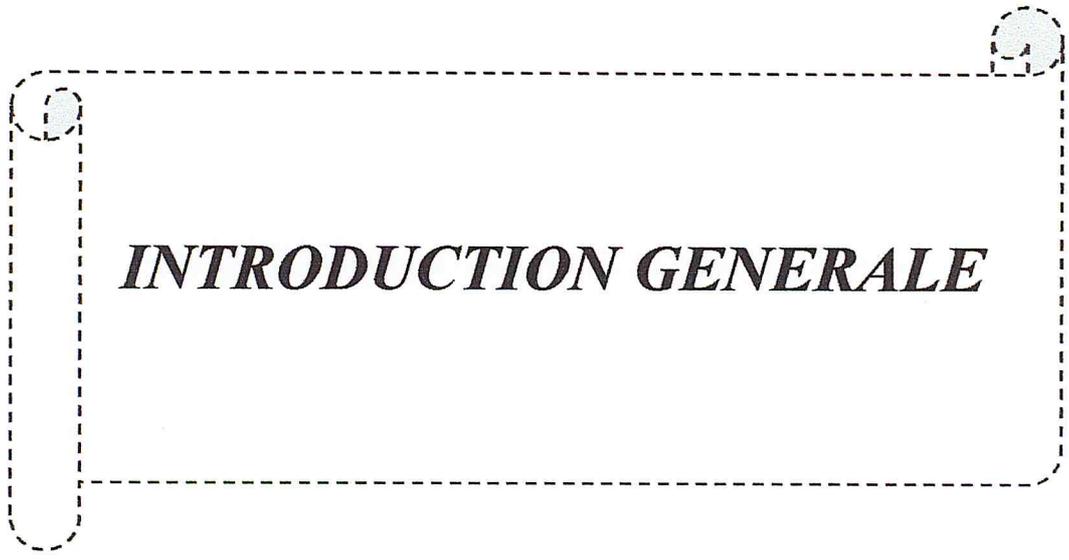
PH : potentiel hydrogène

R : rendement

V : volume

μl : microlitre

% : pourcentage



INTRODUCTION GENERALE

Introduction

Un grand nombre de plantes aromatiques, médicinales et des plantes épicées, sont utilisées dans le monde et depuis des siècles pour des fins alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques, thérapeutiques et agro-alimentaires.

L'organisation mondiale de la santé estime que près de 80% de la population mondiale utilise principalement des remèdes à base de plantes et que 40% des produits pharmaceutiques dérivent des plantes [1].

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels, est bien acceptée par l'organisme et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, l'effet secondaire induit par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme [2,3].

L'importance et la valeur de ces plantes, revient à la présence des molécules chimiques complexes dans ces organes "feuilles, tiges, racines et graines", dites métabolites secondaires. Les métabolites secondaires constituent un groupe biologiquement et chimiquement intéressant, qui font l'objet de nombreuses recherches, notamment la recherche de nouveaux composés bioactifs. Ces métabolites secondaires sont classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les huiles essentielles, les composés phénoliques, les saponosides et les alcaloïdes.

L'étude des huiles essentielles est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Elles constituent un groupe des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante. Elles possèdent des activités, anti-inflammatoires, anti-cancérigènes, antivirales, antifongiques, insecticides, antimicrobiennes et anti- oxydantes. Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection des plantes contre des herbivores en réduisant leur appétit pour ces plantes. Elles peuvent également attirer quelques insectes pour favoriser la dispersion des pollens et des graines, ou repousser l'indésirable de ces derniers [4, 5].

La méthode d'obtention des huiles essentielles intervient de façon déterminante dans le rendement en huile et dans la composition de cette dernière de ce fait, des

méthodes non-conventionnelles ont été développées pour améliorer le rendement et la sélectivité des composants bioactifs à partir de la matière végétale.

Le prétraitement enzymatique est l'une de ces méthodes alternatives qui améliore le rendement sans modification des caractères qualitatives des molécules bioactives. Cette méthode est basée sur la capacité inhérente d'enzymes à catalyser des réactions ayant une spécificité exquise et la régiosélectivité [6]. Les méthodes d'extraction assistée par des enzymes attirent de plus en plus l'attention en raison du besoin de la technologie à l'extraction écologique et d'offrir également la possibilité à la chimie verte pendant que la pression monte sur l'industrie alimentaire et les entreprises pharmaceutiques à identifier des routes plus propres pour l'extraction de nouveaux composés [7]. Ces derniers temps, l'utilisation d'enzymes pour l'extraction des arômes à partir de quelques épices, par exemple, fenugrec, poivre, moutarde, piment et d'agrumes pelures, ont été rapportés. L'application de l'enzyme à ces matières végétales mentionné ci-dessus a conduit à un rendement accru de produits volatils et principaux composants actifs [8].

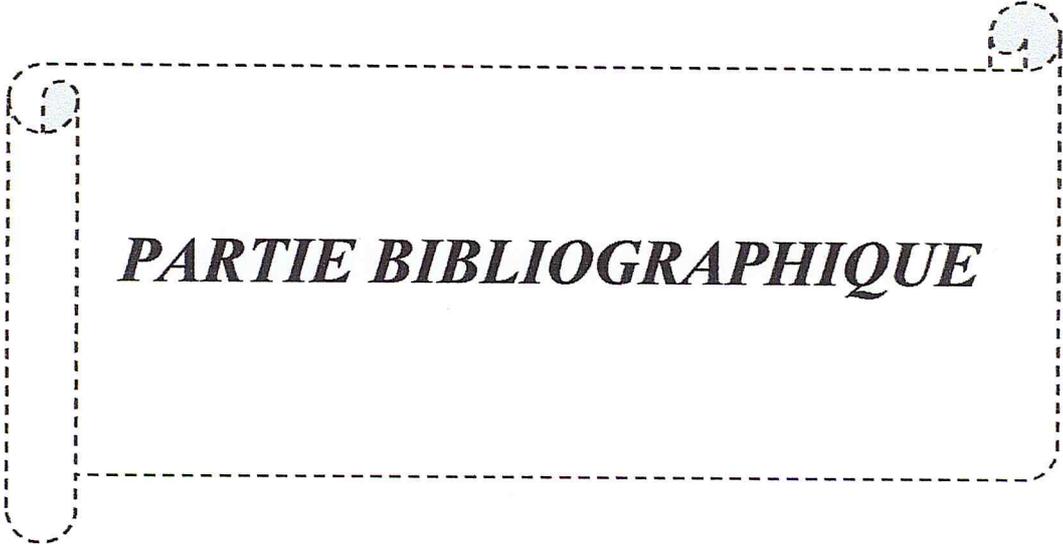
Se trouvant dans le bassin méditerranéen avec de grandes variations climatiques du Nord au Sud, l'Algérie possède des potentialités floristiques extrêmement variées constituant de véritables ressources biologiques, dont la connaissance scientifique sur le plan fondamental et appliqué est indispensable [9]. Parmi ces plantes, nous nous sommes intéressés à valoriser l'espèce *Carum carvi*L. (appartenant au genre *Carum* de la famille des *Apiaceae*), cultivée en Algérie, originaire des régions européennes et d'Asie [10]. Cette espèce est utilisée comme épice pour parfumer la nourriture. Elle est très répandue en médecine traditionnelle comme tranquillisant, diurétique et stimulant gastrique [11].

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'effet du prétraitement enzymatique sur le rendement, les propriétés physico-chimiques, la composition chimique, l'activité antimicrobienne et l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Carum carvi* L. extraite par entraînement à la vapeur d'eau et la comparer avec l'huile essentielle obtenu sans prétraitement enzymatique.

Ce manuscrit est réparti en deux parties :

- la première partie est une synthèse bibliographique dans laquelle, on présentera la matière végétale, son utilisation et les travaux dont elle a fait l'objet.
- La seconde partie est une étude expérimentale consacrée à :
 - ❖ L'extraction de l'huile essentielle des graines de *Carum carvi* L. par entraînement à la vapeur d'eau et l'étude de certains facteurs affectant son rendement,
 - ❖ Optimisation de l'extraction assistée par l'enzyme en étudiant l'effet
 - ❖ Caractérisation physicochimique et organoleptique de cette huile essentielle extraite avec et sans prétraitement enzymatique.
 - ❖ La détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de *Carum carvi* L. obtenu avec et sans prétraitement enzymatique par CG/MS.
 - ❖ Etude de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle.

À partir de l'interprétation des résultats expérimentaux, nous aboutirons à une conclusion générale qui nous permettra d'avoir des perspectives liées à ce travail.



PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE



***CHAPITRE I : PRESENTATION
DE LA PLANTE***

I.1.Introduction

Apiaceae (Umbelliferae) représente l'une des familles de plantes les plus connues. Elle était déjà connue dans les anciennes civilisations Chinoises et indiennes du Mexique, ainsi que chez les Grecs et les Romains. Elle semble être la première famille des plantes à fleurs reconnue par les botanistes vers la fin du XVI^e siècle. Ce fut aussi le premier groupe de plantes faisant l'objet d'une étude systématique publiée par Robert Moison en 1672 [12]. Cette vaste famille rassemble 446 genres et environ 3500 espèces, largement distribués dans les régions à climat tempéré où ils sont souvent utilisés comme des épices, des légumes ou des médicaments en raison de la présence des métabolites secondaires utiles telles que les huiles essentielles [13,14]. Elle occupe aussi une place importante dans la flore Algérienne où elle est représentée par 55 genres [12].

Le genre *Carum* est un genre important de la famille d'Apiaceae, et contient environ 20-30 espèces d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie. Parmi les espèces de ce genre, *Carum carvi L.* qui est l'une des plantes aromatiques et médicinales les plus anciennes [14].

I.2.Systématique :

La classification botanique du Carvi est la suivante : [12, 13, 15]

- **Régne** : *Plantae*
- **Sous règne** : *Plates vasculaires*
- **Embranchement** : *Spermaphytes*
- **Sous embranchement** : *Angiospermes*
- **Classe** : *Dicotylédones*
- **Sous classe** : *Dialypétales*
- **Ordre** : *Apiales*
- **Famille** : *Apiaceae*
- **Sous famille** : *Apioideae*
- **Tribu** : *Apieae*
- **Genre** : *Carum*
- **Espèce** : *Carvi*



Figure 1 : les différentes parties de *Carum carvi L.*

I.3.Noms vernaculaires :

- Nom arabe [16] :Karwiya (كروية)
- Nom anglais [16]: Caraway
- Nom français [17] : carvi
- Nom espagnol [17]: alcaravea
- Nom allemand [17]: Kummel
- D'autres noms [17]: faux anis, cumin officinal, cumin des prés.

I.4.Description botanique :

Le *Carum carvi L.* est une espèce annuelle, bisannuelle. Ses racines sont grêles, fibreuses et peu ramifiées. Le *carvi* bisannuel, dans sa première année, forme une rosette de feuilles filiformes pennées. Si ces racines atteignent un diamètre de 6 mm, les plantes donnent des fleurs l'année suivante, mais si le diamètre de la racine requis n'est pas atteint, les plantes resteront végétatives pour une année de plus [18]. La deuxième année, il produit des ombelles ramifiées de taille moyenne. Les ombelles à fleurs blanches sont sur une tige droite, fistuleuse et cannelée, habituellement 0.5-1,5 m de haut [12,19].

La fleur consiste en cinq pétales, cinq étamines libres, un calice très réduit, un ovaire infère avec deux carpelles et deux loges et un stylopode soutenant les deux styles [12].

Les fleurs du Carvi sont pollinisées par un large éventail de petits insectes recherchant le nectar: mouches, abeilles et mites. Les feuilles froissées sont alternes sans stipules et découpées. Le fruit est à la base d'un fruit sec schizocarpique se séparant à maturité le long d'un septum en deux méricarpes (akènes) à une graine restant fixés sur un axe simple, le carpophore. Ces fruits drupes (les graines) sont généralement disséminés par les oiseaux, tandis que les diakènes sont souvent transportés par le vent [20].

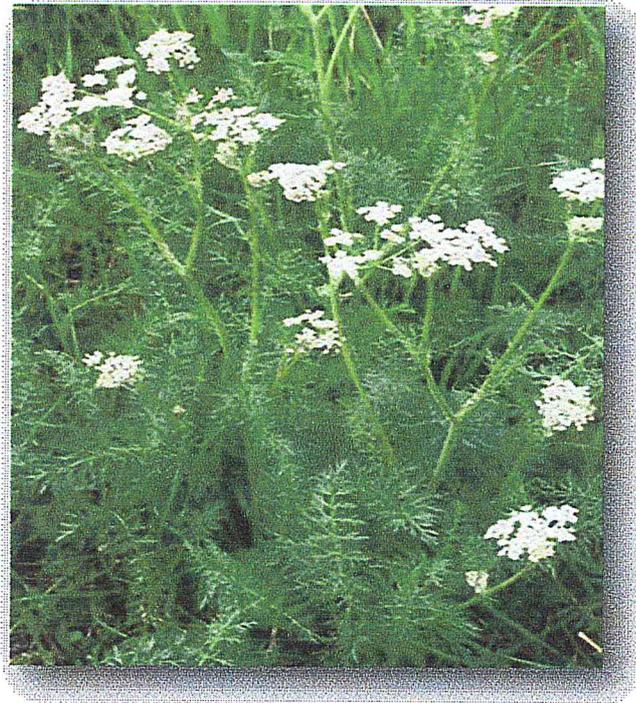


Figure 2 : la plante de *Carum carvi L.*



Figure 3 : les graines de *Carum carvi L.*



Figure 4 : la feuille de *Carum carvi L.*

I.5. Répartition géographique :

Le *Carum carvi L.* se rencontre dans les prairies sur des sols calcaires ou légèrement calcaires. Le sol doit être frais, léger et la culture se fait à l'abri des vents violents. L'espèce est surtout cultivée en Europe centrale, absente dans l'Ouest de la France. Elle se trouve au dessus de 200 m d'altitude : en Italie, en Toscane, en Ombrie, tandis qu'en Espagne, elle est cultivée en Argon jusqu'à 2000 m d'altitude. La Hollande est un gros producteur de *carvi* avec la Finlande. Aux Etats Unis, le *carvi* est annuel et largement distribué [17,21]. Elle se trouve aussi à l'Ouest de l'Asie. En Inde, elle est cultivée dans Himachal Pradesh, dans les collines et les plaines du nord de l'Inde et également dans les collines de sud de l'Inde [10].

En Afrique du nord, l'Egypte représente le plus grand producteur du *carvi*. Elle est présente aussi dans la région du Maghreb [16,17]. En Algérie, cette espèce est distribuée sur les hauts –plateaux [16].

I.6. Parties utilisées :

Les graines sont les fruits de cette espèce, la partie essentielle de la plante utilisée [17].

I.7. Composition chimique de *Carum carvi L.* :

D'un point de vue chimique, la graine de carvi est constituée principalement d'eau (11-16%), de sucre (19-25%), de fibres (17-22%), d'azote libre (4-5 %), d'huile essentielle [22], des acides gras, des flavonoïdes, des saponines, des alcaloïdes, des protéines [10], des coumarines [12] et des stéroïdes [23]. Du point de vue pharmacologique, les substances les plus intéressantes dans la graine sont les huiles essentielles, qui possèdent une odeur spéciale et agréable. Elles sont stockées dans des structures sécrétrices comme le montre la figure 5 [22].

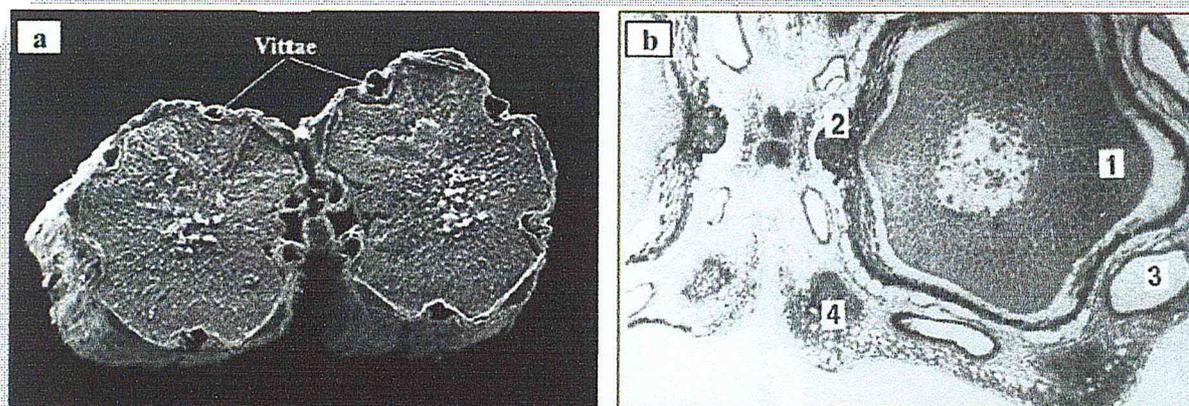


Figure 5 : (a) Localisation des structures sécrétrices dans la graine de carvi
 (b) Coupe transversale d'une graine jeune (1 : cellules à endospermes, 2 : funicules, 3 : poche d'huile valleculeaire , 4 : poche d'huile carinale)[22].

Cette figure montre que la localisation des structures sécrétrices est à l'intérieur de l'espace intercellulaire (sécrétion endogène). Ces structures sécrétrices sont situées au niveau des fosses et des crêtes du schizocarpe. Le nombre de cellules les composant diminue aussi au long de la maturation [22].

Le constituant majeur de l'huile essentielle de la graine de carvi, est le S(+)-carvone, connu aussi sous le nom de *d*-carvone, résultant probablement de l'oxydation allylique de R(+)-limonène avec l'intermédiaire de carvéol. Le monoterpène R(+)-limonène accompagne la carvone dans l'huile volatile des graines de carvi, avec un rapport entre les deux principaux composés variant de 3 pour 2 jusqu'à 3 pour 1, dépendant de la variété de la plante et des conditions de stockage [22].

I.8. Usages de *Carum carvi L.* :

Les graines de *Carum carvi L.* ont une odeur caractéristique et un goût aromatique chaud et pointu. Elles ont été intensivement utilisées en nourriture et dans la médecine traditionnelle. Elles sont largement ajoutées comme épices à une série de nourritures telles que le pain, le yaourt, des conserves au vinaigre, des sauces et des salades pour l'assaisonnement [10,24]. Le *Carum carvi L.* est traditionnellement utilisé autant qu'un tranquillisant, diurétique et stimulant gastrique [11]. Elles sont efficaces contre le manque d'appétit pour les adultes et dans le soulagement de la colique flatulente pour les

nourrissons [11]. Le fruit du *Carum carvi* L. a été utilisé aussi pour traiter le diabète, les maladies cardio-vasculaires et l'hypertension [10,25].

