



# Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens

Dima Mnayer

► **To cite this version:**

Dima Mnayer. Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens. Autre. Université d'Avignon, 2014. Français. <NNT : 2014AVIG0257>. <tel-01271999>

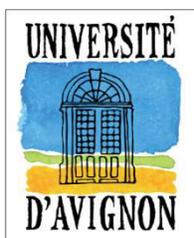
**HAL Id: tel-01271999**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01271999>**

Submitted on 10 Feb 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ D'AVIGNON  
ET DES PAYS DE VAUCLUSE

ACADEMIE D'AIX-MARSEILLE

UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

*ED 536-Sciences et Agrosociences*

# THESE

Présentée pour obtenir le grade de Docteur en Sciences  
de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

**SPECIALITE : CHIMIE**

Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes  
alimentaires en vue d'une application comme agents  
antioxydants et antimicrobiens

par

**Dima MNAYER**

*Ingénieur Agronome*

**Soutenu le 9 Décembre 2014 devant un jury composé de :**

ALLAF	Karim	Professeur Université de la Rochelle, France	<i>Rapporteur</i>
CHEMAT	Farid	Professeur UMR 408 INRA-Université d'Avignon, France	<i>Président du jury</i>
FABIANO-TIXIER	Anne-Sylvie	Maître de conférences HDR UMR 408 INRA Université d'Avignon, France	<i>Directeur de thèse</i>
HAMIEH	Tayssir	Professeur Laboratoire MCEMA, Université Libanaise, Liban	<i>Directeur de thèse</i>
VILAREM	Gérard	Professeur ENSIACET, Toulouse, France	<i>Rapporteur</i>





UNIVERSITÉ D'AVIGNON  
ET DES PAYS DE VAUCLUSE

ACADEMIE D'AIX-MARSEILLE

UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

*ED 536-Sciences et Agrosociences*

# THESE

Présentée pour obtenir le grade de Docteur en Sciences  
de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

**SPECIALITE : CHIMIE**

Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes  
alimentaires en vue d'une application comme agents  
antioxydants et antimicrobiens

par

**Dima MNAYER**

*Ingénieur Agronome*

**Soutenu le 9 Décembre 2014 devant un jury composé de :**

ALLAF	Karim	Professeur Université de la Rochelle, France	<i>Rapporteur</i>
CHEMAT	Farid	Professeur UMR 408 INRA-Université d'Avignon, France	<i>Président du jury</i>
FABIANO-TIXIER	Anne-Sylvie	Maître de conférences HDR UMR 408 INRA Université d'Avignon, France	<i>Directeur de thèse</i>
HAMIEH	Tayssir	Professeur Laboratoire MCEMA, Université Libanaise, Liban	<i>Directeur de thèse</i>
VILAREM	Gérard	Professeur ENSIACET, Toulouse, France	<i>Rapporteur</i>

## *Dédicaces*

*À mon mari Jean,  
Pour avoir vécu avec moi,  
Les bons et les durs moments de la thèse,  
Qui est devenue aussi son rêve...*

## Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail : que le **Prof Karim Allaf** et le **Prof Gérard Vilarem** trouvent mes sincères remerciements pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Je souhaite par ailleurs adresser mes remerciements au **Prof Farid Chemat** pour avoir accepté de présider ce jury et pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire GREEN.*

*Saurai-je trouver les mots pour manifester toute ma gratitude à mes directeurs de thèse :*

***Dr HDR Anne-Sylvie Fabiano-Tixier** qui a été toujours présente durant mon travail. Ça a été un honneur d'être sa première doctorante pendant ces trois années. Sa gentillesse, sa rigueur scientifique et ses conseils ont toujours été très constructifs et m'ont permis de bien avancer dans la thèse.*

*De même, j'adresse mes plus vifs remerciements à mon directeur de thèse du côté libanais le **Doyen Tayssir Hamieh** qui n'a jamais cessé de croire en moi. Je suis très reconnaissante pour m'avoir donné l'occasion de faire ma thèse, de me faciliter la procédure d'accès au laboratoire GREEN à l'Université d'Avignon et de m'avoir permis de mener une partie de ma thèse à la Faculté d'Agronomie à l'Université Libanaise. Je vous remercie aussi pour votre gentillesse, votre générosité, vos conseils et votre support durant mon parcours.*

*Mais aussi, grand merci pour mes directeurs pour leur accompagnement et leur suivi durant mon travail au Liban, en sorte que je me sente toujours comme faisant partie de leur équipe.*

*Merci pour l'accueil chaleureux et l'exclusivité du temps et pour tout support qu'ils m'ont accordés durant mon séjour en France, merci pour leurs encouragements dans mes moments d'angoisse.*

*Je tiens à dire un grand merci à **Dr Nancy Nehme** pour l'aide qu'elle m'a apportée dans la partie microbiologique de la thèse. Je lui exprime toute ma reconnaissance et mon amitié.*

*Je tiens dans ce contexte de cette partie à remercier également le Directeur Général de l'Institut de Recherche Agronomique Libanais, l'Ing. **Michel Afram** pour m'avoir fourni les souches bactériennes pures.*

*Mes plus sincères remerciements s'adressent à **M. Emmanuel Petitcolas** pour sa présence quotidienne dans la vie du laboratoire GREEN. Son assistance technique pour les manipulations m'a permis de bien avancer et son continuel encouragement m'a donné une grande motivation et dynamisme.*

*Je tiens à remercier très chaleureusement l'équipe GREEN à l'Université d'Avignon : **Mme Karine Ruiz, M. Julien Matois, Dr Maryline Abert Van, Dr Sadrine Périno, et Dr Njara Rakotomanomana**, pour leur présence et leur aide au quotidien. J'adresse mes sincères remerciements à mes collègues et amis de l'équipe GREEN, m'ayant accompagnés au cours de cette thèse : **Tamara Allaf, Céline Tanzi, Ying Li, Loïc Petigny, Emilie Ivanoff, Natacha Rombaut, Aurore Filly, Anne-Gaëlle Sicaire, Magalie Jacotet Navarro, Aissata Ball, Cassandra Breil** ; sans oublier celles qui sont passées par notre équipe, **Prof Chahrazed Boutekedjiret, Sabiha Achat et Meryem Boukroufa** et ceux qui sont juste en face et qui ont été d'un soutien plus qu'agréable, **Cyril et Simon**. Ça a été un vrai honneur de travailler au sein de cette équipe dans un environnement dynamique et sérieux avec un bon esprit de collaboration.*

*Mes plus profonds remerciements s'adressent au **Prof Xavier Fernandez** de l'Université de Nice, à **M. Jean Philippe Paris** de la Société Payan Bertrand, Grasse pour les analyses de spectrométrie de masse en phase gazeuse. J'adresse également mes remerciements à **Mme Christine Ferrant** de la Société Ferrant P.H.E, Rodelinghem, pour sa précieuse contribution dans le travail.*

*Je tiens également à exprimer toute ma gratitude aux **Prof Karim Allaf, Prof Tayssir Hamieh, Prof Farid Chemat, Dr Samir Medawar et Dr Wissam Medawar** qui, grâce à leurs efforts, m'ont permis d'avoir accès à l'Université d'Avignon.*

*J'adresse mes vifs remerciements à l'équipe de Liban à la faculté d'Agronomie à l'Université Libanaise, dont chacun a collaboré à sa manière : Je remercie tout d'abord les deux Doyens de la faculté **Prof Tayssir Hamieh** (l'ancien Doyen) et **Dr Samir Medawar** (le nouveau Doyen nommé récemment) qui ont été toujours un vrai support pour moi. Je remercie également mes collègues : **Ing Rindala Hakim, Ing Rachelle Mrad, Ing Zahra Nour el Din, Ing Ghassan Abd***

*el Menhem, Dr Elham el Haj, Dr Joe Rouphael, Dr Racha Karaki, Dr Rabih Roumouz, Mme Nada Sacre et bien d'autres.*

*Je remercie infiniment mon beau-frère l'Ing Khalil Achkar, Mme Layla Chafik et sa fille Cylia qui ont été ma deuxième famille en France. Je leur remercie pour les bons moments qu'on a partagés ensemble. Votre présence à côté de moi m'a permis de surmonter les moments difficiles.*

*De même, je tiens à remercier mes amis en France, Shiraz Bitar, son mari Bahaa Kasouha, et leurs filles Alma et Jana, Marie-Noëlle Douaiher et son mari Jean-Louis Masson, Mounia Makhoul, Marie-Joe Karam, Bassam Jabaian, Gihan Mohamad, Nadine Wazen et bien d'autres que j'oublie sûrement. Je vous remercie pour la bonne compagnie.*

*Je remercie aussi mes amies Nesrine Ger et Lody Awad pour tout l'encouragement au cours de la thèse. Je remercie également tous mes cousins et mes amis pour la confiance et leur aide et le support inconditionnel qu'ils ont su me procurer tout au long de ces années.*

*Merci à ma belle-famille pour leur support tout au long de mon travail, je remercie également Elie Asmar pour son aide.*

*Un merci du fond du cœur à mon père, à ma mère et à mon frère Naji pour votre touchante inquiétude quant à l'avancée de mes travaux. Je vous remercie pour votre amour, votre soutien et votre stimulante fierté. Les mots sont faibles pour exprimer la force de mes sentiments, la reconnaissance et l'amour que je vous porte.*

*Enfin, mes pensées vont à mon mari Jean Achkar pour avoir vécu au rythme de la thèse, pour m'avoir aidé à surmonter tous les obstacles et les moments difficiles. Merci pour l'amour inconditionnel, l'encouragement continu, la patience qui m'ont soutenu tout au long de mon chemin. Sans lui, je n'aurai pas pu y parvenir.*

## **Avant-propos**

Ce travail a été réalisé au laboratoire GREEN (Groupe de Recherche en Eco-Extraction de produits Naturels) à la Faculté des Sciences, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. Une partie des travaux a été effectuée au laboratoire de microbiologie à la Faculté d'Agronomie et de Médecine Vétérinaire, Université Libanaise.

Les résultats obtenus ont fait l'objet des publications suivantes et ont été également valorisés par une communication par affiche :

### **Publications scientifiques**

Dima Mnayer, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Emmanuel Petitcolas, Tayssir Hamieh, Nancy Nehme, Christine Ferrant, Xavier Fernandez, Farid Chemat. "Extraction, chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of six essential oils from the Alliaceae family: garlic, onion, leek, Chinese chive, shallot and chive". *Molecules* **2014**, *19*, 20034-20053

Dima Mnayer, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Emmanuel Petitcolas, Karine Ruiz, Tayssir Hamieh, Farid Chemat. "Simultaneous extraction of essential oils and flavonoids from onions using turbo extraction distillation". *Food analytical methods*. DOI: 10.1007/s12161-014-9884-9.

### **Communication par affiche**

Dima Mnayer, Aurore Filly, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Emmanuel Petitcolas, Karine Ruiz, Tayssir Hamieh, Jean-Philippe Paris, Farid Chemat. *Green Concrete and Absolute using Ultrasound technology for perfumery application*. 14th meeting of the European society of Sonochemistry. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Juin 2-6, 2014.

## **Table des matières**

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>Chapitre I. Les huiles essentielles et arômes: application en agroalimentaire</b> .....	4
I.1. Définition des huiles essentielles et des arômes .....	5
I.2. Composition des huiles essentielles et des arômes .....	5
I.2.1 Les terpènes et terpénoïdes .....	6
I.2.2 Les composés aromatiques .....	7
I.3. Mode d'extraction.....	8
I.3.1 Distillation par entraînement à la vapeur .....	8
I.3.2 Hydrodistillation .....	9
I.3.3 Turbo hydrodistillation .....	10
I.3.4 Expression à froid .....	11
I.3.5 Extraction des molécules aromatiques (concrètes et absolues) .....	12
I.3.5.1 Enfleurage et extraction .....	12
I.3.5.2 Extraction aux solvants .....	12
I.3.6 Extraction aux ultrasons .....	13
I.3.7 Autres méthodes .....	14
I.3.7.1 Extraction sans solvant assistée par micro-ondes .....	14
I.3.7.2 Détente instantanée contrôlée .....	15
I.4. Les huiles essentielles et leurs constituants comme antioxydants .....	16
I.4.1 Les principales techniques de détermination de l'activité antioxydante .....	16
I.4.1.1 Détermination de l'indice de peroxyde (IP) .....	16
I.4.1.2 Détermination des diènes conjugués.....	17
I.4.1.3 Indice p-anisidine.....	17
I.4.1.4 Méthode de sr-TBA (substance réactive acide thiobarbiturique) .....	17
I.4.1.5 Méthode TEAC ( <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> ) .....	18
I.4.1.6 DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) .....	18
I.4.1.7 Folin-Ciocalteu .....	19
I.4.1.8 FRAP ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> ) .....	20
I.4.1.9 Test de blanchissement du $\beta$ - carotène .....	20
I.4.1.10 TRAP ( <i>Total Radical Trapping Antioxidant Parameter</i> ) .....	21

I.4.1.11 ORAC ( <i>Oxygen Radical Absorbance Assay</i> ).....	21
I.4.1.12 RPE (Résonance paramagnétique électronique).....	21
I.4.2 Les huiles essentielles et leurs constituants comme antioxydants: application en agroalimentaire .....	22
I.5. Les huiles essentielles et leurs constituants comme antimicrobiens.....	26
I.5.1 Méthode de diffusion.....	27
I.5.1.1 Méthode de diffusion par disque .....	27
I.5.1.2 Méthode des puits .....	28
I.5.2 Méthode de dilution.....	28
I.5.2.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	28
I.5.2.2 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) en milieu solide .....	29
I.5.2.3 Autres méthodes .....	30
I.5.2.3.1 Dynamique d'action des huiles essentielles par mesure de la décroissance bactérienne ( <i>Time-kill assay</i> ).....	30
I.5.2.3.2 Microscopie électronique à transmission.....	30
I.5.2.3.3 Compte total de viables ( <i>total viable count</i> (TVC)) .....	30
I.5.3 Les huiles essentielles et leurs constituants comme antimicrobiens: application en agroalimentaire .....	31
I.6. Autres applications .....	34
I.6.1 Les huiles essentielles et leurs constituants comme bioinsecticides.....	34
I.6.2 Les huiles essentielles et arômes: dans les parfums et les cosmétiques .....	35
I.6.3 Les huiles essentielles et arômes en tant qu'arôme alimentaire .....	36
I.6.4 Les huiles essentielles et arômes: en aromathérapie et pharmacie .....	36
I.6.5 Les huiles essentielles et arômes: dans la chimie verte .....	38
Références bibliographiques.....	39

**Chapitre II. Extraction, composition chimique, activités antimicrobiennes et antioxydantes des six huiles essentielles de la famille des Alliées: ail, oignon, poireau, ciboule, échalote et ciboulette....** 48

II.1. Introduction .....	49
II.2. Matériels et méthodes.....	50
II.2.1 Produits chimiques .....	50
II.2.2 Huiles essentielles: extraction et rendement.....	51
II.2.3 Identification par GC-FID et GS-MS .....	51

II.2.4 Les souches bactériennes.....	52
II.2.5 Méthode de disque.....	53
II.2.6 Folin-Ciocalteu.....	54
II.2.7 DPPH.....	54
II.2.8 Test de l'huile de friture.....	55
II.2.9 Analyse statistique.....	55
II.3. Résultats et discussion.....	56
II.3.1 La composition chimique des huiles essentielles .....	56
II.3.2 L'activité antimicrobienne <i>in vitro</i> .....	65
II.3.3 Composés phénoliques totaux .....	70
II.3.4 DPPH.....	71
II.3.5 Test de friture .....	74
II.4. Conclusion.....	75
Références bibliographiques .....	76

<b>Chapitre III. L'extraction simultanée des huiles essentielles et des flavonoïdes d'oignons par turbo extraction-distillation.....</b>	<b>80</b>
III.1. Introduction.....	81
III.2. Matériels et méthodes .....	84
III.2.1 Matières premières.....	84
III.2.2 Produits chimiques.....	84
III.2.3 Turbo hydrodistillation: dispositif et procédure.....	84
III.2.4 Extraction des huiles essentielles.....	85
III.2.5 Détermination de la teneur en matière sèche .....	85
III.2.6 Extraction conventionnelle des polyphénols.....	85
III.2.7 Composés phénoliques totaux.....	86
III.2.8 Analyses HPLC.....	86
III.3. Résultats et discussion .....	87
III.3.1 Phénomène de chauffage de turbo hydrodistillation .....	87
III.3.2 Huiles essentielles: extraction, rendement et analyse .....	88
III.3.3 Phase aqueuse: cinétique.....	89
III.3.3.1 Rendement d'extraction de la matière sèche .....	89
III.3.3.2 Composés phénoliques totaux.....	89

III.3.4 Bilan de matière .....	90
III.3.5 Teneurs en polyphénols des extraits d'oignons par turbo hydrodistillation .....	92
III.3.5.1 Composés phénoliques totaux.....	92
III.3.5.2 Teneur en flavonoïdes des échantillons d'oignons .....	92
III.3.5.2.1 Oignon frais.....	92
III.3.5.2.2 Sous-produits d'oignon .....	93
III.3.5.3 Bilan de matière de la quercétine .....	94
III.4. Conclusion .....	97
Références bibliographiques .....	98

**Chapitre IV. Extraction d'éco-concrète et d'éco-absolue utilisant la technologie aux ultrasons pour l'application en alimentaire.....** 102

IV.1. Introduction.....	104
IV.2. Matériels et Méthodes.....	106
IV.2.1 Matériel végétal et produits chimiques .....	106
IV.2.2 Procédures d'extraction .....	106
IV.2.3 Plan d'expériences .....	108
IV.2.4 Etude de cinétique.....	110
IV.2.5 Analyse GC-MS.....	110
IV.2.6 Composés phénoliques totaux .....	111
IV.2.7 DPPH .....	111
IV.2.8 Test de l'huile de friture.....	112
IV.3. Résultats et discussion .....	112
IV.3.1 Etudes de plan d'expériences.....	112
IV.3.1.1 Résultats des rendements d'absolues .....	113
IV.3.1.2 Optimisation de l'extraction aux ultrasons .....	115
IV.3.2 Etude de cinétique.....	117
IV.3.3 Rendements et qualité des absolues.....	118
IV.3.4 Identification par GC-FID et GC-MS .....	119
IV.3.5 Composés phénoliques totaux .....	122
IV.3.6 DPPH .....	122
IV.3.7 Test de friture.....	124
IV.4. Conclusion .....	125

Références bibliographiques .....	126
<b>Conclusion générale et perspectives</b> .....	130
<b>Liste des Figures</b> .....	133
<b>Liste des Tableaux</b> .....	135
<b>Liste des Abréviations</b> .....	137
<b>Résumé</b> .....	141

## **Introduction générale**

De nos jours, la tendance de l'utilisation des produits naturels issus des plantes est en pleine croissance face au souci des effets secondaires des composés synthétiques qui peuvent être nocifs à la santé humaine et à l'environnement. L'application de ces derniers dans différents secteurs industriels (agroalimentaire, insecticide, parfumerie, cosmétique) peut causer des effets mutagènes, cancérigènes et toxiques sur la santé humaine et augmenter le taux de pollution dans la nature. De ce fait, la réflexion s'est développée auprès des industriels visant à diminuer leurs utilisations, avoir recours aux composés aromatiques naturels des plantes et à envisager divers procédés d'extraction pertinents.

Les huiles essentielles et les arômes constituent dans ce contexte la majeure partie des composés aromatiques naturels qui sont aujourd'hui de plus en plus utilisés dans différents domaines. Ces extraits sont obtenus par distillation et par extraction aux solvants et possèdent un large éventail d'activités biologiques (antioxydante, antimicrobienne, anti-cancérigène, anti-inflammatoire, etc).

De même, la chimie verte adopte dans ses principes toutes les précautions nécessaires pour la protection de l'homme et l'environnement en se basant sur les technologies d'extraction vertes, l'utilisation des extraits naturels et des solvants naturels respectueux de l'environnement.

Dans le contexte de la chimie verte, l'objectif de notre recherche s'est orienté vers l'éco-extraction et la valorisation des composés naturels (huiles essentielles, composés phénoliques, absolues) des plantes de la famille des Alliacées et des Lamiacées et la possibilité de leurs utilisations comme des alternatives aux additifs synthétiques et le développement d'une nouvelle procédure verte pour l'extraction des composés aromatiques naturels.

Afin de contribuer aux principes de la chimie verte, cette thèse s'articule autour de quatre chapitres:

Le premier chapitre consiste en une étude bibliographique dans laquelle nous avons présenté des généralités sur les huiles essentielles et les arômes, leurs différents modes d'extraction, leurs diverses activités biologiques (antioxydantes, antimicrobiennes), ainsi que les différents tests utilisés pour l'évaluation de ces propriétés. Puis nous nous sommes intéressés à l'importance de leurs applications dans le domaine agroalimentaire. Leurs applications dans différents secteurs industriels ont été aussi rapportées.

Le deuxième chapitre est consacré à la valorisation des huiles essentielles extraites par turbo hydrodistillation des plantes de la famille des Alliées (ail, oignon, poireau, ciboule, échalote et ciboulette) dont les propriétés biologiques ne sont pas entièrement connues. Leurs compositions chimiques, leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes ont été étudiées.

Le troisième chapitre est destiné à l'optimisation de l'extraction de l'huile essentielle et la valorisation des sous-produits d'oignon (phénols et flavonoïdes), qui sont normalement jetés après la turbo hydrodistillation. Ces composés phénoliques doués de propriétés biologiques intéressantes sont extraits naturellement par l'eau en même temps que les huiles essentielles. Ainsi ce chapitre met en évidence l'importance de la turbo hydrodistillation, une technique «verte» pour l'extraction simultanée de ces composés phénoliques issus d'un solvant naturel (l'eau) en comparaison avec l'extraction classique.

Le quatrième chapitre est axé sur le développement d'une nouvelle procédure «verte» utilisant les ultrasons et l'huile de tournesol comme solvant naturel pour l'extraction des absolues du thym de la famille des Lamiacées. Cette méthode d'extraction écologique a été optimisée et son efficacité a été comparée à l'extraction conventionnelle utilisant des solvants pétroliers. La composition chimique des différentes absolues a été analysée et comparée aux autres extraits tels que les huiles essentielles. Les absolues ont été également testées pour leurs activités antioxydantes. Ce chapitre illustre pour la première fois l'efficacité d'une nouvelle approche écologique pour l'extraction des absolues destinées à l'agroalimentaire et qui peuvent intéresser aussi autres domaines industriels tels que la parfumerie.

## **Chapitre I. Les huiles essentielles et arômes: application en agroalimentaire**

## **I.1. Définition des huiles essentielles et des arômes**

Les arômes sont des molécules organiques de faible masse moléculaire, avec une tension de vapeur élevée pour que ces molécules puissent provoquer un stimulus au contact de la muqueuse olfactive (Richard, 1992). Ils sont formés de dizaine de composés odorants, ayant une polarité faible, une certaine solubilité dans l'eau et un caractère lipophile élevé (Meierhenrich, Golebiowski, Fernandez, & Cabrol-Bass, 2005). Selon les méthodes d'extraction, différents arômes peuvent être produits des plantes tels que les huiles essentielles (HE), les concrètes, les absolues, etc.

La norme AFNOR NFT75-006 définit l'huile essentielle (HE) comme «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques. Les HE sont ensuite séparées de la phase aqueuse par des procédés physiques».

Cette définition basée sur les procédés d'extraction est restrictive car elle exclut les produits obtenus par d'autres procédés et en particulier ceux obtenus par l'extraction au solvant tels que la concrète et l'absolue.

La norme AFNOR définit une concrète comme « un extrait ayant une odeur et/ou une saveur caractéristiques, constitué principalement de composés volatils et des produits cireux et gras non volatils d'une matière première naturelle ». La concrète est obtenue par extraction au moyen d'un solvant non aqueux suivie de l'élimination de ce solvant par un procédé physique.

L'absolue est définie comme un produit ayant une odeur caractéristique, obtenu à partir d'une concrète par extraction à l'éthanol à température ambiante (De Silva, 1995).

Les huiles essentielles et les arômes trouvent une utilisation extensive dans plusieurs secteurs clés de l'industrie chimique comme l'agroalimentaire, la parfumerie, la cosmétique, la médecine et l'aromathérapie.

## **I.2. Composition des huiles essentielles et des arômes**

Aujourd'hui, 300 huiles essentielles parmi 3000 sont importantes d'un point de vue commercial. Les plantes aromatiques en produisent en quantité suffisante. Les plantes considérées riches en HE appartiennent le plus souvent à la famille des Lamiacées (origan, lavande, thym, sauge, menthe etc.), des Apiacées (anis, cumin, carvi etc.), des Myrtacées (eucalyptus, niaouli etc.), des

Pinacées (pin, cèdres, etc.), des Rutacées (citron, orange), et des Lauracées (cannelle, camphrier etc.) (Lardry & Haberkorn, 2007).

La composition chimique d'une huile essentielle peut varier au sein d'un même genre botanique, ces variations peuvent s'observer au sein d'une même espèce. Elle dépend en fait de différents paramètres extrinsèques (le sol, l'environnement, le climat), intrinsèques (le degré de maturité, les facteurs génétiques, la localisation), technologiques (le type de culture, le mode de récolte), ainsi que les modes d'extraction.

Les huiles essentielles et les arômes sont issus du métabolisme secondaire de la plante et peuvent être stockés dans diverses structures telles que les cellules épidermiques, les cellules sécrétrices internes, les poils sécréteurs ou les trichomes (Caissard & Baudino, 2012). Ils sont des mélanges complexes de substances volatiles constituées d'environ de 20 à 60 composés à des concentrations différentes. Les terpènes et les terpénoïdes ainsi que les composants aromatiques à faible poids moléculaire constituent les composés majeurs (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008).

### **I.2.1 Les terpènes et terpénoïdes**

Les composés terpéniques sont largement rencontrés dans les huiles essentielles (Başer & Buchbauer, 2010). Bien qu'ils aient des structures très diverses, ils sont tous formés par la réunion d'unités isopréniques (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). On distingue ainsi selon le nombre de carbone constituant les molécules de ce groupe: les hémiterpènes (1 unité: C<sub>5</sub>), les monoterpènes (2 unités: C<sub>10</sub>), les sesquiterpènes (3 unités: C<sub>15</sub>), les diterpènes (4 unités: C<sub>20</sub>), les sesterpènes (5 unités: C<sub>25</sub>), les triterpènes (6 unités: C<sub>30</sub>), les tétraterpènes (8 unités: C<sub>40</sub>) et les polyisoprènes (n unités: C<sub>5n</sub>).

Les terpènes les plus rencontrés dans les huiles essentielles sont les terpènes les plus volatils dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée tels que les mono (C<sub>10</sub>) et les sesquiterpènes (C<sub>15</sub>) (Couic-Marinier & Lobstein, 2013). Les (C<sub>10</sub>) constituent eux seuls environ 90% des huiles essentielles (Bakkali et al., 2008).

Les dérivés oxygénés des terpènes s'appellent terpénoïdes. Une grande variété de structures caractérisent les terpénoïdes selon le nombre de carbones présents, le caractère saturé ou insaturé des liaisons, la configuration spatiale (forme de chaise, bateau...) et la nature du groupe fonctionnel. Ils sont constitués de différentes fonctions: (Bakkali et al., 2008).

- Phénol: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-OH (thymol),
- Alcool: R-OH (menthol),
- Aldéhyde: R-COH (citronellal),
- Cétone: R<sub>1</sub>-CO-R<sub>2</sub> (carvone),
- Ester: R<sub>1</sub>-COO-R<sub>2</sub> (acetate de linalyle),
- Ether: R<sub>1</sub>-O-R<sub>2</sub> (eucalyptol),
- Peroxide: R<sub>1</sub>-O-O-R<sub>2</sub> (ascaridole).

La Figure I.1 montre la structure des différents composés des terpènes et des terpénoïdes.

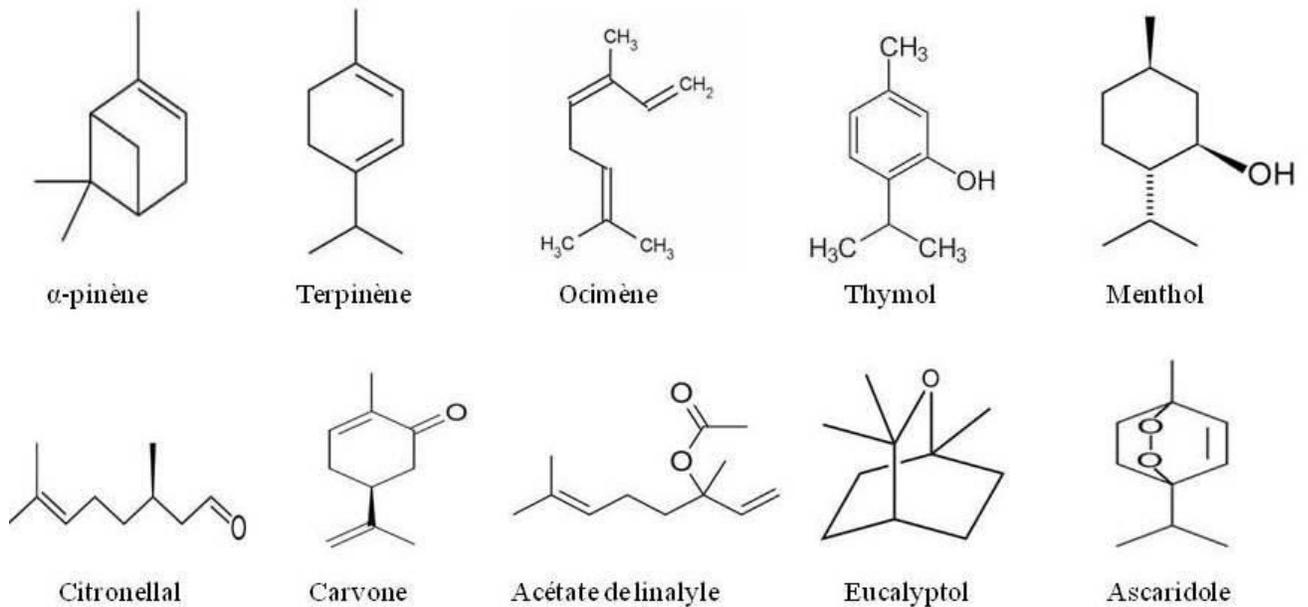


Figure I.1: Représentation des structures des terpènes et des terpénoïdes (Fillatre, 2011).