L'huile essentielle de carvi est très utilisée dans les parfums, les dentifrices, les mousses à raser, les crèmes, les lotions...Elle est connue aussi pour ses propriétés antibactériennes et antifongiques. En effet l'huile essentielle de carvi est utilisée en agroalimentaire comme conservateur permettant de substituer d'autres conservateurs chimiques et d'obtenir des mets plus sains. Elle est aussi utilisée en agriculture pour réguler la germination des pommes de terre et pour prévenir les attaques fongiques lors du stockage de ces pommes de terre [22].

I.9.Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés des graines de *Carum carvi* L.

La majorité des travaux effectués sur la graine de *Carum carvi* L. a porté sur les huiles essentielles et leurs activités biologiques. D'autres travaux sont effectués sur l'identification des flavonoïdes, ainsi que sur les coumarines [12].

I .9.1 Les huiles essentielles

Les graines de *carvi* représentent la partie unique de la plante qui contient l'huile essentielle dont la teneur est de l'ordre de 3-5% [24]. Le rendement en huile essentielle du carvi annuel est moins que le carvi bisannuel [23].

- En 2009, B. Laribi et ses coll [26] ont fait une étude sur les effets du déficit de l'eau sur la composition chimique de l'huile essentielle de graines de *Carum carvi* L. lorsqu'ils sont soumis à différents régimes hydriques. Les grains ont été soumis à trois niveaux d'eau différents:100% [contrôle (C)], 50% [déficit modéré de l'eau (MWD)] et 25% [grave déficit d'eau (SWD)]. les résultats de cette étude ont montré que le déficit modéré de l'eau a augmenté le rendement en huile essentielle. Les composés principaux de l'huile essentielle étaient la carvone et le limonène qui ont montré eux aussi une augmentation sous des niveaux de déficit de l'eau. En effet, le déficit en eau peut changer le comportement des plantes en ce qui concerne la biosynthèse des composés bioactifs.

Le tableau suivant montre la variation dans la composition chimique de l'huile essentielle de *Carum carvi* L.

Tableau 1: Effet du déficit d'eau sur la composition chimique de l'huile essentielle de graines de *Carum carvi L.* [26].

Les principaux composés De <i>carum carvi</i> (Tunisie)	(c)	(MWD)	(SWD)
α – Pinéne	0.54	0.43	0.27
β – Pinéne	0.36	0.25	0.32
β – Myrcéne	0.06	0.08	0.14
Limonène	7.53	10.72	19.26
Trans- dihydrocarvone	0.16	0.13	0.17
Cis- dihydrocarvone	0.24	0.23	0.34
Carvone	83.79	81.46	72.61
Trans-carveol	1.17	1.02	0.95
Cis-carveol	0.24	0.26	0.25
α -Selinéne	0.27	0.22	0.44
β -Selinéne	0.57	0.50	0.74
δ -Cadinéne	0.35	0.31	0.36
γ - Cadinéne	0.47	0.37	0.55

- En 2009, M. Razzaghi et ses coll [27] ont montré que l'huile essentielle de *Carum carvi L.* pourrait être comme agent de conservation naturel dans le contrôle de la contamination des aliments par les aflatoxines (AF). Ces derniers présentent un groupe important de contaminants alimentaires synthétisés principalement par des champignons *Aspergillus flavus* dans des conditions favorables de température et d'humidité. Le mycète toxigène a été cultivé en présence de l'huile essentielle dans des plaques microtitres en utilisant la méthode d'essai microbiologique. La masse mycélienne a été estimée comme index de croissance fongique, alors que les aflatoxines B1 (AFB1) et G1 (AFG1) étaient mesurées par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les résultats ont montré que l'huile essentielle de *Carum carvi L.* inhibe fortement la croissance de l'AF. Cette forte inhibition est due à la présence du Limonène qui possède une activité antifongique et d'autres composés, dillapiol et myristicin dans l'huile essentielle de *Carum carvi L.*

➤ En 2012, K. Assami et ses coll [16] ont isolé l'huile essentielle de graines de *Carum carvi* L. originaire d'Algérie par hydrodistillation avec et sans prétraitement ultrasonique. Les résultats ont montré que le traitement ultrasonique a amélioré le rendement de 1.72 % contre 1.68% sans prétraitement pour une durée de 30 min contre 90 min. 21 composés chimiques ont été identifiés en utilisant la technique chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS). Elle est constituée principalement du carvone (5,93mg/g, 5,73mg/g) et du limonène (5.47 mg/g, 5.28 mg/g).

Le tableau ci-dessous représente les principaux composés de l'huile essentielle de *Carum carvi* L. extraite avec et sans traitement ultrasonique.

Tableau 2 : la teneur (%) des principaux composés de l'huile essentielle de *carum carvi* L. avec et sans traitement ultrasonique[16].

Les principaux composés de <i>Carum carvi</i> L. (Algérie)	% sans traitement ultrasonique	% avec traitement ultrasonique
α – Pinéne	0.01	0.01
β – Pinéne	indet	indet
β – Myrcène	0.15	0.12
Limonéne	45.59	44
Trans- dihydrocarvone	0.08	0.06
Cis- dihydrocarvone	0.03	0.03
Carvone	53.6	55.28
Trans-carveol	0.04	0.03
Cis-carveol	indet	Indet
α -Selinéne	indet	Indet
β -Selinéne	indet	Indet
δ -Cadinéne	indet	Indet
γ - Cadinéne	indet	Indet

➤ En 2013, B. Laribi et ses coll [14] ont fait une étude comparative de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation de trois pays différents, Egypte, Tunisie et Allemagne. Le rendement en huile essentielle le plus élevé a été observé pour l'espèce récoltée en Tunisie dont l'ordre est de 1,41%, suivi de celle de l'Egypte avec 1,21% , par contre le rendement en huile essentielle le plus faible a été observé pour celle de Allemagne avec 0,48%. Cette variabilité dans le rendement en huile essentielle est probablement due aux facteurs environnementaux .En outre, 41 composés volatils ont été identifiés dans les huiles essentielles des graines des trois écotypes de *Carum carvi L.* , dont les principaux sont la carvone (61,58-77,35%) et le limonène (16,15-29,11%).

Le tableau suivant présente la teneur des principaux composés de l'huile essentielle de carvi originaire des trois régions différentes.

Tableau 3 : Comparaison des constituants des huiles essentielles de *Carum carvi L.*[14].

Les principaux Composés de l'huile essentielle	% des composés De <i>Carum carvi L.</i> (Tunisie)	% des composés de <i>Carum carvi L.</i> (Allemagne)	% des composés de <i>Carum carvi L.</i> (Egypte)
α - Pinéne	0.09	0.16	0.16
β - Pinéne	0.03	0.25	0.14
β - Myrcéne	0.16	0.11	3.97
Limonéne	19.52	16.15	29.11
Trans- dihydrocarvone	0.15	0.29	0.15
Cis- dihydrocarvone	0.08	0.25	0.15
Carvone	76.37	77.35	61.58
Trans-carveol	0.05	0.51	0.27
Cis-carveol	0.05	0.08	0.10
α -Selinéne	0.82	0.14	1.09
β -Selinéne	0.41	0.10	0.13
δ -Cadinéne	0.37	0.77	0.56
γ - Cadinéne	0.16	0.37	0.24

La figure suivante représente les structures chimiques des principaux composés de l'huile essentielle de *Carum carvi L.*

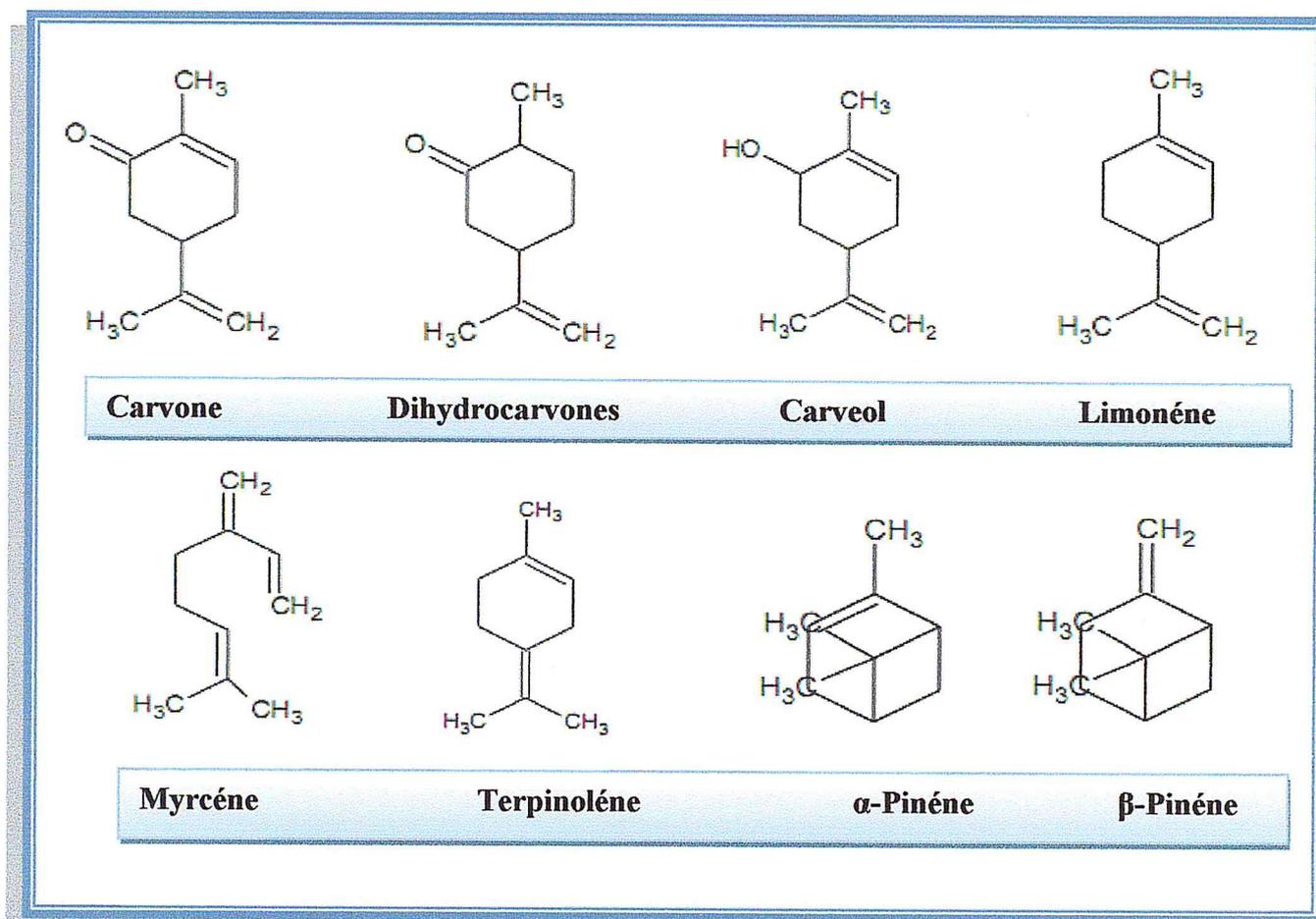
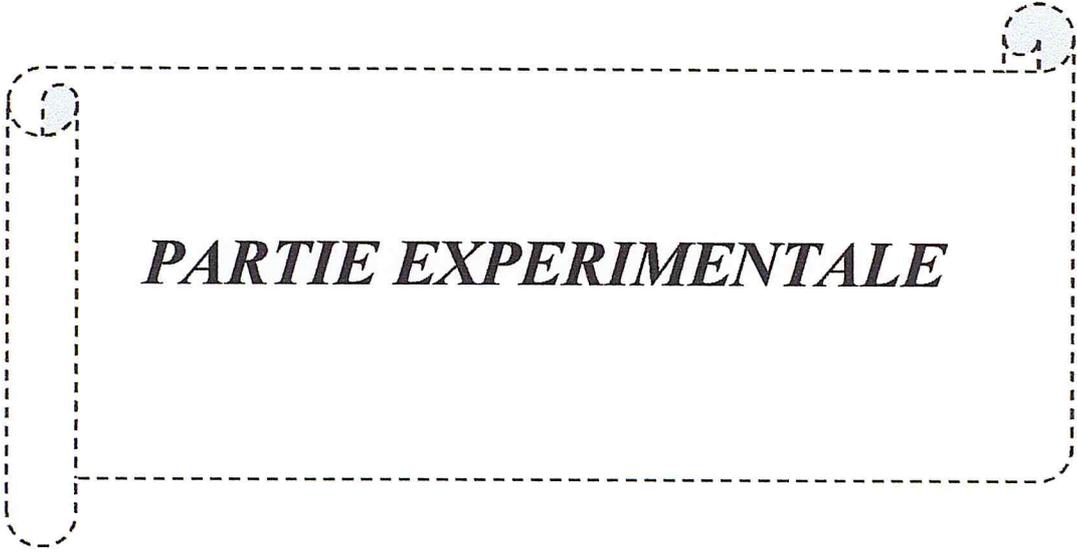


Figure 6 : Constituants principaux de l'huile essentielle de *Carum carviL.* [28]

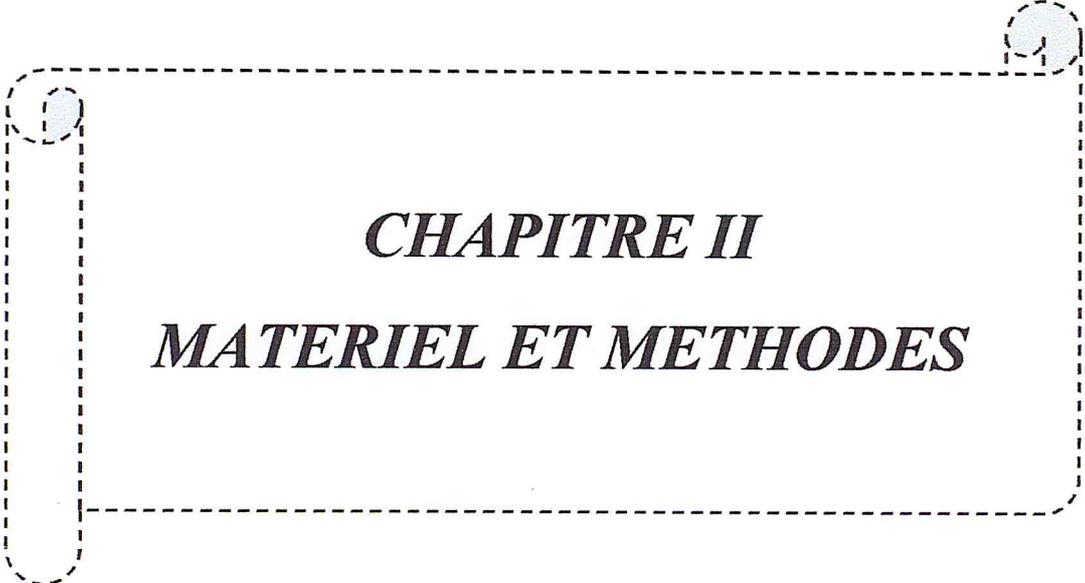
I.9.2. les extraits

- Les flavonoïdes ont été les premiers composés étudiés dans ce genre. Ils sont présents dans presque tous les organes de la plante et jouent un rôle important dans le système de défense comme antioxydants. Ces métabolites secondaires sont connus pour leurs diverses propriétés biologiques : antioxydante, anti-inflammatoire, antithrombique, antibactérienne, antihépatotoxique, antitumorale, antihypertensive, antivirale et antiallergique. Chez l'espèce *Carum carvi L.* furent isolés et identifiés les flavonoïdes suivants : la quercétine-3-O-β-D-glucuronopyranoside, la quercétine-3-O-β-D-glucofuranoside, kaempférol-3-O-β-D-glucoside, quercétine-3-O-β-D-glucoside, isorhamnétine [12].

- Les coumarines et spécialement les furanocoumarines constituent un groupe de Composés naturels ayant une large gamme d'activités biologiques. Ils possèdent des Propriétés : phytotoxique, antibiotique, spasmolytique antifongique et anticancéreuse La présence des coumarines dans les graines de *Carum carvi L.* a été décrite pour la première fois par Nielsen (1970), qui a mentionné l'identification de l'umbelliférone, de la coumarine et de la scopolétine [12].
- En 2004, M. Eddouks et ses coll [29] ont réalisé un travail dont l'objectif était d'évaluer les effets pharmacologiques du *Carum carvi L.*, par un test sur des rats diabétiques et normaux. Le résultat de l'étude a montré une diminution de 36% du taux de glucose dans le sang des rats diabétiques après 6 heures de la prise de la dose de l'extrait aqueux (20mg/Kg) et pas de changement observé pour les rats normaux, ce qui vérifie le potentiel anti-hyperglycémique des graines de *Carum carvi L.*
- En 2007, S. Lahlou et ses coll [9] ont fait une étude dans le but d'évaluer le potentiel diurétique de l'extrait aqueux de graines de carvi chez les rats normaux, après administration par voie aiguë et sous- chronique. Les résultats du traitement ont montré une augmentation de la diurèse après 4 heures de la prise de la dose 5.7 ml contre 3ml pour les rats non traité. le rendement d'urine était sensiblement augmenté en fonction du temps même après 24 heures ; 12.8 ml contre 7.7 ml. Ils ont confirmé que l'extrait aqueux de *Carum carvi L.* possédait une forte action diurétique.
- En 2013, N.B.Thippeswamy et ses coll [30] ont étudié l'activité antibactérienne et antioxydante des extraits de *Carum carvi L.* L'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode de diffusion du sucre d'agar contre des bactéries pathogènes portées par les aliments et des bactéries de détérioration de nourriture à savoir, le *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium*. L'activité antioxydante des extraits phénoliques de *Carum carvi L.* a été examinée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Les résultats ont montré que l'extrait phénolique de *Carum carvi L.* présente une activité antioxydante élevée à quantités de l'ordre du microgramme. En outre, l'extrait phénolique a également montré une activité antibactérienne significative en inhibant la croissance de bactéries pathogènes Gram positif à savoir, *B.cereus* et *S.aureus*.