### I.2.2 Les composés aromatiques

Les composés aromatiques des huiles essentielles sont principalement des dérivés du phénylpropane C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Ils sont beaucoup moins fréquents que les terpènes. Ils peuvent comprendre des phénols (chavicol, eugénol), des aldéhydes (cinnamaldéhyde), des alcools (alcool cinnamique), des dérivés méthoxy (anéthol, estragol) ou méthylène dioxy (myristicine, safrole) (Bakkali et al., 2008). La structure des différentes molécules est présente dans la Figure I.2.

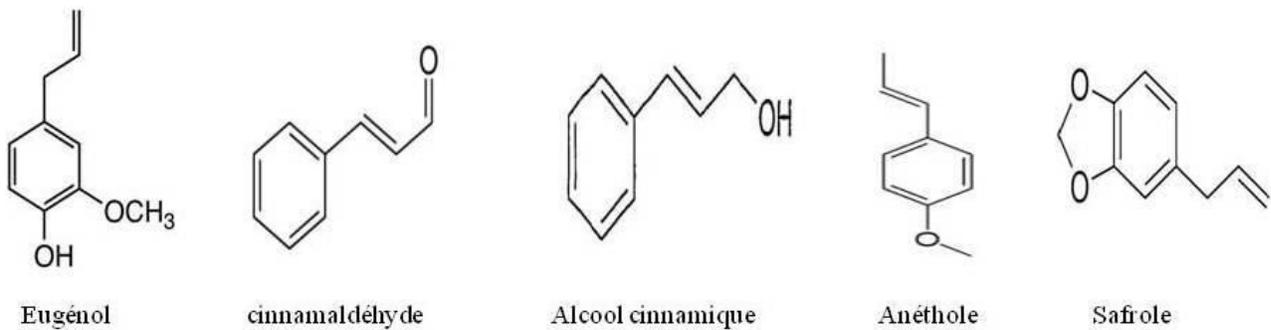


Figure I.2: Structure des composés aromatiques dérivés de phénylpropane (Fillatre, 2011).

Des composés azotés ou soufrés tels que les glucosinolates ou des dérivés d'isothiocyanate sont également caractéristiques des métabolites secondaires des diverses plantes. À titre d'exemple, les composés soufrés sont majoritairement présents dans les huiles essentielles des plantes de la famille des Alliacées (Iranshahi, 2012).

### I.3. Mode d'extraction

Les composés aromatiques doivent être extraits de leur matrice avant de pouvoir les utiliser. Plusieurs méthodes d'extraction sont mises au point. La distillation est le procédé le plus anciennement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles (Başer & Buchbauer, 2010; Wilson, 2010). Bien que plusieurs méthodes d'extraction innovantes aient été mises au point, seules la distillation et l'expression à froid permettent d'obtenir des huiles essentielles conformes à la pharmacopée européenne. Même si les procédés innovants n'aboutissent pas à des huiles essentielles au sens réglementaire, ils permettent l'obtention de plusieurs constituants des HE et des principes aromatiques intéressants. Ainsi les principes des techniques traditionnelles et des procédés innovants d'extraction sont décrits ci-dessous.

#### I.3.1 Distillation par entraînement à la vapeur

La distillation par entraînement à la vapeur est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles (Figure I.3). Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est placé dans l'alambic sur une plaque perforée située à une certaine distance au dessus du fond rempli d'eau. Le végétal est en contact avec la vapeur d'eau saturée mais pas avec l'eau bouillante. La

vapeur provoque la rupture d'un grand nombre de glandes qui libèrent leurs composés aromatiques. Les huiles essentielles diffusent donc à travers le végétal pour entrer en contact avec la vapeur d'eau circulant à l'extérieur. Les vapeurs chargées en composés volatils sont ensuite condensées avant d'être décantées. Du fait de leur différence de densité, les HE et l'eau sont séparées en deux phases et les HE sont ensuite récupérées (Nixon & McCaw, 2001). Cette technique permet d'éviter des réactions lors du contact des constituants des huiles essentielles avec l'eau conduisant à des changements dans la composition finale de l'extrait. En outre, elle agit mieux avec les huiles essentielles contenues dans les glandes situées à la surface du végétal. La distillation à la vapeur des huiles essentielles non superficielles est plus longue et exige plus de vapeur que celle des HE superficielles.

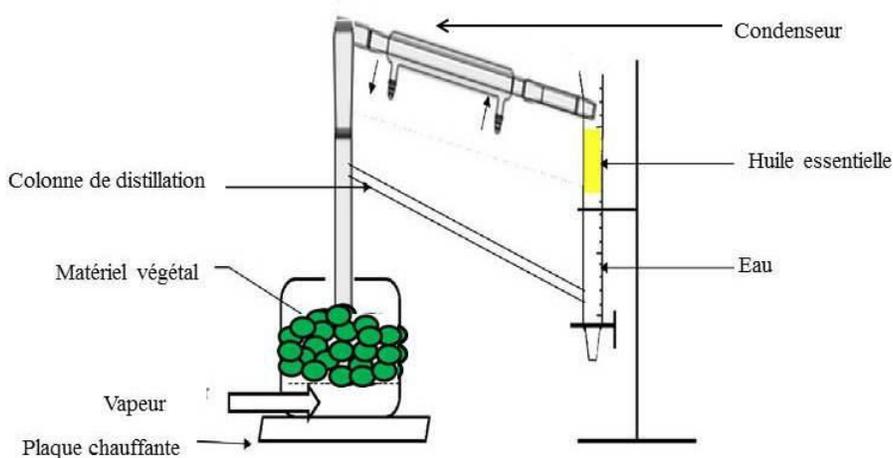


Figure I.3: Extraction par distillation à la vapeur.

### I.3.2 Hydrodistillation

La méthode d'extraction des huiles essentielles la plus simple est l'hydrodistillation (Figure I.4). Son principe consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau, ensuite l'ensemble est porté à ébullition sous pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Durant l'hydrodistillation, l'eau bouillante pénètre dans les cellules végétales et solubilise une partie de l'huile essentielle contenue dans les cellules de la plante. La solution aqueuse chargée de composés volatils, diffuse ensuite à travers le tissu de l'organe végétale vers la surface extérieure où l'huile essentielle sera vaporisée. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotrope. À la température d'ébullition, les pressions de vapeurs combinés sont égales à la pression

d'évaporation. Ainsi, les huiles essentielles, dont les points d'ébullition varient normalement de 200 à 300 °C, s'évaporent à une température proche de celle de l'eau. Le mélange est ensuite refroidi. L'eau et les HE, une fois condensées, se séparent en deux phases (Başer & Buchbauer, 2010). Le contact du matériel végétal avec l'eau dans cette technique engendre notamment des phénomènes d'hydrolyse.

Bien que la distillation (l'hydrodistillation ou la distillation à la vapeur) soit la méthode normalisée pour l'extraction des huiles essentielles, l'effet de la chaleur peut causer des modifications chimiques et des dégradations des composants thermosensibles. Par conséquent, l'huile essentielle récupérée est un produit qui diffère de l'essence originelle, d'autant plus que la durée de distillation est longue (3 heures).

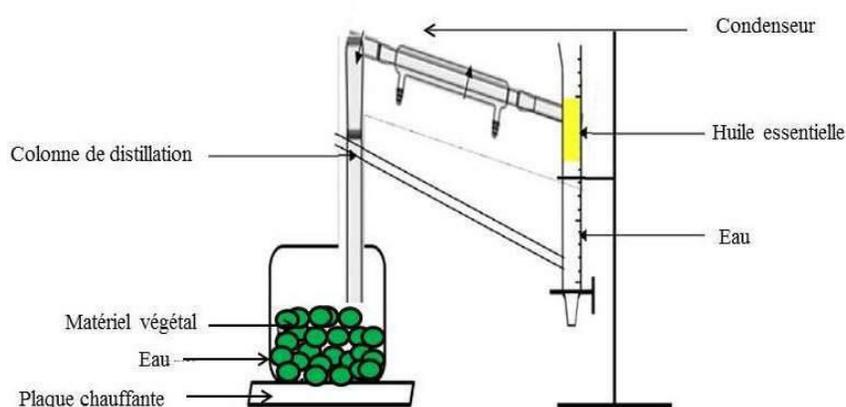


Figure I.4: Extraction par hydrodistillation.

### I.3.3 Turbo hydrodistillation

L'hydrodistillation peut être optimisée par l'installation d'un agitateur électrique dans le mélange d'eau et de la plante durant tout le processus d'extraction. Il est équipé de lames pour cisailer et déstructurer la matrice végétale (Figure I.5). L'agitation sera donc favorisée, permettant la réduction du temps de distillation d'un facteur de 2 ou 3, ce qui engendre une réduction de la consommation de vapeur de chauffe et ainsi une réduction de la consommation énergétique.

Par ailleurs, cette technique offre l'avantage d'extraction des huiles essentielles des plantes difficilement distillables (bois, racines, bulbes d'ail et d'oignon) (Chemat, Fabiano-Tixier & Abert Vian, 2012).

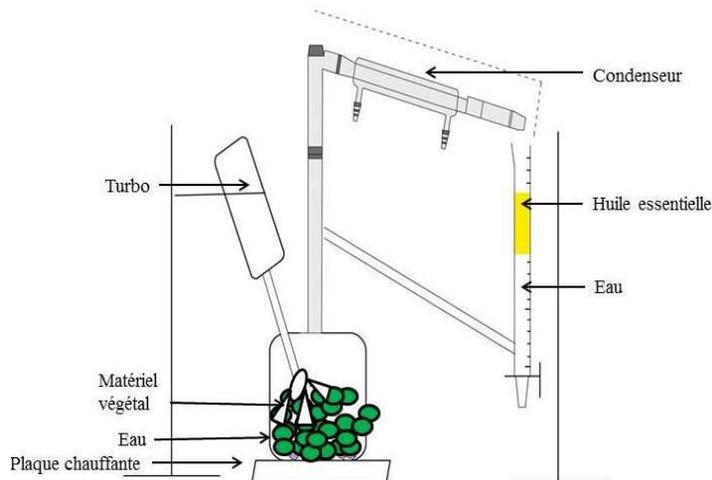


Figure I.5: Extraction par turbo hydrodistillation.

### I.3.4 Expression à froid

L'expression à froid est une extraction sans chauffage réservée aux agrumes (citron, mandarine, orange, pamplemousse) (Figure I.6). Le principe de ce procédé mécanique consiste à éclater les minuscules vésicules et les poches à essences. L'essence ainsi libérée est entraînée par un courant d'eau. Le procédé consiste à fixer le fruit sur une coupe équipée de lames et une seconde coupe pour l'enfermer. Un couteau circulaire creuse un trou à la base du fruit. L'application d'une pression sur les parois du fruit entraîne l'extraction du jus qui va être transporté jusqu'au collecteur pendant que l'essence est extraite de la peau et collectée à l'aide d'un jet d'eau. L'émulsion eau-essence est ensuite séparée par décantation. L'intérêt de cette technique réside dans l'obtention d'essence n'ayant pas subi de modification chimique liée à la chaleur. De même, elle est couplée avec la production du jus de fruit (Başer & Buchbauer, 2010; Wilson, 2010).

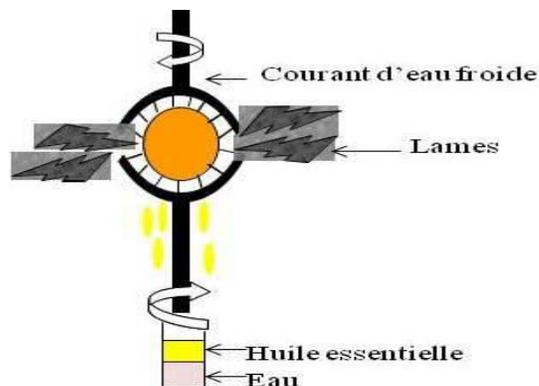


Figure I.6: Extraction par expression à froid.

### **I.3.5 Extraction des molécules aromatiques (concrètes et absolues)**

Certaines plantes contiennent peu de molécules aromatiques, ce qui rend difficile l'obtention d'une huile essentielle. En outre, les composés odorants peuvent être sensibles et modifiés sous l'action de la chaleur lors de la distillation. C'est souvent le cas des fleurs (jasmin, rose, fleur d'oranger) où le rendement en HE est très faible ou de qualité odorante décevante par rapport au parfum de la fleur. L'extraction sous forme d'absolue par exemple permet de retrouver le parfum de ces fleurs de façon plus fidèle et plus efficace. Pour cela, deux méthodes sont utilisées, l'enfleurage et l'extraction aux solvants.

#### **I.3.5.1 Enfleurage et extraction**

L'enfleurage est une ancienne méthode utilisée pour l'extraction des plantes aromatiques destinées surtout à la parfumerie. Le principe consiste à placer les fleurs odorantes dans la graisse, afin de laisser les arômes y pénétrer. Une fois saturée, celle-ci est ensuite lavée à l'alcool pour extraire les composés odorants. L'alcool obtenu est ensuite évaporé pour donner l'absolue. Cette méthode est peu utilisée de nos jours à cause de l'utilisation de la graisse animale et du coût de production élevé. Elle a été remplacée par l'extraction aux solvants (De Silva, 1995; Wilson, 2010).

#### **I.3.5.2 Extraction aux solvants**

La méthode consiste à faire macérer les fleurs dans un solvant volatil hydrocarboné apolaire (le pentane, l'hexane, etc.). Le solvant est ensuite évaporé pour donner une pâte appelée concrète qui renferme des composés aromatiques, des cires et des composés huileux de la plante. À cette étape, la concrète ne peut pas être utilisée dans la parfumerie. Les cires présentes dans leur composition rendent la solution trouble et par conséquent peu soluble dans la base de parfum. La macération de la concrète dans l'alcool permet la réduction de cire et l'obtention de l'absolue. La solution alcoolique est ainsi homogénéisée par une forte agitation entre 30-60 °C puis réfrigérée entre -5 et -10 °C de sorte que les cires peuvent être éliminées par précipitation. Selon Meyer-Warnod, (1984), les cires ne sont pas solubles dans l'alcool à des températures inférieures à -1 °C. L'alcool est ensuite évaporé pour donner l'absolue très prisée des parfumeurs (De Silva, 1995; Nixon & McCaw, 2001; Wilson, 2010).

### I.3.6 Extraction aux ultrasons

Les ultrasons sont des ondes mécaniques capables de se déplacer dans un milieu élastique à une fréquence supérieure à la limite maximale d'audibilité de l'oreille humaine (16 kHz). Les ultrasons de puissance fonctionnant à une intensité entre 20 et 100 kHz sont utilisés pour l'extraction des arômes et bien d'autres molécules des plantes.

Le bac ou la sonde à ultrasons sont les deux types d'équipements couramment utilisés dans les laboratoires (Figure I.7). Lorsque les ultrasons se propagent à travers un liquide, les oscillations des molécules provoquent la formation des zones de compression et de dépression (raréfaction). Quand les cycles de raréfaction augmentent, les forces maintenant la cohésion du liquide sont vaincues et des bulles de cavitation apparaissent. Ce phénomène est appelé cavitation. Les bulles vont imploser à côté de la surface solide (le matériel végétal) et provoquer la rupture des membranes des cellules qui libèrent leur contenu à l'extérieur (Dolatowski, Stadnik, Stasiak, et al, 2007). Puisque les glandes des huiles essentielles sont généralement présentes à la surface des plantes aromatiques, l'implosion des bulles de cavitation détruit les glandes qui libèrent l'HE dans le milieu environnant (Veillet, Tomao, & Chemat, 2010).

La technologie aux ultrasons prend beaucoup d'ampleur dans le domaine agroalimentaire (Chemat, Zill-e-Huma, & Khan, 2011; Pingret, Fabiano-Tixier, & Chemat, 2013). Elle permet de pallier à certains problèmes rencontrés par la distillation conventionnelle telle que la dégradation thermique due aux températures élevées, la grande consommation d'eau, les longues durées d'extraction et les rendements faibles (Da Porto, Decorti, & Kikic, 2009).

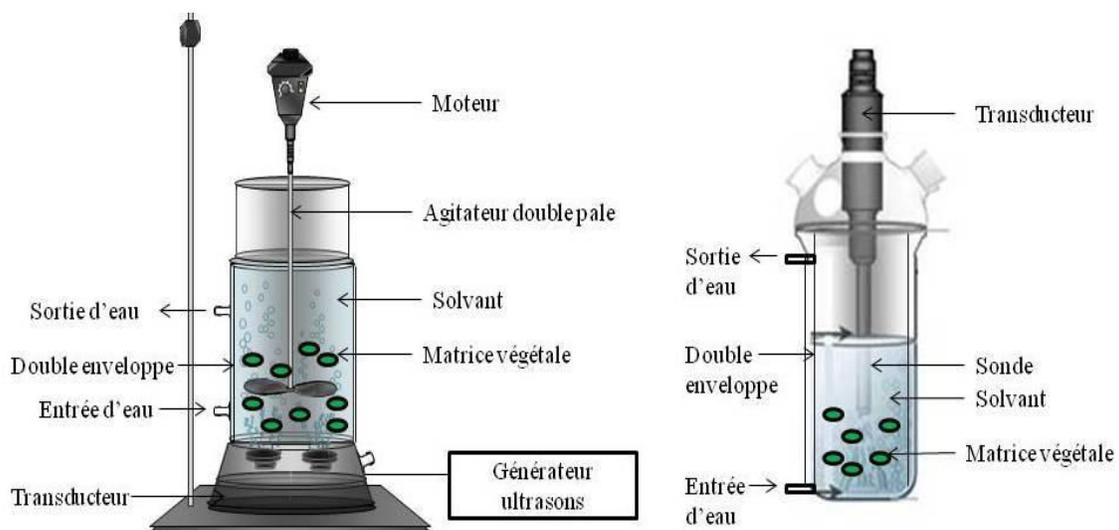


Figure I.7: Extraction aux ultrasons: bac et sonde.

### I.3.7 Autres méthodes

Dans la catégorie des nouvelles techniques pour l'extraction des composés aromatiques, deux méthodes sont mentionnées brièvement ci-dessous vu leurs intérêts et leurs utilisations dans les laboratoires, à savoir l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes et la détente instantanée contrôlée.

#### I.3.7.1 Extraction sans solvant assistée par micro-ondes

Les micro-ondes constituent, par ailleurs, une méthode d'extraction en plein développement (Figure I.8). Cette méthode permet de réaliser des extractions du matériel végétal frais à pression atmosphérique, sans ajout d'eau ou de solvant. Elle consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur au sein d'un four micro-ondes. Le chauffage interne de l'eau intrinsèque de la plante permet de dilater ses cellules et provoquer la distillation azéotropique d'un mélange d'eau/huile essentielle. Un système réfrigérant situé à l'extérieur du four à micro-ondes permet la condensation du distillat en continu, puis le mélange est dirigé dans l'appareil de Clevenger où les composés aromatiques sont obtenus par simple séparation de phase. L'excès d'eau est réintroduit dans le réacteur de manière à restaurer la quantité d'eau initialement présente dans la plante.

Comparée à la distillation traditionnelle, l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes permet d'obtenir une huile essentielle similaire de point de vue qualitative et quantitative en une durée d'extraction plus courte. Toutefois, l'extraction des composés oxygénés, de valeurs odorantes plus significatives que les monoterpènes est favorisée (Lucchesi, Chemat, & Smadja, 2004).

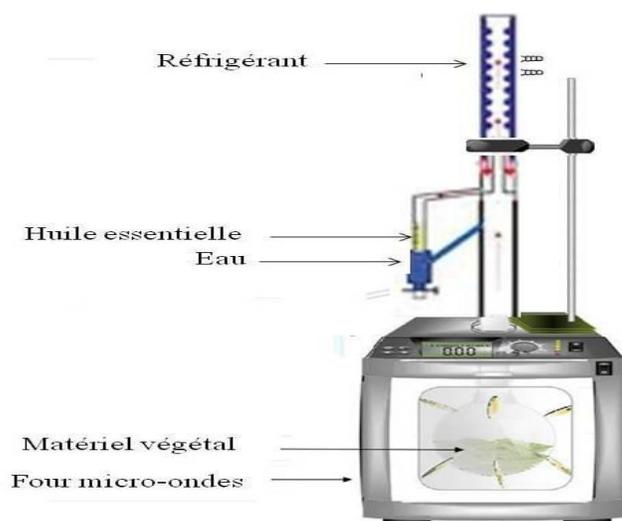


Figure I.8: Extraction sans solvant assistée par micro-ondes.

### I.3.7.2 Détente instantanée contrôlée

Le procédé de la détente instantanée contrôlée consiste en un traitement du matériel végétal frais pendant une courte durée à haute température (180 °C) et à haute pression (10 bars) suivie d'une détente abrupte vers le vide qui provoque l'auto-vaporisation instantanée d'une partie de l'eau et des composants volatils (Figure I.9). Comparée à la distillation traditionnelle, cette technique présente l'avantage de réduction du temps, une moindre consommation d'eau et d'énergie et une augmentation de rendement (Besombes, Berka-Zougali, & Allaf, 2010).

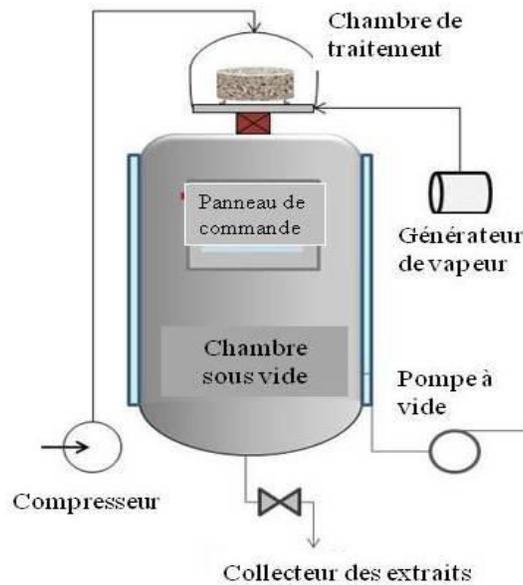


Figure I.9: Extraction par détente instantanée contrôlée.

## **I.4. Les huiles essentielles et leurs constituants comme antioxydants**

### **I.4.1 Les principales techniques de détermination de l'activité antioxydante**

L'activité antioxydante des extraits naturels est évaluée par de nombreuses méthodes physico-chimiques, (Chemat, Abert-Vian, & Dangles, 2007; Decker, Warner, Richards, & Shahidi, 2005). Cependant il n'existe pas de test universel. Tenant en compte la nature diversifiée des antioxydants, ainsi que la complexité des processus d'oxydation, les valeurs de l'activité antioxydante d'un composé diffèrent d'un test à l'autre. Ce qui rend difficile une comparaison entre les méthodes et par la suite une certaine standardisation. Il faut combiner les réponses des tests susceptibles d'être réalisés afin d'avoir une indication aussi précise que possible sur la capacité antioxydante d'un échantillon. L'activité antioxydante peut être évaluée soit par des méthodes directes en dosant des produits formés (les hydroperoxydes par exemple), soit par des méthodes indirectes où l'efficacité d'un antioxydant est révélée en mesurant sa capacité à piéger des radicaux libres grâce à l'utilisation de sonde intermédiaire (Shahidi & Zhong, 2005) .

#### **I.4.1.1 Détermination de l'indice de peroxyde (IP)**

Cette méthode normalisée (AFNOR T60-220, AOCS Cd 8-53) permet de mesurer les produits primaires issus d'oxydation comme les peroxydes formés lors de l'oxydation lipidique. Cet indice permet d'évaluer le degré d'oxydation des acides gras insaturés, et par conséquent le rancissement. L'inhibition de leur formation sous l'effet d'antioxydant peut être employée comme méthode pour évaluer l'activité antioxydante de ce dernier. La méthode iodométrique est utilisée pour déterminer les teneurs en hydroperoxydes. Elle consiste à mesurer la quantité d'iode produite lors de l'oxydation de l'iodure de potassium par les peroxydes. Puis, l'iode formé est dosé par une solution de thiosulfate de sodium à température ambiante. Les résultats obtenus sont exprimés sous forme d'indice de peroxyde (IP = nombre de  $\mu\text{g}$  d' $\text{O}_2$  actif contenus dans 1g de corps gras). Cet indice permet d'évaluer le rancissement des acides gras insaturés de la matière grasse. Plus celui-ci est élevé, plus la matière grasse est oxydée. Cependant, cet indice constitue un indicateur de début d'oxydation: celui-ci augmente pour atteindre un pic puis diminue en fonction de l'avancement de l'état d'oxydation. Les peroxydes forment alors des composés aldéhydiques volatils (ex.: glyoxal ou ethanedial) et non volatils (aldéhydes à longue chaîne carbonée).

#### **I.4.1.2 Détermination des diènes conjugués**

La méthode de l'indice de peroxyde est complétée par la mesure des produits intermédiaires d'oxydation, les diènes conjugués, qui apparaissent sur les acides gras comportant au moins deux doubles liaisons selon la norme AOCS Cd 7-58. En fait, l'oxydation des acides gras polyinsaturés conduit à la formation des structures conjuguées diéniques et triéniques qui absorbent de façon caractéristique dans l'UV à 232-234 et à 268 nm respectivement. Cependant à cause des interférences entre les lipides natifs et les diènes conjuguées, un fort bruit de fond peut être observé et perturber les mesures. Afin de limiter ces interférences, la détermination d'un indice ( $I = A_{233\text{nm}}/A_{215\text{nm}}$ ) proposé par Klein en 1970 a été mis en place (Klein, 1970).

#### **I.4.1.3 Indice p-anisidine**

La détermination de l'indice de para-anisidine permet, de déterminer les composés secondaires issus d'oxydation (Wai, Saad, & Lim, 2009). L'indice de p-anisidine (IpA) permet la quantification des composés aldéhydiques, caractéristiques de l'odeur de rance. En solution acétique, les composés aldéhydiques réagissent avec la p-anisidine pour donner un complexe coloré jaune absorbant à 350 nm. Le dosage est réalisé selon les normes UICPA 2-504 et ISO 6885.

La connaissance des indices de peroxyde (IP) et de p-anisidine (IpA) permet de déterminer la valeur TOTOX (*total oxydation value*) par l'équation suivante:

$$\text{TOTOX} = 2 \text{IP} + \text{IpA}$$

La valeur TOTOX présente l'avantage de tenir compte à la fois de l'état actuel de la matière grasse et de sa possibilité à donner de nouveaux produits d'oxydation.

#### **I.4.1.4 Méthode de sr-TBA (substance réactive acide thiobarbiturique)**

Cette méthode est couramment utilisée pour doser les produits secondaires de l'oxydation des lipides tels que les aldéhydes et par conséquent évaluer l'activité antioxydante d'un composé (Wang, Pace, Dessai, Bovell-Benjamin, & Phillips, 2002). L'acide 2-thiobarbiturique (TBA) réagit avec le dialdéhyde malonique (MDA) pour former un complexe de couleur rose détecté par spectroscopie UV-visible à 532 nm (AOCS Cd-19-90) (Ohkawa, Ohishi, & Yagi, 1979). La diminution de l'absorbance traduisant l'inhibition de l'oxydation peut être observée sous l'action des antioxydants.

#### **I.4.1.5 Méthode TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)**

Le test TEAC est le plus courant parmi toutes les méthodes utilisant un radical stable. Il a été décrit pour la première fois en 1993 par Miller et al. (Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinatan, & Milner, 1993). Ce test consiste en une mesure colorimétrique du transfert d'électrons d'un antioxydant vers un accepteur d'électrons du sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS<sup>•+</sup>). C'est un radical relativement stable de coloration bleu-verdâtre possédant une forte absorption dans l'intervalle 600-750 nm par spectrophotométrie. Un antioxydant réagit par transfert d'électron avec l'ABTS<sup>•+</sup> (en excès) pour donner l'ABTS incolore (Lien, Ren, Bui, & Wang, 1999). L'activité des composés est exprimée par la Capacité Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC) qui correspond à la concentration en Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), une molécule de structure similaire à celle de la vitamine E (2,2'-azobis-3-ethylbenzothiazidine), donnant la même capacité antioxydante qu'une concentration de 1 mM d'antioxydant testé. Ainsi l'antioxydant est plus efficace d'autant plus la valeur de TEAC est élevée.