PARTIE EXPERIMENTALE



CHAPITRE II
MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel

II.1.1. Matière végétale

La matière végétale est constituée de graines de *Carum carvi* L. Cette espèce provient de la région de Ben-Chicao située au sud de l'Atlas à une centaine de kilomètre au sud-ouest d'Alger, à 20Km de Médéa. Elle a été récoltée en Octobre 2013. Les graines ont été séchées à température ambiante, à l'abri de la lumière et dans des endroits bien aérés et conservées dans des sacs.

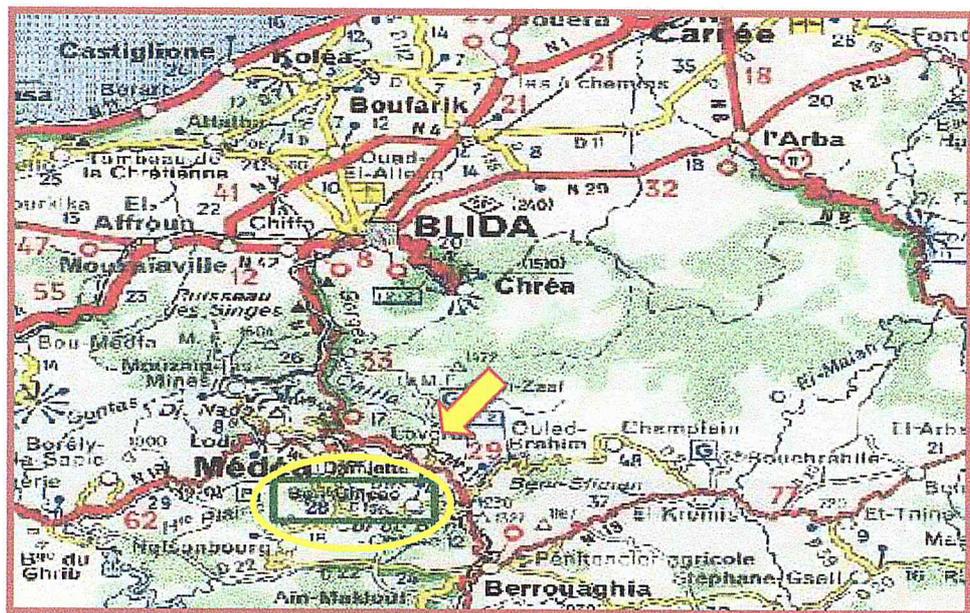


Figure 7: Carte géographique de la région de Médéa

Région de
la récolte

II.1.2. Réactifs

L'éther diéthylique (Sigma Aldrich ,Allemagne), éthanol 96% (Sigma Aldrich, Allemagne), méthanol(Sigma Aldrich ,Allemagne), hydroxyde de potassium KOH(Panreac Quimica ,Espagne), Sulfate de sodium anhydre Na_2SO_4 (Sigma Aldrich ,Allemagne), acide citrique (VWR BDH Prolabo , CE), acide ascorbique (Sigma Aldrich ,Allemagne) , DPPH 2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl (Alfa Aesar, Allemagne).

Les enzymes :pectinase E.C.3.2.1.15(Sigma Aldrich ,Danemark), cellulase E.C.3.2.1.1 (Sigma Aldrich ,Japon), hemicellulase E.C.3.1.173 (Sigma Aldrich ,USA).

II.2.Extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. À la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. L'entraînement à la vapeur d'eau consiste à récupérer l'huile essentielle des végétaux, en faisant passer à travers ces derniers un courant de vapeur d'eau, qui traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « vapeur d'eau+ huile essentielle». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier, avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile [30].

En utilisant le procédé d'entraînement à la vapeur d'eau, l'extraction de l'huile essentielle de *Carum carvi L.* a été réalisée à l'échelle laboratoire où nous avons étudié l'influence de quelques paramètres sur le rendement en huile essentielle de *Carum carvi L.* :

- La durée d'extraction,
- La masse de la matière végétale à traiter.

Pour ce faire, nous avons utilisé le même lot de cette espèce pour les différents essais.

II.2.1. Détermination de la durée d'extraction de l'huile essentielle des graines de *Carum carvi L.*

Nous avons procédé à l'extraction de l'huile essentielle en réalisant des essais de 30 min à 180 min.

II.2.2. Détermination de l'influence de la masse végétale à traiter

Nous avons effectué une série d'extraction en faisant varier la masse de 50g à 250g et en fixant le temps d'extraction constant pour chaque essai (temps optimal donnant le meilleur rendement).

II.2.3. Protocole expérimental d'extraction de l'huile essentielle

On introduit de l'eau dans le ballon de capacité de 2 L au 2/3 qu'on porte à ébullition (figure 6). La matière végétale, préalablement pesée, est introduite dans l'ampoule à décanter. La vapeur d'eau traverse la matière végétale, entraînant ainsi l'huile essentielle. Les vapeurs sont condensées au niveau du réfrigérant pour obtenir un distillat qui est un liquide légèrement trouble où surnage l'huile essentielle récupérée dans une ampoule à décanter. Le distillat recueilli est traité avec un volume d'éther diéthylique, on obtient alors deux phases, une phase organique contenant l'huile essentielle et l'autre aqueuse. L'extraction liquide-liquide est répétée trois fois afin de récupérer le maximum de l'huile essentielle. La phase étherée est placée sur un desséchant de type sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) afin d'éliminer toute trace d'eau. L'huile essentielle est récupérée après l'évaporation de l'éther diéthylique dans un évaporateur rotatif à 35 °C, ensuite elle est mise dans un flacon propre, pesée au préalable, et conservée au frais.



Figure 8: Dispositif expérimental de l'entraînement à la vapeur d'eau

II.3. Prétraitement enzymatique

Les méthodes d'extraction assistée par l'enzyme reçoivent de plus en plus d'attention en raison du besoin de la technologie à l'extraction écologique. Une caractéristique quantitative du traitement enzymatique dans l'industrie est représentée dans la littérature par une faible application des enzymes. La réaction des enzymes est souvent considérée comme une alternative à la destruction thermo-mécanique des parois cellulaires.

Les enzymes sont utilisées en particulier pour le traitement de la matière végétale avant des procédés classiques d'extraction. La connaissance préalable de la composition de la paroi cellulaire de la matière première permet dans la sélection d'une enzyme ou d'enzymes utile pour le prétraitement. Pour cela diverses enzymes telles que la cellulase, la pectinase et l'hémicellulase sont souvent nécessaires pour rompre l'intégrité de la structure de la paroi cellulaire de la plante, ce qui améliore l'extraction de composés bioactifs à partir de plantes [7]. Ces enzymes qui peuvent être dérivées des bactéries, des champignons, des organes d'animaux ou d'extraits de légumes / fruits, hydrolysent les composants de la paroi cellulaire, ce qui accroît la perméabilité de la paroi cellulaire qui se traduit par des meilleurs rendements d'extraction de composés bioactifs [7].

Des méthodes d'extraction assistée par l'enzyme ont donné des rendements élevés d'extraction pour des composés comprenant les polysaccharides, les huiles, les colorants, les parfums et les composés médicinaux [31–32]. Les études récentes sur l'extraction assistée par l'enzyme ont montré une extraction plus rapide et offre une économie en énergie une fois comparée aux méthodes non enzymatiques, elle a un impact environnemental moindre. L'application réussie d'enzymes pour l'extraction d'une variété de produits, y compris l'extraction des caroténoïdes de fleur de souci ou de la peau de tomates, de la vanilline à partir de gousses de vanille vertes, les polysaccharides de *sterculia*, l'huile extraite à partir de pépins de raisin et les polyphénols, indique que les enzymes peuvent également être utiles pour l'extraction des composés bioactifs à partir d'autres sources végétales. Les extractions à base d'enzymes font l'objet de la recherche continue et ont le potentiel d'être commercialement intéressantes [7].

II.3.1. Mode opératoire

- Dans un cristallisateur, on place 100 g de graines de Carvi
- On prépare une suspension enzymatique pour chaque enzyme individuellement à différentes concentrations (0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5%) w/w. Cette suspension est composée de :
 - L'enzyme choisie
 - 20 ml d'eau distillée
- La suspension est uniformément pulvérisée sur les graines tout en agitant le mélange, ensuite on rajoute une solution d'acide citrique à 0.1% (~10 ml) pour maintenir le PH entre 4.5 et 5.

- Le mélange obtenu est incubé à une température de 45°C pendant une période de 60 – 120 min. Les graines sont ensuite séchées pendant une heure qui par la suite sera sujette à un entraînement à la vapeur pour l'extraction de l'huile essentielle.

Les deux paramètres PH et température d'incubation sont maintenus constants suite à des travaux déjà réalisés [33],[34] où ces deux paramètres ont été déjà optimisés et ont présentés des meilleurs résultats .

II.4. Calcul du rendement en huile essentielle [35]

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle extraite et la masse de la matière végétale, il est exprimé en pourcentage % et calculé par la formule suivante :

$$R^{dt} (\%) = M(HE) / M (MV) \times 100$$

$R^{dt} (\%)$: Rendement en huile essentielle (en g) pour 100 g de matière sèche

$M(HE)$: Masse de l'huile essentielle (g)

$M(MV)$: Masse de la matière végétale sèche utilisée (g) (AFNOR ; 2000)

II.5. Optimisation de l'extraction assistée par l'enzyme

II.5.1. Optimisation de la concentration et du temps d'incubation des enzymes dans le prétraitement

Afin d'optimiser la concentration et le temps d'incubation des enzymes (cellulase, pectinase et hémicellulase), une série d'essais est effectuée en faisant varier la concentration des enzymes de 0,05% à 1,5% w/w et le temps d'incubation de 30 min à 120 min. Le pH, la température d'incubation et le temps d'extraction et la masse végétale à traiter sont maintenus constants.

II.5.2. Optimisation par plan d'expériences de l'extraction assistée par la cellulase

Une étude préliminaire composée de plusieurs expériences a été conduite et nous a permis de déterminer le domaine de variation des paramètres opératoires expérimentalement accessibles et qui affectent sensiblement l'extraction assistée par l'enzyme sur le rendement en huile essentielle. Afin de déterminer les conditions opératoires optimales d'extraction assistée par la cellulase, nous avons procédé à l'optimisation de ces paramètres. A cet effet nous avons fait appel à la méthode par planification des expériences.

La méthodologie des plans d'expériences repose sur l'élaboration d'une série de tests expérimentaux ayant pour but d'obtenir divers renseignements sur les effets des paramètres impliqués sur un critère d'optimisation. De manière classique, la méthodologie consiste à fixer tous les paramètres et à n'en faire varier qu'un, tout en observant une réponse investiguée (critère d'optimisation). Ceci peut représenter un nombre d'essais considérable augmentant de façon quasi-exponentielle avec le nombre de facteurs (variables impliquées dans le modèle étudié) et de niveaux (états distincts pouvant prendre chaque facteur) impliqués.

La méthode des plans d'expériences utilise une terminologie spécifique : La grandeur d'intérêt, qui est généralement notée y , porte le nom de réponse. Les variables qui peuvent modifier la réponse sont appelées facteurs. On parle donc des facteurs qui influent sur une réponse. Les termes facteur et réponse sont universellement employés dans le domaine des plans d'expériences [36].

Les facteurs sont des variables quantitatives ou qualitatives, continus ou discontinus, contrôlables ou non. La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau. Un facteur varie entre deux bornes :

- La borne inférieure est le niveau bas, notée par -1
- La borne supérieure est le niveau haut, notée par +1

Lorsque l'on attribue la valeur -1 au niveau bas d'un facteur et la valeur +1 au niveau haut, on fait introduire des nouvelles variables que l'on appelle « variables centrées réduites (v.c.r) » : centrées pour indiquer le changement d'origine et réduites pour signaler la nouvelle unité. On les trouve sous la dénomination : valeurs codées. Le passage des

variables d'origine A aux variables centrées réduites X, et inversement donné par la formule suivante :

$$X = (A - A_0) / \text{pas}$$

A_0 est la valeur centrale en unités courantes

L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le domaine de variation du facteur, ou tout simplement, le domaine du facteur. La réunion des domaines de chaque facteur définit le « domaine d'étude » ; ce domaine d'étude est la partie de l'espace expérimental retenu par l'expérimentateur pour faire ses essais [37].

De nombreuses informations utiles, comme l'influence des variables, les interactions entre les facteurs ou les paramètres optimums pourront ainsi être définis. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés aux relations qui unissent variables et variable réponse avec pour but final, de modéliser mathématiquement les réponses étudiées et de les optimiser. Ainsi, nous avons choisi de travailler avec une procédure expérimentale de type Box-Wilson [38,39] plus communément appelée plan composite centré. Il est utilisé pour la modélisation des surfaces de réponse, orienté vers l'optimisation de(s) réponse(s). Il permet de décrire l'évolution de la réponse pour un nombre limité de facteurs. Les facteurs doivent être tous quantitatifs et continus et le comportement de la réponse sera représenté par une surface de réponse. Le modèle peut permettre de localiser un extremum pour une réponse. Cette méthodologie de surface de réponse a déjà été utilisée avec succès pour l'étude et l'optimisation de l'extraction des huiles essentielles [40, 41,42].

Un plan composite centré est défini par:

- Un plan factoriel complet 2^k
- N_0 répétitions au centre du domaine expérimental, dédiées à l'analyse statistique.
- Deux points en étoile par paramètre et positionnés sur les axes de chacun de ceux-ci à une distance α du centre du domaine. Ces points contribuent à l'évaluation des termes quadratiques du modèle polynomial, c'est-à-dire qu'ils donnent des informations sur la courbure de la surface de réponse.

Le nombre total d'essais devant être menés, N, va dépendre du nombre de facteurs K étudiés et du nombre de répétitions au centre du domaine, n_0 :

$$N = 2^K + 2.K + n_0 \quad (\text{équat1})$$

La valeur de α est déterminée par le nombre de facteur (K), selon la formule:

$$\pm \alpha = \sqrt[4]{2^K} = \pm 1,414 \quad (\text{équat2})$$

Chaque facteur possède cinq niveaux ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$).

Au niveau du plan expérimental, La combinaison des niveaux de valeurs dans ce type de plans à deux variables à cinq niveaux donne le nombre de points expérimentaux suivants: 2^2 essais factoriels (± 1), 2 répétitions au centre du domaine expérimental (codé 0), 2×2 essais en étoile ($\pm \alpha$) (4 points axiaux dont la valeur est égale à 1,414). Au total nous obtenons 10 combinaisons à réaliser (tableau 4).

Tableau 4 : Plan d'expériences de Box -Wilson à 2 facteurs

N° d'expérience	Concentration de cellulase (%)	Temps d'incubation (min)
1	0	0
2	0	$-\alpha$
3	-1	1
4	0	0
5	+1	-1
6	0	$+\alpha$
7	$-\alpha$	0
8	1	+1
9	$+\alpha$	0
10	-1	-1

Les diverses réponses, analyses de données et interprétations seront réalisées en utilisant un logiciel informatique de plans d'expériences statistiques : Statgraphics Plus 2000 (Statgraphics, Manugistics, Rockville, USA). La méthodologie des surfaces de réponses va permettre de modéliser les réponses étudiées sous la forme d'une équation polynomiale du second degré présentée ci-après :

$$Y = a_0 + \sum a_i X_i + \sum a_{ij} X_i X_j + \sum a_{ii} X_i^2 \quad (\text{équat3})$$

Avec $i < j$

Dans laquelle Y est la grandeur à laquelle on s'intéresse (y), mesuré à chaque essai. La valeur de cette grandeur dépend de plusieurs facteurs. A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse [43], a_0, a_i, a_{ii} et a_{ij} sont les coefficients de régression ; et X_i, X_j sont des variables codées.

II.5.3.Choix du domaine expérimental

La détermination du domaine d'étude est étroitement liée aux connaissances initiales détenues sur le phénomène physique étudié mais également aux objectifs visés par l'expérimentation. Nous définissons le domaine d'étude et la validité de l'expérience menée en considérant les limites possibles pour la variation des facteurs. Nous rappelons dès maintenant que les résultats de l'étude ne seront valables que sur le domaine de variation des facteurs considérés. Le choix des domaines d'étude des paramètres étudiés, définis à l'issue des essais préliminaires sont présentés comme l'indique le tableau 5 .

Tableau 5 : Domaine d'étude des facteurs

Valeurs codées	Concentration d'enzyme (w/w)	Temps d'incubation (min)
$-\alpha$	0,02	18
-1	0,1	30
0	0,3	60
+1	0,5	90
$+\alpha$	0,6	102

II.6. Propriétés physico-chimiques et organoleptiques de l'huile essentielle

Les propriétés organoleptiques (aspect, couleur, odeur) et physico-chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle de *Carum carvi L.* extraite par entraînement à la vapeur d'eau sans prétraitement et avec prétraitement enzymatique. Nos essais ont été effectués selon un protocole précis et obéissent aux normes édictées par AFNOR (Annexe A).

II.7. Activités biologiques

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcool, phénol, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques. Ainsi la nature des structures chimiques qui la constituent et leurs proportions [44]. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent d'une manière synergique. De cette manière la valeur d'une huile essentielle tient à l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires [45].

II.7.1. Activité antimicrobienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé appelée aromatoگرامme .

II.7.1.1. Aromatoگرامme

L'aromatoگرامme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques figure 8. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des huiles essentielles testées, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale [46].

La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à

la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité bactériostatique de l'H.E sur le germe testé. On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre, soit en traduisant en croix le degré d'activité [47].

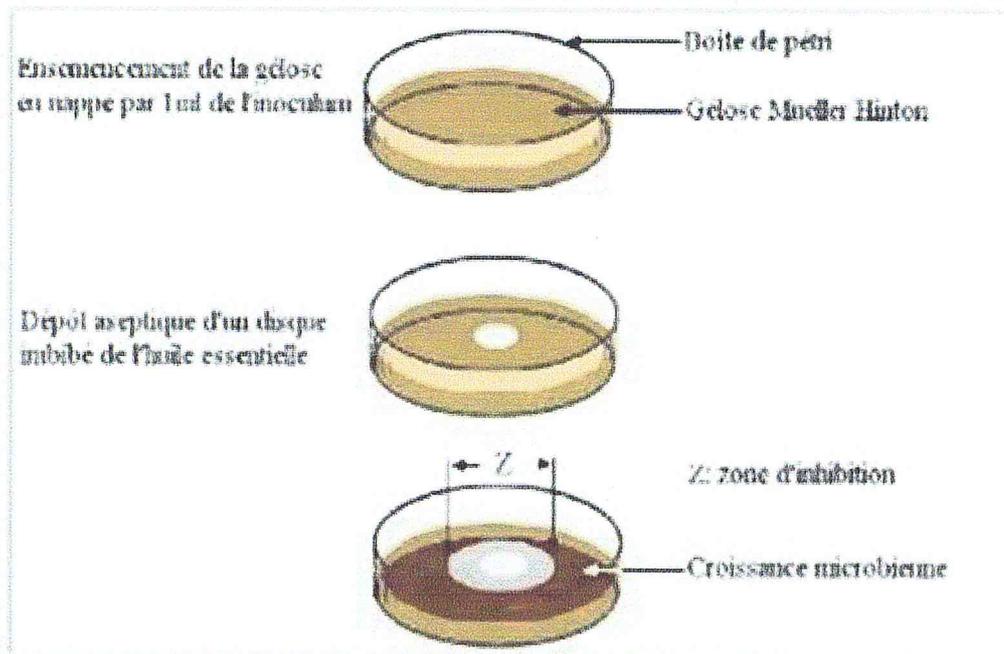


Figure 9: Illustration de la méthode d'aromatogramme

II.7.1.2. Microorganismes utilisés

Les souches utilisées dans notre étude sont référencées ATCC (American Type Culture Collection) voir tableau 4 et ont été choisies pour leurs contaminations élevées sur les denrées alimentaires et leur pathogénicité.

Les tests sont réalisés sur quatre bactéries (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*) et un champignon *Aspergillus brasiliensis* provenant du laboratoire Algérien du médicament (LAM), département de contrôle de qualité, service de microbiologie. Ces souches ont été reçues dans des tubes stériles contenant 10 ml de gélose de conservation puis conservées à une température de 4°C.

Tableau 6 : liste des souches microbiennes testées

Souches	Espèces bactériennes utilisées	Gram	Référence des souches bactériennes
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC 8739
	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	ATCC 14028
	<i>Bacillus subtilis</i> sous espèce <i>spizizenii</i>	+	ATCC 6633
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC 6538
Champignon	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	/	16404

II.7.1.3. Milieux de culture

Suivant la méthode employée et selon les souches, les milieux de culture utilisés sont les suivants :

- Gélose Nutritive et Gélose Mueller Hinton (MH) pour les bactéries,
- Gélose Sabouraud dextrose (GSD), appelée communément Sabouraud Merck pour les champignons,

II.7.1.4. Protocole expérimental

✓ Préparation de pré-culture

Les tests antimicrobiens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures). La réactivation des souches est effectuée par ensemencement de l'espèce microbienne dans un milieu liquide. Les germes utilisés ont été cultivés sur gélose nutritive, les boîtes ainsi ensemencées sont incubées à 37°C pendant 18 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour les champignons.

✓ Préparation de l'inoculum

A partir des cultures jeunes sur (GN). On prélève 3 à 5 colonies bien isolées et identiques dans 9 ml d'eau physiologique stérile, on agite au vortex pendant quelques secondes. La standardisation de la suspension, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm. Selon Mac Farland, on admet une DO comprise

entre 0,08 et 0,1 pour les bactéries et entre 2 et 3 pour les champignons ce qui correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml [28].

✓ **Ensemencement**

Des boîtes de pétrie stériles préalablement coulées, sont ensemencées par inondation à l'aide d'une pipette pasteur contenant la suspension bactérienne, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries.

✓ **Dépôts des disques**

A l'aide d'une pince propre, les disques stériles de papier de Wathman 6 mm du diamètre, imprégnés de 20 μ l d'huile essentielle sont déposés sur la surface gélosée. Après diffusion de l'HE dans la gélose pendant 30min à température ambiante, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et 25°C pour le champignon.

✓ **Lecture**

La lecture s'effectue après l'incubation par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition (le diamètre du disque inclus), La lecture se fait à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition [46].

- Non sensible(-) ou résistante : diamètre < 8 mm
- Peu sensible(+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- sensible (++) ou intermédiaire : diamètre compris entre 15 à 19 mm
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

II.7.2. Activité antioxydante

II.7.2.1. Méthode au DPPH

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Le pouvoir antioxydant de nos échantillons en HE a été testé par la méthode au DPPH [49] avec quelques modifications. Ce radical libre stable possède une coloration violette foncée, lorsqu'il est réduit (piégé par des substances antioxydantes), la coloration devient jaune pâle.

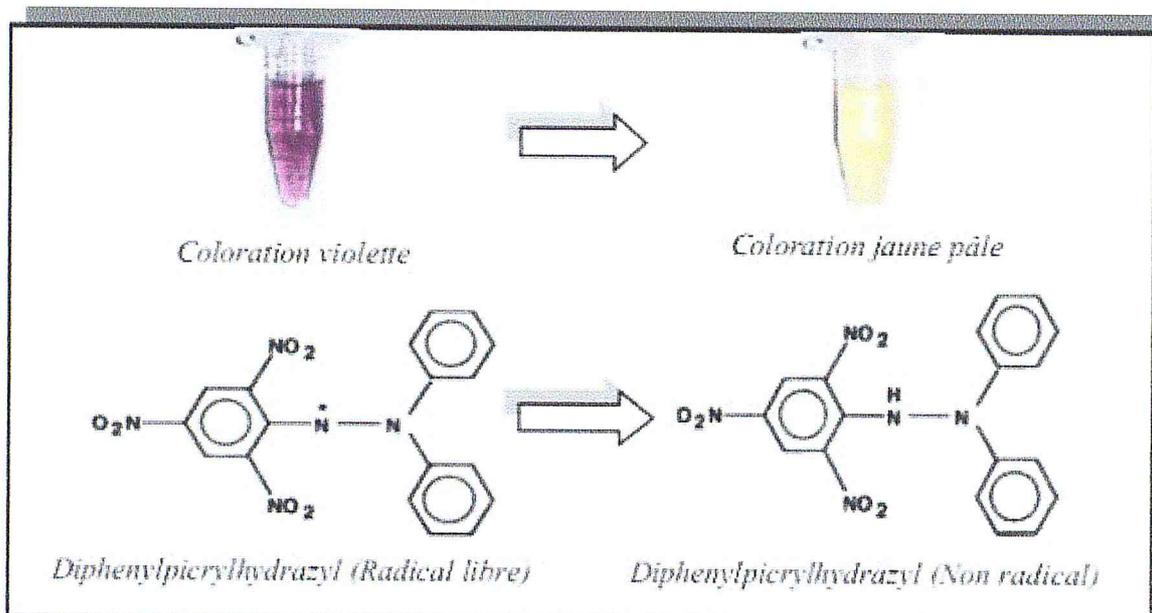


Figure 10: forme libre et réduite du DPPH [50].

II.7.2.2. Mode opératoire

✓ **Préparation de la solution DPPH** : le DPPH 2,2 -Diphényl-1- picrylhydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$), M : 394,33 g/mole est solubilisé dans du méthanol absolu pour en avoir une solution de 4%.

✓ **Solution d'huile essentielle** : pour le test les échantillons en HE ont été préparés par dissolution dans le méthanol absolu à raison de 90 mg/ml. Ces solutions dites solutions mères, subiront ensuite des dilutions pour en avoir différents concentrations de l'ordre de mg par ml.

✓ **L'essai au DPPH** : dans des tubes secs et stériles, on introduit 1ml de la solution à tester, on ajoute 1ml de solution au DPPH. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à la température ambiante pendant 30 minutes pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par un spectrophotomètre.

Pour chaque dilution, on prépare un blanc, constitué de 1ml de méthanol et 1ml de la solution au DPPH.

En parallèle, une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

✓ **Expression des résultats :**

Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Abs \text{ c} - Abs \text{ e}) / Abs \text{ c}] \times 100 \quad [50]$$

Abs c : Absorbance du contrôle

Abs e : Absorbance de l'échantillon testé

Nos résultats ont été exprimés en tenant compte de la moyenne de trois mesures obtenues.

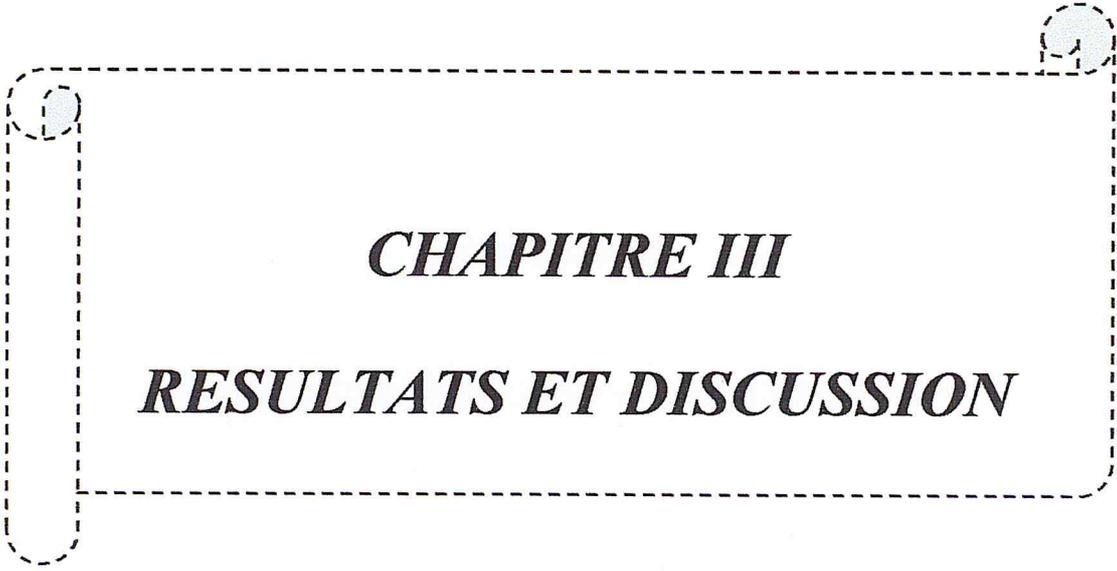
Pour chaque échantillon en HE, nous avons déterminé la valeur IC50 qui est la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH [41].

Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance antiradicalaire [52].

$$ARP = 1 / IC50$$

ARP : Puissance anti radicalaire

IC50 : Concentration de l'HE nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH.



CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Extraction de l'huile essentielle de *Carum carvi L.* par entraînement à la vapeur d'eau

III.1.1. Les paramètres influençant le rendement en HE

Dans cette partie de notre travail, nous avons étudiés quelques paramètres pouvant influencer le rendement en HE. Cette étude a été faite sur les graines de *Carum carviL.*

III.1.1.1. Influence du temps d'extraction

Pour l'étude de ce paramètre nous avons pris la masse de la matière végétale comme constante (100g) et le temps d'extraction pour variable, alors nous avons effectué cinq manipulations. Le tableau 7 résume la variation du rendement en fonction du temps d'extraction.

Tableau7: variation du rendement en fonction du temps d'extraction

N°	Temps d'extraction (Min)	R(%)
1	30	0,15
2	60	0,40
3	90	0,73
4	120	0,73
5	150	0,73

D'après le tableau ci-dessus, on remarque que le rendement obtenu par entraînement à la vapeur augmente jusqu'à atteindre une valeur maximale 0,73% au bout de 90 min.

III.1.1.2. Influence de la masse végétale

Pour ce deuxième paramètre, nous avons considéré que le temps d'extraction constant et la masse végétale pour variable .Pour cela nous avons effectué cinq manipulations.

Le tableau 8 résume la variation du rendement en fonction de la masse végétale La figure ci-dessous représente cette variation.

Tableau 8 : Influence de la masse de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle

N°	La masse végétale (g)	R%
1	50	0,71
2	100	0,73
3	150	0,42
4	200	0,39
5	250	0,29

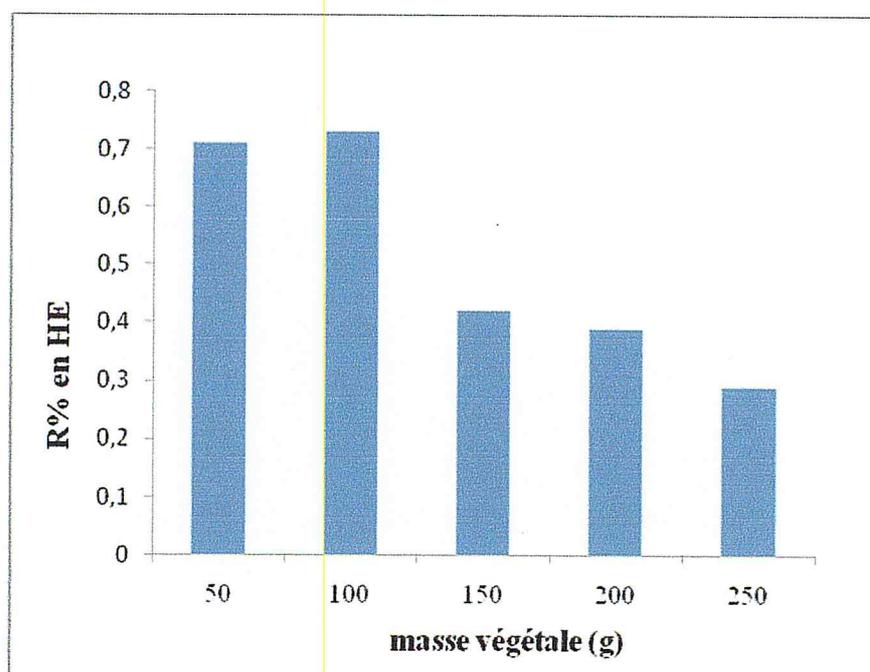


Figure 11 : Influence de la masse de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle

On constate d'après ces résultats que le rendement en HE varie selon la variation de la matière végétale, il atteint le maximum lorsque la masse est égale à 100g .Ces variations du rendement sont probablement liées au tassement de la matière, il impose à la vapeur d'emprunter des chemins préférentiels. De ce fait, la vapeur n'entre pas en contact avec la matière végétale dans certains endroits, ce qui implique une diminution dans le rendement.

III.1.1.3. Evolution du rendement en HE en fonction du temps

Lors de cette étude, un suivi cinétique a été réalisé sur l'extraction de l'huile essentielle de la matière végétale (les graines) par entrainement à la vapeur d'eau, en effectuant des prélèvements horaires à intervalles réguliers sur les phases aqueuses et organiques durant l'extraction. Pour cela nous avons choisi les paramètres qui ont donné le rendement le plus élevé (100 g de graines de *Carum carvi L.* avec un temps d'extraction de 90 min). L'évolution du rendement en huile essentielle est présentée par le tableau 9. La courbe ci-dessous montre cette évolution.

Tableau 9: L'évolution du rendement en fonction du temps

Temps (min)	Rendement (R%)
0	0
15	0
30	0
45	0,11
60	0,23
75	0,50
90	0,62
105	0,68
120	0,72
135	0,72
150	0,72

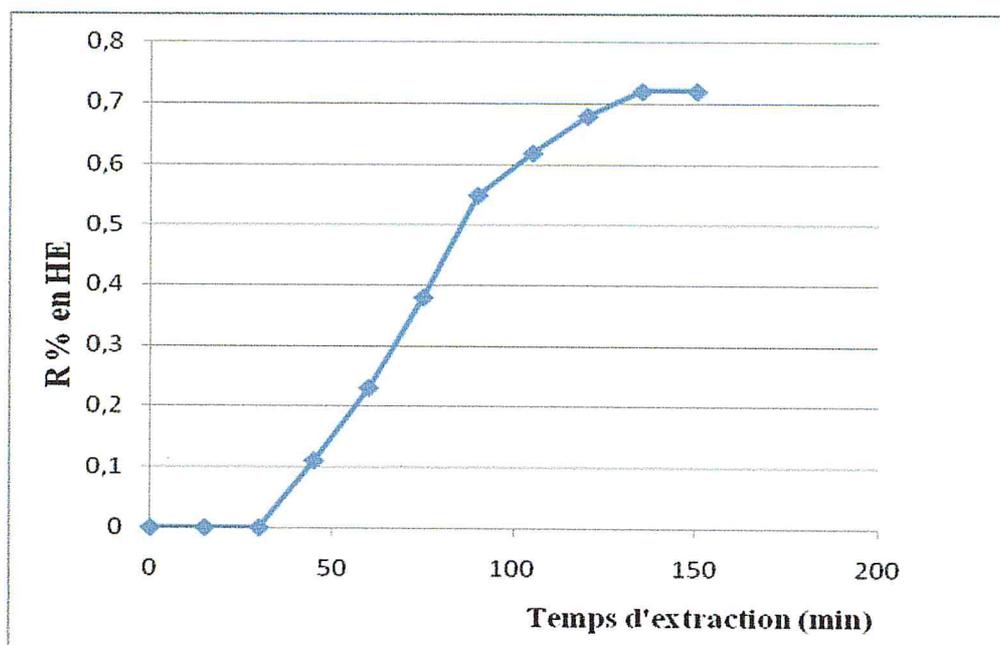


Figure 12 : L'évolution du rendement en fonction du temps

D'après le graphe on constate que la cinétique se divise en trois étapes :

- L'étape 0 correspond au temps mort, il est de l'ordre de 30 min, cette étape durant laquelle aucune extraction d'huile essentielle ne se produit.
- La première étape rapide représente une extraction plus ou moins rapide, on observe une augmentation significative du rendement.

La troisième étape correspond à une ligne horizontale qui enregistre la fin d'extraction et au cours de cette étape, la courbe tend vers un pallier donnant un rendement maximale de l'ordre de 0,72%.

En comparant ce rendement, il est inférieur à celui de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation de graines de carvi originaire de Tunisie (1,41%), de l'Egypte (1,21%) par contre il est supérieur à celui de l'Allemagne (0,48%) [14]. Cette différence de rendement en HE pourrait être expliquée par le choix de la période de récolte, le climat, la zone géographique, la génétique de la plante la période de séchage, la méthode d'extraction employée, etc. Ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur les rendements en huiles essentielles.