#### **I.4.1.6 DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)**

Ce test permet de mettre en évidence d'une façon simple la capacité antiradicalaire d'un antioxydant. Cette méthode consiste à mesurer la capacité réductrice d'un antioxydant en présence d'un radical libre, le DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). C'est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette présentant une absorption à 517 nm dans le méthanol. La réduction du DPPH<sup>•</sup> par un donneur d'atome H (AH) conduit à la formation de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine incolore (DPPH-H) et au radical A<sup>°</sup> (Lee, Kim, & Lee, 2001).



Plus un composé est capable de céder son atome d'hydrogène, plus celui-ci est efficace en tant qu'antioxydant. Le potentiel d'un échantillon à donner d'atomes H est le plus souvent exprimé par le paramètre EC<sub>50</sub> qui correspond à la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire la concentration initiale de DPPH<sup>•</sup> de 50%. Plus l'EC<sub>50</sub> est faible, plus la molécule est antioxydante (Villaño, Fernández-Pachón, Moyá, Troncoso, & García-Parrilla, 2007).

Les absorbances mesurées à 517 nm permettent de calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH<sup>•</sup>, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire du composé testé. Donc la diminution de la coloration qui est suivie par spectrométrie est due à la réduction de DPPH en présence

d'antioxydant. Ce test est en fait un test complet qui permet de déterminer certains paramètres permettant de réaliser ainsi une comparaison entre les différents antioxydants:

Il est donc possible d'obtenir :

- L' $EC_{50}$  qui correspond au rapport molaire  $MR = n_{\text{antiox}} / n_{\text{DPPH}}$  nécessaire pour réduire l'absorbance du DPPH initial de 50%.
- Le pouvoir antiradicalaire qui est égal à  $1/EC_{50}$ . Plus ce rapport est élevé, plus le composé a un pouvoir antioxydant.
- Le nombre de DPPH° réduit qui est le nombre de moles de DPPH réduites par une mole d'antioxydant. Ce paramètre est déduit de l' $EC_{50}$  de l'antioxydant, par la relation suivante:  $NRD = \frac{1}{2 * EC_{50}}$
- Le  $t(EC_{50})$  qui représente le temps mis par l'antioxydant au rapport molaire  $MR = EC_{50}$  pour atteindre l'état d'équilibre ou bien un pallier. Ce paramètre a été introduit par Sanchez-Moreno et al. en 1998 (Sanchez-Moreno, Larrauri, & Saura-Calixto, 1998).

#### **I.4.1.7 Folin-Ciocalteu**

La méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) est une méthode simple habituellement utilisée pour doser les polyphénols totaux d'un échantillon. Elle peut également mesurer la capacité réductrice d'un échantillon, et par conséquent représenter son activité antioxydante. Les teneurs en polyphénols totaux sont déterminées au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu (Parejo et al., 2002). Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphomolybdique et d'acide phosphotungstique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène présentant une absorption maximale à 760 nm. Cette dernière est proportionnelle au taux des composés phénoliques. La quantité des polyphénols totaux présente dans un extrait est déterminée par l'utilisation d'une gamme étalon réalisée avec un acide phénolique de référence comme l'acide gallique par exemple. Cette quantité est exprimée en mg d'équivalent acide gallique par g de matière sèche.

#### **I.4.1.8 FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)**

Cette méthode permet d'évaluer le pouvoir réducteur des composés. Elle est basée sur la réduction de l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en ion ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Benzie & Strain, 1999). À un pH faible à 37 °C, les antioxydants réduisent le complexe tripyridyltriazine ferrique (TPTZ- $\text{Fe}^{3+}$ ) incolore en sa forme  $\text{Fe}^{2+}$ , de couleur bleue intense, permettant une quantification par spectrophotométrie à 593 nm. Ainsi, la formation de ce complexe indique un pouvoir réducteur et une capacité antioxydante du composé testé. Les valeurs sont obtenues en comparant à 593 nm l'absorbance d'un mélange réactionnel contenant l'antioxydant à tester, à celle d'un mélange réactionnel contenant une concentration connue en  $\text{Fe}^{2+}$ .

#### **I.4.1.9 Test de blanchissement du $\beta$ - carotène**

Cette méthode est basée sur l'oxydation couplée du  $\beta$ -carotène et de l'acide linoléique solubilisés dans une solution aqueuse de tensioactif Tween 40. Elle consiste à mesurer la décoloration du  $\beta$ -carotène à 470 nm résultant de son oxydation par les radicaux peroxydes issus de l'acide linoléique. L'ajout d'un antioxydant dans ce système retarde la décoloration du  $\beta$ -carotène. Cette méthode permet de déterminer un pourcentage d'inhibition. Un oxydant chimique, l'AAPH, (2 ;2'-azobis (2amidinopropane) dihydrochloride), est utilisé comme amorceur de peroxydation lipidique pour améliorer l'oxydation (Roginsky & Lissi, 2005).

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à une longueur d'onde de 470 nm pendant des intervalles de temps réguliers (Taga, Miller, & Pratt, 1984). L'antioxydant (solubilisé dans le méthanol) est ajouté à une émulsion du  $\beta$ -carotène et de l'acide linoléique solubilisée dans une solution aqueuse de Tween-40, puis le mélange est porté à 50 °C pendant 120 min. Le  $\beta$ -carotène est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation. L'ajout d'un second antioxydant permet sa préservation et c'est cette protection qui est mesurée. L'activité antioxydante (AA) est calculée à une concentration donnée selon l'équation suivante:  $AA = (A_{\text{antiox 120}} - A_{\text{témoin 120}}) / (A_{\text{antiox 0}} - A_{\text{témoin 120}})$  avec  $A_{\text{antiox 0}}$  et  $A_{\text{antiox 120}}$ , les absorbances de la solution en présence d'antioxydant à 0 et 120 min respectivement et  $A_{\text{témoin 120}}$ , l'absorbance de la solution sans antioxydant à 120 min.

#### **I.4.1.10 TRAP (*Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*)**

La méthode TRAP a été développée par Wayner et al. (Wayner, Burton, Ingold, & Locke, 1985) et elle est basée sur la mesure d'oxygène consommé lors d'une réaction de peroxydation lipidique. Dans ce test, l'AAPH (un radical peroxy très stable) est solubilisé dans un milieu aqueux avec l'antioxydant et un indicateur qui devient luminescent lorsqu'il est oxydé à 37 °C. Cette réaction d'oxydation est induite par la décomposition thermique de l'AAPH qui permet de générer un radical peroxyde *in situ*. La capacité de l'antioxydant à inhiber l'oxydation de l'indicateur est comparée à celle du Trolox donnant une valeur TRAP. La méthode TRAP utilise l'accroissement de la chimioluminescence induite par la réaction des radicaux peroxydes avec le luminol (Luukkainen et al., 1999). Les résultats sont exprimés en µmoles de radicaux peroxydes captés par litre de milieu étudié.

#### **I.4.1.11 ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Assay*)**

La méthode ORAC (capacité d'absorption des radicaux oxygénés) (Prior et al., 2003) est basée sur la décroissance de la fluorescence de la fluoresceine en présence de l'AAPH. En fait, les radicaux ROO°, issus de la décomposition thermique de l'AAPH oxydent la fluoresceine en des produits non fluorescents. L'antioxydant à tester doit être capable de protéger la fluoresceine de l'oxydation induite par le radical peroxyde. La méthode est réalisée en mesurant au cours du temps le déclin de la fluoresceine en présence des concentrations croissantes de Trolox, et des différentes concentrations des échantillons à tester. Les données sont calculées en aire sous une courbe et sont standardisées par rapport à des concentrations connues de Trolox. Les résultats sont alors exprimés en TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) et permettent d'obtenir une mesure globale de la capacité antioxydante.

#### **I.4.1.12 RPE (*Résonance paramagnétique électronique*)**

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique relativement nouvelle pour étudier l'activité antioxydante des divers composés. C'est la seule méthode directe qui permet de mesurer la présence des radicaux libres. Elle utilise la propriété paramagnétique du radical libre, c'est-à-dire le magnétisme émis par l'électron célibataire de ce dernier. Cette méthode permet de détecter spécifiquement les radicaux libres impliqués dans l'auto-oxydation. Elle permet ainsi d'étudier l'effet de l'antioxydant sur ces radicaux (Antolovitch, Prenzler, Patsalides, McDonald,

& Robards, 2002). En théorie, il suffit de mesurer la quantité de radicaux libres dégradée par un composé pour mesurer son potentiel antioxydant. Cependant, d'un point de vue pratique, ce n'est pas simple en raison de la durée de vie très courte de ces radicaux comme le radical peroxyde ( $10^{-9}$  s). Pour éviter ce problème, des piègeurs de spin qui réagissent avec les radicaux libres, sont ajoutés au milieu pour former des radicaux de durée de vie plus longue, et permettre ainsi de réaliser une mesure à l'aide de cette technique. Les piègeurs de spin généralement additionnés sont des radicaux nitroxydes ou des nitrones qui sont habituellement utilisés dans des systèmes biologiques. La RPE mesure donc la capacité d'un antioxydant à capter les radicaux par rapport à la molécule utilisée en tant que piègeur de spin. Cette technique très prometteuse permet de mesurer des concentrations de radicaux libres formés durant un processus d'oxydation.

#### **I.4.2 Les huiles essentielles et leurs constituants en tant qu'antioxydants: application en agroalimentaire**

L'oxydation des lipides est un problème récurrent (Gray, Gomaa, & Buckley, 1996), en particulier dans l'alimentation parce qu'elle implique des altérations organoleptiques. Généralement, pour éviter l'oxydation, les industriels rajoutent à leurs recettes différents antioxydants synthétiques qui sont de plus en plus impopulaires auprès des consommateurs puisqu'ils sont suspectés d'entraîner à long terme des effets tératogènes, mutagènes et cancérigènes.

Face à l'augmentation de la demande du consommateur pour des produits naturels sans conservateurs, des importants travaux de recherche sur l'utilisation des antioxydants naturels en agroalimentaire (Velasco & Williams, 2011) ont conduit l'industrie alimentaire à envisager l'incorporation des substances considérées comme non chimiques dans leur préparation. Les chercheurs ont travaillé sur l'effet antioxydant des HE extraites des plantes. Ils ont rapporté que certaines huiles essentielles peuvent jouer un rôle essentiel pour limiter l'oxydation des lipides, en particulier dans la viande et dans autres produits gras (confère Tableau I.1). Cet effet peut toutefois être différent selon le type d'aliment, selon les conditions d'élevage des animaux mais également selon les conditions de stockage. Le Tableau I.1 montre quelques exemples d'utilisation des huiles essentielles et leurs constituants en agroalimentaire.

Tableau I.1: Emploi des huiles essentielles et leurs constituants en tant qu'antioxydants en agroalimentaire.

Aliments	Huiles essentielles/ composés majoritaires	Test antioxydant	Remarques	Références
Saucisse de porcs ibériques	-HE de romarin	sr-TBA	L'effet de l'ajout de l'HE de romarin sur la stabilité oxydative des saucisses dépend de la quantité d'huile essentielle introduite ainsi que du type de saucisse. L'HE a montré une activité antioxydante en inhibant l'oxydation des lipides et des protéines.	(Estévez & Cava, 2006)
Saucisses de porcs blancs				
Viande de porc et de bœuf	-HE d'origan (thymol, p-cymène, γ-terpinène, carvacrol) -HE de sauge (eucalyptol, camphor, α-pinène)	sr-TBA DPPH	L'utilisation des HE réduit l'oxydation. Le rôle des antioxydants semble être beaucoup plus important dans la viande cuite que crue. L'HE d'origan a un effet inhibiteur supérieur à celle de la sauge.	(Fasseas, Mountzouris, Tarantilis, Polissiou, & Zervas, 2008)
Viande d'agneau	-HE d'origan (carvacrol, thymol, γ-terpinène, p-cymène, β-caryophyllène)	sr-TBA	L'incorporation de l'HE d'origan dans les aliments a entraîné un retard important de l'oxydation des lipides de la viande aussi bien au cours du stockage à froid.	(Simitzis et al., 2008)
Bœuf frites	-HE de cassia ((E)cinnamaldehyde, acide benzoïque)	Indice de peroxyde sr-TBA	L'utilisation de l'HE de cassia entraîne un effet antioxydant important durant le processus de friture réalisé dans les conditions optimales.	(Du & Li, 2008)
Beurre	-HE de sarriette (thymol, carvacrol, p-cymène, γ-terpinène)	Indice de peroxyde DPPH	Le résultat montre que l'utilisation de l'HE réduit le taux d'oxydation du beurre à +4 et +20 °C en termes de formation de peroxyde. L'activité antioxydante dépend de la concentration en HE.	(Ozkan, Simsek, & Kuleasan, 2007)
Sauce bolognaise	-HE de romarin	sr-TBA DPPH	Le résultat montre une augmentation de la stabilité oxydative des sauces bolognaises, tout en réduisant la quantité d'antioxydant synthétique ajoutée.	(Viuda-Martos, Ruiz-Navajas, Fernández-López, & Pérez-Álvarez, 2010)
Mortadelle	-HE de romarin -HE de thym	sr-TBA	Le résultat montre que l'utilisation de l'HE a un effet positif en termes de stabilité oxydative, impliquant une augmentation de la durée de vie de la mortadelle. L'HE de romarin est plus efficace que celle de thym.	(Viuda-Martos, Ruiz-Navajas, Fernández-López, & Pérez-Álvarez, 2010)

Saindoux	-HE d'origan (thymol, carvacrol, p-cymène)	Indice de peroxide	L'huile essentielle a montré un effet antioxydant sur les saindoux stockés.	(Milos, Mastelic, & Jerkovic, 2000)
Jaune d'œuf	-100 composants d'huiles essentielles pures	sr-TBA  Formation des diènes conjugués	D'un point de vue général, les phénols possèdent l'activité antioxydante la plus élevée parmi les autres composants terpéniques.	(Ruberto & Baratta, 2000)
Huile d'olive vierge	-HE de basilic (linalool, eugenol) - HE de cannelle (cinnamic aldehyde, eugenol), -HE de clou de girofle (eugenol, acetyl-eugenol) -HE de noix de muscade ( $\alpha$ - pinène,sabinène) -HE d'origan (thymol, carvacrol) -HE de thym (linalool,thymol)	DPPH	Les huiles essentielles présentent de bonnes propriétés antioxydantes et peuvent être efficacement utilisées pour contrôler l'oxydation des lipides au cours de la transformation des aliments.	(Tomaino et al., 2005)
Mortadelle	-HE de romarin -HE de thym	sr-TBA	L'ajout des HE de romarin et de thym est une alternative technologique viable dans les produits à base de viande. Les HE ont des effets sur la stabilité à l'oxydation, ce qui contribue à prolonger leur durée de vie.	(Viuda-Martos, 2011)
Poulet	-Préparation commerciale des HE de certaines plantes (calendula, échinacées, cassis, écorce jaune)	sr-TBA	Les résultats ont montré qu'Apacox (préparation commerciale des HE) retardent l'oxydation des lipides dans les poitrines et les cuisses crues et cuites.	(Botsoglou et al., 2004)
Dorade	-HE d'origan	sr-TBA	L'HE d'origan a une forte activité antioxydante. L'ajout de l'HE donne un goût distinctif et ralentit le processus d'altération du poisson.	(Goulas & Kontominas, 2007)
Pâté de foie	-HE d'origan  -HE de sauge	sr-TBA	L'ajout des HE réduit de façon significative la quantité totale des produits volatils dérivés des lipides isolés du pâté de foie. Les HE inhibent la dégradation oxydative de pâtés de foie à une efficacité plus importante que le butylhydroxytoluène (BHT).	(Estévez, Ramírez, Ventanas, & Cava, 2007)

Viande de dinde crue et cuite	-HE d'origan	sr-TBA	L'ajout de l'HE d'origan augmente de manière significative la stabilité de la viande de dinde crue et cuite à l'oxydation des lipides par rapport au témoin.	(Botsoglou, Grigoropoulou, Botsoglou, Govaris, & Papageorgiou, 2003)
Viande de poulet	-HE d'origan	sr-TBA	L'ajout de l'HE d'origan a un impact majeur sur la stabilité à l'oxydation de la viande de poulet.	(Botsoglou, Fletouris, Florou-Paneri, Christaki, & Spais, 2003)
Viande de poulet	-HE d'origan	sr-TBA	L'ajout de l'HE d'origan retarde l'oxydation des lipides des viandes crues ou cuites réfrigérées.	(Botsoglou, Christaki, Fletouris, Florou-Paneri, & Spais, 2002)
Film à base de protéines pour la préservation du muscle de bœuf	-HE d'origan -HE du piment	sr-TBA	Le résultat montre que les films à base de l'HE d'origan stabilisent l'oxydation des lipides dans les échantillons de muscle de bœuf, tandis que les films à base d'HE de piment présentent la plus forte activité antioxydante.	(Oussalah, Caillet, Salmiéri, Saucier, & Lacroix, 2004)
Viande hachée	-HE d'ail -HE de thym -HE de citronnelle	sr-TBA	Les HE de citronnelle, de thym et d'ail peuvent jouer un rôle important en tant qu'agents antioxydants et antibactériens dans la viande hachée réfrigérée. l'HE de citronnelle a la meilleure activité.	(Amany, Reham, & Gehan, 2010)
Films pour les galettes de sardines	-HE de clou de girofle	ABTS FRAP	L'ajout de l'HE de clou de girofle à des formulations à base de protéines de tournesol concentrées permet de préparer des films biodégradables et comestibles avec une augmentation des propriétés antioxydantes.	(Salgado, López-Caballero, Gómez-Guillén, Mauri, & Montero, 2013)
Film de mucilage de grains de cognassier	-HE de thym (thymol, carvacrol, p-cymène, y-terpinène)	Phénols totaux DPPH	Les films présentent une activité antioxydante, significativement améliorée par l'ajout de l'HE.	(Jouki, Mortazavi, Yazdi, & Koocheki, 2014)
Film de gélatine de peau de poisson	-HE des agrumes (citron, bergamote, citron kaffir, citron vert)	DPPH ABTS FRAP	L'activité antioxydante des films varient selon les HE. Celle du citron pourrait être potentiellement utilisée puisque les films incorporés par cette HE présentent la plus forte activité antioxydante.	(Tongnuanchan, Benjakul, & Prodpran, 2012)

Film de protéine comestible de merlu	-HE de citronnelle ( $\beta$ -citronella $\Delta^3$ -carène) -HE de coriandre ( $\Delta^3$ -carene $\gamma$ -terpinène), - HE d'estragon (methylchavicol) -HE de thym (thymol, carvacrol)	DPPH FRAP	Les films de merlu présentent une activité antioxydante, qui est considérablement améliorée par l'ajout des HE. Les résultats indiquent que les films biodégradables contenant ces HE présentent un bon potentiel pour leur utilisation dans les emballages alimentaires.	(Pires et al., 2013)
Viande enrichie en n-3 acide gras polyinsaturé dans les poulets	-HE d'origan -HE de romarin	sr-TBA	Il y a un effet de synergie possible entre les HE d'origan et de romarin dans la prévention de l'oxydation des lipides dans la viande stockée enrichie en n-3 acide gras polyinsaturé.	(Basmacıoğlu, Tokuşoğlu, & Ergül, 2004)
Viandes de dinde congelées et stockées à long terme	-HE d'origan	sr-TBA	Les résultats montrent que l'ajout de l'HE d'origan a une activité antioxydante et augmente la rétention d' $\alpha$ -tocophérol dans la viande.	(Botsoglou, Govaris, Botsoglou, Grigoropoulou, & Papageorgiou, 2003)

### **I.5. Les huiles essentielles et leurs constituants comme antimicrobiens**

De nombreuses études ont rapporté les activités des différentes huiles essentielles contre un large spectre de bactéries à Gram positif et à Gram négatif. L'activité antibactérienne varie d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre.

Le mode d'action des HE sur les bactéries n'est pas entièrement élucidé étant donné la complexité des composants présents dans leurs fractions. Cependant, le caractère hydrophobe des HE permet aux molécules d'affecter la membrane cytoplasmique de la bactérie et déstabiliser sa structure. Ceci engendre une augmentation de la perméabilité membranaire et une fuite d'ions et des constituants intracellulaires indispensables à la vie de la bactérie conduisant finalement à la mort de la cellule (Burt, 2004). Les composés phénoliques sont principalement responsables des propriétés antibactériennes des huiles essentielles tels que le thymol et le carvacrol qui sont fréquemment présents dans différentes plantes de la famille des Lamiacées (Soković, Marin, Brkić, & Van Griensven, 2007).

Les huiles essentielles agissent selon deux modes d'action, soit bactériostatique en bloquant la multiplication des cellules bactériennes, soit bactéricide en les tuant.

Il existe plusieurs tests pour la détermination de l'activité antibactérienne d'une HE. Cependant, il n'existe pas de tests standards pour pouvoir comparer entre les différentes études. Le choix de

la méthode a une grande influence sur les résultats. L'insolubilité des HE dans l'eau et leur volatilité sont les principales difficultés rencontrées. Les tests se basent principalement sur la diffusion et la dilution. Ils permettent soit d'évaluer le pouvoir antimicrobien, soit de le quantifier en termes de concentration minimale inhibitrice ou bactéricide. Les tests communs utilisés aux laboratoires sont décrits ci-dessous.

## I.5.1 Méthode de diffusion

### I.5.1.1 Méthode de diffusion par disque

La FDA (*Food and Drug Administration*) a approuvé cette méthode comme standard pour le comité national de laboratoire clinique (Tajkarimi, Ibrahim, & Cliver, 2010). Cette technique, fiable et reproductible, est souvent la plus utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne (Figure I.10). Elle est semblable à l'antibiogramme qui permet de tester les antibiotiques. Elle constitue une étape préliminaire à des études plus approfondies car elle donne des résultats qualitatifs. Elle consiste à déposer un disque stérile, imbibé d'huile essentielle, sur la surface de géloseensemencée de bactérie tout au début de sa croissance, puis les géloses sont incubées dans les conditions optimales de température du microorganisme étudié pendant 24 à 48 h. L'obtention d'un halo clair autour du disque montre la zone où les bactéries n'ont pas pu se développer. Le diamètre de la zone d'inhibition, qui dépend de la sensibilité à l'HE, est mesuré en mm traduisant l'activité antibactérienne de l'huile essentielle (Benkeblia, 2004; Hanif et al., 2011).

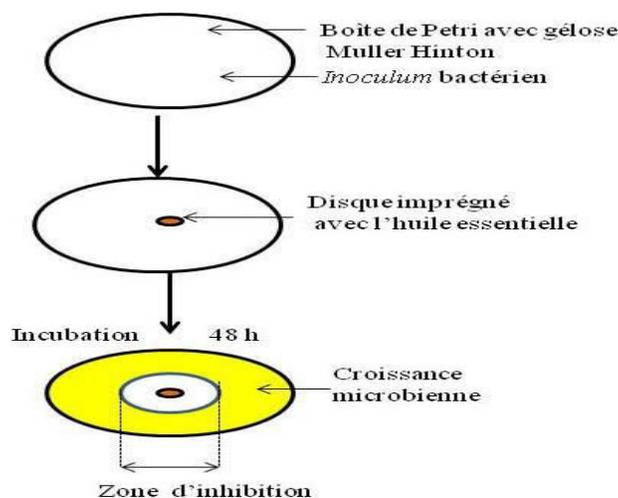


Figure I.10: Méthode de disque.

### **I.5.1.2 Méthode des puits**

Le principe de cette technique est semblable à la méthode de disque, mais ce dernier est remplacé par un puits creusé stérilement sur la gélose ensemencée. L'incubation des boîtes de Pétri à la température optimale de croissance du micro-organisme permet le développement des colonies. La formation d'un halo clair autour du puits indique l'absence de la croissance microbienne dont le diamètre dépend de la sensibilité à l'HE (Wan, Wilcock, & Coventry, 1998). Ces deux méthodes (des disques et des puits) sont largement employées pour l'indication qualitative de la sensibilité ou la résistance des micro-organismes. Des études plus approfondies seront nécessaires afin de pouvoir quantifier en termes de concentrations par les méthodes de dilution.

### **I.5.2 Méthode de dilution**

La méthode de dilution consiste à faire une série de dilution d'une gamme de concentration en huile essentielle à laquelle une suspension bactérienne est inoculée. Le but est de déterminer la concentration la plus faible de l'HE qui inhibe la croissance de la bactérie testée exprimée en  $\mu\text{L/mL}$  ou  $\text{mg/mL}$ . Cette technique est utilisée pour les bactéries qui ont présenté une sensibilité aux HE par les méthodes de diffusion.

#### **I.5.2.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La CMI par définition correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne (Burt, 2004; Oussalah, Caillet, Saucier, & Lacroix, 2007) (Figure I.11). Bien que cette méthode soit la plus utilisée parmi les chercheurs, sa définition diffère entre les publications, ce qui rend difficile la comparaison entre les études. Généralement, la CMI n'est pas bactéricide et les colonies bactériennes peuvent se développer après repiquage sur un milieu exempt d'inhibiteur.

La technique consiste à introduire l'inoculum dans une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. L'ensemble des tubes inoculés est incubé à la température optimale de la croissance du germe pendant 24 à 48 h. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la CMI de l'HE qui est le premier tube dépourvu de croissance bactérienne.

Différentes techniques de dilution sont utilisées pour la détermination de la CMI, à savoir la macrodilution en milieu liquide (Singh, Shushni, & Belkheir, 2011), la microdilution en milieu

solide (Ponce, Fritz, del Valle, & Roura, 2003) et la microdilution en milieu liquide (Cosentino et al., 1999).

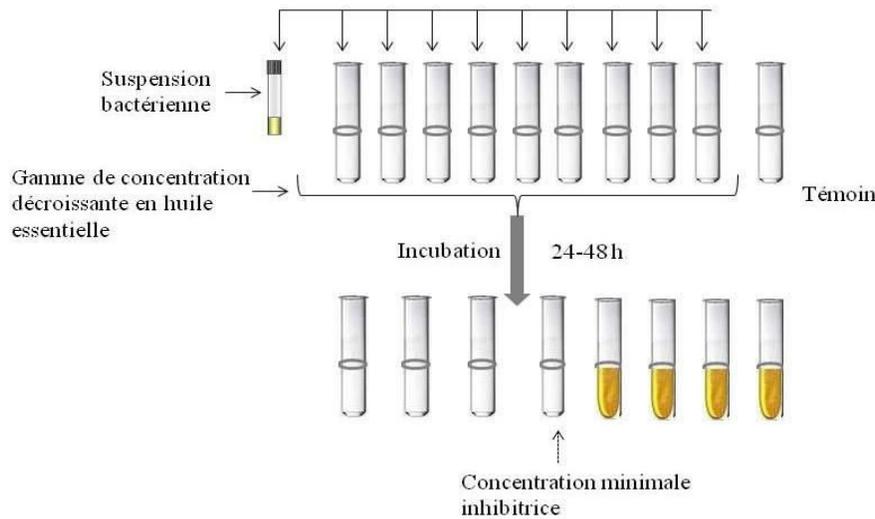


Figure I.11 : Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.

### I.5.2.2 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) en milieu solide

La concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la concentration en HE nécessaire à laquelle l'action bactéricide est totale. Elle est rapportée comme étant la plus faible concentration où aucune croissance n'est observée après repiquage en milieu nutritif frais (Singh et al., 2011) ou bien la concentration capable d'engendrer 99,9% de mortalité des cellules bactériennes initiales (Moreira, Ponce, del Valle, & Roura, 2005; Ponce et al., 2003).

Le test de la CMB succède directement au test de la CMI. En fait, la même gamme de concentration réalisée par la technique de dilution par la CMI est utilisée pour déterminer la CMB de l'huile essentielle à tester. La CMB est déterminée par l'évaluation des survivants après l'élimination du composé inhibiteur (Rota, Herrera, Martínez, Sotomayor, & Jordán, 2008).

La méthode consiste à faire des prélèvements des cultures n'ayant pas donné de développement bactérien (résultat du test de la CMI) sur un milieu de culture neuf. Puis, les géloses ensemencées sont incubées à la température optimale du germe pendant 24 à 48 h. Après incubation, la CMB est considérée comme étant la concentration minimale en HE pour laquelle aucun développement bactérien n'est observé.

### **I.5.2.3 Autres méthodes**

#### **I.5.2.3.1 Dynamique d'action des huiles essentielles par mesure de la décroissance bactérienne (*Time-kill assay*)**

Cette méthode permet de caractériser l'activité antibactérienne d'une huile essentielle au cours du temps. Elle permet d'évaluer la décroissance des bactéries soumises à une concentration donnée en huile essentielle, sur plusieurs heures (De Azeredo et al., 2011).

#### **I.5.2.3.2 Microscopie électronique à transmission**

Cette méthode consiste à observer les effets d'une huile essentielle au niveau cellulaire. Elle est principalement adaptée pour visualiser les altérations au niveau de la paroi ainsi que la perte du contenu cytoplasmique (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001).

#### **I.5.2.3.3 Compte total de viables (*total viable count* (TVC))**

Cette méthode consiste à utiliser une gélose de dénombrement (*plate count agar*) pour quantifier, après l'utilisation de l'inhibiteur, la concentration bactérienne présente dans les produits alimentaires tels que la viande, le lait, les produits à base de viande, etc. Elle est exprimée en unité formant colonie (UFC) par g ou par mL d'échantillon (Pavelková et al., 2014).