III.1.1.4. Influence du prétraitement enzymatique

III.1.1.4.A. Influence de la concentration d'enzyme

Pour la deuxième partie de notre travail, nous avons considéré les paramètres suivants comme constants, la masse végétale (100g), le temps d'extraction (90min), le PH (4-5), le temps d'incubation (60min), la température d'incubation (45°C) et la concentration de chaque enzyme (hémicellulase, cellulase, pectinase) comme variable . Pour faire cette étude nous avons effectué des manipulations, les résultats sont donnés sur le tableau 10 et représentés par la figure suivante :

Tableau 10: Influence de la concentration de l'enzyme

Concentration d'enzyme (w /w)	R% (hémicellulase)	R% (cellulase)	R% (pectinase)
0,05	0,75	0,93	0,85
0,1	0,93	0,99	0,81
0,5	0,90	1,01	0,70
1	0,67	0,93	0,68
1,5	0,64	0,73	0,68

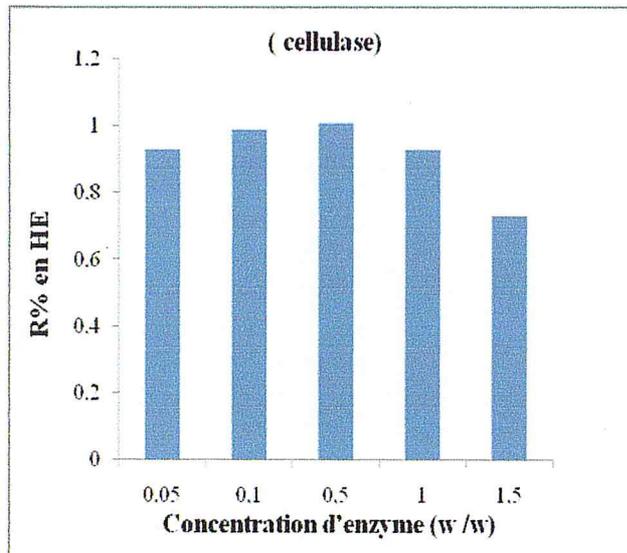


Figure 13a : Effet de la concentration de la cellulase.

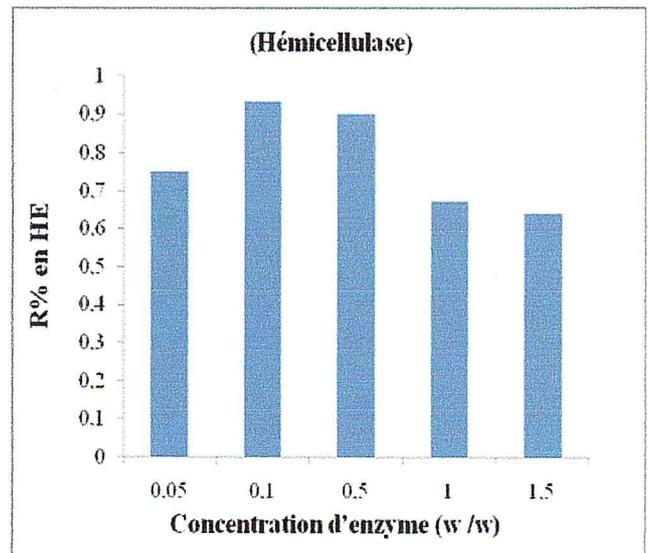


Figure 13b : Effet de la concentration de L'hémicellulase

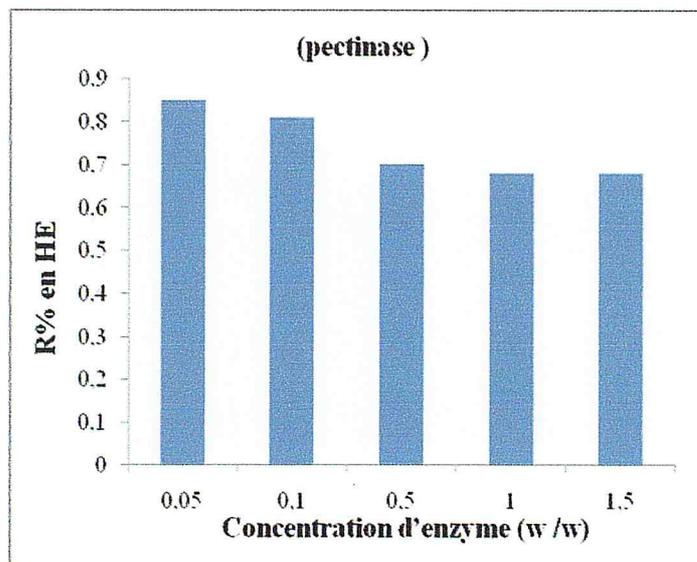


Figure 13c : Effet de la concentration de la pectinase

D'après les résultats obtenus nous constatons que le rendement en HE varie selon la concentration et la nature de l'enzyme utilisée pour le prétraitement de la matière végétale et qui est responsable de la dégradation de la paroi de la graine. Il atteint un maximum de 1,01% pour la cellulase avec une concentration de 0,5%, 0,93% pour l' hémicellulase avec une concentration de 0,1% et un rendement de 0,85% pour la pectinase avec une concentration de 0,05 %.

On observe une augmentation remarquable du rendement en utilisant le prétraitement enzymatique comparativement au rendement en HE sans prétraitement (0,73%). Cette augmentation en rendement est due forcément au traitement de la matière avant l'extraction avec l'enzyme, sa réaction est souvent considérée comme une alternative à la destruction thermo-mécanique des parois cellulaires. Dans notre cas, le meilleur rendement est obtenu avec la cellulase comparativement aux deux autres enzymes, il dépend de la composition de la paroi de la matière végétale traitée qui est composée essentiellement de la cellulose, l'hémicellulose et la pectine [53].

III.1.1.4.B. Influence du temps d'incubation

100g de graines de *Carum carvi L.* sont traitées par les trois différents enzymes : l'hémicellulase (0.1%), la pectinase (0.05 %) et la cellulase (0.5%) ont été soumises à différentes périodes d'incubation (30, 60 ,90 et 120 min).le tableau 9 résume les résultats qui sont représentés dans la figure suivante :

Tableau 11 : Influence du temps d'incubation

Temps d'incubation (min)	R% en HE (Hémicellulase)	R% en HE (Pectinase)	R% en HE (Cellulase)
30	0,88	0,80	0,93
60	0,91	0,85	0,97
90	0,94	0,90	0,99
120	1,03	1,01	1

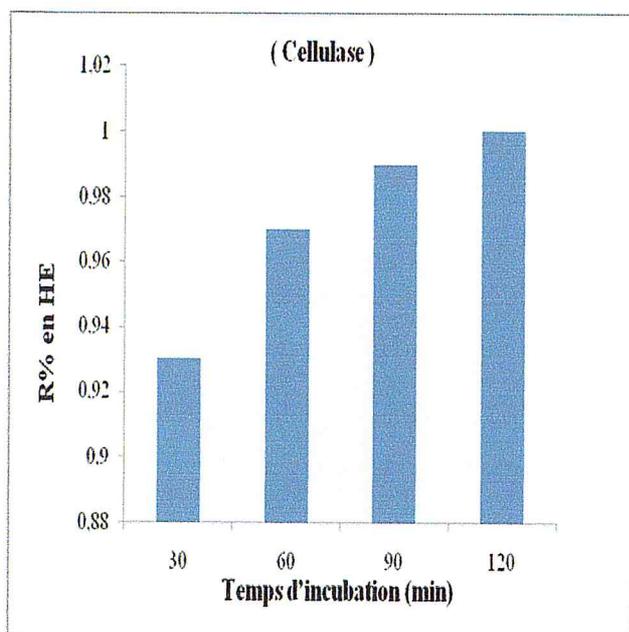


Figure 14a: Effet du temps d'incubation sur le rendement

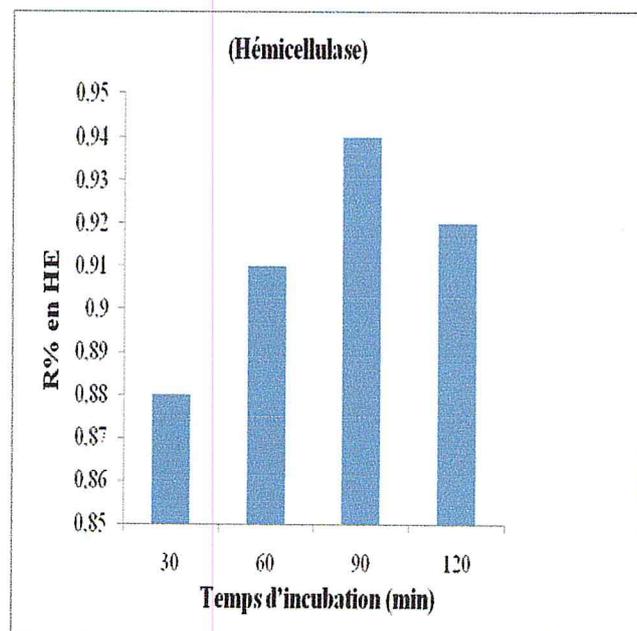


Figure 14b : Effet du temps d'incubation sur le rendement

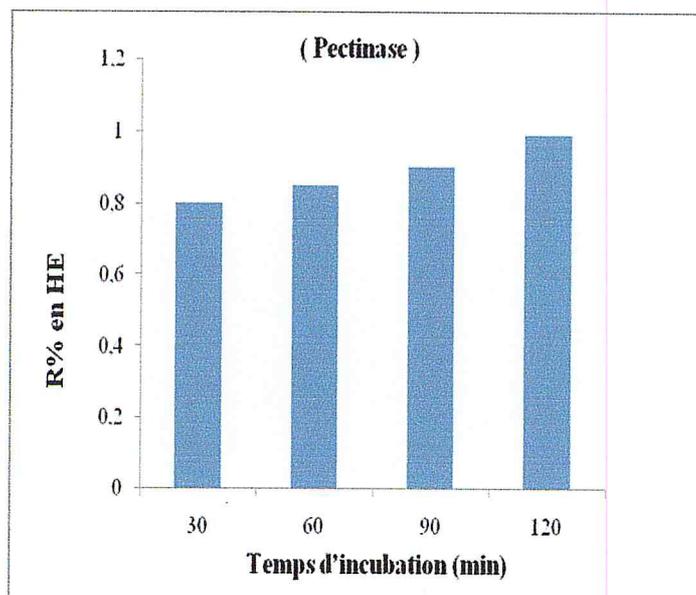


Figure 14c : Effet du temps d'incubation sur le rendement

Le traitement de carvi avec la cellulase a donné le meilleur rendement pour la période d'incubation de 30,60 et 90 min de l'ordre 0,93%, 0,97 %, 0,99% avec une légère augmentation dans le rendement en huile essentielle (1%) pour une période de 120min (fig .16a) Par contre .Utilisation du pectinase et l'hémicellulase à donné le meilleur rendement (1,01% ,0,92%) pour 120min d'incubation (fig 16b ,fig 16c) .

III.1.2.Optimisation des conditions expérimentales par la méthodologie des plans d'expérience

III.1.2.1.Expérimentation

Le tableau présente les différents niveaux des deux facteurs en coordonnées réelles,les rendements en huiles essentielles de *Carum carvi L.* obtenus comme réponse pour chacune des dix expériences du plan Box- Wilson.

Tableau12 : Expériences réalisées dans le plan expérimental et réponses obtenues

N° d'expérience	Concentration de cellulase (%)	Temps d'incubation (min)	R%
1	0,3	60	0,90
2	0,3	18	0,72
3	0,1	90	1,06
4	0,3	60	0,91
5	0,5	30	0,93
6	0,3	102	1,12
7	0,02	60	0,89
8	0,5	90	0,95
9	0,6	60	1,01
10	0,1	30	0,65

D'après les résultats présentés dans le tableau, on peut constater des variations de réponses en fonction des niveaux des facteurs impliqués dans l'expérience. Cette variance est de 0.65 à 1.12%.

III.1.2.2. Etude des effets du temps d'incubation et de la concentration de cellulase sur le rendement en huile essentielle

L'étude de l'influence des paramètres sélectionnés sur le rendement permet de déterminer la combinaison des facteurs qui permettraient d'améliorer le rendement. Les résultats du plan Box-Wilson ont été analysés par le logiciel statistique statgraphics. Cette analyse a pour but de déterminer les effets simples de chaque paramètre, leurs effets quadratiques, les interactions entre eux ainsi que l'élaboration du modèle empirique décrivant le comportement du système étudié.

III.1.2.2.1. Analyse de la variance (ANAVAR).

Une analyse de variance a été réalisée sur les résultats obtenus (tableau13). Cette analyse est une technique statistique qui a pour but d'interpréter les coefficients relatifs à chaque action du modèle. Elle permet de tester chaque effet des paramètres étudiés, linéaires, quadratiques et interactions entre facteurs et de représenter graphiquement l'importance de chaque facteur sur la réponse étudiée [31]. Cette analyse permet aussi de déterminer si le modèle sélectionné est adéquat.

Les effets des paramètres sont estimés par le test de Fisher (F-ratio) ; où F représente le rapport des carrés moyens de chaque effet par rapport au carré moyen de l'erreur expérimentale.

$$F(\text{effet}) = (\text{carré moyen de l'effet}) / (\text{carré moyen des écarts expérimentaux})$$

A côté de la valeur du rapport F, le logiciel associe la valeur de probabilité P. Les valeurs de P montrent qu'à un niveau de confiance de 95 %, les effets statistiquement significatifs sont ceux qui ont uniquement un $P < 0.05$. De ce fait, les effets inférieurs à 0.05 dans la colonne de P sont significatifs [54].

- ✓ Si val- P > 0.05 : L'action sera déclarée comme non significative.
- ✓ Si val- P < 0.05 : L'action sera déclarée comme significative.
- ✓ Si val- P < 0.01 : L'action sera déclarée comme hautement significative.

Tableau 13 : Analyse de la variance du rendement en huile essentielle

Source	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carrés moyens	Ratio- F	Valeur – P
A : concentration d'enzyme	0,014425	1	0,014425	16,62	0,0266
B : temps d'incubation	0,123924	1	0,123924	142,78	0,0013
AA	0,000787499	1	0,000787499	0,91	0,4111
AB	0,038025	1	0,038025	43,81	0,0070
BB	0,000016072	1	0,000016072	0,02	0,9004
Erreur totale	0,00260387	3	0,000867957		
Totale	0,18264	9			

$$R^2 = 98.57\%$$

Les résultats sur le tableau 13 montrent que la concentration de l'enzyme et le temps d'incubation influencent de façon significative ($P < 0.05$) le rendement en huile essentielle. Il convient de noter également une interaction significative entre ces deux variables.

Le modèle développé présente un coefficient de régression égale à 98.57%, ce qui traduit une bonne adéquation avec le phénomène expérimental. Ce coefficient indique le degré d'ajustement du modèle $Y=f(X)$; plus Il est proche de 100% plus le niveau de confiance vis-à-vis du modèle proposé est grand et le modèle sera de plus en plus satisfaisant (plus R^2 est proche de 1, meilleur est l'ajustement).

III.1.2.2.2 Analyse graphique des résultats

a) Diagramme de Pareto

Le diagramme de Pareto Figure 19 est un diagramme à barres qui représente l'effet linéaire, quadratique et interaction entre facteurs. La longueur de la barre est proportionnelle à la valeur absolue de l'amplitude des effets estimés des coefficients.

La barre transversale représente l'amplitude minimale à partir de laquelle les effets seront considérés comme étant statistiquement significatifs sur la variable réponse étudiée avec un niveau de confiance de 95%.

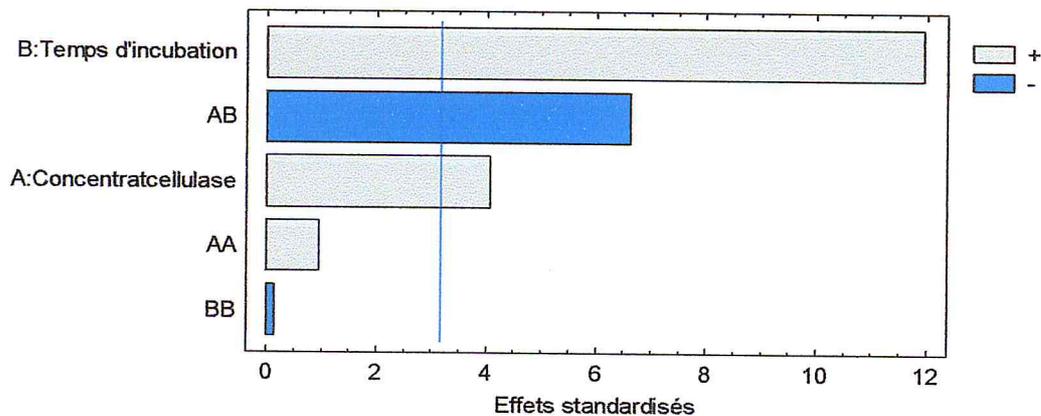


Figure 15: diagramme des effets standardisés sur le rendement

L'analyse de ce diagramme montre que :

- ✓ l'effet simple du « temps d'incubation » est la variable quantitative présentant l'influence la plus importante sur le rendement.
- ✓ L'effet d'interaction du couple « temps d'incubation - concentration de cellulase » présente aussi une influence sur le rendement.
- ✓ l'effet simple du « temps d'incubation » est plus significatif que l'effet simple du « concentration de cellulase ».
- ✓ Il ne semble pas y avoir d'effet quadratique du « temps d'incubation » et effet quadratique du « concentration de cellulase » significatifs. Ils ne sont pas influents sur la réponse étudiée.

b) Les effets simples

La figure illustre l'action des effets simples des paramètres sur le rendement en huile essentielle(%). Les effets simples de chaque variable représenté permettent d'évaluer leur action lorsque le paramètre passe de son niveau bas à son niveau haut. L'autre paramètre est fixé au centre du domaine expérimental.

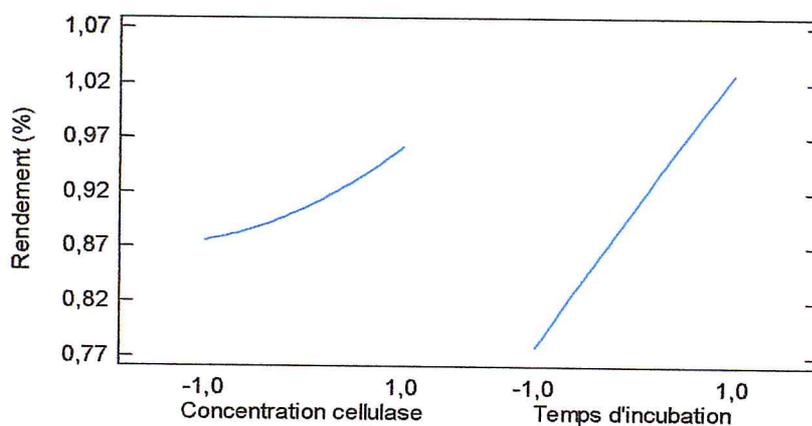


Figure 16 : Effet simples des paramètres opératoires sur le rendement

L'analyse de cette figure montre que la concentration de cellulase et le temps d'incubation ont des effets sur le rendement d'extraction. L'effet simple de la concentration de cellulase augmente de manière proportionnelle avec le rendement.