### **I.5.3 Les huiles essentielles et leurs constituants comme antimicrobiens: application en agroalimentaire**

La présence des pathogènes dans les denrées alimentaires est responsable de nombreuses maladies qui peuvent être mortelles (Burt, 2004). Au cours des dernières années, l'industrie agroalimentaire s'intéresse aux extraits naturels des plantes et principalement aux huiles essentielles comme alternatives aux additifs artificiels, d'une part, pour conserver les aliments et diminuer leur altération et d'autre part pour prévenir et contrôler la croissance des micro-organismes (Tajkarimi et al., 2010). Le Tableau I.2 montre quelques exemples d'application des HE dans divers types d'aliments (la viande, les fruits et les fromages). Bien que les huiles essentielles exercent une bonne activité *in vitro*, leur application dans les aliments nécessite une concentration plus élevée pour avoir la même efficacité. En outre, les HE agissent mieux dans les aliments moins lipidiques et moins protéiques. En fait, elles se dissolvent dans la phase lipidique des aliments, les rendant relativement moins disponibles d'accéder au niveau de la bactérie. Par contre, les glucides n'ont pas un effet protecteur des bactéries contre les HE comme les lipides et les protéines. L'activité antimicrobienne des HE dépend aussi d'autres facteurs tels que le pH, les teneurs d'eau et du sel présents dans les aliments (Burt, 2004). Le Tableau I.2 montre aussi que l'incorporation de l'HE soit directement dans les aliments ou par les films destinés à la conservation, aide à contrôler la flore microbienne et à préserver les aliments au delà de leur durée normale de stockage.

Tableau I.2: Emploi des huiles essentielles et leurs constituants en tant qu'antimicrobiens en agroalimentaire.

Aliments	Huiles essentielles/composés majoritaires	Microorganisme	Test antimicrobien	Remarques	Références
Film comestible de protéines de soja pour la galette de bœuf haché	-HE d'origan -HE de thym	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Lactobacillus plantarum</i> .	Diffusion par disques	Une meilleure activité antimicrobienne est observée dans les films incorporés par les HE.	(Emiroğlu, Yemiş, Coşkun, & Candoğan, 2010)
Film à base de protéine de poisson et de gélatine de peau de poisson	-HE des feuilles de basilic (linalool)	<i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Diffusion par disques	Une forte activité antimicrobienne est observée avec les films contenant 100% d'HE de basilic. Les films peuvent être utilisés comme un emballage actif pour assurer la sécurité et prolonger la durée de vie des aliments emballés.	(Arfat, Benjakul, Prodpran, Sumpavapol, & Songtipya, 2014)
Poitrine de poulet	-HE de thym (thymol, carvacrol) -HE d'origan (thymol, carvacrol)	<i>Pseudomonas aeruginosae</i> et <i>Lactobacillus</i> spp.	Compte total de viables	L'utilisation des HE d'origan et de thym a un effet significatif sur la réduction des microorganismes comparé au contrôle. Les HE peuvent être utilisées comme alternatives aux additifs synthétiques	(Pavelková et al., 2014)
Brocoli frais	-HE asiatique (noix de muscade, citronnelle) -HE italienne (origan, baies de piment et citronnelle)	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , et <i>Salmonella</i> Typhimurim	Compte total de viable	Les films bioactifs ont montré une réduction significative et une bonne capacité de contrôler la croissance des microorganismes. Les films montrent de bonne activité antimicrobienne par la diffusion des composés antimicrobiens volatils sur les bactéries dans les légumes.	(Takala, Vu, Salmieri, Khan, & Lacroix, 2013)
Jus de fruits (jus d'orange et de poire)	-HE d'arbre de thé	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et <i>Escherichia coli</i>	MIC-MBC	Les composés terpéniques des HE ont montré la plus forte activité antimicrobienne sans affecter les propriétés organoleptiques du jus.	(Donsì, Annunziata, Sessa, & Ferrari, 2011)

Fromage mou	-HE de baie de piment -HE de clou de girofle -HE de cannelle -HE de thym	<i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Salmonella enteritidis</i>	Compte total de viables	Les résultats montrent que les HE peuvent agir comme des inhibiteurs potentiels des bactéries étudiées dans les aliments. L'activité antimicrobienne est plus forte dans le fromage moins gras.	(Smith-Palmer, Stewart, & Fyfe, 2001)
Saucisse de toscane	-HE de laurier	<i>Escherichia coli</i> et <i>Yersinia enterocolitica</i>	MIC-MBC	L'HE est capable de réduire la population des coliformes totaux et de prolonger la durée de vie de saucisse.	(Da Silveira et al., 2014)
Blette organique	-Différentes HE (eucalyptus, arbre de thé, mélisse, menthe, romarin, menthe, rosier musqué, clou de girofle, basilic, anis, citron, origan, lavande)	Microflore de blette : (entérobactéries, bactéries psychrophiles, bactéries lactiques, moisissures, levures).	Diffusion par disques MIC-MBC	Les résultats montrent que les HE d'eucalyptus, d'anise, d'arbre de thé et de clou de girofle présentent la plus forte activité antimicrobienne. Elles peuvent être utilisées comme des agents de désinfection.	(Ponce et al., 2003)
Filets de poulet crus	-HE d'origan	<i>Listeria monocytogenes</i>	TVC	L'HE d'origan a des effets antibactériens et de conservation significatifs sur les échantillons de filets de poulet.	(Khanjari, Karabagias, & Kontominas, 2013)
Filet de poulet	-HE de clou de girofle -HE d'origan	<i>Pseudomonas</i> spp., entérobactéries, bactéries psychrophiles, bactéries lactiques et bactéries mésophiles.	TVC	Les HE appliquées directement sur les filets de poulet ou sur les films comestibles des poulets ont montré leur efficacité comme agents antimicrobiens. L'activité antimicrobienne des films dépend de la concentration des HE, du type des HE et du microorganisme étudié.	(Fernández-Pan, Carrión-Granda, & Maté, 2014)

## **I.6. Autres applications**

La composition chimique des huiles essentielles confère à ces extraits des propriétés intéressantes autres que leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes. Leurs utilisations sont en expansion dans de nombreux domaines industriels, que ce soit dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques, les secteurs de la santé, ou bien comme insecticides naturels.

### **I.6.1 Les huiles essentielles et leurs constituants comme bioinsecticides**

Les insecticides synthétiques sont largement utilisés pour le contrôle phytosanitaire. Par contre, ces produits chimiques peuvent entraîner des résidus toxiques dans les plantes. De même, ils peuvent provoquer la pollution de l'environnement à cause de leur lente dégradation et avoir des effets néfastes sur la santé humaine (Kordali et al., 2008). Ceci a conduit à des réglementations de plus en plus sévères visant la restriction de leur utilisation ou leur interdiction totale.

Le marché des biopesticides est en croissance à l'échelle de la planète pour pallier aux inconvénients issus de l'utilisation des produits synthétiques. Plus d'une centaine d'espèces végétales dotées de propriétés insecticides sont répertoriées. La recherche s'est alors orientée vers les composés naturels issus des plantes comme produits alternatifs (Nerio, Olivero-Verbel, & Stashenko, 2010).

Les propriétés phytosanitaires des diverses huiles essentielles et extraits des plantes sont rapportées. Parmi les différents axes étudiés, la famille des Lamiacées s'est montrée avoir des HE ayant des effets répulsifs sur les diptères et les coléoptères. À titre d'exemple, l'HE de la menthe est efficace sur une large gamme d'insectes (*Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae*, *Acanthoscelides obtectus*, etc.) (Kumar, Mishra, Malik, & Satya, 2011). L'HE de l'origan a causé la mortalité de 68,3 et 36,7% des adultes des coléoptères *Sitophilus granarius* et *Tribolium confusum* respectivement (Kordali et al., 2008). L'HE du basilic et d'orange (Rutacées) sont toxiques sur les deux coléoptères fréquemment trouvés dans les graines stockées, le *Sitophilus zeamais* et le *Tribolium castaneum* (Kim & Lee, 2014). L'HE de la sauge sauvage s'est montrée efficace contre le coléoptère *Tribolium castaneum* (El Abdouni Khiyari et al., 2014). D'autres travaux publiés montrent que l'HE de l'anise (Apiacées) et son composé majeur trans-Anéthole, a accéléré la mortalité des larves et des adultes de *Culex quinquefasciatus* (diptères) (Pavela, 2014). L'application de l'HE de l'ail (Alliacées) est toxique sur les coléoptères *Sitophilus oryzae* et *Tribolium castaneum* (Yang, Liang, Xu, Lu, & Zeng, 2010). L'HE d'eucalyptus (Myrtacées)

exerce une activité toxique sur les larves et les nymphes du diptère *Musca domestica* (Kumar, Mishra, Malik, & Satya, 2012).

Les activités répulsives des HE sont liées généralement à la présence des monoterpènes et sesquiterpènes. Dans certains cas, les composés peuvent agir en synergie améliorant leur efficacité. Par exemple, les fortes activités des HE du basilic et de l'eucalyptus sont dues aux composants présents dans leurs fractions montrant de forte activité répulsive tels que l' $\alpha$ -pinène, le limonène, le citronellol, le citronellal, le camphor et le thymol (Nerio et al., 2010). Le mode d'action des HE peut être par contact, inhalation (Kim & Lee, 2014), ingestion (Werding González, Gutiérrez, Ferrero, & Fernández Band, 2014) ou par combinaison de ces modes.

Les techniques de détermination de l'activité insecticide d'une huile essentielle ont une grande influence sur les résultats. Elles se répartissent en deux catégories principales, la méthode de micro-atmosphère et de contact direct (Prates et al., 1998). Quelque soit la technique utilisée, la lecture porte sur le nombre d'insectes morts après un temps bien déterminé d'exposition à l'HE.

### **I.6.2 Les huiles essentielles et arômes: dans les parfums et les cosmétiques**

Les huiles essentielles sont des ingrédients appréciés dans le domaine des parfums et des cosmétiques. Suite aux soupçons de toxicité des conservateurs d'origine synthétique sur la santé, l'utilisation des HE commence à prendre de l'ampleur comme agent conservateur grâce à leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, pouvant augmenter la durée de vie du produit. En outre, leurs caractéristiques odorantes en font des ingrédients très utilisées dans la formulation des produits. Cependant, leur utilisation peut connaître des contre-indications: des concentrations plus élevées du pourcentage recommandé peut générer des odeurs très prononcées ou bien peuvent causer des réactions cutanées comme les allergies. Le comité scientifique des produits de consommation contrôle leur emploi puisque parmi les 26 substances classées comme allergènes, dix-sept peuvent être retrouvées dans les HE (eugénol, linalol, cinnamaldéhyde, géraniol, citral, etc.) (André & Bettenfeld, 2012). Le septième amendement de la directive Cosmétique oblige leur étiquetage si elles sont présentes à plus de 0,0001% dans les produits rincés (savons, shampoings, etc.) et à plus de 0,01% dans les produits non rincés (crèmes, lotions) (AFSSAPS, 2008).

Les huiles essentielles couramment utilisées comme ingrédients en parfumerie ainsi que dans les produits cosmétiques sont les HE de citronnelle, de bois de cèdre, de lavandin, de patchouli, de thym, d'origan et bien d'autres (Fernandez, Chémat, & Do, 2012).

En plus des huiles essentielles, différents extraits des plantes peuvent être aussi utilisés tels que les concrètes et les absolues à condition que celles-ci soient extraites avec des solvants acceptés par les différents référentiels. La concrète est souvent utilisée dans les parfums solides et comme épaississant des crèmes et lotions vu qu'elle est peu soluble dans la formulation du parfum. L'absolue est très appréciée auprès des parfumeurs en raison de l'intensité et la finesse de son parfum. À titre d'exemple, les absolues de jasmin, de lavande, de géranium, de lavandin, du narcisse, etc. sont souvent utilisées comme ingrédients dans les parfums (De Silva, 1995).

### **I.6.3 Les huiles essentielles et arômes en tant qu'arôme alimentaire**

Les huiles essentielles sont très utilisées comme arômes alimentaires, aussi bien dans le secteur salé que sucré (alcools, boissons non alcoolisées, confiserie, produits laitiers, produits carnés, sauces, soupes, snacks, produits de boulangerie). Les HE, y compris aussi d'autres extraits comme les concrètes et les absolues font partie des préparations aromatisantes naturelles pour conférer une odeur et un goût aux denrées alimentaires. Cette utilisation des arômes naturels est aussi en pleine expansion devant la demande croissante de naturalité. Bien que des substances chimiques trouvées dans les HE ne puissent pas être ajoutées aux aliments, elles sont cependant autorisées lorsqu'elles sont apportées par le biais d'une HE en raison de leur occurrence naturelle dans ces composés aromatiques. Ainsi, les HE et leurs composants, pourraient de ce fait être utilisés comme arôme alimentaire et sont pour la plupart classés comme GRAS « généralement reconnus comme sains » (*generaly recongnized as safe*), (Mascret, 2010).

### **I.6.4 Les huiles essentielles et arômes: en aromathérapie et pharmacie**

L'aromathérapie peut se définir comme la partie de la phytothérapie qui utilise les huiles essentielles. Le mot « aromathérapie » (du latin *aroma*, arôme, et du grec *thérapia*, soin, cure) signifie le traitement des maladies et le soin du corps par des extraits aromatiques de plantes, ce qui la différencie de la phytothérapie qui fait usage de l'ensemble des éléments d'une plante (Gérault & Mary, 2008; Salvador, 2010) .

Les vertus thérapeutiques des huiles essentielles sont connues depuis très longtemps, constituant la base de la médecine traditionnelle. Donc, les huiles essentielles sont souvent très utilisées dans le domaine de la santé. En pharmacie, l'article L. 5121-1 16° du Code de la santé publique définit les médicaments à base de plantes comme «tout médicament dont les substances actives sont exclusivement une ou plusieurs substances végétales ou préparations à base de plantes ou une association de plusieurs substances végétales ou préparations à base de plantes». Les médicaments à base d'huiles essentielles doivent être conformes à la réglementation régissant ces médicaments. S'ils satisfont aux critères définis par l'ordonnance n° 2007-613 du 26 avril 2007 (1er chapitre, article 2), ils doivent faire l'objet d'un enregistrement de médicament traditionnel à base de plantes (Mascret, 2010).

Dans les médicaments, la fonction des HE dépasse l'aromatisation et la production d'antiseptique. Le potentiel thérapeutique de ces composés montre leur bienfaits dans le traitement du cancer, des problèmes cardiovasculaires, des infections bactériennes, virales, du diabète et dans la lutte contre le stress oxydatif (Edris, 2007). De même, les propriétés lipophiles des composés aromatiques permettent aux HE de pénétrer dans la peau, ce qui facilite l'administration des médicaments par voie transdermique (Edris, 2007). Une longue liste des huiles essentielles des plantes est utilisée en médecine, à titre d'exemple celles de l'ail, de l'oignon, du romarin, de sauge, d'origan, d'anise, de la citronnelle, de lavande, du thym et bien d'autres.

Dans le domaine d'aromathérapie, les HE et les autres extraits comme les absolues, sont utilisés pour soigner, atténuer ou prévenir les infections par inhalation ou bien par application sur la peau à travers des massages pour le traitement du stress, des crampes, du rhumatisme, de la douleur, de la circulation sanguine, de la cellulite, etc. Afin d'améliorer son action ou compléter ses propriétés, les composés aromatiques sont mélangés à d'autres selon la potentialisation de l'action thérapeutique désirée. Les HE et les absolues sont diluées avec une huile grasse ou une crème de massage pour éviter toute réaction allergique ou irritation cutanée et pour faciliter leur incorporation par voie cutanée (Gérault & Mary, 2008).

À titre d'exemple, les HE utilisées en massage sont celles du basilic (inflammation, rhumatisme), du thym (rhumatisme), de la menthe (antiseptique, douleur, circulation), de lavande (cicatrice, crampes), du laurier (crampes, douleur) (Wilson, 2010). Le marché de l'aromathérapie est en

pleine expansion, à travers le développement des centres de massage, de bien-être et d'ouvrages consacrés à cet art.

#### **I.6.5 Les huiles essentielles et arômes: dans la chimie verte**

La chimie verte, appelée aussi chimie écologique est l'utilisation des techniques et des méthodologies de la chimie qui réduisent ou éliminent l'usage des produits, des solvants et des réactifs, qui sont néfastes pour l'environnement et la santé (Armenta, Garrigues, & de la Guardia, 2008). Par ailleurs, la législation environnementale incite les entreprises à utiliser des solvants et des procédés plus respectueux de l'environnement. L'intérêt de l'utilisation des huiles essentielles et des arômes naturels contribue aux principes de la chimie verte permettant de substituer aux produits issus des solvants pétrochimiques. Un autre intérêt des huiles essentielles peut se manifester par leur utilisation comme agrosolvant pour l'extraction des substances naturelles. Le d-limonène, un monoterpène hydrocarboné présent dans les HE d'agrumes à des proportions élevées (91 à 97%) constitue un exemple d'agrosolvant. Les industries ne pouvant pas perdre ces matières premières, a envisagé leur application comme solvants industriels naturels qui peuvent intéresser de nombreux secteurs comme l'agroalimentaire, la pharmacie, la cosmétique et les parfums (Antoniotti, Abert Vian & Chemat, 2012).

## Références bibliographiques

- AFSSAPS. (2008). Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles.
- Amany, M. S., Reham, A. A., & Gehan, S. A. (2010). Studies on Antimicrobial and Antioxidant Efficiency of Some Essential Oils in Minced Beef. *Journal of American Science*, 6(12), 691-700.
- André, C. & Bettenfeld, M. L. (2012). Applications des huiles essentielles dans le domaine des arômes et parfums. In X. Fernandez & F. Chemat (Eds). *La chimie des huiles essentielles: Tradition et innovation*. (pp. 193-211). Paris: Vuibert.
- Antolovitch, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., Mcdonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Royal Society of Chemistry Analyst*, 127, 183–192.
- Antoniotti, S., Abert Vian, M., & Chemat, F. (2012). Les huiles essentielles comme ingrédients pour une chimie "verte". In X. Fernandez & F. Chemat (Eds). *La chimie des huiles essentielles: Tradition et innovation*. (pp. 249-274). Paris: Vuibert.
- Arfat, Y. A., Benjakul, S., Prodpran, T., Sumpavapol, P., & Songtipya, P. (2014). Properties and antimicrobial activity of fish protein isolate/fish skin gelatin film containing basil leaf essential oil and zinc oxide nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 41, 265–273.
- Armenta, S., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2008). Green Analytical Chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(6), 497–511.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.
- Başer, K. H. C., & Buchbauer, G. (2010). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis.
- Basmacıoğlu, H., Tokuşoğlu, Ö., & Ergül, M. (2004). The effect of oregano and rosemary essential oils or alpha-tocopheryl acetate on performance and lipid oxidation of meat enriched with n-3 PUFA's in broilers. *South African Journal of Animal Science*, 34(3), 197–210.
- Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT - Food Science and Technology*, 37(2), 263–268.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method Enzymol*, 299, 15–27.
- Besombes, C., Berka-Zougali, B., & Allaf, K. (2010). Instant controlled pressure drop extraction of lavandin essential oils: Fundamentals and experimental studies. *Journal of Chromatography A*, 1217(44), 6807–6815.

- Botsoglou, N. A., Christaki, E., Fletouris, D. J., Florou-Paneri, P., & Spais, A. B. (2002). The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Science*, *62*, 259–265.
- Botsoglou, N. A., Christaki, E., Florou-Paneri, P., Giannenas, I., Papageorgiou, G., & Spais, A. B. (2004). The effect of a mixture of herbal essential oils or  $\alpha$ -tocopheryl acetate on performance parameters and oxidation of body lipid in broilers. *South African Journal of Animal Science*, *34*(1), 52–61.
- Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Florou-Paneri, P., Christaki, E., & Spais, A. B. (2003). Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation. *Food Research International*, *36*(3), 207–213.
- Botsoglou, N. A., Govaris, A., Botsoglou, E. N., Grigoropoulou, S. H., & Papageorgiou, G. (2003). Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and alpha- tocopheryl acetate supplementation in long-term frozen stored turkey meat. *J. Agric. Food Chem*, *51*, 2930–2936.
- Botsoglou, N. A., Grigoropoulou, S. H., Botsoglou, E., Govaris, A., & Papageorgiou, G. (2003). The effects of dietary oregano essential oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Science*, *65*(3), 1193–1200.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*(3), 223–253.
- Caissard, J. C. & Baudino, S. (2012). Sécrétion et stockage des huiles essentielles par les végétaux. In X. Fernandez & F. Chemat (Eds). *La chimie des huiles essentielles: Tradition et Innovation* (pp. 22-34). Paris: Vuibert.
- Chemat, F., Abert-Vian, M., & Dangles, O. (2007). Essential oils as antioxidants. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, *1*, 4–15.
- Chemat, F., Fabiano-Tixier, A. S. & Abert Vian, M. (2012). Éco-extraction des huiles essentielles: Intensification et innovation. In X. Fernandez & F. Chemat (Eds). *La chimie des huiles essentielles: Tradition et innovation*. (pp.102-123). Paris: Vuibert
- Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(4), 813–835.
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, *29*(2), 130–135.
- Couic-Marinier, F., & Lobstein, A. (2013). Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités Pharmaceutiques*, *52*(525), 22–25.

- Da Porto, C., Decorti, D., & Kikic, I. (2009). Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry*, *112*(4), 1072–1078.
- Da Silveira, S. M., Luciano, F. B., Fronza, N., Cunha, A., Scheuermann, G. N., & Vieira, C. R. W. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 °C. *LWT - Food Science and Technology*, *59*(1), 86–93.
- De Azeredo, G. A., Stamford, T. L. M., Nunes, P. C., Gomes Neto, N. J., de Oliveira, M. E. G., & de Souza, E. L. (2011). Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International*, *44*(5), 1541–1548.
- De Silva, T. (1995). Development of essential oil industries in developing countries. Austria: K.Tuley de Silva.
- Decker, E. A., Warner, K., Richards, M. P., & Shahidi, F. (2005). Measuring Antioxidant Effectiveness in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(10), 4303–4310.
- Dolatowski, Z. J., Stadnik, J., Stasiak, D., & others. (2007). Applications of ultrasound in food technology. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, *6*(3), 89–99.
- Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., & Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(9), 1908–1914.
- Du, H., & Li, H. (2008). Antioxidant effect of Cassia essential oil on deep-fried beef during the frying process. *Meat Science*, *78*(4), 461–468.
- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, *42*(4), 308–323.
- El Abdouni Khiyari, M., Kasrati, A., Jamali, C. A., Zeroual, S., Markouk, M., Bekkouche, K., Abbad, A. (2014). Chemical composition, antioxidant and insecticidal properties of essential oils from wild and cultivated *Salvia aucheri* subsp. *blancoana* (Webb. & Helder)), an endemic, threatened medicinal plant in Morocco. *Industrial Crops and Products*, *57*, 106–109.
- Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K., & Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, *86*(2), 283–288.
- Estévez, M., & Cava, R. (2006). Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: Contradictory effects in different types of frankfurters. *Meat Science*, *72*(2), 348–355.

- Estévez, M., Ramírez, R., Ventanas, S., & Cava, R. (2007). Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté. *LWT - Food Science and Technology*, *40*(1), 58–65.
- Fasseas, M. K., Mountzouris, K. C., Tarantilis, P. A., Polissiou, M., & Zervas, G. (2008). Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry*, *106*(3), 1188–1194.
- Fernandez, X., Chémat, F., & Do, T. K. T. (2012). *Les huiles essentielles: vertus et applications*. Paris: Vuibert.
- Fernández-Pan, I., Carrión-Granda, X., & Maté, J. I. (2014). Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. *Food Control*, *36*(1), 69–75.
- Fillatre, Y. (2011). *Produits phytosanitaires: Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem*. Thèse d'Université d'Angers.
- Gérault, G., & Mary, R. (2008). *Le guide l'aromathérapie*. Paris: A. Michel.
- Goulas, A. E., & Kontominas, M. G. (2007). Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, *100*(1), 287–296.
- Gray, J. I., Gomaa, E. A., & Buckley, D. J. (1996). Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, *43*, 111–123.
- Hanif, M. A., Al-Maskari, M. Y., Al-Maskari, A., Al-Shukaili, A., Al-Maskari, A. Y., & Al-Sabahi, J. N. (2011). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of unexplored Omani basil. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(5), 751–757.
- Iranshahi, M. (2012). A review of volatile sulfur-containing compounds from terrestrial plants: biosynthesis, distribution and analytical methods. *Journal of Essential Oil Research*, *24*, 393–434.
- Jouki, M., Mortazavi, S. A., Yazdi, F. T., & Koocheki, A. (2014). Characterization of antioxidant–antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil. *Carbohydrate Polymers*, *99*, 537–546.
- Khanjari, A., Karabagias, I. K., & Kontominas, M. G. (2013). Combined effect of N,O-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat fillets. *LWT - Food Science and Technology*, *53*(1), 94–99.
- Kim, S.I., & Lee, D.-W. (2014). Toxicity of basil and orange essential oils and their components against two coleopteran stored products insect pests. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *17*(1), 13–17.

Klein, R. A. (1970). The detection of oxidation in liposome preparations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 210(3), 486–489.

Kordali, S., Cakir, A., Ozer, H., Cakmakci, R., Kesdek, M., & Mete, E. (2008). Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*, 99(18), 8788–8795.

Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., & Satya, S. (2011). Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 802–817.

Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., & Satya, S. (2012). Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). *Acta Tropica*, 122(2), 212–218.

Lambert, R. J. , Skandamis, P., Coote, P., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oils, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453–462.

Lardry, J. M., & Haberkorn, V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinesither Rev*, 61, 14–17.

Lee, D. S., Kim, N. S., & Lee, S. H. (2001). 2, 2-Diphenyl-1- picrylhydrazyl Hydrate, a Stable Free Radical, Is an  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor. *J Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 24, 727–728.

Lien, E. J., Ren, S., Bui, H. H., & Wang, R. (1999). Quantitative structure activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 26, 285–294.

Lucchesi, M. E., Chemat, F., & Smadja, J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043(2), 323–327.

Luukkainen, P., Aejmelaeus, R., Alho, H., Metsa-Ketela, T., Ikonen, S. R., & Salo, M. K. (1999). Plasma chain-breaking antioxidants in preterm infants with good and poor short-term outcome. *Free Radical Research*, 30(3), 189–197.

Mascret, C. (2010). La réglementation régissant les huiles essentielles. *Actualités Pharmaceutiques*, 49(492), 54–56.

Meierhenrich, U. J., Golebiowski, J., Fernandez, X., & Cabrol-Bass, D. (2005). De la molécule à l'odeur. *L'actualité Chimique*, (289), 29–40.

Meyer-Warnod, B. (1984). Natural essential oils, extraction processes and application to some major oils. *Perfumer Flavorist*, 94(2), 93–104.

- Miller, N. ., Rice-Evans, C. ., Davies, M. ., Gopinatan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. *Clinic Science*, *84*, 407–412.
- Milos, M., Mastelic, J., & Jerkovic, I. (2000). Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *Journal of Food Chemistry*, *71*, 79–83.
- Moreira, M. R., Ponce, A. ., del Valle, C. E., & Roura, S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT - Food Science and Technology*, *38*(5), 565–570.
- Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, *101*(1), 372–378.
- Nixon, M., & McCaw, M. (2001). *The Compleat distiller*. New Zealand: The Amphora Society.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues. *Analytical Biochem*, *95*, 351–358.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2004). Antimicrobial and Antioxidant Effects of Milk Protein-Based Film Containing Essential Oils for the Preservation of Whole Beef Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(18), 5598–5605.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, *18*(5), 414–420.
- Ozkan, G., Simsek, B., & Kuleasan, H. (2007). Antioxidant activities of *Satureja cilicica* essential oil in butter and *in vitro*. *Journal of Food Engineering*, *79*(4), 1391–1396.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., & Codina, C. (2002). Comparison between the Radical Scavenging Activity and Antioxidant Activity of Six Distilled and Nondistilled Mediterranean Herbs and Aromatic Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(23), 6882–6890.
- Pavela, R. (2014). Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *17*(3), 287–293.
- Pavelková, A., Kačániová, M., Horská, E., Rovná, K., Hleba, L., & Petrová, J. (2014). The effect of vacuum packaging, EDTA, oregano and thyme oils on the microbiological quality of chicken's breast. *Anaerobe*, *29*, 128–133.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.-S., & Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*, *31*(2), 593–606.

- Pires, C., Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Nunes, M. L., & Marques, A. (2013). Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 224–231.
- Ponce, A. G., Fritz, R., del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Science and Technology*, 36(7), 679–684.
- Prates, H. T., Santos, J. P., Waquil, J. M., Fabris, J. D., Oliveira, A. B., & Foster, J. E. (1998). Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*, 34(4), 243–249.
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Jacob, R. (2003). Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3273–3279.
- Richard, H. (1992). Connaissance de la nature des arômes. In H. Richard & J. L. Multon (Eds). *Les arômes alimentaires*. (pp. 21-37). Paris: Tec et doc-Lavoisier:APRIA
- Roginsky, V., & Lissi, E. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2), 235–254.
- Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19(7), 681–687.
- Ruberto, G., & Baratta, M. T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69, 167–174.
- Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2013). Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 74–84.
- Salvador, C. (2010). *L'aromathérapie spirituelle histoire et bienfaits des huiles essentielles pour les maux du corps et de l'âme*. Paris: G. Trédaniel.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270–276.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2005). *Lipid oxidation: measurement methods* (Vol. 1). New Jersey: Bailey's industrial oil and fat products.

- Simitzis, P. E., Deligeorgis, S. G., Bizelis, J. A., Dardamani, A., Theodosiou, I., & Fegeros, K. (2008). Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. *Meat Science*, 79(2), 217–223.
- Singh, R., Shushni, M. A. M., & Belkheir, A. (2011). Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*. DOI: 10.1016/j.arabjc.2011.01.019
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolyb diphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18(4), 463–470.
- Soković, M., Marin, P. D., Brkić, D., & Van Griensven, L. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. *Food*, 1(2), 220–226.
- Taga, M. S., Miller, E. E., & Pratt, D. E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(5), 928–931.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218.
- Takala, P. N., Vu, K. D., Salmieri, S., Khan, R. A., & Lacroix, M. (2013). Antibacterial effect of biodegradable active packaging on the growth of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in fresh broccoli stored at 4 °C. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 499–506.
- Tomaino, A., Cimino, F., Zimbalatti, V., Venuti, V., Sulfaro, V., De Pasquale, A., & Saija, A. (2005). Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry*, 89(4), 549–554.
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2012). Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chemistry*, 134(3), 1571–1579.
- Veillet, S., Tomao, V., & Chemat, F. (2010). Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. *Food Chemistry*, 123(3), 905–911.
- Velasco, V., & Williams, P. (2011). Improving meat quality through natural antioxidants. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(2), 313–322.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1), 230–235.

- Viuda-Martos, M. (2011). Effect of Packaging Conditions on Shelf-Life of Mortadella Made with Citrus Fibre Washing Water and Thyme or Rosemary Essential Oil. *Food and Nutrition Sciences*, 02(01), 1–10.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of mortadella. *Meat Science*, 85(3), 568–576.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Effect of adding citrus fibre washing water and rosemary essential oil on the quality characteristics of a bologna sausage. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 958–963.
- Wai, W. T., Saad, B., & Lim, B. P. (2009). Determination of TOTOX value in palm oleins using a FI-potentiometric analyzer. *Food Chemistry*, 113(1), 285–290.
- Wan, J., Wilcock, A., & Coventry, M. J. (1998). The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(2), 152–158.
- Wang, B., Pace, R. D., Dessai, A. P., Bovell-Benjamin, A., & Phillips, B. (2002). Modified Extraction Method for Determining 2-Thiobarbituric Acid Values in Meat with Increased Specificity and Simplicity. *Journal of Food Science*, 67(8), 2833–2836.
- Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., & Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Letters*, 187(1), 33–37.
- Werdin González, J. O., Gutiérrez, M. M., Ferrero, A. A., & Fernández Band, B. (2014). Essential oils nanoformulations for stored-product pest control – Characterization and biological properties. *Chemosphere*, 100, 130–138.
- Wilson, M. (2010). Huiles essentielles pour la cuisine et le bien-être. [Montréal]: Fides.
- Yang, F.L., Liang, G.-W., Xu, Y.-J., Lu, Y.-Y., & Zeng, L. (2010). Diatomaceous earth enhances the toxicity of garlic, *Allium sativum*, essential oil against stored-product pests. *Journal of Stored Products Research*, 46(2), 118–123.

## **Chapitre II. Extraction, composition chimique, activités antimicrobiennes et antioxydantes des six huiles essentielles de la famille des Alliées: ail, oignon, poireau, ciboule, échalote et ciboulette**

Ce chapitre fait l'objet d'une publication:

Dima Mnayer, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Emmanuel Petitcolas, Tayssir Hamieh, Nancy Nehme, Christine Ferrant, Xavier Fernandez, Farid Chemat. "Extraction, chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of six essential oils from the Alliaceae family: garlic, onion, leek, Chinese chive, shallot and chive". *Molecules* **2014**, *19*, 20034-20053

## Résumé

Six huiles essentielles (HE) des plantes de la famille des Alliées: l'ail (*Allium sativum*), l'oignon (*Allium cepa*), le poireau (*Allium porrum*), la ciboule (*Allium tuberosum*), l'échalote (*Allium ascalonicum*) et la ciboulette (*Allium schoenoprasum*) sont analysées par GC et GC-MS et évaluées pour leurs propriétés biologiques. Les propriétés antimicrobiennes sont testées sur cinq pathogènes d'origine alimentaire: deux bactéries à Gram positif *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) et trois bactéries à Gram négatif *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 8739) et *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291). Les HE de l'ail, la ciboule et l'oignon sont les plus efficaces contre ces souches bactériennes. Les propriétés antioxydantes et antiradicalaires sont analysées par les tests de Folin-Ciocalteu et de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Des suggestions sur les relations entre la composition chimique et l'activité biologique sont décrites. Le chauffage (friture) provoque une diminution de l'activité antioxydante de ces HE en utilisant le test des matériaux polaires totaux (TPM) de l'huile de tournesol.

Mots-clés: Huiles essentielles, les espèces d'*Allium*, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

## II.1. Introduction

L'*Allium*, le genre le plus important de la famille des Alliées, est parmi les plantes les plus anciennement cultivées. Elles peuvent être utilisées comme ornements, épices, légumes, ou bien peuvent servir pour le traitement de diverses maladies. Le genre *Allium* comprend plus de 700 espèces largement réparties dans le monde entier (Tepe, Sokmen, Akpulat, & Sokmen, 2005) en raison de leur bonne saveur, leur longue période de stockage, et de la facilité de leur transport. Les espèces diffèrent dans la forme et le goût, mais elles sont proches du point de vue biochimique et phytochimique. Les espèces d'*Allium* sont caractérisées par leur richesse en composés soufrés, responsables de leurs paramètres organoleptiques (Benkeblia & Lanzotti, 2007; Lanzotti, 2006). Ces composés soufrés volatils contribuent aux activités antioxydantes et antimicrobiennes de l'espèce *Allium* (Corzomartinez, Corzo, & Villamiel, 2007; Leuschner, & Ielsch, 2003; Mostafa, Mima, Ohnishi, & Mori, 2000; Yin & Cheng, 1998; Yin & Cheng, 2003). Ils constituent la majeure partie des huiles essentielles de ces plantes (Iranshahi, 2012).

L'ail et l'oignon, consommés partout dans le monde, constituent les espèces d'*Allium* les plus importantes. Le poireau, la ciboule, l'échalote et la ciboulette sont connus pour leurs propriétés médicinales (Amin & Kapadnis, 2005; Bernaert et al, 2012; Fista, Bloukas, & Siomos, 2004; Leelarungrayub, Rattanapanone, Chanarat, & Gebicki, 2006; Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2008; Stajner, Milic-Demarino, & Canadanovic-Brunet, 2003; Yabuki et al, 2010).

Malgré l'importance économique des HE de la famille des Alliées (2400 Euros par kg d'HE de poireau, d'échalote ou de ciboulette; 950 Euros par kg d'HE de ciboule; 660 Euros par kg d'HE d'oignon; 120 Euros par kg d'HE d'ail), peu d'attention est accordée à leurs compositions et leurs propriétés. Par conséquent, ce travail est réalisé afin d'évaluer la composition chimique des huiles essentielles ainsi que leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes. Les HE sont obtenues par turbo hydrodistillation et testées pour leurs activités antioxydantes par deux méthodes complémentaires, le Folin-Ciocalteu pour la détermination des teneurs en polyphénols et le DPPH pour leurs activités antiradicalaires. L'activité antimicrobienne utilisant la méthode du disque est conduite contre les cinq plus importants pathogènes d'origine alimentaire. L'utilisation des HE sous les conditions thermiques est étudiée. L'objectif de ces tests est de déterminer la possibilité d'utilisation des HE comme additifs naturels pour l'industrie agroalimentaire afin de satisfaire les demandes des consommateurs en réduisant les antioxydants synthétiques.

## **II.2. Matériels et méthodes**

### **II.2.1 Produits chimiques**

Le glycérol et le butylhydroxytoluène (BHT) sont fournis par Sigma Aldrich (États-Unis), le Trypticase Soy Agar est obtenu de Biomerieux (France). Le bouillon nutritif et la gélose Mueller Hinton sont achetés de BDH (Royaume-Uni), la gélose nutritive et l'amoxicilline/acide clavulanique sont fournis par Himedia (Inde), l'eau peptonée est obtenue de SRL (Inde). Le méthanol est fourni par Fisher Scientific (Royaume-Uni). Le réactif de Folin-Ciocalteu et l'acide gallique sont obtenus d'Isitec Lab-Seppal (France) et le DPPH est fourni par Sigma Aldrich (Allemagne).

## II.2.2 Huiles essentielles: extraction et rendement

Les HE sont extraites par turbo hydrodistillation (Figure II.1). Cinq kilogrammes des différentes plantes fraîches d'*Allium* sont trempés dans l'eau distillée (8000 mL) et sont soumis à la turbo hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. Les huiles essentielles sont recueillies, séchées avec du sulfate de sodium anhydre et conservées à 4 °C à l'abri de la lumière jusqu'à leurs utilisations. Les rendements des huiles essentielles par tonne (g/t) de matière première sont: 1600 ± 1,3 g/t pour l'ail, 68 ± 1,7 g/t pour l'oignon, 90 ± 2,1 g/t pour le poireau, 250 ± 1,9 g/t pour la ciboule, 100 ± 2,3 g/t pour l'échalote et 35 ± 1,8 g/t pour la ciboulette.

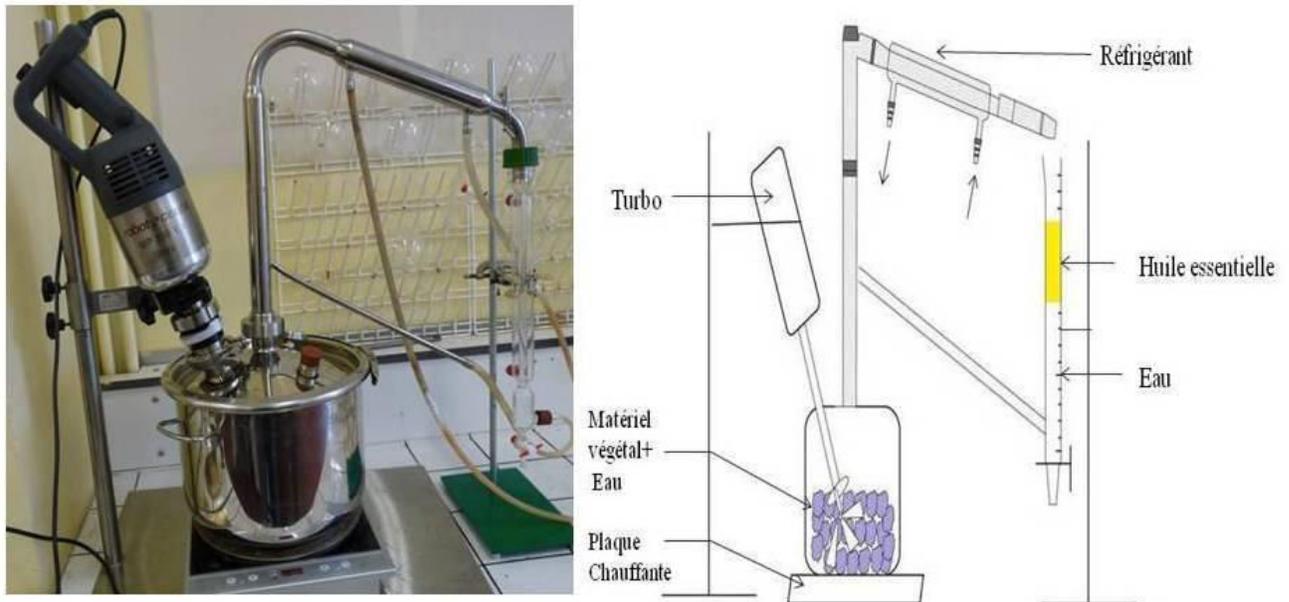


Figure II.1: Extraction des huiles essentielles par turbo hydrodistillation.

## II.2.3 Identification par GC-FID et GS-MS

Les huiles essentielles sont analysées par chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (GC-MS) pour identifier leurs constituants chimiques.

Les huiles essentielles sont analysées tout d'abord par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID). Ces analyses sont effectuées en utilisant un chromatographe en phase gazeuse 7890A (Agilent, France) avec une colonne non polaire HP-5MS (5% phényle 95% méthylsiloxane, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Agilent, France).

L'injection de 0,4 µL de chaque échantillon est réalisée avec un mode split avec un ratio de 1:100, le gaz vecteur est H<sub>2</sub>, et la température d'injection est de 250 °C. La programmation de

température du four progresse de 40 à 250 °C à 2 °C min<sup>-1</sup> (pendant 60 minutes). Ensuite, la chromatographie en phase gazeuse couplée à des spectres de masse sont réalisées sur un détecteur de spectrométrie de masse 5975C (Agilent, France), utilisant la même colonne que celle de GC-FID. Les spectres GC-MS sont obtenus en utilisant les conditions suivantes: mode split avec un ratio de 1:100, le volume d'injection est de 0,4 µL et le gaz vecteur est l'hélium. La température d'injection est de 250 °C et la programmation de température du four progresse de 40 à 250 °C à 2 °C min<sup>-1</sup> (pendant 60 minutes). Le mode d'ionisation utilisé est l'impact électronique à 70 eV et la gamme de masse entre 35 et 400 est scannée. Les huiles essentielles sont identifiées par comparaison de leurs indices de rétention (RI) linéaires de GC, avec une série homologue d'alcane. L'identification est confirmée par comparaison de leur spectre de masse avec des échantillons authentiques, avec celles stockées dans la base de données MS (home-made and commercial libraries : Wiley 6N, NIST 98) et avec les données de littérature de l'index de rétention (Adams, 2007) en utilisant le logiciel AMDIS (Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System). Trois injections répétées sont effectuées pour l'analyse quantitative des composants.

#### **II.2.4 Les souches bactériennes**

Les bactéries à Gram positif *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) et les bactéries à Gram négatif *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 8739) sont fournies par l'Institut de Recherche Agronomique Libanais. La bactérie à Gram négatif *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291) est fournie par l'Université Libanaise, Faculté d'Agronomie et de Médecine Vétérinaire.

Les cultures bactériennes sont congelées à -20 °C dans un bouillon nutritif contenant 20% de glycérol (v/v). Au cours des expériences, les souches sont repiquées chaque mois sur la gélose Trypticase Soy et conservées à 4 °C. Avant leur utilisation, les bactéries ont été activées dans un bouillon nutritif et incubées pendant 24 h à 42 °C pour *Campylobacter jejuni* dans des conditions microaérophiles et 24 h à 37 °C pour les autres souches. La suspension bactérienne est ensuite diluée dans l'eau peptonée de façon à obtenir le nombre initial de cellules d'environ 10<sup>6</sup> UFC/mL.

### II.2.5 Méthode de disque

La méthode de disque est utilisée pour déterminer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Un mL de la suspension microbienne ( $10^6$  UFC/mL) est étalé sur des boîtes de Petri contenant 20 mL de gélose Muller Hinton. Des disques de papier filtre de 6,0 mm de diamètre (Whatman n° 40) sont imprégnés individuellement avec 15  $\mu$ L d'huile essentielle, puis posés sur la surface de la gélose ensemencée. Un disque contenant 30  $\mu$ g d'amoxicilline/acide clavulanique est placé dans la boîte de Petri comme contrôle positif. À la fin du temps d'incubation (48 h à 42 °C pour *Campylobacter jejuni* dans des conditions microaérophiles et 48 h à 37 °C pour les autres bactéries), l'obtention d'un halo clair autour du disque indique l'inhibition du développement microbien. Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en mm incluant le diamètre du disque (Figure II.2).

Cette sensibilité est classée selon Ponce, Fritz, Del Valle, and Roura, (2003) comme suit: non sensible pour un diamètre inférieur à 8 mm; sensible pour un diamètre de 9-14 mm; très sensible pour un diamètre de 15-19 mm et extrêmement sensible pour diamètre supérieur à 20 mm. Chaque test est réalisé en trois répétitions.

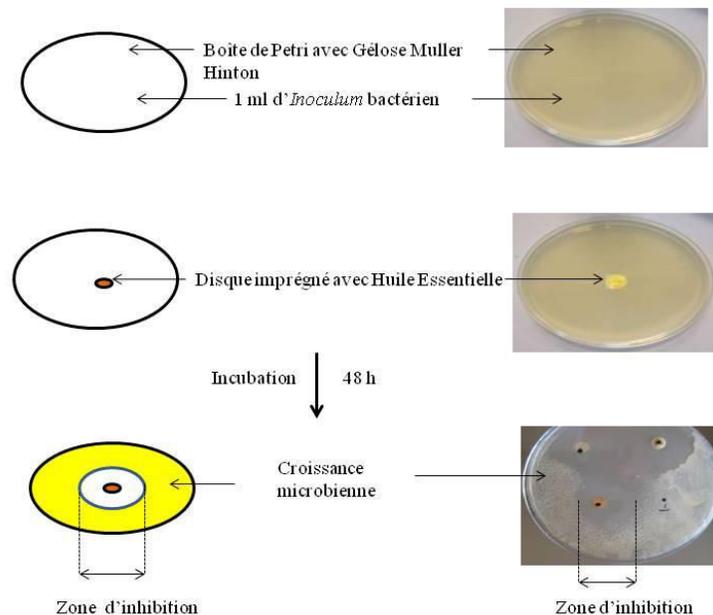


Figure II.2: Etude de l'activité antimicrobienne par la méthode de disque.

### **II.2.6 Folin-Ciocalteu**

La teneur en phénols totaux (CPT) est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu suivant le protocole décrit par le fournisseur du kit (Isitec Lab-Seppal). Un volume de 100  $\mu$ L d'une solution méthanolique des huiles essentielles (HE; 20 mg/mL) est introduit dans des tubes à essai, suivi par 2 mL de réactif de Folin-Ciocalteu et 1 mL de tampon alcalin. Les tubes sont soumis à un vortex et puis mis à l'obscurité pendant 1 heure. L'absorption à 760 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre, à barrette de diode Hewlett-Packard 8453 (Allemagne) et comparée à une solution d'acide gallique (3 g/L) utilisée comme standard. Les valeurs des composés phénoliques sont calculées selon la formule suivante: Teneur en phénols totaux = 3 x (absorbance de l'échantillon - absorbance du blanc)/(absorbance du standard - absorbance du blanc). Le BHT est utilisé comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en mg équivalents acide gallique (EAG)/g d'échantillon. Chaque essai est réalisé en trois répétitions.

### **II.2.7 DPPH**

Les activités antioxydantes des huiles essentielles de l'ail, de l'oignon, du poireau, de la ciboule, de l'échalote et de la ciboulette sont mesurées en termes de capacité réductrice ou piégeage des radicaux par la décoloration de la solution méthanolique de radical stable DPPH de couleur pourpre (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

Les solutions diluées sont préparées dans du méthanol pour obtenir des concentrations finales allant de 20 à 1 mg/mL de la solution-mère des huiles essentielles (20 mg/mL).

Deux millilitres de solution méthanolique fraîche de DPPH à une concentration de  $6 \times 10^{-5}$  M sont ajoutés. Le BHT (0,1 mg/mL) est utilisé comme contrôle positif à des concentrations méthanoliques diluées allant de 0,01 à 0,08 mg/mL. Les échantillons sont agités dans l'obscurité pendant quatre heures.

La diminution de l'absorbance à 517 nm est déterminée en utilisant un spectrophotomètre, à barrette de diode Hewlett-Packard 8453 (Allemagne) pour tous les échantillons. Le méthanol est utilisé comme blanc; le méthanol avec DPPH est utilisé comme contrôle négatif. Tous les échantillons sont testés en trois répétitions.

La concentration de l'échantillon nécessaire pour diminuer l'absorption de DPPH de 50% ( $EC_{50}$ ) est calculée graphiquement. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculé selon la formule du Yen et Duh (Yen & Duh, 1994):

$$I = (A_0 - A_i) / A_0 \times 100$$

où I = inhibition de DPPH (%),

A<sub>0</sub> = absorbance de contrôle (Pas antioxydant) t = 0

et A<sub>i</sub> = absorbance de l'échantillon testé à la fin de la réaction (t = 4 h)

### **II.2.8 Test de l'huile de friture**

L'effet de chauffage est étudié par la détermination des matériaux polaires totaux. Chacune des six huiles essentielles (0,25 g) est ajoutée à 250 g de l'huile de tournesol et les échantillons sont chauffés dans des conditions domestiques de friture, c'est-à-dire à  $180 \pm 5$  °C pendant plusieurs heures (Casal, Malheiro, Sendas, Oliveira, & Pereira 2010). La température est contrôlée par un thermocouple (ATC-300) inséré directement dans les friteuses électriques. Tous les échantillons sont évalués avant les premières séances de friture et après chaque heure de chauffage jusqu'à ce que l'huile devienne non utilisable. La fin des essais de chauffage est déterminée par la valeur de TPM, où un pourcentage maximal de 25% est toléré, conformément à la loi française (article 3-3 du décret N° 86-857 du 18/07/86). Cette valeur légale maximale des matériaux polaires totaux dans les huiles de friture, y compris les produits d'hydrolyse (diglycérides, monoglycérides et les acides gras libres) et une distribution complexe des produits d'oxydation englobant les polymères, est formée à des températures inférieures à 180 °C (la loi française N° 86-857). La valeur des matériaux polaires totaux, habituellement évaluée dans les restaurants et l'industrie agroalimentaire par des tests commerciaux rapides (principalement basés sur les lectures colorimétriques) a démontré une bonne corrélation avec les valeurs obtenues par les normes officielles (Casal et al. , 2010).

### **II.2.9 Analyse statistique**

Les moyennes et les écarts-types des tests sont calculés en utilisant des méthodes statistiques classiques. Chaque traitement est réalisé en trois répétitions. Les données sont traitées par l'analyse statistique (ANOVA) pour déterminer les différences ( $p < 0,05$ ). Les différences de moyennes sont analysées par le test de Tukey. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel Statgraphics XV.I pour Windows.

## **II.3. Résultats et discussion**

### **II.3.1 La composition chimique des huiles essentielles**

Le Tableau II.1 montre les constituants chimiques, leur pourcentage relatif de la surface totale du chromatogramme et l'indice de rétention des huiles essentielles de l'ail, de l'oignon, du poireau, de la ciboule, de l'échalote et de la ciboulette.

L'analyse par GC-MS de l'huile essentielle de l'ail a identifié 27 constituants représentant plus de 94,63% de l'HE totale. Les principaux composants sont le diallyl disulfide (37,90%), le diallyl trisulfide (28,06%), le méthyl allyl trisulfide (7,26%), le diallyle sulfide (6,59%), le diallyl tétrasulfide (4,14%) et le méthyl allyl disulfide (3,69%). Le profil obtenu dans cette étude est similaire à celui présenté par Banerjee, Mukherjee, and Maulik, (2003) et Kim, Huh, Kyung, and Kyung, (2004). Différentes études sur la composition de l'huile essentielle de l'ail montrent que le diallyl disulfide et le diallyl trisulfide sont les deux composés majeurs (Casella, Leonardi, Melai, Fratini, & Pistelli, 2012; Corzomartinez et al, 2007).

Dans l'HE de l'oignon, 31 constituants représentant plus de 82,36% de l'huile essentielle totale sont identifiés. Les principaux composants sont le dipropyl disulfide (30,92%), le dipropyl trisulfide (17,10%), le 1-propényl propyl disulfide (7,26%) et le méthyl propyl trisulfide (5,20%). Nos résultats sont en accord avec ceux de Corzomartinez et al., (2007) rapportant que le dipropyl disulfide est le composé le plus représentatif.

Dans l'HE du poireau, 41 composés qui constituent plus de 86,90% de l'huile essentielle totale sont identifiés. L'HE contient une teneur élevée en dipropyl disulfide représentant 47,70% suivi par le dipropyl trisulfide (15,01%), le méthyl propyl disulfide (4,48%), le 1-propényl propyl disulfide (3,75%) et le méthyl propyl trisulfide (3,19%). Ces résultats sont en accord avec ceux de Casella et al., (2012) qui ont rapporté que le dipropyl disulfide et le dipropyl trisulfide sont également les principaux composés.

Dans l'HE de la ciboule, 37 composés sont identifiés, représentant 85,79% de l'huile essentielle totale. L'HE se compose principalement du diméthyl disulfide (19,58%), du diméthyl trisulfide (14,34%), du méthyl allyl disulfide (14,37%), du méthyl allyl trisulfide (7,24%), du méthyl 1-propényl disulfide (6,07%) et du diallyl disulfide (5,14%).

En ce qui concerne l'HE de l'échalote, 42 composés qui représentent plus de 70,29% de l'huile essentielle totale sont identifiés. Les composants principaux sont le dipropyl disulfide (15,17%),

le dipropyle trisulfide (11,14%), le méthyl propyl trisulfide (9,20%), le 1-propényl propyl disulfide (4,57%) et le méthyl propyl disulfide (3,26%).

Les analyses GC-MS de l'HE de la ciboulette ont identifié 48 composants, représentant plus de 76,36% de l'huile essentielle totale. Les principaux composés trouvés dans l'HE de la ciboulette sont le dipropyl disulfide (19,49%), le dipropyl trisulfide (15,21%), le méthyl propyl trisulfide (8,47%) et le 1-propényl propyl disulfide (5,84%).

Tableau II.1: Composition chimique des huiles essentielles de l'ail, de l'oignon, du poireau, de la ciboule, de l'échalote et de la ciboulette.