L'effet simple du temps d'incubation est plus important et davantage influent que celui de l'autre variable. Le rendement atteint son maximum lorsque le temps d'incubation est à son niveau +1.

III.1.2.2.3. Modèle mathématique

Les résultats de l'extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau assistée par la cellulase sont résumés sous la forme d'une équation polynomiale du second degré et les effets estimés de chaque coefficient sont regroupés dans le tableau 14.

L'analyse de ce tableau révèle que l'effet quadratique de la concentration de la cellulase et du temps d'incubation sont faibles. Tandis que les autres effets sont les plus importants et les plus influençants sur le rendement en huile essentielle.

Tableau 14 : Effets estimés de coefficients

Coefficients	Estimations
Constant	0,905
A:concentration de cellulase	0,0424633
B:temps d'incubation	0,124461
AA	0,013125
AB	-0,0975
BB	-0,00187504

Les effets estimés nous permettent d'exprimer le rendement sous la forme d'une équation polynomiale du second degré relative au domaine expérimental défini et impliquant les deux facteurs étudiés.

Le modèle en variables codées s'écrit alors :

$$\text{Rendement} = 0.905 + 0.0424633 \times A + 0.124461 \times B + 0.013125 \times A^2 - 0.0975 \times AB - 0.00187504 \times B^2$$

Où,

- **A, B**, sont respectivement les coefficients linéaires des variables quantitatives «concentration de cellulase», «temps d'incubation» .
- **A², B²**, représentent les effets quadratiques des variables,
- **AB**, représentent l'interaction entre les variables.

III.1.2.2.4. Définition des conditions optimales

a) surface de réponses

Les surfaces de réponse sont des représentations graphiques en trois dimensions de la réponse du système étudié en fonction des paramètres opératoires .Le tracé de ces courbes de surfaces de réponse permet de rechercher des régions expérimentales pour laquelle la réponse est optimale.

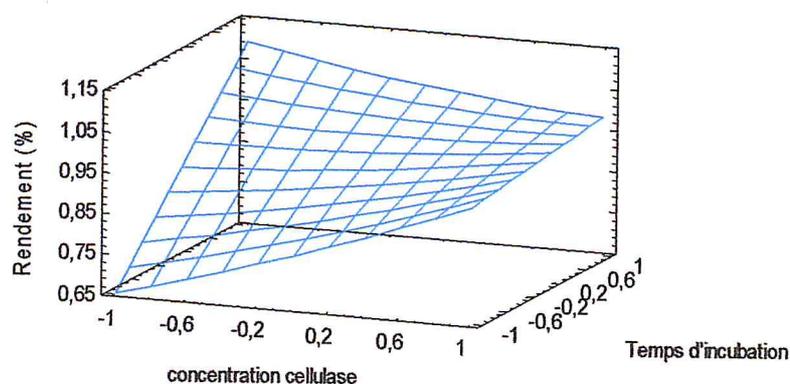


Figure 17: Surface de réponses correspondant au couple temps d'incubation- concentration de cellulase

b) Conditions optimales

Les valeurs des paramètres opératoires optimisés sont présentées dans le tableau suivant (en valeur codée et réelle).

Tableau 15 : les conditions optimales

Facteurs	Valeur codée	Valeur réelle
Concentration de cellulase	-1,41421	0,02
Temps d'incubation	1,41421	102

Après avoir fixé les conditions optimales nous avons obtenue un rendement de 1.24% en huile essentielle.

III.2. Caractérisation de l'huile essentielle de *Carum carvi L.* sans et avec prétraitement enzymatique

Les propriétés organoleptiques et physico-chimiques tels que : l'indice de réfraction, l'indice d'ester ...etc, constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle. Ces essais sont déterminés selon un protocole précis.

III.2.1. Propriétés organoleptiques

L'huile essentielle des graines de *Carum carvi L.* obtenue par entraînement à la vapeur d'eau (sans et avec prétraitement enzymatique) présente les mêmes caractères organoleptiques regroupés dans le tableau suivant.

Tableau 16 : propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Carum carvi L.*

Aspect	Couleur	Odeur
Liquide, mobile	Jaune pâle	Epicée et piquante



Figure 18 : Huile essentielle de *Carum carvi L.*

III.2.2. Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de *Carum carvi L.*

Les résultats des analyses physico-chimiques sont donnés par le tableau suivant :

Tableau 17 : propriétés physico-chimiques de l'HE de *Carum carvi L.*

Huile essentielle	I _A	I _E	I _S	I _R à 25°C	Miscibilité à l'éthanol 95%
Sans prétraitement enzymatique	2,24	87,52	89,76	1,491	1:1
Traitée avec l'hémicellulase	3,92	141,94	145,25	1,473	1:1
Traitée avec la cellulase	3,36	103,23	106,59	1,484	1:1
Traitée avec la pectinase	3,36	136,89	140,25	1,491	1:1

Les paramètres physico-chimiques sont influencés par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les conditions de culture des plantes.

L'indice de réfraction est parmi les caractéristiques physiques généralement utilisées dans la classification des huiles essentielles .Il dépend de la composition chimique qui augmente en fonction des longueurs des chaînes d'acides, de leurs degrés d'insaturation et de la température, il varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. Pour certains auteurs, le faible indice de réfraction de l'huile essentielle indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques [28] . Pour notre travail, les résultats indiquent qu'il n'y a pas de grandes différences entre les valeurs de l'indice de réfraction pour les quatre échantillons. On remarque aussi qu'ils sont du même ordre de grandeur que ceux relevés dans la littérature IR = 1.484 - 1.488 à 20°C [55].

La miscibilité à l'éthanol 96% est d'un volume d'huile essentielle pour un volume d'éthanol pour les quatre échantillons.

Pour les constantes chimiques, l'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acides libres. Dans notre étude, cet indice est un peu élevé pour les quatre échantillons .Cela peut trouver une explication dans la dégradation de HE durant sa conservation .Inversement, un indice d'acide inférieur à 2 est une preuve de bonne conservation de l'essence. [4]

L'indice de saponification caractérise le poids moyen de la matière grasse auquel il est inversement proportionnel : plus le poids moléculaire est élevé, plus l'indice de saponification est faible.

On constate aussi que le prétraitement enzymatique des graines de carvi n'a pas une grande influence sur les propriétés organoleptiques et physico-chimiques de l'huile essentielle.

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais non suffisante pour caractériser les huiles essentielles. Il est donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques : GC/MS , ces dernières sont souvent utilisées comme moyen analytique complémentaire pour l'analyse structurale des substances volatiles.

III.3. Activités biologiques

III.3.1. Activité antimicrobienne

L'étude qualitative de l'activité antimicrobienne de quatre échantillons ; huile essentielle sans et avec prétraitement enzymatique des graines de *Carum carvi L.* été testée sur quatre bactéries et un champignon, par la méthode de diffusion sur un milieu gélosé.

Le pouvoir antimicrobien de ces échantillons est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm).

Les observations effectuées sur l'effet des huiles essentielles testées sur la croissance des souches bactériennes sont représentées dans le tableau (18).

Tableau 18 : Résultats de l'activité antimicrobienne des quatre échantillons

Les souches	HE	HE Prétraitement Cellulase	HE Prétraitement hémicellulase	HE Prétraitement Pectinase
<i>Escherichia coli</i>	24 mm	24 mm	17mm	22 mm
<i>Salmonella typhimurium</i>	17 mm	18 mm	14 mm	15 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	20 mm	17 mm	18 mm	17 mm
<i>Bacillus subtilis subsp spizizenii</i>	16 mm	12 mm	15 mm	14 mm
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	52 mm	51 mm	49 mm	50 mm

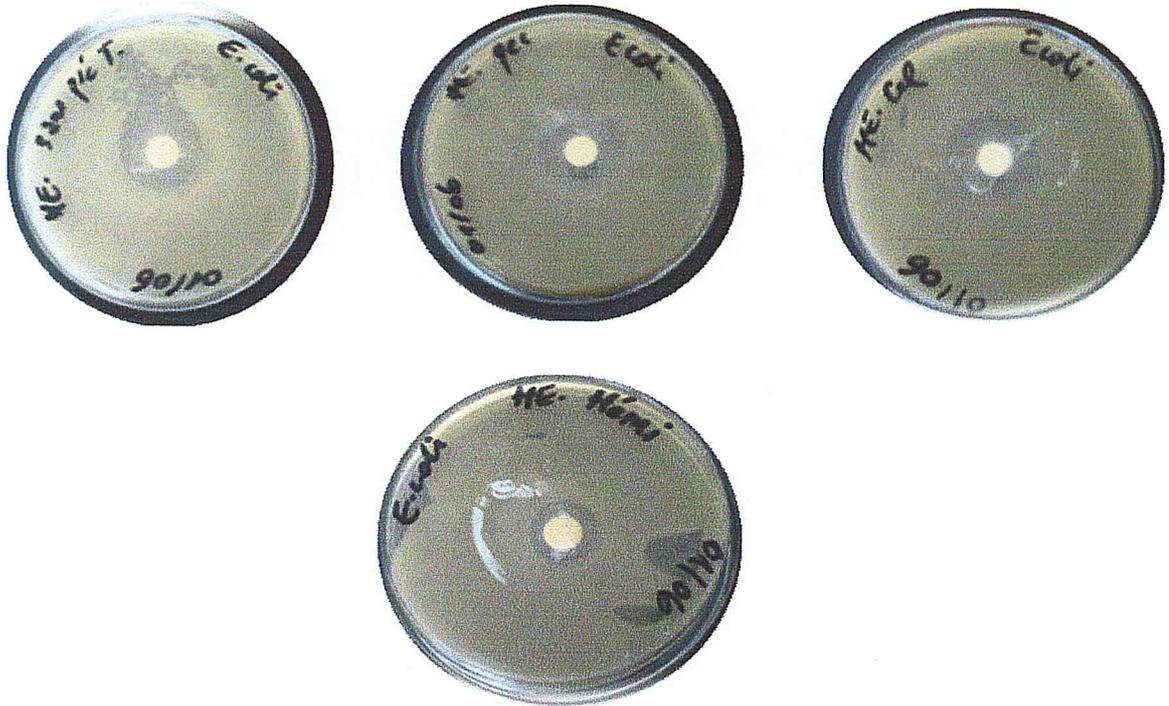


Figure 19 a: Effet inhibiteur des quatre échantillons de l'huile essentielle des graines de *Carum carvi L.* sur la souche bactérienne *Escherichia coli*.



Figure 19b: Effet inhibiteur des quatre échantillons de l'huile essentielle des graines de *Carum carvi L.* sur la souche bactérienne *Salmonella typhimurium*



Figure 19c: Effet inhibiteur des quatre échantillons de l'huile essentielle des graines de *Carum carvi L.* sur la souche bactérienne *Staphylococcus aureus*.

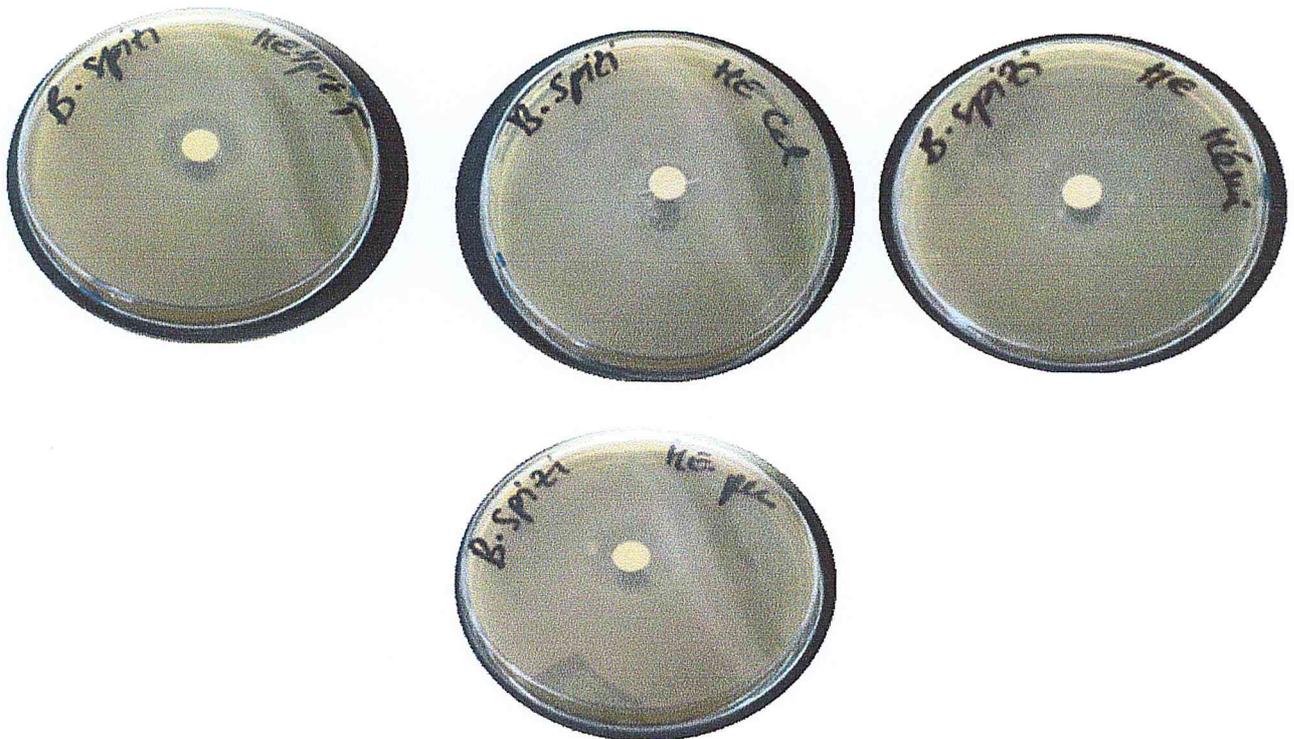


Figure 19 d: Effet inhibiteur des quatre échantillons de l'huile essentielle des graines de *Carum carvi L.* sur la souche bactérienne *Bacillus subtilis subsp spizizenii*.

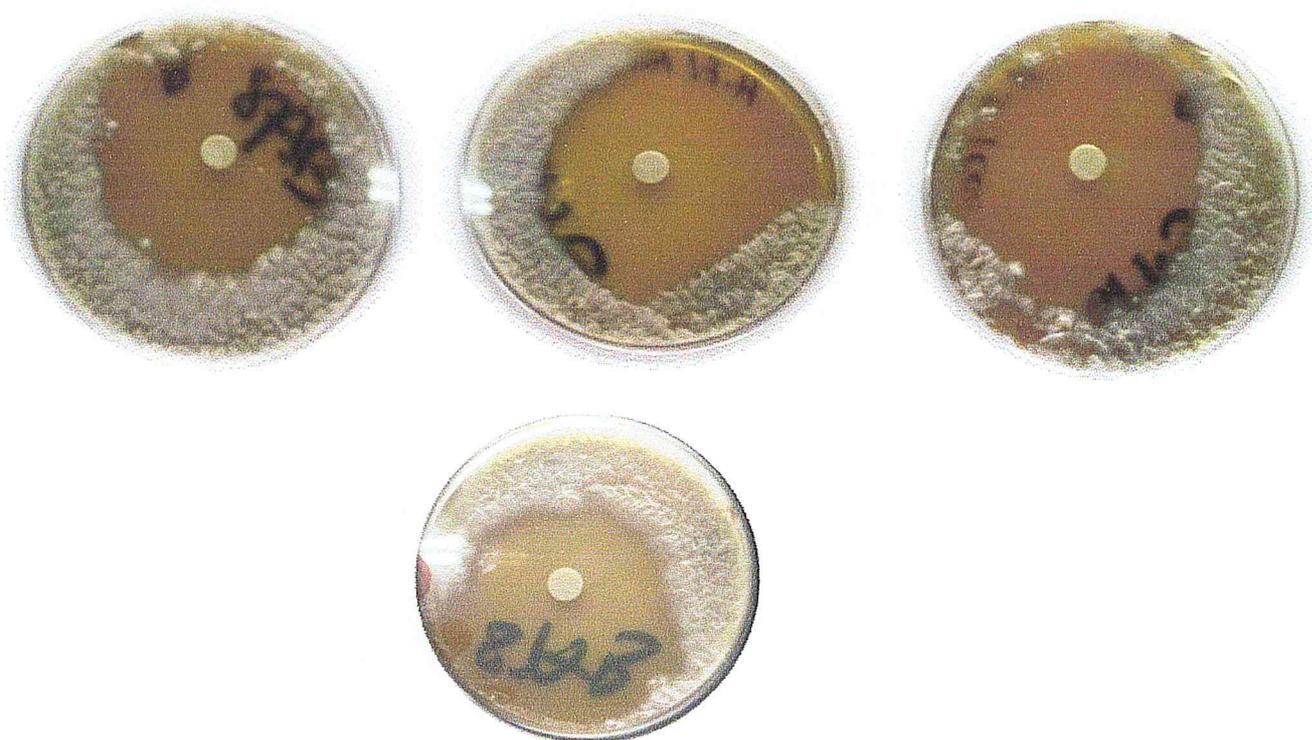


Figure 19 e : Effet inhibiteur des quatre échantillons de l'huile essentielle des graines de *Carum carvi L.* sur la souche du champignon *Aspergillus brasiliensis*

Après l'incubation, on remarque l'apparition des zones d'inhibition avec des diamètres différents qui entourent les disques imprégnés de l'huile essentielle sans et avec prétraitement enzymatique, ce qui explique la sensibilité des souches testées vis-à-vis nos échantillons.