Composés	Huiles Essentielles (% ± ET)							Méthodes d'identification
	LRI <sub>HP5</sub>	Ail	Oignon	Poireau	Ciboule	Echalote	Ciboulette	
Isoamyl alcohol	762	-	0,13 ± 0,03	-	-	-	-	SM, LRI, Std
Methyl 1-propenyl sulfide <sup>a</sup>	764	-	-	-	-	Tr	-	SM, LRI
Dimethyl disulfide	767	1,12 ± 0,18	Tr	0,28 ± 0,02	19,58 ± 2,62	Tr	tr	SM, LRI, Std
(Z)-3-hexenal	769	0,15 ± 0,01	-	Tr	Tr	0,16 ± 0,03	tr	SM, LRI, Std
2-methyl –pentenal <sup>a</sup>	776	0,15 ± 0,02	-	-	-	0,51 ± 0,07	-	SM, LRI
Hexanal	802	-	-	Tr	Tr	0,17 ± 0,02	-	SM, LRI, Std
Propanal diethyl acetal <sup>t</sup>	813	-	-	Tr	-	-	0,16 ± 0,03	SM
2-ethyl pyridine	836	0,10 ± 0,01	-	-	-	-	-	SM, LRI
(E)-hexenol	848	-	-	Tr	-	-	-	SM, LRI, Std
1,3-propanedithiol <sup>t</sup>	851	-	-	Tr	-	-	0,17 ± 0,01	SM
Diallyl sulfide	854	6,59 ± 0,55	Tr	Tr	1,47 ± 0,10	Tr	tr	SM, LRI, Std
n-hexanol	866	-	-	0,25 ± 0,02	-	-	-	SM, LRI, Std
Allyl propyl sulfide	867	0,09 ± 0,01	-	0,15 ± 0,01	-	0,16 ± 0,03	-	SM, LRI
Bis-(1-propenyl)-sulfide <sup>a</sup>	884	0,08 ± 0,01	-	-	0,21 ± 0,01	-	-	SM, LRI
Dimethyl thiophene <sup>a</sup>	871	-	-	-	-	-	0,15 ± 0,01	SM, LRI
Nonane	900	-	-	-	-	-	tr	SM, LRI, Std
Dimethyl thiophene <sup>a</sup>	902	0,08 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,34 ± 0,03	-	0,21 ± 0,01	0,26 ± 0,01	SM, LRI

Composés	Huiles Essentielles (% ± ET)							Méthodes d'identification
	LRI <sub>HP5</sub>	Ail	Oignon	Poireau	Ciboule	Echalote	Ciboulette	
Methyl Allyl disulfide	915	3,69 ± 0,02	-	-	14,37 ± 0,36	-	-	SM, LRI, Std
Methyl propyl disulfide	926	0,25 ± 0,01	2,11 ± 0,16	4,48 ± 0,33	1,21	3,26 ± 0,27	2,55 ± 0,13	SM, LRI
Methyl 1-propenyl disulfide <sup>a</sup>	934	0,46 ± 0,02	0,51 ± 0,04	0,27 ± 0,03	6,07 ± 0,13	1,33 ± 0,13	0,62 ± 0,03	SM, LRI
Dimethyl trisulfide	962	0,33 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,12 ± 0,01	14,34 ± 0,05	1,22 ± 0,06	0,65 ± 0,02	SM, LRI, Std
2-pentyl furan	990	-	-	-	-	-	0,14 ± 0,01	SM, LRI
Diallyl disulfide	1084	37,90 ± 0,07	-	-	5,14 ± 0,21	0,13	-	SM, LRI, Std
Allyl propyl disulfide	1088	-	0,42 ± 0,08	0,73 ± 0,04	-	0,55 ± 0,06	0,44 ± 0,02	SM, LRI
Linalool	1101	-	-	-	1,75 ± 0,14	-	-	SM, LRI, Std
Dipropyl disulfide	1105	0,25 ± 0,06	30,92 ± 0,03	47,70 ± 0,03	1,24 ± 0,05	15,17 ± 0,18	19,49 ± 0,08	SM, LRI
Ethyl-3-(methylthio)propionate	1113	0,09 ± 0,01	-	-	-	-	-	SM, LRI
1-propenyl propyl disulfide <sup>a</sup>	1116	-	7,26 ± 0,06	3,75 ± 0,02	-	4,57 ± 0,05	5,84 ± 0,05	SM, LRI
2,4,5-trithiahexane <sup>†</sup>	1118	-	-	-	0,15 ± 0,01	-	-	SM
3,5-dimethyl-1,2,4-trithiolane	1126	-	0,12 ± 0,01	0,21 ± 0,01	-	-	-	SM, LRI
Methyl Allyl trisulfide	1131	7,26 ± 0,05	-	-	7,24 ± 0,38	-	0,2	SM, LRI
Menthone	1145	-	-	-	1,91 ± 0,12	-	-	SM, LRI, Std
Methyl propyl trisulfide	1148	-	5,20 ± 0,02	3,19 ± 0,02	-	9,20 ± 0,10	8,47 ± 0,10	SM, LRI
Methyl 1-propenyl trisulfide	1153	-	0,34 ± 0,01	0,13 ± 0,01	-	0,50 ± 0,08	0,36 ± 0,01	SM, LRI
Methyl-1-(methylthio)ethyl-disulfide <sup>†</sup>	1159	-	0,47 ± 0,05	0,15 ± 0,01	-	0,68 ± 0,05	0,51 ± 0,02	SM

Composés	Huiles Essentielles (% ± ET)							Méthodes d'identification
	LRI <sub>HP5</sub>	Ail	Oignon	Poireau	Ciboule	Echalote	Ciboulette	
<i>n</i> -nonanol	1172	-	-	0,47 ± 0,01	-	-	0,15 ± 0,01	SM, LRI, Std
3,4-dihydro-3-vinyl-1,2-dithiin <sup>†</sup>	1177	0,13 ± 0,02	-	-	-	-	-	SM
Borneol	1183	-	-	-	-	0,33 ± 0,01	0,85 ± 0,01	SM, LRI, Std
$\alpha$ -terpineol	1187	-	-	-	0,32 ± 0,01	-	-	SM, LRI, Std
Methyl salicylate	1189	-	-	-	0,46 ± 0,01	-	-	SM, LRI, Std
Methyl chavicol	1196	-	-	-	-	0,11 ± 0,01	-	SM, LRI, Std
Dimethyl tetrasulfide	1206	0,56 ± 0,01	0,15 ± 0,01	-	2,82 ± 0,19	0,46 ± 0,01	0,39 ± 0,01	SM, LRI, Std
3-ethyl-5-methyl-1,2,4-trithiolane <sup>a, †</sup>	1216	-	0,13 ± 0,01	-	-	0,11 ± 0,01	-	SM
3-ethyl-5-methyl-1,2,4-trithiolane <sup>a, †</sup>	1219	-	0,16 ± 0,01	0,54 ± 0,01	-	0,17 ± 0,01	-	SM
Butyl thiocyanate	1239	-	-	-	-	0,21 ± 0,01	-	SM, LRI
Methyl 1-(methylthiopropyl) disulfide	1249	-	0,36 ± 0,04	0,12 ± 0,01	0,59 ± 0,04	0,52 ± 0,06	0,20 ± 0,01	SM, LRI
2-undecanone	1292	-	0,53 ± 0,01	-	0,62 ± 0,04	0,82 ± 0,01	0,10 ± 0,01	SM, LRI
Tridecane	1301	-	0,49 ± 0,05	-	-	-	-	SM, LRI, Std
Diallyl trisulfide	1305	28,06 ± 0,63	-	-	-	-	-	SM, LRI
3-methoxy octane <sup>†</sup>	1311	1,10 ± 0,03	-	-	-	0,88 ± 0,01	1,24 ± 0,02	SM
Dipropyl trisulfide	1328	tr	17,10 ± 0,28	15,01 ± 0,27	Tr	11,14 ± 0,14	15,21 ± 0,18	SM, LRI
1-propenyl propyl trisulfide <sup>a</sup>	1332	-	-	0,43 ± 0,02	-	1,36 ± 0,02	-	SM, LRI
Allyl propyl trisulfide	1334	-	1,84 ± 0,01	1,58 ± 0,03	-	1,97 ± 0,01	1,92 ± 0,02	SM, LRI

Composés	Huiles Essentielles (% ± ET)							Méthodes d'identification
	LRI <sub>HP5</sub>	Ail	Oignon	Poireau	Ciboule	Echalote	Ciboulette	
Di-1-propenyl trisulfide	1347	0,23 ± 0,05	3,07 ± 0,01	-	-	0,26 ± 0,02	0,14 ± 0,01	SM, LRI
Eugenol	1356	0,21 ± 0,01	-	-	0,26 ± 0,01	-	-	SM, LRI
Benzyl thiocyanate	1359	-	-	0,20 ± 0,02	0,27 ± 0,02	-	-	SM, LRI, Std
α-copaene	1370	-	-	-	-	-	0,14 ± 0,01	SM, LRI, Std
Allyl methyl tetrasulfide	1371	1,07 ± 0,03	-	-	1,21 ± 0,09	-	-	SM, LRI
Benzyl methyl disulfide <sup>t</sup>	1373	-	-	-	0,37 ± 0,04	-	-	SM
Geranyl acetate	1386	-	-	0,83 ± 0,01	-	-	-	SM, LRI
Methyl eugenol	1405	-	-	-	-	0,14 ± 0,03	-	SM, LRI, Std
6,10-dimethyl 2-undecanone	1406	-	-	-	-	-	0,32 ± 0,01	SM, LRI
β-caryophyllene	1410	-	-	-	-	-	0,17 ± 0,01	SM, LRI, Std
3,6-dimethyl-2,4,5,7 tetrathiooctane <sup>t</sup>	1423	-	-	0,39 ± 0,04	-	-	0,11 ± 0,01	SM
2-hexyl-5-methyl 3(2 <i>H</i> )-furanone	1440	-	1,26 ± 0,01	0,13 ± 0,01	-	5,40 ± 0,15	0,15 ± 0,01	SM, LRI
β-selinene	1445	-	-	-	-	-	0,25 ± 0,03	SM, LRI
(E)-β-farnesene	1457	-	-	-	-	-	1,50 ± 0,06	SM, LRI
β-ionone	1481	-	-	-	0,13 ± 0,01	-	0,30 ± 0,04	SM, LRI, Std
Methyl-1-propylthioethyl tetrasulfide	1487	-	-	0,43 ± 0,01	-	-	-	SM, LRI
2-tridecanone	1496	-	0,32 ± 0,03	-	-	0,63 ± 0,01	-	SM, LRI
γ-cadinene	1506	0,10 ± 0,01	-	-	-	-	-	SM, LRI
α-farnesene	1509	-	-	-	-	-	2,56 ± 0,08	SM, LRI

Composés	Huiles Essentielles (% ± ET)							Méthodes d'identification
	LRI <sub>HP5</sub>	Ail	Oignon	Poireau	Ciboule	Echalote	Ciboulette	
β-sesquiphellandrene	1521	-	-	-	-	-	0,15 ± 0,01	SM, LRI
Diallyl tetrasulfide	1538	4,14 ± 0,11	-	-	0,22 ± 0,02	-	-	SM, LRI, Std
2-methyl -3,4-dithiaheptane	1558	-	6,48 ± 0,08	2,03 ± 0,04	-	4,42 ± 0,05	3,70 ± 0,05	SM, LRI
Dipropyl tetrasulfide	1573	-	0,55 ± 0,04	-	-	-	0,35 ± 0,01	SM, LRI
Tetradecanal	1607	-	-	0,15 ± 0,02	-	-	-	SM, LRI
Dimethyl pentasulfide	1686	-	-	-	0,23 ± 0,02	-	-	SM, LRI
Propyl-1-(propylthio)ethyl trisulfide <sup>t</sup>	1700	-	-	0,28 ± 0,01	-	0,44 ± 0,03	1,12 ± 0,02	SM
6,10, 14-trimethyl-2-pentadecanone	1845	-	-	0,52 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,23 ± 0,01	1,35 ± 0,01	SM, LRI
Benzyl salicylate	1857	-	-	-	-	0,27 ± 0,01	-	SM, LRI
2,4-diméthyl-5,6-dithia-2,7-nonadienal	1885	0,44 ± 0,02	-	-	-	-	-	SM, LRI
Methyl palmitate	1928	-	0,81 ± 0,04	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,01	1,39 ± 0,02	0,30 ± 0,01	SM, LRI, Std
Palmitic acid	1970	-	-	0,76 ± 0,01	1,58 ± 0,10	-	2,17 ± 0,06	SM, LRI, Std
Ethyl palmitate	1996	-	0,42 ± 0,02	0,48 ± 0,01	0,41 ± 0,03	0,43 ± 0,01	0,56 ± 0,01	SM, LRI, Std
Methyl linoleate	2093	-	0,55 ± 0,01	-	0,14 ± 0,01	-	0,25 ± 0,01	SM, LRI, Std
Methyl linolenate	2099	-	-	-	0,16 ± 0,01	-	-	SM, LRI, Std
Phytol	2113	-	-	0,16 ± 0,01	0,61 ± 0,03	-	-	SM, LRI
Ethyl linoleate	2161	-	-	0,26 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,42 ± 0,04	0,35 ± 0,01	SM, LRI, Std
Ethyl oleate	2167	-	0,18 ± 0,01	-	-	0,36 ± 0,01	-	SM, LRI, Std

Composés	Huiles Essentielles (% ± ET)						Méthodes d'identification	
	LRI <sub>HP5</sub>	Ail	Oignon	Poireau	Ciboule	Echalote		Ciboulette
Ethyl linolenate	2168	-	-	0,21 ± 0,01	-	-	0,35 ± 0,02	SM, LRI
Ethyl α-linolénate	2244	-	-	-	0,19 ± 0,02	-	-	SM, LRI

ET = Ecart-Type

Les valeurs de composés inférieures à 0,1% sont représentées comme traces (tr).

La présence d'un composé est indiqué par son pourcentage avec ET de GC-FID, l'absence est indiquée par "-".

a- L'isomère correct n'est pas identifié

t- Tentative

Selon les résultats mentionnés ci-dessus, le diallyl disulfide est principalement présent dans les huiles essentielles de l'ail et la ciboule. Le dipropyl disulfide et le dipropyl trisulfide sont les composés les plus représentatifs présents dans les huiles essentielles de l'oignon, du poireau, de l'échalote et de la ciboulette. Les structures des principaux composants bioactifs des différentes HE sont présentées dans la Figure II.3.

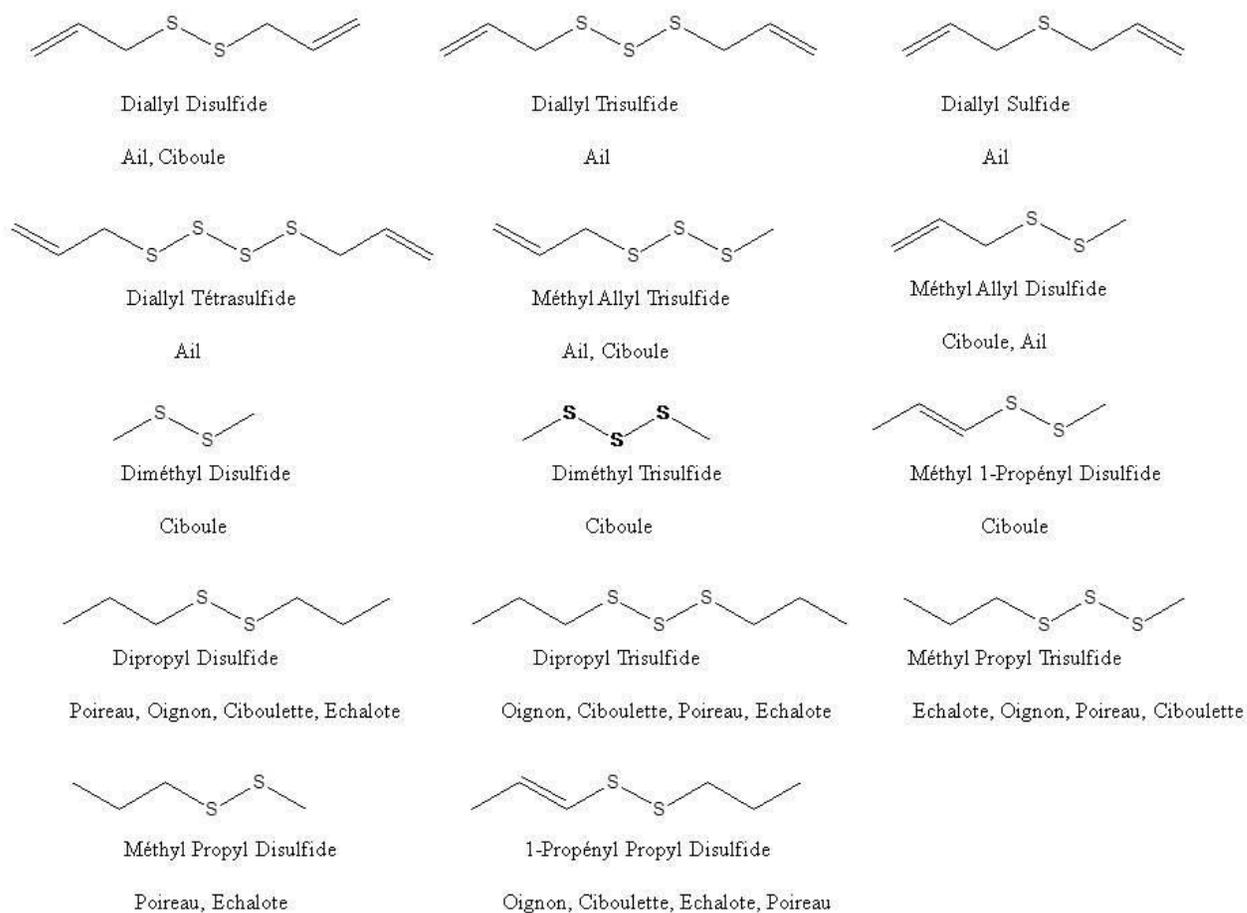


Figure II.3: Structure des principaux composés des huiles essentielles de l'ail, de l'oignon, du poireau, de la ciboule, de l'échalote et de la ciboulette.

### II.3.2 L'activité antimicrobienne *in vitro*

*Staphylococcus aureus* est un pathogène d'une grande importance dans l'industrie alimentaire. Certaines souches produisent une toxine résistante à des hautes températures, à l'acidité gastrique et aux protéases. En outre, cette bactérie peut croître dans des conditions de salinité élevée, de faibles activités de l'eau ( $A_w$  aussi bas que 0,83) et de pH relativement bas.

*Listeria monocytogenes* est capable de croître à 4 °C, elle peut être présente à des concentrations élevées en cas de stockage prolongé. Sa transmission peut être materno-fœtale et par des aliments contaminés.

La principale cause des maladies d'origine alimentaire est *Salmonella* Typhimurium, un pathogène grave pour l'homme, associé aux épidémies provoquées principalement par la viande et les œufs contaminés.

*Escherichia coli* est souvent un indicateur de la contamination fécale dans les produits alimentaires. Il constitue environ 80% de la flore intestinale humaine.

*Campylobacter jejuni* constitue le deuxième pathogène associé aux intoxications alimentaires après *Salmonella*, elle manifeste une mobilité importante dans le phénomène de la colonisation du tractus intestinal.

Un résumé des propriétés des bactéries et de leurs effets pathogènes sur la santé humaine est présenté dans le Tableau II.2.

Tableau II.2: Propriétés et symptômes des bactéries testées.

Type du micro-organisme	Forme	Taille des cellules (µm)	Structure de la paroi cellulaire	Habitat	Spécification	Symptômes
<i>Staphylococcus aureus</i>	Petit, irrégulier, coccoïde 	0,8-1	Gram positif	-Saprophytes (sol, eau, aliments) -Commensale (voies respiratoires supérieures, peau, muqueuses des mammifères)	-Anaérobies facultatives -Non encapsulée -Non sporulante -Immobile	-Intoxication alimentaire -Infection de la peau -Maladie respiratoire -Septicémie
<i>Listeria monocytogenes</i>	Tiges courtes 	0,4-0,5 x 0,5-2	Gram positif	-Ubiquitaire -Saprophytes (sol, plantes, eau) -Commensal (tractus intestinal de l'homme, le bétail, les oiseaux)	-Anaérobies facultatives -Non encapsulée -Non sporulante -Mobile à 20 ° C	-Septicémie -Méningo-encéphalite -Avortement -Arrêt prématuré de la grossesse
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Tiges droites 	0,7-1,5 x 2-5	Gram négatif	-Saprophytes (endroits secs, eau, aliments (viande)) -Commensal (tractus intestinal de la plupart des animaux, les excréments)	-Entérobactéries -Anaérobies facultatives -Mobile -Non-sporulante	-Intoxication alimentaire -Diarrhée aiguë -Crampes abdominales -Vomissements -Nausées -Mort (personnes immunodéprimées)
<i>Escherichia coli</i>	Tiges droites 	1-1,5 x 2-6	Gram négatif	-Commensal (tractus intestinal de l'homme et la plupart des animaux à sang chaud, matières fécales) -Saprophytes (eau, sol, végétaux)	-Entérobactéries -Anaérobies facultatives -Non sporulante -Immobile	-Diarrhée aiguë -Infections des voies urinaires -Bactériémie -Méningite -Gastro-entérite -Septicémie
<i>Campylobacter jejuni</i>	Courbé, de forme hélicoïdale 	0,2-0,5 x 0,5-8	Gram négatif	-Commensal (tractus intestinal des humains et des animaux, les excréments) -Saprophytes (eau, aliments)	-Microaérophile -Non-sporulante -Mobile	-Intoxication alimentaire -Campylobactériose (maladies diarrhéiques) -Fièvre -Maux de tête -Douleurs musculaires -Douleurs abdominales -Nausées

L'activité antimicrobienne *in vitro* des six huiles essentielles est évaluée par la méthode de disques en mesurant les zones d'inhibition. Les résultats sont présentés dans le Tableau II.3. Les huiles essentielles qui ont les effets inhibiteurs les plus forts manifestent des zones d'inhibition de plus de 20 mm de diamètre.

Tableau II.3: Activités antibactériennes des huiles essentielles de l'ail, l'oignon, le poireau, la ciboule, l'échalote, la ciboulette et le contrôle positif après 48 h<sup>1</sup>.

Pathogènes	Diamètre d'inhibition (mm) <sup>2</sup> incluant le diamètre du disque (6,0 mm)		
	Ail	Oignon	Poireau
<i>Staphylococcus aureus</i>	20,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	15,5 ± 2,1 <sup>a</sup>	10,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
<i>Salmonella</i> Typhimurium	9,0 ± 1,0 <sup>c</sup>	12,0 ± 1,8 <sup>ab</sup>	NA
<i>Listeria monocytogenes</i>	23,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	15,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	NA
<i>Escherichia coli</i>	9,3 ± 0,9 <sup>c</sup>	NA	NA
<i>Campylobacter jejuni</i>	12,6 ± 2,1 <sup>b</sup>	9,0 ± 1,2 <sup>b</sup>	9,3 ± 1,9 <sup>a</sup>

Pathogènes	Diamètre d'inhibition (mm) <sup>2</sup> incluant le diamètre du disque (6,0 mm)			
	Ciboule	Echalote	Ciboulette	Contrôle Positif
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	20,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	11,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	30,6 ± 0,6 <sup>a</sup>
<i>Salmonella</i> Typhimurium	9,3 ± 1,2 <sup>b</sup>	11,3 ± 2,3 <sup>b</sup>	NA	25,6 ± 1,3 <sup>b</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	NA	NA	NA	28,0 ± 0,5 <sup>ab</sup>
<i>Escherichia coli</i>	9,0 ± 1,4 <sup>b</sup>	NA	NA	25,5 ± 1,1 <sup>b</sup>
<i>Campylobacter jejuni</i>	21,0 ± 1,7 <sup>a</sup>	11,6 ± 1,5 <sup>b</sup>	10,3 ± 2,1 <sup>a</sup>	25,3 ± 1,2 <sup>b</sup>

1 Résultats sont analysés selon Ponce et al., (2003)

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

Pour la même huile essentielle, les valeurs suivies par des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) selon le test de Tukey's Multiple Range

NA, non actif

Le contrôle positif amoxicilline/acide clavulanique est extrêmement efficace sur toutes les bactéries testées, avec des diamètres d'inhibition allant de 25,3 à 30,6 mm. *Staphylococcus aureus* est très sensible au contrôle positif (30,6 mm) ( $p < 0,05$ ), suivie par *Listeria monocytogenes* (28,0 mm). Les trois bactéries à Gram négatif sont également très sensibles sans aucune différence statistique entre elles (25,6 mm pour *Salmonella* Typhimurium, 25,5 mm pour *Escherichia coli* et 25,3 mm pour *Campylobacter jejuni*).

Parmi les huiles essentielles, l'HE de l'ail est la plus efficace, inhibant les cinq bactéries testées avec différentes sensibilités.

L'HE d'ail est très efficace ( $p < 0,05$ ) sur *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*, avec des zones d'inhibition de 20,0 et 23,0 mm respectivement. L'HE d'ail présente une activité d'inhibition plus faible sur *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* et *Salmonella* Typhimurium avec des diamètres d'inhibition de 12,6; 9,3 et 9,0 mm respectivement.

Les deuxièmes HE représentant une bonne activité antimicrobienne sont celles de la ciboule et de l'oignon. Elles ont toutes les deux inhibé quatre bactéries. *Campylobacter jejuni* et *Staphylococcus aureus* sont très sensibles ( $p < 0,05$ ) à l'HE de la ciboule avec des zones d'inhibition de 21,0 et 18,5 mm respectivement. *Salmonella* Typhimurium et *Escherichia coli* sont sensibles à l'HE de la ciboule (9,3 et 9,0 mm respectivement), tandis que *Listeria monocytogenes* est résistante à la même HE.

*Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* sont très sensibles ( $p < 0,05$ ) à l'huile essentielle d'oignon avec des diamètres de 15,5 et 15,0 mm respectivement. *Salmonella* Typhimurium et *Campylobacter jejuni* sont aussi sensibles avec des zones d'inhibition de 12,0 et 9,0 mm respectivement. Cependant, *Escherichia coli* est la seule bactérie résistante à cette huile essentielle.

L'HE de l'échalote a inhibé trois des cinq bactéries testées, elle est efficace ( $p < 0,05$ ) sur *Staphylococcus aureus* (20,0 mm) et active sur *Campylobacter jejuni* (11,6 mm) et sur *Salmonella* Typhimurium (11,3 mm).

Les huiles essentielles du poireau et de la ciboulette ont des effets inhibiteurs sur deux bactéries, avec des zones d'inhibition de *Staphylococcus aureus* de 10,0 et 11,5 mm respectivement et pour *Campylobacter jejuni* de 9,3 et 10,3 mm respectivement.

Les résultats sont en accord avec d'autres déjà publiés montrant que les huiles essentielles de l'ail, de l'oignon, du poireau, de la ciboule, de l'échalote et de la ciboulette ont une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Babu, Sundari, Indumathi, Srujan, & Sravanthi, 2011; Benkeblia, 2004; Casella et al., 2012; Kim et al., 2004; Rattanachaiakunsopon & Phumkhachorn, 2008, 2009; Razavi Rohani, Moradi, Mehdizadeh, Saei-Dehkordi, & Griffiths, 2011; Zohri, Abdel-Gawad, & Saber, 1995).

Plusieurs études montrent que le diallyl sulfide exerce une bonne activité antimicrobienne (Corzomartinez et al., 2007; Kim, Kim, & Kyung, 2004; O'Gara, Hill, & Maslin, 2000; Yin &

Cheng, 2003). Dans les composants soufrés, le plus grand nombre d'atomes de soufre est associé à une meilleure activité antimicrobienne (Kim et al., 2004; Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2008; Tsao & Yin, 2001). Les bonnes activités antimicrobiennes des HE de l'ail et de la ciboule peuvent alors être expliquées par la présence de diallyl disulfide dans leurs compositions (37,90% et 5,14% respectivement). En outre, l'HE de l'ail contient aussi le diallyl trisulfide (28,06%) et le diallyl tétrasulfide (4,14%). Ces composés qui sont riches en atome de soufre peuvent contribuer aussi à cette activité. La forte activité antimicrobienne de la ciboule peut également être attribuée à d'autres composés soufrés tels que le diméthyl disulfide (19,58%), le méthyl allyl disulfide (14,37%), le diméthyl trisulfide (14,34%), et le méthyl allyl trisulfide (7,24%).

Les études sur l'activité antimicrobienne de dipropyl disulfide et de dipropyl trisulfide, qui sont les principaux composants des huiles essentielles de l'oignon, du poireau, de l'échalote et de la ciboulette dans notre étude, sont rares. Cependant, le dipropyl trisulfide a montré une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* (Kim et al., 2004). L'activité antibactérienne de ces HE peut être liée à ces dérivés de propyle.

Plusieurs études indiquent que les HE agissent mieux sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001). Ceci est dû à la différence de la composition de la paroi cellulaire (Ratledge & Wilkinson, 1988). Cependant, beaucoup de controverses existent dans les divers travaux publiés sur la sensibilité par rapport au Gram. La bactérie à Gram négatif *Campylobacter jejuni* est décrite comme particulièrement sensible à l'action des HE (Wannissorn, Jarikasem, Siriwangchai, & Thubthimthed, 2005). Ceci est en accord avec nos résultats puisque *Campylobacter jejuni* montre une sensibilité aux six huiles essentielles. La bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus* est également sensible à toutes les HE.

En raison de la complexité de la composition chimique des huiles essentielles, leurs mécanismes d'action ne sont pas encore élucidés. Cependant, des hypothèses sur leurs activités pourraient être proposées ciblant différentes structures bactériennes. Leur caractère hydrophobe permet d'attaquer la membrane phospholipidique de la cellule bactérienne et d'augmenter sa perméabilité. Par conséquent, les contenus des cellules sont libérés conduisant à la mort des bactéries (Burt, 2004).

Plus précisément, la relation entre la structure chimique et les activités antibactériennes des composés soufrés n'est pas entièrement comprise. Cependant, Kyung, (2012) a signalé que le soufre peut endommager les cellules microbiennes en interagissant avec des groupes SH des protéines cellulaires pour générer des disulfures mixtes.

### **II.3.3 Composés phénoliques totaux**

Les valeurs des composés phénoliques totaux des huiles essentielles de l'ail, de l'oignon, du poireau, de la ciboule, de l'échalote et de la ciboulette sont présentées dans le Tableau II.4. Le contrôle positif BHT représente la teneur la plus élevée ( $p < 0,05$ ) (46,77 mg équivalent acide gallique/g). Parmi les six huiles essentielles, l'échalote et le poireau montrent la teneur en phénols la plus élevée ( $p < 0,05$ ) (11,14 et 10,79 mg EAG/g respectivement). Les HE de la ciboulette et de l'ail ont une teneur inférieure en phénols (6,76 et 5,61 mg EAG/g respectivement), tandis que les HE de la ciboule et de l'oignon possèdent la plus faible teneur en phénols totaux (4,24 et 3,29 mg EAG/g respectivement), sans aucune différence statistique entre elles. Les données sur la teneur en phénols de ces huiles essentielles ne sont pas disponibles. Cependant, Lu et al., (2011); Yang, Meyers, van der Heide, and Liu (2004) ont montré que les extraits d'échalote possèdent la plus haute teneur en phénols (17,18 mg EAG/g de poids frais et 114,70 mg EAG/100 g échantillon respectivement) parmi les différentes variétés d'oignon. Les extraits de poireau sont également riches en phénols (Bernaert et al., 2012; Stajner et al., 2003). La teneur des composés phénoliques est un bon indicateur de l'activité antioxydante, leur fort potentiel redox leur permet d'agir en tant que donneurs d'hydrogène ou piègeurs de radicaux (Miguel, 2010; Viuda-Martos et al., 2011). Les CPT jouent également un rôle important dans le potentiel antimicrobien des huiles essentielles (Cosentino et al., 1999; Dorman & Deans, 2000; Holley & Patel, 2005).

Tableau II.4: Les composés phénoliques totaux des huiles essentielles de l'ail, de l'oignon, du poireau, de la ciboule, de l'échalote, de la ciboulette et du contrôle positif BHT.

	Phénols Totaux (mg EAG/g)
Ail	5,61 ± 0,69 <sup>c</sup>
Oignon	3,29 ± 0,12 <sup>d</sup>
Poireau	10,79 ± 0,53 <sup>b</sup>
Ciboule	4,24 ± 0,11 <sup>d</sup>
Echalote	11,14 ± 0,43 <sup>b</sup>
Ciboulette	6,76 ± 0,37 <sup>c</sup>
BHT	46,77 ± 0,81 <sup>a</sup>

Les valeurs suivies par les mêmes lettres dans la même colonne ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ) selon de test de Tukey's Multiple Range

### II.3.4 DPPH

La capacité des huiles essentielles et du BHT à donner un atome d'hydrogène est testée en utilisant le radical libre stable DPPH. Le Tableau II.5 montre le pourcentage d'inhibition du radical DPPH pour les différentes concentrations de chaque HE et de BHT. L'activité de piégeage est dépendante des concentrations pour toutes les HE étudiées. Toutes les huiles essentielles sont capables de réduire le radical stable 2,20-diphényl-1-picrylhydrazyl libre (DPPH) en diphenylpicrylhydrazine de couleur jaune avec des degrés variables. Plus la décoloration est forte (passage du violet au jaune), plus l'activité antioxydante est élevée, reflétant une EC<sub>50</sub> plus basse (Tableau II.5). Les valeurs de l'EC<sub>50</sub> sont dans l'ordre suivant: BHT < échalote < poireau < ciboulette < ail < ciboule < oignon. Le contrôle positif BHT est le plus fort antioxydant avec une valeur EC<sub>50</sub> de 0,03 mg/mL. Parmi les huiles essentielles, les HE de l'échalote et du poireau montrent l'activité antioxydante la plus forte avec des valeurs EC<sub>50</sub> de 2,70 et 4,49 mg/mL respectivement. Cette activité est suivie par les HE de la ciboulette (5,59 mg/mL) et de l'ail (7,67 mg/mL). Les HE de la ciboule et de l'oignon ont montré l'activité antioxydante la plus basse avec des valeurs EC<sub>50</sub> de 12,16 et 20,19 mg/mL respectivement.

L'activité antioxydante de ces plantes est attribuée en partie à leurs composés soufrés, qui représentent les principaux constituants de ces huiles essentielles (Corzomartinez et al., 2007; Lampe, 1999; Yin & Cheng, 2003). Amagase, Petesch, Matsuura, Kasuga, and Itakura (2001) ont rapporté que les diallyl polysulfides confèrent leurs propriétés antioxydantes aux huiles

essentielles.

Les différentes activités antioxydantes entre ces huiles essentielles peuvent être dues à la variabilité de la composition et de la concentration des composés soufrés. Elles peuvent également être attribuées à la présence et la synergie des différents composés mineurs. Il est intéressant de noter qu'une bonne corrélation entre le test de DPPH et de Folin-Ciocalteu est trouvée; elle est dans le même ordre pour toutes les huiles essentielles. Les deux tests confirment que l'huile essentielle de l'échalote exerce l'activité antioxydante la plus forte et celle de l'oignon la plus basse. Ce résultat indique que les composés phénoliques des espèces d'*Allium* contribuent à leurs propriétés antioxydantes.

Tableau II.5: Activité antioxydante des huiles essentielles de l'ail, de l'oignon, du poireau, de la ciboule, de l'échalote, de la ciboulette et du BHT à des différentes concentrations mesurées par la méthode DPPH.

	Inhibition de DPPH (%)						EC <sub>50</sub> <sup>*</sup>
	2 mg/mL	4 mg/mL	8 mg/mL	12 mg/mL	16 mg/mL	20 mg/mL	
Ail	31,35 ± 1,91	37,93 ± 1,59	51,07 ± 0,67	64,22 ± 0,78	77,37 ± 0,79	90,52 ± 0,59	7,67
Oignon	22,30 ± 0,97	25,34 ± 0,19	31,43 ± 1,60	37,52 ± 0,32	43,61 ± 0,42	49,70 ± 1,49	20,19
Ciboule	17,93 ± 0,89	24,24 ± 1,39	36,85 ± 1,38	49,46 ± 0,30	62,08 ± 0,68	74,69 ± 0,31	12,16
Ciboulette	39,05 ± 0,33	45,15 ± 0,11	57,34 ± 1,14	69,54 ± 1,45	81,73 ± 0,11	93,93 ± 1,70	5,59
	1 mg/mL	2 mg/mL	3 mg/mL	4 mg/mL	5 mg/mL		
Poireau	9,90 ± 1,32	21,37 ± 1,70	32,84 ± 1,46	44,31 ± 0,64	55,78 ± 1,49		4,49
Echalote	29,95 ± 1,18	42,59 ± 1,11	51,99 ± 1,44	61,38 ± 1,58	70,77 ± 1,64		2,70
	0,01 mg/mL	0,02 mg/mL	0,04 mg/mL	0,06 mg/mL	0,08 mg/mL		
BHT	16,01 ± 1,71	35,3 ± 1,27	68,93 ± 2,01	85,50 ± 0,13	91,21 ± 0,41		0,03

\* EC<sub>50</sub> : concentration (mg/mL) pour une inhibition de 50%

### II.3.5 Test de friture

L'utilisation des huiles essentielles dans le processus de friture pour prolonger la durée de vie de l'huile de tournesol est testée par le suivi des valeurs des matériaux polaires totaux pendant les séances de chauffage à 180 °C.

La Figure II.4 montre les variations des valeurs des matériaux polaires totaux de l'huile de tournesol avec l'HE de l'ail et sans HE (utilisé comme témoin). Aucune différence n'est détectée entre les heures de friture de l'huile de tournesol seule ou mélangée avec chaque HE puisque leurs valeurs de matériaux polaires totaux sont atteintes pour un temps total de chauffage variant de 12 à 15 heures. L'ajout de n'importe quelle huile essentielle n'augmente pas la durée de vie de l'huile de tournesol. Wangcharoen and Morasuk, (2009) ont révélé que le traitement thermique provoque la dégradation des composés soufrés et phénoliques, ce qui est en accord avec nos résultats.

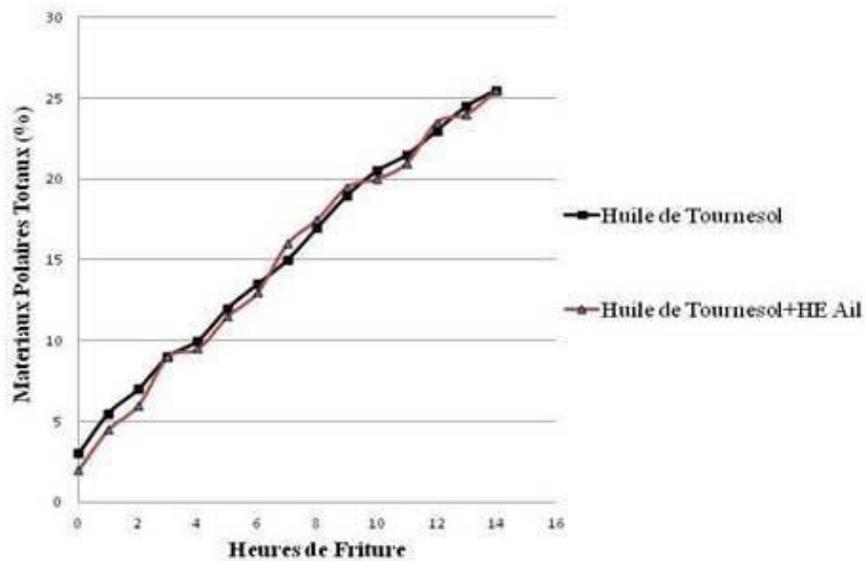


Figure II.4: Valeurs des matériaux polaires totaux au cours du processus de friture à 180 °C de l'huile de tournesol.

## II.4. Conclusion

De nombreuses études sur les propriétés biologiques des huiles essentielles sont en cours pour leurs utilisations comme alternatives aux antioxydants synthétiques tels que le BHT. Cette étude décrit non seulement la composition des huiles essentielles des six espèces d'*Allium* mais aussi leurs activités antioxydantes, antimicrobiennes ainsi que leurs utilisations dans l'industrie alimentaire contre les effets thermiques.

Toutes les huiles essentielles montrent des propriétés antioxydantes avec des degrés différents d'activité antiradicalaire. Les HE de l'échalote et du poireau exercent l'activité antioxydante la plus élevée. Toutes les huiles essentielles inhibent une bonne gamme de bactéries à Gram positif et à Gram négatif; les HE de l'ail, de l'oignon et de la ciboule montrent l'activité antibactérienne la plus forte. Ces activités seraient principalement attribuées à la présence des composés soufrés dans leurs fractions. Il existe une variabilité dans la composition, la structure et la concentration des différents composés soufrés présents dans les huiles essentielles, ce qui peut jouer un rôle important dans la détermination de leurs activités antimicrobiennes et antioxydantes.

Certains composants tels que le groupe d'allyle sulfide sont étudiés pour leurs propriétés biologiques, mais d'autres composants actifs ne sont pas entièrement élucidés. Des recherches reliant les composés soufrés à leurs propriétés particulières fonctionnelles seraient nécessaires.

Prenant en compte les tests antimicrobiens et antioxydants, nos résultats montrent que toutes les huiles essentielles peuvent être utilisées comme des alternatives naturelles aux conservateurs synthétiques alimentaires en évitant le processus de chauffage.

## Références bibliographiques

- Adams, R. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed., Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- Amagase, H., Petesch, B., Matsuura, H., Kasuga, S., & Itakura, Y. (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of Nutrition*, 131, 955S–962S.
- Amin, M., & Kapadnis, BP. (2005). Heat stable antimicrobial activity of *Allium ascalonicum* against bacteria and fungi. *Ind. J. Exp. Biol.*, 43, 751–754.
- Babu, A. J., Sundari, A. R., Indumathi, J., Srujan, R. V. N., & Sravanthi, M. (2011). Study on the Antimicrobial activity and Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils of Spices. *Veterinary World*, 4(7), 311–316.
- Banerjee, S., Mukherjee, K., & Maulik, S. (2003). Garlic as an Antioxidant: The Good, The Bad and The Ugly. *Phytotherapy Research*, 17, 97–106.
- Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT - Food Science and Technology*, 37(2), 263–268.
- Benkeblia, N, & Lanzotti, V. (2007). Allium thiosulfinates: chemistry, biological properties and their potential utilization in food preservation. *Food*, 1(2), 193–201.
- Bernaert, N., De Paepe, D., Bouten, C., De Clercq, H., Stewart, D., Van Bockstaele, E., Van Droogenbroeck, B. (2012). Antioxidant capacity, total phenolic and ascorbate content as a function of the genetic diversity of leek (*Allium ampeloprasum* var. porrum). *Food Chemistry*, 134(2), 669–677.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 25–30.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods— a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Casal, S., Malheiro, R., Sendas, A., Oliveira, B. P. P., & Pereira, J. A. (2010). Olive oil stability under deep-frying conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2972–2979.
- Casella, S., Leonardi, M., Melai, B., Fratini, F., & Pistelli, L. (2012). The Role of Diallyl Sulfides and Dipropyl Sulfides in the *In Vitro* Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Garlic, *Allium sativum* L., and Leek, *Allium porrum* L. *Phytotherapy Research*, 27(3), 380-3.
- Corzomartinez, M., Corzo, N., & Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, 18(12), 609–625.

- Cosentino, S., Tuberoso, C. I., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 130–135.
- Dorman, H., & Deans, S. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308–316.
- Fista, G., Bloukas, J., & Siomos, A. (2004). Effect of leek and onion on processing and quality characteristics of Greek traditional sausages. *Meat Science*, 68(2), 163–172.
- Holley, R., & Patel, D. (2005). Improvement of shelflife and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22, 273–292.
- Iranshahi, M. (2012). A review of volatile sulfur-containing compounds from terrestrial plants: biosynthesis, distribution and analytical methods. *Journal of Essential Oil Research*, 24, 393–434.
- Isitec Lab-Seppal. Indice de Folin/Polyphénols totaux; Montauban, France.
- Kim, J., Kim, Y., & Kyung, K. (2004). Inhibitory activity of essential oils of garlic and onion against bacteria and yeasts. *Journal of Food Protection*, 67(3), 499–504.
- Kim, J. W., Huh, J. E., Kyung, S. H., & Kyung, K. H. (2004). Antimicrobial activity of alk(en)yl sulfides found in essential oils of garlic and onion. *Food Science and Biotechnology*, 13(2), 235–239.
- Kyung, K. H. (2012). Antimicrobial properties of allium species. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 142–147.
- Lambert, R. J., Skandamis, P., Coote, P., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oils, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453–462.
- Lampe, J. (1999). Health effects of vegetables and fruit: Assessing mechanisms of action in human experimental studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 475S–490S.
- Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*, 1112(1), 3–22.
- Leelarungrayub, N., Rattanapanone, V., Chanarat, N., & Gebicki, J. M. (2006). Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *Nutrition*, 22(3), 266–274.
- Leuschner, R. G. K., & Ielsch, V. (2003). Antimicrobial effects of garlic, clove and red hot chilli on *Listeria monocytogenes* in broth model systems and soft cheese. *Int. J. of Food Sci. and Nut.*, 54, 127–133.

- Lu, X., Wang, J., Al-Qadiri, H. M., Ross, C. F., Powers, J. R., Tang, J., & Rasco, B. A. (2011). Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 129(2), 637–644.
- Miguel, M. (2010). Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour Fragrance Journal*, 25, 291–312.
- Mostafa, M., Mima, T., Ohnishi, S. T., & Mori, K. (2000). S-allylcysteine ameliorates doxorubicin toxicity in the heart and liver in mice. *Planta Medica*, 66, 148–151.
- O’Gara, E., Hill, D., & Maslin, D. (2000). Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2269–2273.
- Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C. E., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on native microbial population of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technology*, 36, 679–684.
- Ratledge, C., & Wilkinson, S. (1988). An overview of microbial lipids. In: Ratledge, C., Wilkinson, S.G. (Eds.), *Microbial Lipids*, vol. 1. Academic Press, London, pp. 3– 22.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2008). Diallyl sulfide content and antimicrobial activity against food-borne pathogenic bacteria of chives (*Allium schoenoprasum*). *Bionsci. Biotechnol, Biochem*, 72(11), 2987–2991.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2009). Shallot (*Allium ascalonicum* L.) oil: Diallyl sulfide content and antimicrobial activity against food-borne pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 3(11), 747–750.
- Razavi Rohani, S. M., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S. S., & Griffiths, M. W. (2011). The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2260–2265.
- Stajner, D., Milic-DeMarino, M., & Canadanovic-Brunet, J. (2003). Screening for antioxidant properties of leeks, *Allium sphaerocephalon* L. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal plants*, 10(3), 75–82.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H., & Sokmen, A. (2005). *In vitro* antioxidant activities of the methanol extracts of five species from Turkey. *Food Chemistry*, 92(1), 89–92.
- Tsao, S., & Yin, M. (2001). In-vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *Journal of Medical Microbiology*, 50 (7), 646–9.

- Viuda-Martos, M., Mohamady, M. A., Fernández-López, J., Abd ElRazik, K. A., Omer, E. A., Pérez-Alvarez, J. A., & Sendra, E. (2011). *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*, 22(11), 1715–1722.
- Wangcharoen, W., & Morasuk, W. (2009). Effect of heat treatment on the antioxidant capacity of Garlic. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 3, 60–70.
- Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T., & Thubthimthed, S. (2005). Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, 76, 233–236.
- Yabuki, Y., Mukaida, Y., Saito, Y., Oshima, K., Takahashi, T., Muroi, E., Uda, Y. (2010). Characterisation of volatile sulphur-containing compounds generated in crushed leaves of Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottler). *Food Chemistry*, 120(2), 343–348.
- Yang, J., Meyers, K. J., Van der Heide, J., & Liu, R. H. (2004). Varietal Differences in Phenolic Content and Antioxidant and Antiproliferative Activities of Onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22), 6787–6793.
- Yen, G., & Duh, P., (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *J. Agric. Food Chem*, 42, 629–632.
- Yin, M., & Cheng, W. (1998). Antioxidant activity of several *Allium* members. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4097–4101.
- Yin, M., & Cheng, W. (2003). Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat science*, 63(1), 23–28.
- Zohri, A.N., Abdel-Gawad, K., & Saber, S. (1995). Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion (*Allium cepa* L.) oil. *Microbiological research*, 150(2), 167–172.

### **Chapitre III. L'extraction simultanée des huiles essentielles et des flavonoïdes d'oignons par turbo extraction-distillation**

Ce chapitre fait l'objet d'une publication :

Dima Mnayer, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Emmanuel Petitcolas, Karine Ruiz, Tayssir Hamieh, Farid Chemat, " Simultaneous extraction of essential oils and flavonoids from onions using turbo extraction distillation". *Food analytical methods*. DOI: 10.1007/s12161-014-9884-9

## Résumé

L'extraction simultanée par turbo hydrodistillation (THD) de l'huile essentielle (HE) et des flavonols de l'oignon (*Allium cepa* L.) est étudiée. L'extraction de l'HE est optimisée. De même, l'efficacité de cette méthode pour l'extraction des composés phénoliques totaux (CPT), de la quercétine totale (QT), la quercétine aglycone (QA), la quercétine-3,4'-diglucoside (QDG), la quercétine-4'-monoglucoside (Q4G), la quercétine-3-monoglucoside (Q3G) et le kaempférol (KMF) est évaluée et comparée avec l'extraction conventionnelle par solvant de l'oignon frais. La turbo hydrodistillation offre une bonne extraction des sous-produits d'oignon: 68,90 g/t d'HE, 95,86% des phénols totaux et 55,94% de la quercétine totale. L'extraction conventionnelle de l'oignon frais a montré que la QDG (684,78 mg/100 g MS) et la Q4G (423,44 mg/100 g MS) sont les seuls flavonoïdes prédominants, alors que la QA, la Q3G et le KMF sont également présents dans les sous-produits d'oignon obtenus par THD. Pour un processus de turbo hydrodistillation de 180 min, la teneur la plus élevée en composés phénoliques est obtenue dans la phase aqueuse (47,58 mg EQ/g MS). La QDG (315,29 mg/100 g MS) et la Q4G (335,05 mg/100 g MS) sont principalement présentes dans la phase aqueuse tandis que la QA (271,79 mg/100 g MS) est surtout présente dans la phase solide. La Q3G et le KMF sont détectés en quantités mineures dans les extraits d'oignon.

Mots-clés : Extraction par turbo distillation, sous-produits d'oignon, huiles essentielles, flavonoïdes.

### III.1. Introduction

Le système biologique humain est vulnérable à l'attaque des espèces réactives oxygénées (ERO) qui sont produites en permanence à la suite de réactions enzymatiques endogènes et aussi par des sources exogènes (Stajner & Varga, 2003; Subhasree, Baskar, Laxmi Keerthana, Lijina Susan, & Rajasekaran, 2009). La formation et l'activité de ces ERO sont responsables de maladies dégénératives et de leurs complications associées telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires et le vieillissement accéléré des organismes (Singh et al., 2009). L'augmentation de la consommation des régimes riches en fruits et légumes est associée à une faible prévalence de maladies dégénératives puisqu'ils fournissent une quantité importante d'antioxydants phytochimiques. La littérature a prouvé que les antioxydants contribuent aux mécanismes de

défense au sein de l'organisme contre les ERO (Boivin et al., 2009). Ces antioxydants (phénols, huiles essentielles...) agissent comme piègeurs de radicaux libres et offrent une protection contre les lésions cellulaires en retardant le stress oxydatif. Parmi les polyphénols, le groupe des flavonoïdes domine généralement et se trouve relativement en concentration plus élevée sous forme de sucres conjugués, conformément à ce que Miesan and Mohamed, (2001) ont étudié dans 62 plantes comestibles, détectant une quantité abondante de quercétine glucoside dans les différents légumes.

L'oignon (*Allium cepa* L.), une plante polyvalente de la famille des Alliacees, est appréciée dans le monde entier non seulement pour le goût et la saveur distinctifs mais aussi pour ses composés nettement bénéfiques. Plusieurs études ont révélé la présence de divers flavonoïdes dans différentes variétés d'oignons avec d'autres composés bioactifs (Lachman et al., 2003). Le flavonol principale est basé sur la quercétine dont la quercétine diglucoside et la quercétine monoglucoside sont les composants principaux (Bonaccorsi, Caristi, Gargiulli, & Leuzzi, 2008; Rhodes & Price, 1996; Roldán-Marín, Sánchez-Moreno, Lloría, de Ancos, & Cano, 2009). La quasi-totalité d'entre eux est principalement localisée dans l'épiderme abaxial des écailles d'oignon (Hirota, Shimoda, & Takahama, 1999). La teneur en quercétine glucoside est beaucoup plus importante dans les bulbes d'oignon que d'autres légumes (Bystrická, Musilová, Vollmannová, Timoracká, & Kavalcová 2013; Hertog, Hollman, & Venema, 1992). Les études ont montré leur forte activité antioxydante (Stratil, Klejdus, & Kubáň, 2006) et anti-proliférative (Boivin et al., 2009). D'autres composés bioactifs tels que les huiles essentielles sont associées à des activités antioxydantes et antimicrobiennes (Romeilah, Sayed, & Mahmoud, 2010; Ye, Dai, & Hu, 2013). Tout en considérant l'utilité des antioxydants contre les maladies cardiovasculaires et le cancer colorectal, il est nécessaire d'examiner leurs procédés d'extraction de différentes plantes afin d'optimiser leurs effets bénéfiques sur la santé. L'efficacité du procédé d'extraction et la masse des composants libérés dépendent du degré de désintégration des cellules végétales obtenues précédemment par extraction classique solide-liquide, par des procédés tels que le chauffage, l'ébullition, le pressage, la macération et la fragmentation mécanique de la matière végétale (Aoyama & Yamamoto, 2007; Sun, Powers, & Tang, 2007; Takahama, Oniki, & Hirota, 2001; Yang, Meyers, van der Heide, & Liu, 2004). Le lessivage ou l'extraction par solvant organique est le procédé le plus utilisé pour l'obtention de composés phénoliques des végétaux de nombreuses décennies. La littérature récente montre également l'utilisation de l'extraction

classique par solvant supplémenté par des processus intensifs comme la distillation à la vapeur de pousses d'oignon (Takahashi & Shibamoto, 2008) et l'extraction par soxhlet de l'enveloppe externe d'oignon (Singh et al., 2009). Les extraits phénoliques sont également purifiés et extraits en utilisant des résines échangeuses d'ions de l'oignon et de la laitue (Goupy, Amiot-Carlin, Escudier, Mikolajczak, & Martin, 2004; Ly et al., 2005). L'utilisation de l'ultrason (Santas, Carbo, Gordon, & Almajano, 2008) et de l'hydrodiffusion générée par micro-ondes (microwave hydrodiffusion and gravity) (Zill-e-Huma, Abert Vian, Maingonnat, & Chemat, 2009) comme des techniques innovantes d'extraction est rapportée pour l'extraction des composés phénoliques d'oignon. D'autres techniques telles que l'extraction au fluide supercritique (Martino & Guyer, 2004), l'extraction par eau subcritique (Ko, Cheigh, Cho, & Chung, 2011; Turner et al., 2006), et l'extraction par liquide sous pression (SØltoft, Christensen, Nielsen, & Knuthsen, 2009) sont également rapportées pour l'extraction des composés phénoliques de l'oignon.

L'extraction des huiles essentielles de l'oignon est rarement étudiée. La technique de l'hydrodistillation (Romeilah et al., 2010) est rapportée pour l'extraction de ces HE.

En raison d'une demande de plus en plus forte concernant des solvants naturels respectueux de l'environnement (Armenta, Garrigues, & de la Guardia, 2008; Curylo, Wardencki, & Namieśnik, 2007), la turbo hydrodistillation (THD), une technologie verte, qui a été élaborée au départ pour l'extraction des huiles essentielles des baies de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Perino-Issartier, Abert-Vian, Petitcolas, & Chemat, 2010) est utilisée dans cette étude pour l'optimisation de l'extraction de l'HE de l'oignon et la valorisation des sous-produits d'oignon. En effet les déchets d'oignons qui sont normalement rejetés après distillation sont encore très riches en phénols et en flavonoïdes. L'eau bouillante utilisée comme solvant naturel pendant la turbo hydrodistillation pourrait être utile pour l'extraction des phénols restants dans les déchets d'oignon. Ce chapitre illustre pour la première fois l'efficacité du THD pour l'extraction de l'huile essentielle et des flavonoïdes de l'oignon jaune et met en évidence les caractéristiques nutritionnelles de l'oignon en termes d'huiles essentielles (HE), de composés phénoliques totaux (CPT) et des teneurs en flavonols (la quercétine totale (QT), la quercétine aglycone (QA), la quercétine-3,4'-diglucoside (QDG), la quercétine-4'-monoglucoside (Q4G), la quercétine-3-monoglucoside (Q3G) et le kaempférol (KMF)).

## **III.2. Matériels et méthodes**

### **III.2.1 Matières premières**

Les oignons jaunes (*Allium cepa*) sont achetés dans un supermarché local. Ils présentent un diamètre de 50-80 mm. Les bulbes qui sont apparemment exempts de dommages externes sont sélectionnés et épluchés manuellement pour leurs traitements ultérieurs.

### **III.2.2 Produits chimiques**

Tous les solvants utilisés à des fins chromatographiques sont achetés selon les normes de l'HPLC. Le méthanol, l'eau et l'acétonitrile sont obtenus de Fisher Scientific (Royaume-Uni), l'acide formique est acheté de Merck (Allemagne). La quercétine-3,4'-diglucoside et la quercétine-4'-monoglucoside (spiraeoside) sont obtenues d'Extrasynthèse (France). La quercétine est fournie par Sigma (Inde), la quercétine-3-monoglucoside est obtenue de Sigma (France). Le Kaempférol est acheté de Sigma (Allemagne). L'éther de pétrole est obtenu de Sigma (États-Unis) et le réactif de Folin-Ciocalteu est fourni par Isitec Lab-Seppal (France).

### **III.2.3 Turbo hydrodistillation: dispositif et procédure**

Cinq kilogrammes des bulbes d'oignons sont coupés manuellement, trempés dans l'eau distillée (8000 mL) et soumis à la turbo hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger sur une plaque chauffante. Cette technique est identique à l'hydrodistillation classique. La différence réside dans l'installation d'un agitateur électrique dans l'appareillage. Il est équipé de lames pour cisailer les bulbes d'oignons en petits morceaux au cours de la distillation en vue d'augmenter et d'accélérer le processus d'extraction.

Afin d'étudier la cinétique d'extraction de la phase aqueuse de l'oignon, différents échantillons sont prélevés toutes les 10 min pendant le processus de la turbo hydrodistillation (180 min). Les échantillons sont centrifugés à 3000 t/min pendant 15 min, les surnageants sont recueillis et évalués pour leur teneur en matière sèche (MS) et leur teneur en composés phénoliques totaux (CPT). Les résultats sont représentés en fonction du temps. Les expériences sont effectuées à trois répétitions.

La turbo hydrodistillation est menée à des durées différentes (90, 105, 120, 150 et 180 min). À la fin de chaque expérience, les phases aqueuses et solides sont prélevées. La phase aqueuse est

filtrée. Ensuite, ces prélèvements, en plus des échantillons d'oignons frais, sont lyophilisés et le rendement est exprimé en pourcentage (%). Chaque essai est réalisé en trois répétitions.

#### **III.2.4 Extraction des huiles essentielles**

Les huiles essentielles d'oignon sont obtenues par turbo hydrodistillation. Le processus d'extraction est poursuivi jusqu'à ce que plus aucune goutte d'huile essentielle ne sorte. Les HE sont recueillies par chauffage des échantillons d'oignon à différents temps d'extraction (90, 105, 120, 150, 180 et 210 min). L'HE oignon, ayant une densité (d) plus élevée que l'eau (d = 1,029), décanse vers le bas tandis que l'eau flotte au-dessus ce qui entraîne une perte d'une quantité d'HE qui reste sur les parois et ne décanse pas. L'extraction de l'HE est optimisée par l'ajout d'éther de pétrole dans le système. Ce solvant piège l'huile essentielle en haut du tube évitant sa décanse et par conséquent sa perte. Ensuite, les HE sont séparées et filtrées sur le sulfate de sodium pour éliminer toute trace d'eau. L'éther de pétrole est évaporé dans un évaporateur rotatif à 40 °C. Les HE sont recueillies, conservées à 4 °C loin de la lumière et le rendement aux différents temps d'extraction est calculé. Chaque essai est réalisé trois fois.

#### **III.2.5 Détermination de la teneur en matière sèche**

La détermination de la teneur en matière sèche de l'extrait aqueux pour les essais de cinétique est effectuée par un humidimètre (OHAUS MB35). Deux grammes des échantillons filtrés (0,45 µm) sont chauffés 30 min à 110 °C pour obtenir la stabilité de la masse. Le test est effectué en trois répétitions. Le pourcentage de matière sèche est calculé selon l'équation suivante:

$\% \text{ en matière sèche} = 100\% - \% \text{ de la teneur en eau de l'extrait.}$

#### **III.2.6 Extraction conventionnelle des polyphénols**

Deux grammes des échantillons lyophilisés (oignon frais, phases aqueuses et solides) sont homogénéisés dans 50 mL de méthanol à 80% dans un ultra homogénéisateur à 8000 t/min pendant 5 min. Ensuite, le mélange est filtré, le surnageant est recueilli et complété avec 50 mL de méthanol. Les solutions filtrées sont utilisées directement pour les analyses de CPT et HPLC.