- Le champignon *Aspergillus brasiliensis*, présente une sensibilité très élevée et extrême vis-à-vis l'HE extraite à partir des graines sans et avec prétraitement enzymatique, avec une zone d'inhibition très importante de diamètre compris entre 52 et 49 mm avec les quatre échantillons
- La bactérie *Escherichia coli* est extrêmement sensible, il y'a la présence d'une zone d'inhibition d'un diamètre important 24 et 22 mm qui entourent les disques imprégnés de l' HE extraite de la plante non traitée et traitée avec la cellulase et la pectinase respectivement , par contre elle est moins sensible vis-à-vis l'HE extraite à partir des graines traitées avec l'hémicellulase dont le diamètre d'inhibition est de 17 mm.

- *Salmonella typhimurium* est très sensible à l'HE sans prétraitement et celui de l'HE extraite à partir des graines traitées avec la cellulase, avec une zone d'inhibition de 17,18 mm respectivement. Elle est peu sensible vis-à-vis l'HE extraite à partir des graines traitées avec l'hémicellulase et la pectinase avec un diamètre d'inhibition de 14 et 15 mm respectivement.
- *Staphylococcus aureus* est extrêmement sensible à l'HE sans prétraitement, avec une zone d'inhibition de 20 mm de diamètre. Par contre, elle présente une forte sensibilité vis-à-vis l'HE extraite à partir des graines traitées avec les différentes enzymes dont le diamètre d'inhibition est presque identique entre 17 et 18 mm.
- *Bacillus subtilis* subsp *spizizenii* présente une sensibilité moyenne vis-à-vis les échantillons d'HE extraite à partir des graines traitées avec la cellulase, l'hémicellulase et la pectinase, avec une zone d'inhibition de 12,15 et 14 mm respectivement. Par contre elle est sensible à l'HE extraite des graines non traitées du fait de la présence d'une zone d'inhibition d'un diamètre de 16 mm.

L'activité antimicrobienne des échantillons d'HE analysés est plus prononcée contre le champignon que les bactéries, et contre les bactéries à gram⁻ que la bactérie à Gram⁺ cette activité peut être attribuée principalement à ses constituants majoritaires la carvone et le limonène .

D'après les résultats obtenus, on remarque que les bactéries sont plus sensibles à l'HE extraite des graines non traitées qu'à celle extraite à partir des graines traitées avec les différentes enzymes.

Des travaux semblables ont été rapportés dans les travaux de Syed et ses coll, en 1987 et Mishenkova et ses coll en 1985. Ils ont étudié l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de carvi qui a montré la présence des zones d'inhibition contre les bactéries : de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, [54].

L'histogramme suivant présente le comportement de l'huile essentielle avec et sans prétraitement enzymatique ainsi vis-à-vis les souches microbiennes.

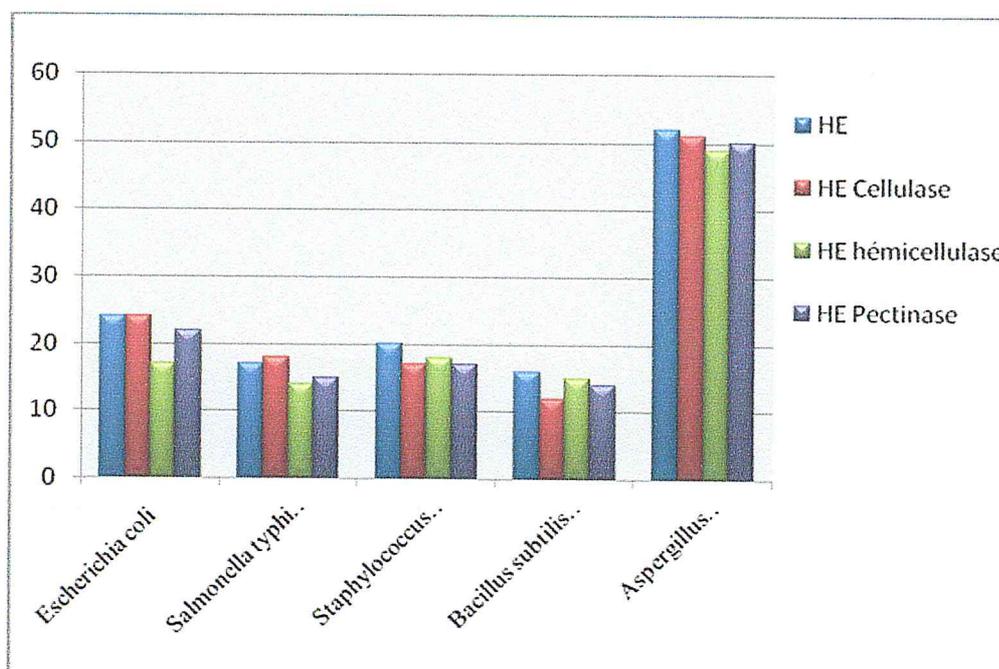


Figure20 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes

III.3.2. Activité antioxydante :

L'activité antioxydante des différents échantillons de HE de carvi vis –à vis du radical DPPH a été évaluée par un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires .



Figure 21 : Réduction du radical DPPH

Dans ce travail, l'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif de l'évaluation de l'activité antioxydante.

Tableau 19a: pourcentage de réduction du DPPH en fonction des concentrations des HEs avant et après traitement enzymatique

Huile Essentielle	Concentration d'HE en (mg/ml)	DO (valeurs moyennes)	% de réduction du DPPH
Huile essentielle extraite des graines non traitée	90	0,248	51,93
	54	0,283	45,16
	36	0,347	32,75
	26	0,387	25
	8	0,470	6,97
	3	0,497	3,68
Huile essentielle extraite des graines traitées avec l'hémicellulase	90	0,168	66,20
	72	0,199	60
	54	0,244	50,91
	36	0,31	37,63
	18	0,40	19,52
	9	0,466	9,69
Huile essentielle extraite des graines traitées avec la cellulase	90	0,23	58,68
	70	0,28	50,11
	50	0,283	45,15
	40	0,300	41,18
	30	0,359	30,43
	10	0,509	4,50
Huile essentielle extraite des graines traitées avec la pectinase	90	0,18	70
	72	0,182	69,66
	54	0,184	69,33
	36	0,258	57
	18	0,408	32
	9	0,546	9

Tableau 19b: pourcentage de réduction du DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique

Standard	Concentration d'HE en (mg/ml)	DO (valeurs moyennes)	% de réduction du DPPH
Acide ascorbique	0,3	0,03	96,64
	0,2	0,23	75,58
	0,1	0,58	38,37
	0,05	0,72	23,24
	0,025	0,77	17,96

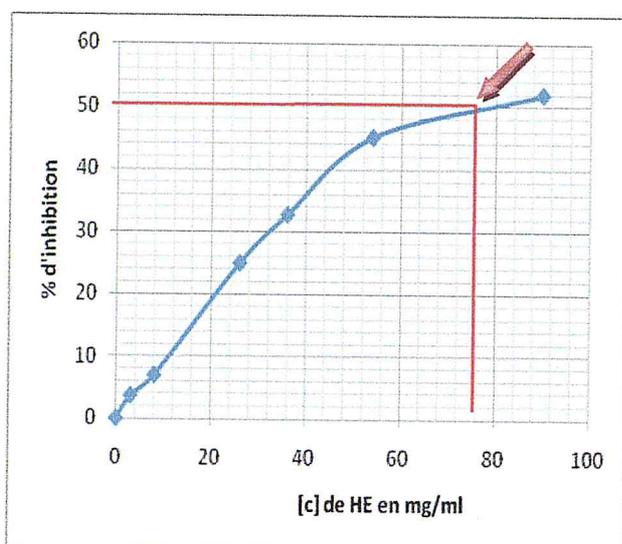


Figure 22 a : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de l'HE extraite des graines non traitées

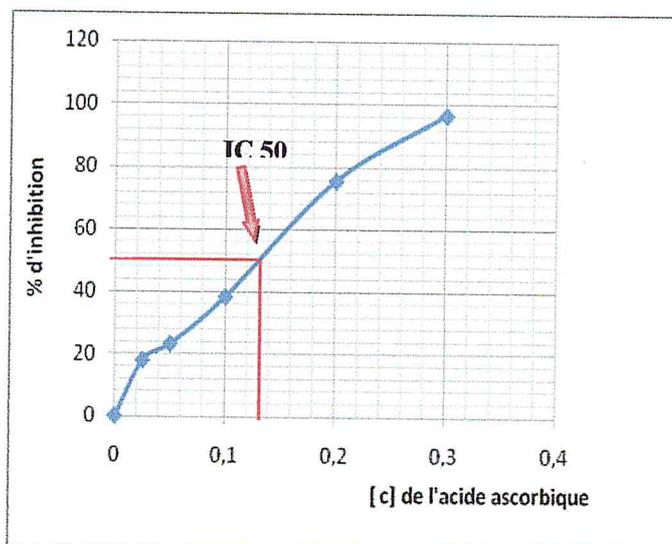


Figure 22b: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique

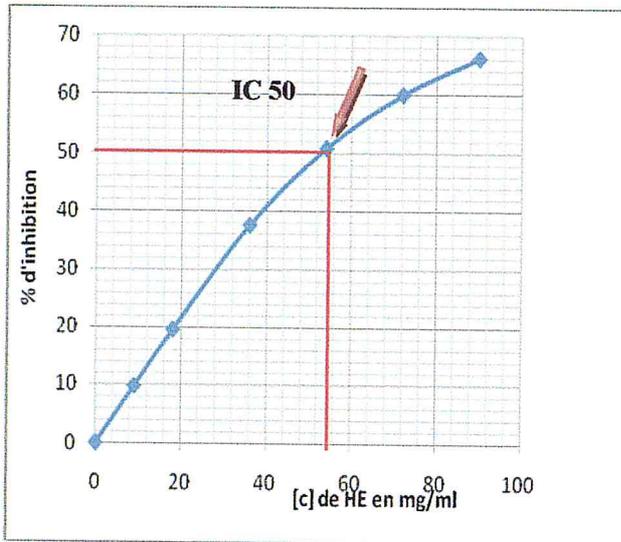


Figure 22c : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de l'HE extraite des graines traitées avec hémicellulase

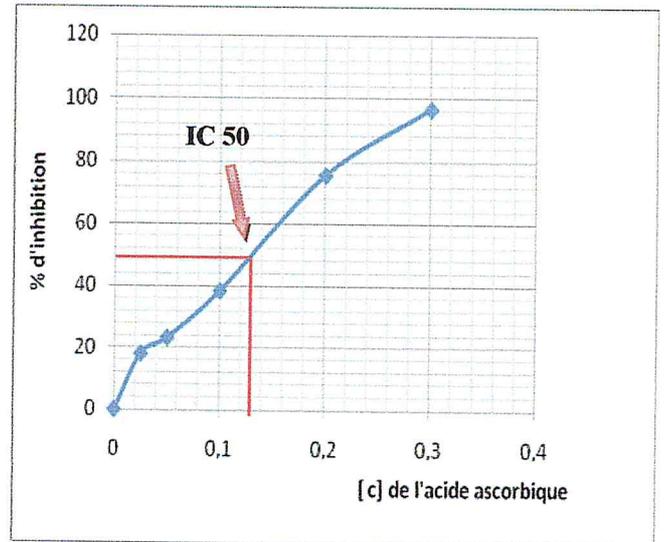


Figure 22b : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique

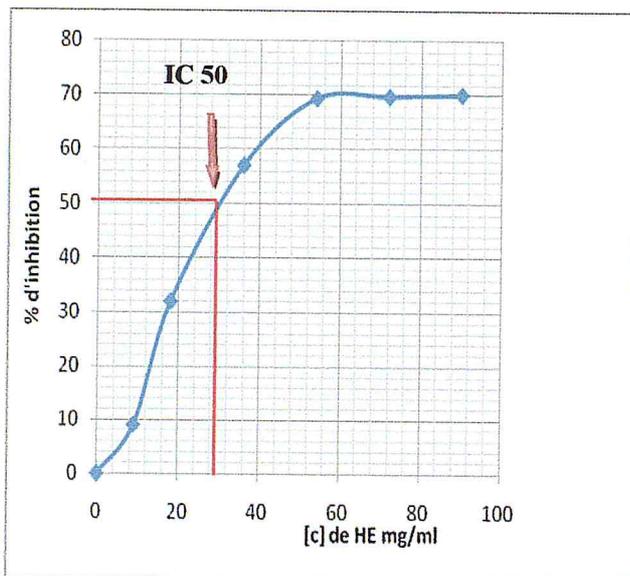


Figure 22d : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de l'HE extraite des graines traitées avec la pectinase

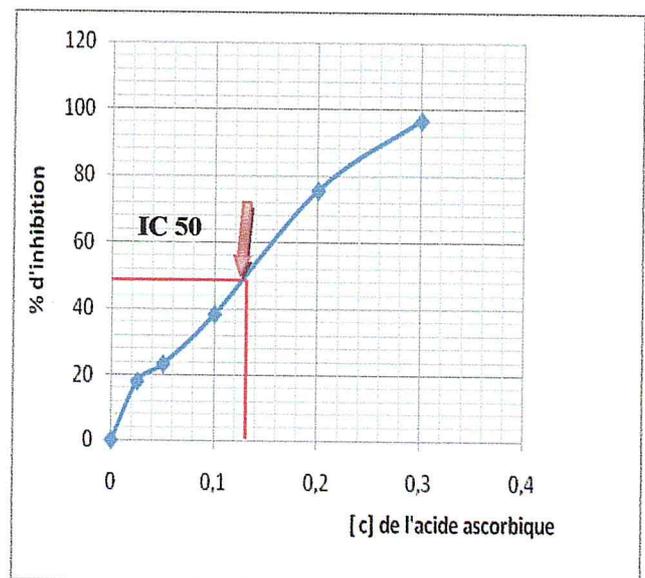


Figure 22b : Pourcentage d'inhibition du libre radical DPPH en fonction d l'acide ascorbique

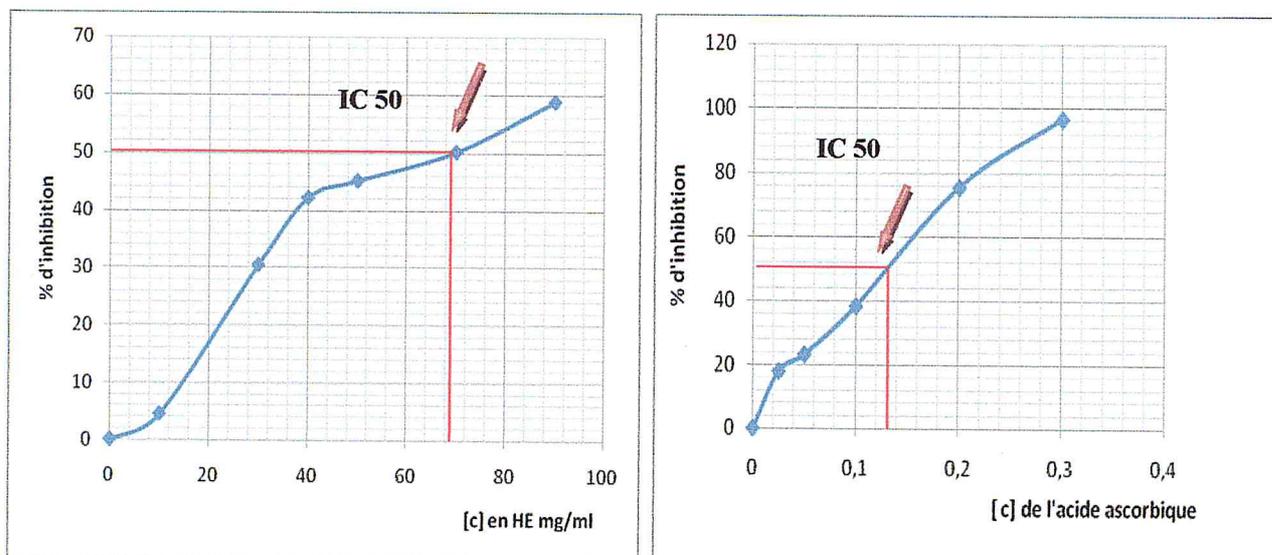


Figure 22e: Pourcentage d’inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de l’HE extraite des graines traitées avec la cellulase.

Figure 22b : Pourcentage d’inhibition du libre radical en fonction de la concentration de l’acide Ascorbique.

Les figures (21a, 21b, 21c, 21d, 21e) rapportent les résultats du pouvoir antioxydant des huiles essentielles extraites des graines de *Carum carvi* avec et sans traitement enzymatique.

Ces résultats montrent que l’huile essentielle présente un pouvoir antioxydant mais qui est nettement inférieur à celui de l’acide ascorbique.

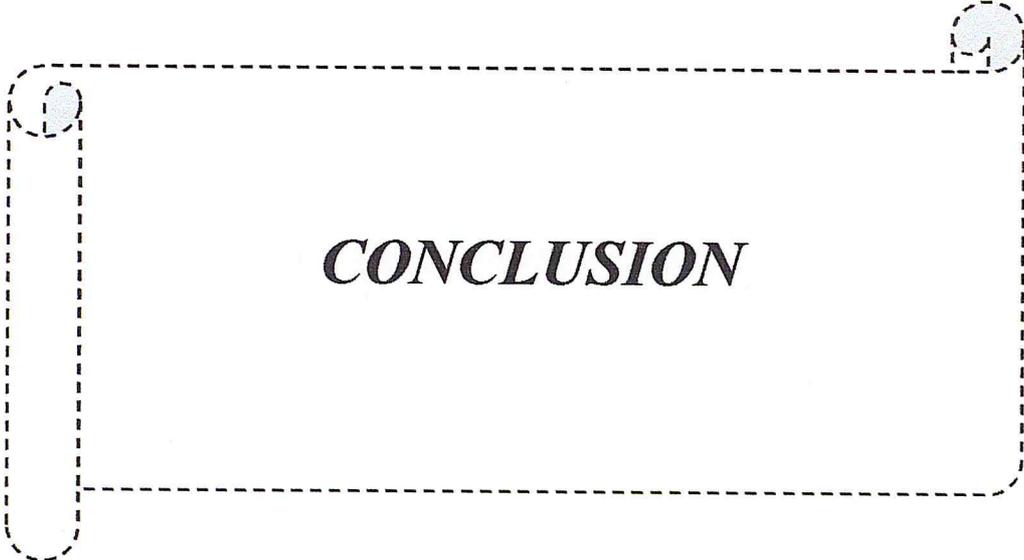
L’activité antioxydante est exprimée en EC50, ce paramètre définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l’activité de DPPH.

Ces EC50 sont déterminés graphiquement dont l’abscisse représente la concentration de l’HE et l’ordonnée présente l’activité antioxydante en pourcentage.

Tableau 20: EC50 et puissance antioxydante (ARP) des échantillons et standard

Huile essentielle	EC50 (mg/ml)	ARP
HE sans prétraitement	75	0.013
HE (cellulase)	68	0.015
HE (Hémicellulase)	53	0.019
HE (pectinase)	31	0.032
Acide ascorbique	0.13	7.69

D'après les résultats des EC50, on constate que le prétraitement enzymatique augmente le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle. Ces résultats montrent aussi que l'huile essentielle extraite des graines de carvi traitées avec la pectinase possède le meilleur pouvoir antioxydant par rapport à l'HE extraite des graines traitées avec l'hémicellulase et la cellulase.



CONCLUSION

Conclusion

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet du prétraitement enzymatique de la matière végétale sur le rendement, les propriétés physico-chimiques et l'activité biologique de l'huile essentielle de *Carum carvi L.* extraite par entraînement à la vapeur d'eau et faire une comparaison avec celle extraite sans prétraitement enzymatique.

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par entraînement à la vapeur d'eau à l'échelle laboratoire. L'étude de certains paramètres influençant le rendement de l'huile essentielle nous a permis d'obtenir un rendement de l'ordre de 0.73%.

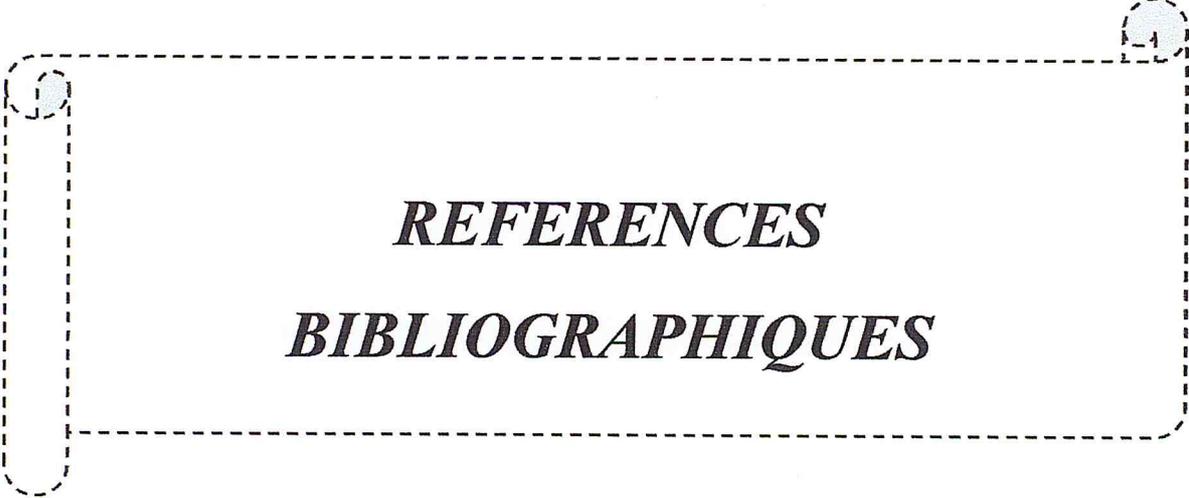
Une augmentation du rendement a été observée après l'utilisation des enzymes (cellulase, hémicellulase et pectinase) pour un prétraitement de la matière végétale. L'étude de l'effet de la concentration de chaque enzyme a montré que le rendement a augmenté de 0,73% sans prétraitement à 0,85% pour la pectinase, 0,93% pour l'hémicellulase et 1.01 % pour la cellulase avec des concentrations de 0.05, 0.1 et 0.5 (w/w) respectivement. De même, l'étude de l'effet du temps d'incubation sur le rendement a montré que le traitement de carvi avec la cellulase a donné le meilleur rendement pour la période d'incubation de 30,60 et 90 min de l'ordre 0.93%, 0.97%, 0,99% avec une légère augmentation dans le rendement en huile essentielle (1%) pour une période de 120min. Cependant, le traitement du carvi avec la pectinase et l'hémicellulase a donné un rendement égale à 1,01% et 0,92% respectivement pour une durée de 120min d'incubation.

L'optimisation des paramètres du prétraitement enzymatique de la carvi avec la cellulase « concentration de cellulase » et « temps d'incubation » par le plan composite centré a montré que l'effet simple du « temps d'incubation » est la variable quantitative présentant l'influence la plus importante sur le rendement, suivi par l'effet d'interaction du couple « temps d'incubation - concentration de cellulase » et l'effet simple « concentration de cellulase ». Ainsi que la valeur du coefficient de détermination R^2 qui est égale a 98.57%, indique une meilleure relation entre l'expérimental et le modèle choisi

L'analyse physico-chimique de l'huile essentielle avec et sans prétraitement ont montré que le prétraitement enzymatique ne possède pas une grande influence sur les propriétés.

Les tests d'activités antimicrobiennes effectués sur l'huile essentielle extraite de la carvi avec et sans prétraitement enzymatique ont montré qu'ils avaient des actions extrêmement inhibitrices contre *Aspergillus brasiliensis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*

L'étude de l'activité antioxydante réalisée par la méthode du piégeage de radical libre DPPH a montré que tous les échantillons de l'huile essentielle de *carum carvi* avec et sans prétraitement enzymatique possèdent un pouvoir antioxydant faible par rapport à l'acide ascorbique.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] S.Kung, C.J. Arntzen (1988). « Plant Biotechnology ». Boston : Butterworth, J.E. Smith 2nd . London : Edward Arnold 337-353.
- [2] J. Verdrag (1978). « Ces médicaments qui nous viennent des plantes » , EdS.A. Maloine , 151p
- [3] M. Fernandez (2010). « De quelques plantes dites médicinales et de leurs fonctions ».
- [4] M.N. Boukhatem, M.S. Hamaidi, F.Saidi, Y.Hakim (2010). Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du *Géranium Rosat (Pelargonium graveolens L.)* cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). Nature et technologie.
- [5] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaoma (2008) .Biological effects of essential oils –A review. Food and chemical toxicology 46 ,446-475.
- [6] L.Gardossi, et al. (2009). Guidelines for reporting of biocatalytic reactions. Trends Biotechnol. 28, 171–180.
- [7] M.Puri, D.Sharma, C.J.Barrow (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. Trends in biotechnologie, vol 30, No 1.
- [8] H.B. Sowbhagya, P. Srinivas, N. Krishnamurthy (2010). Effect of enzymes on extraction of volatiles from celery seeds. Food Chemistry 120, 230-234.
- [9] A. Rouibi (2011) .Etude photochimique et activité antimicrobienne des molécules actives de *Cassia actifolia* et de *Cassia obovata*. Effet du stress salin et thermique sur la callogenèse et la biosynthèse des molécules actives. Thèse de doctorat, Université de Blida
- [10] R. Rajamanickam, R. Kumar, G. Johnsy, S.N.Sabapathy (2013). Sorption characteristics and some physical properties of caraway (*Carum Carvi L.*) seeds. International Food Research Journal 20(3): 1223-1227.
- [11] S. Lahlou, A. Tahraoui, Z.Israili, B.Lyoussi (2007). Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats. Journal of Ethnopharmacology 110 ,458-463.
- [12] M. Banahmed. (2009). Contribution à l'étude phytochimique de deux plantes de la famille des apiaceae : *carum montanum* coss. & dur. et *bupleurum montanum* coss. Thèse de doctorat en chimie organique, option phytochimie. Université Mentouri-Constantine, Algérie.

- [13] M. Botineau, «Préface de Jean-Marie- Pelt .Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs ».
- [14]B.Laribi, K. Koukia, T. Bettaieba, A. Mougoua, B. Marzouk(2009). Essential oils and fatty acids composition of Tunisian, German and Egyptian caraway (*Carum carvi L.*) seed ecotypes: A comparative study. *Industrial Crops and Products* 41 ,312– 318.
- [15]Classification / USDA plants (united states departement of agriculture)23-12-2013.
- [16]K. Assami, D. Pingretc, S. Chemat, B.Y. Meklati, F.Chemat (2012) .Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi L.* seeds *Chemical Engineering and Processing* 62 ,99– 105.
- [17] G.Gilly, « Préface de Hubert Richard. Les plantes aromatiques et huiles essentielles à Grasse » p 111 ,112.
- [18]A.Evenhuis, B. Verdam, M. Gerlagh, H.M. Goossen-van de Geijn(1995). Studies on major diseases of caraway (*Carum cawi*) in the Netherlands. *Industrial Crops and Products* 4, 53-61.
- [19]A.K. Borg-karlgon, T. Valterovat, L.Anders Nilleson. (1994). Volatile compounds from flowers of six species in the family Apiaceae: bouquets for different pollinators. *Phytochemistry*. 1. 35, no. 1. pp. 111-119.
- [20]Judd.Campbell,Kellogg.stevens, « Botanique systématique, une perspective phylogénétique ». Traduction et révision scientifique de la première édition américaine par J. Bouharmont et C.M. Evrard.
- [21] Classification des plantes par famille ; Dupeyré M. 3 décembre 2013.
- [22] A.Farhat(2010).Vapo-Diffusion assistée par micro-ondes : conception et application Thèse de doctorat, université d'Avignon et des Pays de Vauclise .
- [23] M. Kamaleeswari, D. Kumaraswami, M. Sengottuvelan, N. Namasivayam.(2006). Effect of dietary caraway (*Carum carvi L.*) on aberrant crypt foci development, fecal steroids, and intestinal alkaline phosphatase activities in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis.*Toxicology and Applied Pharmacology* 214, 290–296.

- [24] A. Sattar, M. Ashraf, M.K. Bhatti, L.H. Chisti, phytochemistry (1978) .17,559-560.
- [25] T. Baysal, D.A.J.Starmans (1999). Supercritical carbon dioxide extraction of carvone and limonene from caraway seed. Journal of Supercritical Fluids 14, 225–234.
- [26] B. Laribi, I. Bettaieb, K. Kouki, A. Sahli, A. Mougou, B.Marzouk (2009).Water deficit effects on caraway (*Carum carvi* L.) growth, essential oil and fattyacid composition.Industrial Crops and Products 30, 372–379.
- [27]M. Razzaghi-Abyaneh, M. Shams-Ghahfarokhi, R. Mohammad-Bagher,K. Jaimand S. Alinezh,R. Saberi, T. Yoshinari(2009). Chemical composition and antiaflatoxic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils.Food Control 20, 1018–1024.
- [28]O. Chouitah (2011). Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra* .Thèse de doctorat, Es-sciences, département de biologie, université d’Oran.
- [29]M. Eddouks, A. Lemhadri, J.B. Michel(2004). Caraway and caper: potential anti-hyperglycaemic plants in diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 94, 143–148.
- [30]N.B. Thippeswamy, K. Akhilender Naidu, N. Rajeshwara Achur (2013). Antioxidant and antibacterial properties of phenolic extract from *Carum carvi* L.journal of pharmacy research, 7,352-357.
- [31] K. Boutemak(2011). Contribution à l’étude des procédés d’extraction conventionnels et innovants appliqués à la récupération de l’huile essentielle de l’armoise blanche d’Algérie *Artemisia Hrba Alba*. Thèse de doctorat. Spécialité :Génie des procédés . Université de Blida I, Algérie.
- [32]Yan Wua, Steve W. Cui, Jian Tang, Xiaohong Gu (2007).Optimization of extraction process of crude polysaccharides fromboat-fruited sterculia seeds by response surface methodology. Food Chemistry .105, 1599–1605.
- [33] K.L. Nagendra chari, D. Manasa, P. Srinivas, H.B. Sowbhagya (2013).Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger.(*Zingiber officinale* Roscoe) Food Chemistry 139, 509–514.

- [34] H.B. Sowbhagya , Kaul T. Purnima , Suma P. Florence , A.G. Appu Rao , P. Srinivas (2009) Evaluation of enzyme-assisted extraction on quality of garlic volatile oil. *Food Chemistry*. 113 ,1234–1238.
- [35] Yu-Chun Yang, Ji Li, Yuan-Gang Zu, Yu-Jie Fu , Meng Luo, Nan Wu, Xiao-Lei Liu (2010). Optimisation of microwave-assisted enzymatic extraction of corilagin and geraniin from *Geranium sibiricum* Linne and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry* 122 ,373–380.
- [36] J. Goupy, L Creighton (2006), *Introduction aux plans d'expériences*, 3^{ème} édition. Dunod. Paris.
- [37] J. Goupy (1997). *Modélisation par les plans d'expériences*. Techniques de l'ingénieur. Traité Mesure et contrôle, R 275.
- [38] G.E.P.Box & K.B. Wilson(1951). the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 13, pp. 1-45.
- [39] J.Yoon.(2007). Application of experimental design and optimization to PFC model calibration in uniaxial compression simulation. *International Journal Of Rock Mechanics & Mining Sciences*, 44, 871-889.
- [40] S.A. Rezzoug, C. Boutekdjiret, K. Allaf (2004). Optimization of operating of rosemary essential oil extraction by a fast controlled pressure drop process using response surface methodology. *Journal of food engineering*.
- [41] S. Zeboudj, N. Belhaneche-Bensemra, R. Belabbes (2005). Use of surface response methodology for the optimization of the concentration of the sweet orange essential oil of Algeria by wiped film evaporator. *Journal of food Engineering* 67, 507-512.
- [42] M. E. Lucchesi, J. Smadja, S. Bradshaw, W. Louw, F. Chemat (2006). Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L. A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of food engineering*, 79, 1079-1086.
- [43] J. Goupy. *Modélisation par les plans d'expériences*. Techniques de l'ingénieur Traité mesures et contrôle. R275.
- [44] S.A. Burt, R.D. Reinders (2003). "Antibacterial activity of selected plant essential oils against *E. coli* O 157:H7". *Letters in Applied Microbiology*, V. 36 n° 3, 16 -167.

- [45] M. Lahlou (2004). "Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils"- *Phytotherapy research*, n°18, 435-448.
- [46] J.L Fauchere, J.L. Avril (2002) « Bactériologie générale et médicale ». Ellipses éditent, Paris, 365.
- [47] V. Guerin-fauble, G. Carret (1999). « L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites ». Journées Nationales GTV- INRA, 5-12.
- [48] C. Duraffourd, J-C. Lapraz, R. Chemli, (1997). La plante médicinale de la tradition à la science. 1er congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris, p.222.
- [49] A.Y. Loo, K. Jain, I. Darah (2008). « Antioxydant activity of compound isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata* ». *Food chemistry*, 107, p.1151-1160.
- [50] P. Molyneux (2004). « The use of the stable free radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity », *Songklanakarin J. Sci. Technol* 26 (2), p. 211-219.
- [51] R. M. Samarth, M. Panwar, A. Soni, M. Kumar, A. Kumar (2008). Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract *Food Chemistry*, 106, 868-873.
- [52] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel- Wissenschaft and Technology*, 28, 25-30.
- [53] Herbert Hopf and Orro Kandler (1977). Characterization of the 'reserve cellulose' of the endosperm of *Carum carum* as a β (1-4)-mannan. *botanisches institut der universitat Munchen, Menzinger strasse 67, d-8000 Munchen 19, west Germany*.
- [54] M. Virot (2009). Soxhlet assisté par micro-ondes. Conception et application à l'extraction des matières grasses. Thèse de doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
- [55] S. K. Malhotra (2012). Council of Agricultural Research, India.

ANNEXE

ANNEXE

Propriétés physico-chimiques

Pour obtenir de données sur la composition et le degré de pureté des huiles essentielles et, dans certains cas, pour l'identifier, on procède à l'étude de ses propriétés physiques et chimiques.

Mesure des indices chimiques

✓ **Détermination de l'indice d'acide (AFNOR NF T 60-2000)**

La détermination de l'indice d'acide renseigne généralement sur le degré d'hydrolyse. Les huiles essentielles ne contiennent pas ou très peu d'acides gras libres à courte chaîne carbonique. Ce paramètre est une variable qui dépend essentiellement des conditions de conservation et surtout des conditions d'extractions.

L'indice d'acide I_A est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de Potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans un gramme de l'huile essentielle.

Méthode de calcul

L'indice d'acide est exprimé selon la formule suivante :

Où :

I_A : L'indice d'acide

V : Le volume de KOH (0.1M) consommé en ml.

m : La masse de la substance à examiner en g

✓ **Détermination de l'indice d'ester (AFNOR NF T 75-104:1994)**

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'huile essentielle. L'hydrolyse des esters présents dans l'huile essentielle se fait par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique et dosage en retour de l'excès

d'alcali par une solution d'acide chlorhydrique HCl. La figure 10 illustre les différentes étapes de la détermination de l'indice d'ester.

L'indice d'ester (IE) est donné par la formule suivante :

Où :

IE : Indice d'ester ;

V_0 : est le volume, ml, de la solution de HCl utilisé pour l'essai à blanc ;

V_1 : est le volume, ml, de la solution de HCl utilisé pour la détermination ;

m : est la masse, en grammes, de l'huile essentielle ;

IA : est la valeur de l'indice d'acide déterminé selon la norme NF T 75-103

II.3.2.2. Mesure des grandeurs physiques

✓ **Mesure de la miscibilité à l'éthanol** : (AFNOR NF T 75-101 ;2000)

Une huile essentielle est dite miscible à V volumes et plus d'éthanol de titre alcoométrique déterminé , à la température de 20 ° C ,lorsque le mélange de 1 volume de l'huile essentielle considérée avec V volumes de cet éthanol est limpide et le reste après addition graduelle d'éthanol de même titre, jusqu'à un total de 20 volumes.

La miscibilité des HE a été déterminée dans de l'éthanol à 96%

✓ **Détermination de l'indice de réfraction** : (AFNOR ISO 280 : 1999(75-112))

L'indice de réfraction n_D d'un milieu homogène, transparent, peut être défini comme le pouvoir qui possède ce milieu pour dévier un rayon arrivant sur la surface selon British pharmacopeia. La détermination de l'indice de réfraction se fait à l'aide d'un refractomètre

Mode opératoire :

On met de l'HE dans la cellule de mesure en moyennant une micropipette, puis on referme le couvercle. Au bout de quinze secondes (le temps nécessaire pour que l'appareil soit stabilisé à 20°C) on règle l'appareil jusqu'à la localisation du trait au centre de la cellule,

on lit alors la valeur de l'indice de réfraction n_{TD}