### III.2.7 Composés phénoliques totaux

La teneur totale en phénols est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu suivant la procédure décrite par le fournisseur du kit (Isitec Lab-Seppal). Un volume de 100 µL des échantillons est introduit dans des tubes à essai, suivi par 2 mL de réactif de Folin-Ciocalteu et 1 mL de tampon alcalin. Les tubes sont mis à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorption à 760 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre, à barrette de diode Hewlett-Packard 8453 (Allemagne) et comparée à une courbe d'étalonnage de la quercétine. Les mesures des CPT sont effectuées à trois répétitions et les valeurs moyennes, exprimées en g équivalents quercétine (g EQ)/L d'échantillon pour les extraits aqueux et mg EQ/g MS d'extraits lyophilisés, sont rapportées.

### III.2.8 Analyses HPLC

Les analyses HPLC sont effectuées en utilisant un appareil HPLC Waters (Milford, MA) composé d'une pompe Waters 600E, un injecteur manuel rheodyn Waters 717, un détecteur à barrette de photodiode Waters 2996. Les pompes HPLC, l'injecteur manuel rheodyn, la température de la colonne et le système à barrette de diode sont contrôlés à l'aide du logiciel de Waters Empower 2 Chromatography. La longueur d'onde utilisée pour la quantification des flavonoïdes d'oignon avec le détecteur à diode est 360 nm. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne fermée RP-18 Purospher star (250 mm × 4 mm D.I. ; la taille des particules de 5 µm fourni par VWR), avec une colonne de garde RP-18 (4 mm x 4 mm D.I., la taille des particules de 5 µm fourni par VWR). La colonne fermée et la colonne de garde sont maintenues à 37 °C et le débit est fixé à 1 mL/min. La phase mobile est composée de deux solvants: (A) de l'eau acidifiée (acide formique 0,5%) et (B) 100% d'acétonitrile. Le gradient de solvant utilisé est le suivant: 0 min, (A) 95% et (B) 5%; 20 min, (A) 60% et (B) 40%; 30 min, (A) 0% et (B) 100%; 45 min, (A) 95% et (B) 5%. Le volume d'injection est de 20 µL et toutes les analyses sont effectuées au moins trois fois et les valeurs moyennes sont rapportées. L'identification des flavonoïdes est faite en comparant l'ordre d'élution et les spectres UV visible. La quantification est réalisée en utilisant les standards externes de concentrations connues. Les surfaces des pics sont utilisées pour quantifier les composés dans l'échantillon. Une analyse de régression linéaire est réalisée sur les données de la surface du pic par rapport à la concentration. Des courbes d'étalonnage linéaires des standards allant de 10 à 200 mg/L sont

obtenues avec une bonne linéarité et les valeurs de  $R^2$  sont précises de plus de 99,5% pour tous les standards. L'extraction est réalisée trois fois et les concentrations finales des différents flavonoïdes sont calculées en utilisant les valeurs moyennes, exprimées en mg/100 g MS.

### III.3. Résultats et discussion

#### III.3.1 Phénomène de chauffage de turbo hydrodistillation

La Figure III.1 montre le suivi de chauffage dans l'appareil de type Clevenger pendant 180 min de turbo hydrodistillation. Deux phases de variation de température peuvent être distinguées. La première phase correspond à la phase de chauffage de la matière végétale; l'augmentation de la température de la température initiale (25 °C) à la température d'ébullition de l'eau (100 °C) est obtenue après 60 min. Dans la deuxième phase (phase d'ébullition), les échantillons d'oignon exposés à l'eau bouillante libèrent leurs huiles essentielles par évaporation. À la température d'ébullition, les pressions de vapeurs combinés sont égales à la pression ambiante. Ainsi, les huiles essentielles, dont les points d'ébullition varient normalement de 200 à 300 °C, s'évaporent à une température proche de celle de l'eau. Cette phase commence avec l'apparition de la première goutte de distillat. La température maintient un plateau et reste dans cet état stable à 100 °C jusqu'à l'extraction complète.

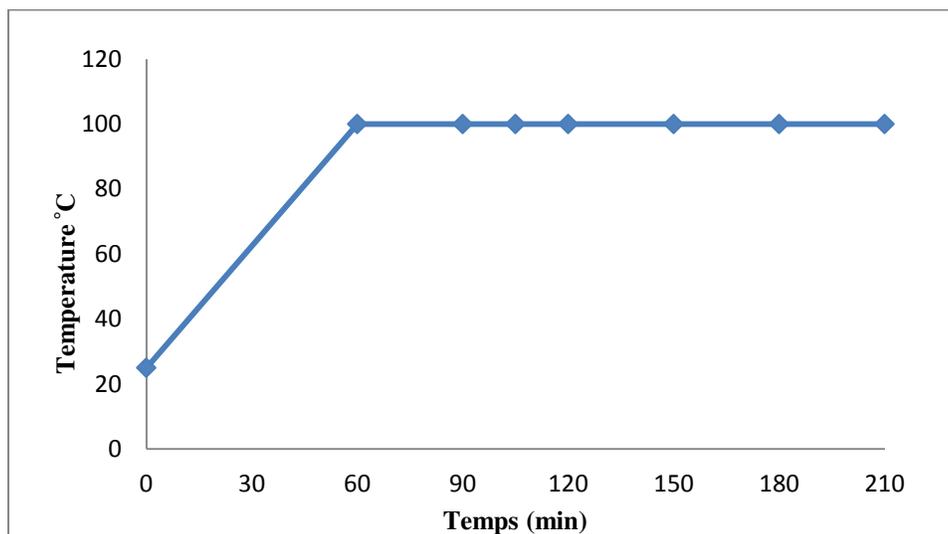


Figure III.1: Profil température-temps au cours de la turbo hydrodistillation d'oignons.

### III.3.2 Huiles essentielles: extraction, rendement et analyse

Les huiles essentielles obtenues aux différents temps d'extraction sont présentées dans la Figure III.2. Les rendements d'HE augmentent continuellement avec le temps d'extraction, atteignant un plateau après 180 min. Le rendement le plus élevé est de 68,90 grammes/tonne (g/t). L'extraction des HE d'oignons est optimisée par l'ajout d'éther de pétrole évitant sa décantation et par conséquent sa perte partielle dans le système.

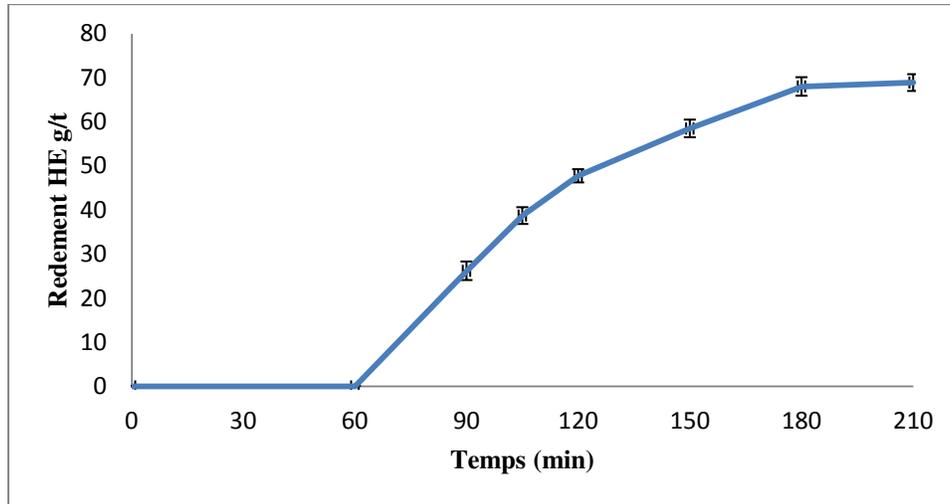


Figure III.2: Rendements en huiles essentielles obtenues à des différentes périodes d'extraction.

La composition chimique des HE d'oignon a été analysée par GC-MS et les composants les plus représentatifs sont présentés dans le Tableau III.1.

Tableau III.1: Principaux composés d'oignon HE analysés par GC-MS.

Composés Majeurs	HE d'oignon (% ± Ecart-Type)
Méthyl propyl disulfide	2,11 ± 0,16
Dipropyl disulfide	30,92 ± 0,03
1-propényl propyl disulfide	7,26 ± 0,06
Méthyl propyl trisulfide	5,20 ± 0,02
Dipropyl trisulfide	17,10 ± 0,28
Allyl propyl trisulfide	1,84 ± 0,01
Di-1-propényl trisulfide	3,07 ± 0,01
2-hexyl-5-méthyl 3(2 <i>H</i> )-furanone	1,26 ± 0,01
2-méthyl -3,4-dithiaheptane	6,48 ± 0,08

### III.3.3 Phase aqueuse: cinétique

#### III.3.3.1 Rendement d'extraction de la matière sèche

L'effet de la turbo hydrodistillation est étudié sur le rendement d'extraction de la phase aqueuse à différents intervalles de temps. Il est contrôlé toutes les 10 min pendant le processus de distillation des échantillons d'oignon. La matière sèche augmente avec la période de distillation pour atteindre un plateau à la fin de la durée d'extraction (180 min) avec une valeur de 3,45% (Figure III.3). La masse de la matière sèche des extraits, qui est mesurée après l'élimination de l'eau de la phase aqueuse par le procédé de lyophilisation, est également dans l'ordre ascendant avec les différentes périodes d'extraction. Les rendements de la matière sèche obtenus sont de 3,60% (90 min), 3,67% (105 min), 3,69% (120 min), 3,88% (150 min) et 3,89% (180 min) prouvant l'extraction efficace de certains composés solubles comme le sucre, les acides et les phénols dans l'eau.

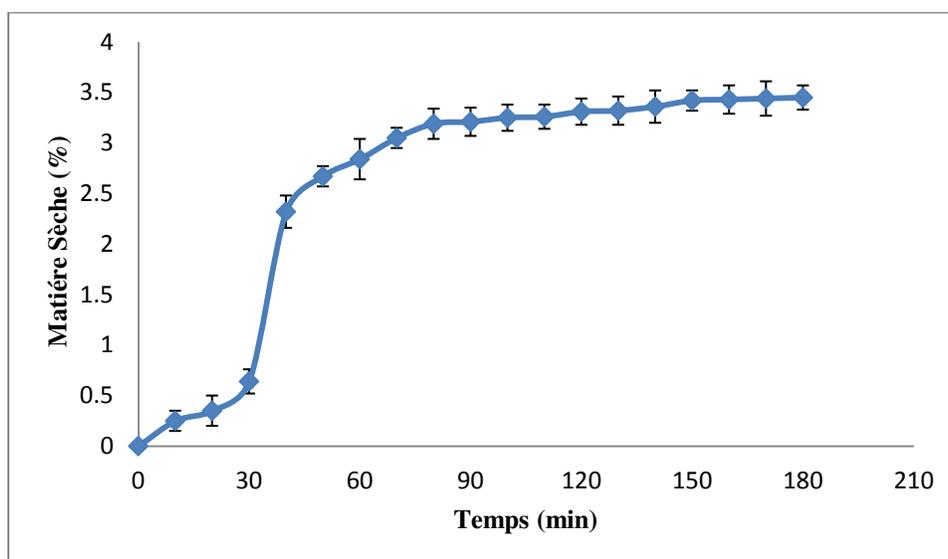


Figure III.3: Cinétique des rendements de la matière sèche de la phase aqueuse pendant la turbo hydrodistillation de 180 min.

#### III.3.3.2 Composés phénoliques totaux

Les valeurs des composés phénoliques totaux mesurées toutes les 10 min pendant le processus de turbo hydrodistillation (180 min) sont présentées dans la Figure III.4. La teneur en CPT augmente avec le temps d'extraction. Elle commence à atteindre un plateau au début de la phase d'ébullition (60 min) jusqu'à la fin de l'expérience. La valeur finale des CPT obtenue à 180 min est de 2,15 g EQ/L. Ce résultat est confirmé par les valeurs obtenues dans le Tableau III.2,

montrant de légères différences des valeurs de CPT des extraits aqueux lyophilisés à des différentes périodes d'extraction (allant de 48,34 à 47,58 mg EQ/g MS). Pas de dégradation remarquable de la teneur en TPC est détectée à la fin de la durée de l'extraction dans la phase aqueuse.

Cette tendance montre l'efficacité de l'eau bouillante pour extraire des composés phénoliques des tissus d'oignon dans l'eau, ce qui est en accord avec les études de Hamauzu et al., (2011); Ioku et al., (2001); Lombard, Peffley, Geoffriau, Thompson and Herring, (2005) qui indiquent que l'eau bouillante augmente l'extraction de ces composants.

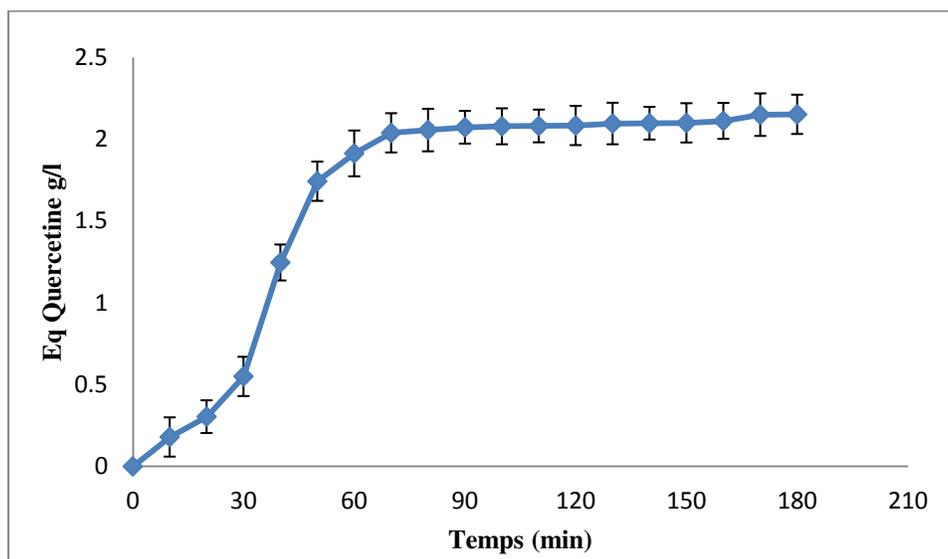


Figure III.4: Cinétique de valeurs de CPT de la phase aqueuse pendant le processus de la turbo hydrodistillation.

### III.3.4 Bilan de matière

Le bilan de matière est établi pour étudier la masse des phénols totaux (exprimée en g équivalents quercétine (EQ)) extraits des échantillons d'oignons et par conséquent les masses finales présentes dans les sous-produits d'oignon dans le système de THD (Figure III.5). La masse de l'HE obtenue de 5000 g d'oignon frais est de 0,34 g.

Les masses des sous-produits d'oignon sont mesurées à la fin du temps d'extraction (180 min). Elles ont atteint des valeurs finales de 8000 et 1325 g dans les phases aqueuses et solides respectivement à la suite de la décomposition et de la dilution des tissus d'oignon dans l'eau bouillante.

Le pourcentage en matière sèche est mesuré selon la moyenne en matière sèche des échantillons lyophilisés d'oignons frais (10%), des extraits aqueux (3,89%) et des extraits solides (8%) à la fin de la distillation.

Selon les valeurs de CPT des échantillons lyophilisés d'oignons à 180 min pendant la période de turbo hydrodistillation (Tableau III.2), la masse initiale de phénols totaux de l'oignon frais avant la THD est de 20,05 g EQ alors que les masses finales sont 14,80 et 4,42 g dans les phases aqueuses et solides respectivement.

Par conséquent, 73,82% des phénols totaux sont extraits dans la phase aqueuse tandis que 22,04% sont retenus dans la phase solide par rapport à la masse initiale de phénols totaux présents dans l'oignon frais avant le processus de distillation. Les résultats montrent que la turbo hydrodistillation est une méthode efficace pour l'extraction des composés phénoliques totaux dans les sous-produits d'oignon (95,86%) sans dégradation remarquable.

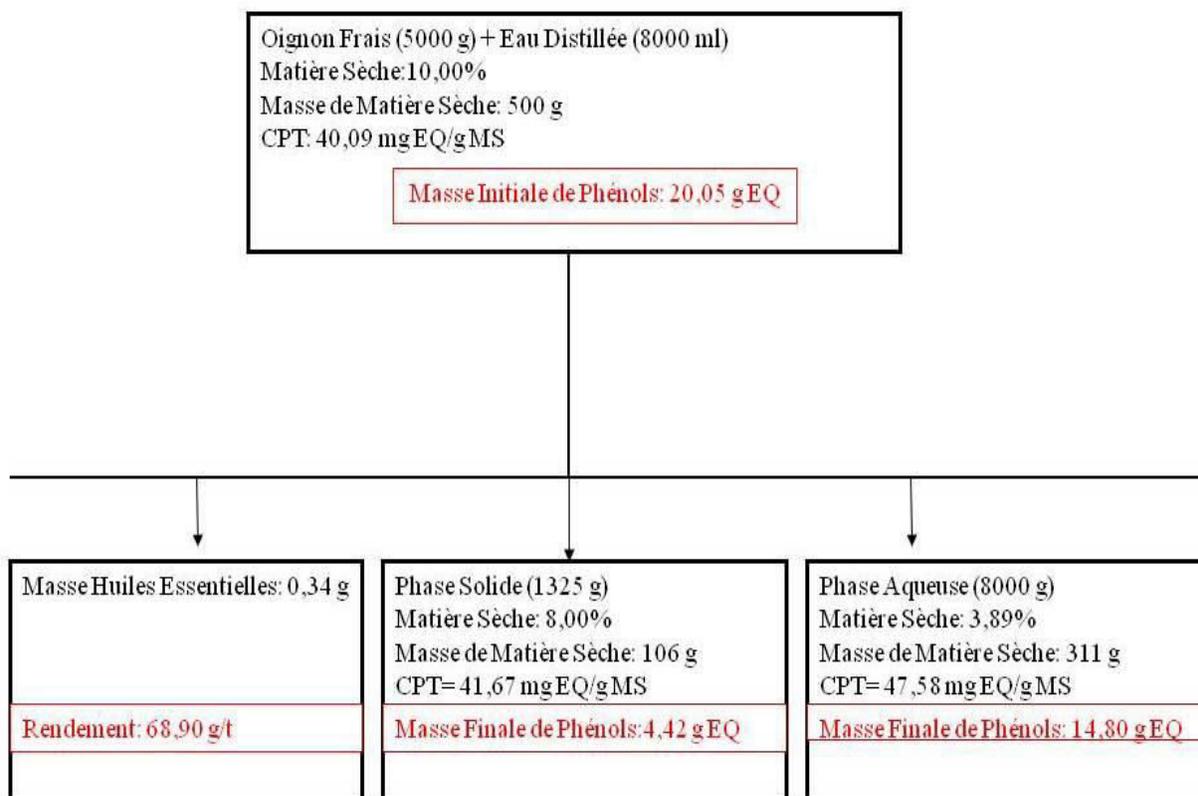


Figure III.5: Bilan de matière des phénols extraits des échantillons d'oignon pendant le processus de turbo hydrodistillation.

### **III.3.5 Teneurs en polyphénols des extraits d'oignons par turbo hydrodistillation**

#### **III.3.5.1 Composés phénoliques totaux**

La teneur en composés phénoliques totaux varie dans les extraits d'oignon obtenus à différents temps d'extraction (Tableau III.2).

L'oignon frais, obtenu par extraction classique au méthanol (80%), présente une valeur en CPT de 40,09 mg EQ/g MS. Dans les sous-produits d'oignon issus de la THD, la valeur de CPT la plus élevée dans la phase solide est de 41,67 mg EQ/g MS à 180 min. Cependant, les teneurs en CPT les plus élevées sont trouvées dans la phase aqueuse allant de 48,34 à 47,58 mg EQ/g MS. Ces résultats sont compatibles avec les cinétiques de CPT et le bilan de matière des phénols montrant que la turbo hydrodistillation permet une bonne extraction des composés phénoliques.

#### **III.3.5.2 Teneur en flavonoïdes des échantillons d'oignons**

La distribution des flavonoïdes quantifiés par HPLC dans l'oignon frais et les sous-produits d'oignon obtenus à différentes périodes de THD est présentée dans le Tableau III.2.

La quercétine totale (QT) présentée dans le Tableau III.2 représente la somme des concentrations de la quercétine aglycone (QA), et les différentes formes de la quercétine présentes en conjugaison avec des hydrates de carbone principalement les glucosides comme la quercétine-3-4'-diglucoside (QDG), quercétine-4'-monoglucoside (Q4G) et la quercétine-3-monoglucoside (Q3G). La quantification de ces composés est effectuée en comparant le temps de rétention et l'absorption des pics à 360 nm avec l'utilisation des standards authentiques.

##### **III.3.5.2.1 Oignon frais**

Dans l'oignon frais, la QDG et la Q4G sont les principaux flavonoïdes présents car elles constituent la teneur totale en flavonols. La QDG présente la plus forte concentration (684,78 mg/100 g MS), suivie par la Q4G (423,44 mg/100 g MS). Ces résultats sont compatibles avec les études précédentes montrant que la QDG et la Q4G sont les flavonoïdes les plus représentatifs de l'oignon jaune (Crozier, Del Rio, & Clifford, 2010; Kiassos, Mylonaki, Makris, & Kefalas, 2009; Lindahl, Liu, Khan, Karlsson, & Turner, 2013; Roldán-Marín et al, 2009).

La quercétine aglycone n'est pas détectée dans l'oignon frais. Seule la partie comestible des bulbes d'oignons frais est analysée alors que la QA est surtout présente dans l'enveloppe externe sèche (Beesk et al., 2010; Prakash, Singh, & Upadhyay, 2007) à cause de la transformation de la

quercétine glucoside en quercétine aglycone pendant la formation de l'enveloppe extérieure sèche (Patil, Pike, & Yoo, 1995). La Q3G n'est pas aussi présente dans l'oignon frais. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Zill-e-Huma et al., (2011); Zill-e-Huma, Abert Vian, Maingonnat and Chemat, (2009), montrant que ces deux flavonoïdes sont absents ou présents en très faibles concentrations dans l'oignon jaune frais.

Le kaempférol est présent en faibles quantités par rapport à la quercétine dans différentes variétés d'oignons (Aoyama & Yamamoto, 2007; Slimestad, Fossen, & Vågen, 2007). Nos résultats montrent que le kaempférol est absent dans l'oignon frais. Ceci est en accord avec Nuutila, Puupponen-Pimia, Aarni, and Oksman-Caldentey, (2003) qui ont également signalé que le kaempférol n'est pas détecté dans l'oignon jaune lyophilisé.

La teneur de la quercétine totale de l'oignon frais est 1108,22 mg/100 g MS. Cette concentration, déterminée par extraction solide-liquide classique, se situe dans la gamme des valeurs des flavonols de l'oignon jaune (270-1187 mg/100 g MS), rapportée par Slimestad et al., (2007). Cette variabilité de la concentration des flavonoïdes parmi les différentes variétés d'oignons dépend de différents facteurs tels que les conditions climatiques et le stade de maturité (Beesk et al., 2010; Zill-e-Huma et al., 2011). Les méthodes d'extraction jouent également un rôle important dans la détermination de la quantité de ces composants.

#### **III.3.5.2.2 Sous-produits d'oignon**

La QDG et la Q4G, les principaux flavonoïdes trouvés dans l'oignon frais, sont également prédominantes dans la phase aqueuse représentant 87,07% de la quercétine totale à 180 min de turbo hydrodistillation avec des valeurs de 315,29 et 335,05 mg/100 g MS respectivement. Ce résultat montre que le processus de distillation provoque le lessivage de ces deux flavonols dans l'eau. Dans la phase solide, la QDG et la Q4G sont également détectées en quantité inférieure (164,28 et 297,92 mg/100 g MS respectivement) que dans les extraits aqueux, représentant 62,20% de la quercétine totale à 180 min.

Cependant, la quercétine aglycone qui est absente dans l'oignon frais, est détectée dans les deux sous-produits d'oignon. La QA représente 11,66% de la quercétine totale dans la phase aqueuse à 180 min avec une concentration de 87,13 mg/100 g MS. Dans la phase solide, la quercétine aglycone est présente à une concentration plus élevée (271,79 mg/100 g MS à 180 min) par rapport à la phase aqueuse représentant 36,58 % de la quercétine totale.

La présence de la quercétine aglycone dans les deux sous-produits d'oignon est attribuée à la rupture des liaisons glycosidiques dans la QDG et la Q4G. Ce phénomène est également signalé par Lindahl et al., (2013) montrant que l'hydrolyse élimine la glycosylation provoquant la formation de la QA.

La distribution des flavonoïdes à différentes périodes de la turbo hydrodistillation montre que la QDG et la Q4G sont présentes à des concentrations plus élevées dans la phase aqueuse alors que la quercétine est principalement présente dans la phase solide. Ceci est dû à la solubilité de ces formes mono et di-glucosidiques de la quercétine dans l'eau par rapport à la quercétine aglycone qui est peu soluble dans l'eau (Hota, Kulkarni, & Perumal, 2012; Małgorzata, 2008).

La quercétine-3-monoglucoside est présente à une faible quantité dans les phases aqueuses et solides à 180 min (9,41 et 8,99 mg/100 g MS respectivement). Le kaempférol, qui n'est pas détectable dans l'oignon frais et l'extrait aqueux, est présent en faibles concentrations dans la phase solide à 180 min (11,06 mg/100 g MS), en raison de son caractère hydrophobe. La présence de ces composés mineurs dans les sous-produits d'oignon peut être attribuée au phénomène de déglycosylation et/ou la conversion des constituants pendant le processus de distillation.

Dans la phase aqueuse, l'ébullition de 90 à 180 min provoque la diminution de la concentration des flavonoïdes avec des valeurs allant de 828,21 à 746,88 mg/100 g MS. Les valeurs de CPT ont aussi tendance à diminuer mais avec une légère différence allant de 48,34 à 47,58 mg EQ/g MS). Cependant, dans la phase solide, les concentrations de la quercétine totale ont tendance à augmenter de 540,40 à 742,98 mg/100 g MS. Les valeurs de CPT ont également augmenté de 37,75 à 41,67 mg EQ/g MS. Cette tendance peut s'expliquer par l'hydrolyse des QDG et Q4G en quercétine aglycone qui est mieux retenue dans les tissus de l'oignon étant peu soluble dans l'eau. Une diminution de la quercétine totale dans la phase aqueuse peut également être attribuée à la longue durée de chauffage causant sa dégradation (Lombard et al., 2005).

### **III.3.5.3 Bilan de matière de la quercétine**

Le bilan de matière des QDG et Q4G montre que 33,94% et 64,00% respectivement de ces deux flavonols sont récupérés des sous-produits d'oignon. Ceci est principalement dû à l'hydrolyse de la QDG non seulement en quercétine, mais aussi en Q4G.

Le bilan de matière de la quercétine totale dans le système de turbo hydrodistillation est comme suivant: dans l'oignon frais, la masse initiale de la quercétine totale est 5,54 g alors que 2,32 g de la QT sont récupérés dans l'extrait aqueux et une quantité de 0,78 g de QT reste dans la phase solide.

Selon les résultats mentionnés ci-dessus, la phase aqueuse permet de récupérer 41,87% de la quercétine totale tandis que 14,07% de la QT sont retenus dans la phase solide (180 min). La perte totale de la QT dans les tissus d'oignon pendant l'ébullition constitue 85,93% de la quercétine totale à la fin de la turbo hydrodistillation. Les pertes de la quercétine dans les tissus d'oignon sont rapportées dans une gamme allant de 20,60 à 75,00% pour une période d'ébullition maximale de 60 min (Crozier, Lean, McDonald, & Black, 1997; Hirota, Shimoda, & Takahama, 1998; Ioku et al., 2001; Makris & Rossiter, 2001; Price, Bacon, & Rhodes, 1997). En général, plus la période d'ébullition est longue, plus la perte est importante. Dans le système de turbo hydrodistillation, la phase d'ébullition effective est de 120 minutes, elle est deux fois plus longue que celle rapportée par d'autres études. En conséquence, la perte de la quercétine totale dans les tissus d'oignon est attribuée en partie à son lessivage dans l'eau (41,87%) et à sa dégradation thermique (44,06%).

La quercétine totale récupérée à la fin de la durée d'extraction (dans les phases aqueuses et solides) constitue 55,94% de la quercétine totale présente dans l'oignon frais. Ceci signifie que les flavonoïdes d'oignon sont relativement stables à la chaleur tenant compte de la longue période d'ébullition dans le processus d'extraction.

Les résultats montrent que la turbo hydrodistillation offre un bon rendement d'extraction des sous-produits d'oignon (95,86% des phénols totaux et 55,94 % des flavonoïdes). La variabilité du rendement d'extraction de ces deux composants est attribuée à la différente sensibilité à la dégradation et à l'hydrolyse (Nuutila, Kammiovirta, & Oksman-Caldentey, 2002).

De plus, la THD permet une extraction plus élevée que d'autres techniques avancées; Zill-e-Huma et al., (2009) ont rapporté une extraction de 41,90% des flavonols utilisant l'hydrodiffusion assistée aux micro-ondes.

Tableau III.2: Les flavonoïdes et les composés phénoliques totaux (CPT) des échantillons d'oignons obtenus dans des différentes périodes de turbo hydrodistillation.

Echantillons d'oignons	QDG <sup>a</sup>	Q4G <sup>a</sup>	QA <sup>a</sup>	Q3G <sup>a</sup>	Quercétine Totale	KMF <sup>a</sup>	CPT
	(mg/100 g MS)	(mg/100 g MS)	(mg/100 g MS)	(mg/100 g MS)	(mg/100 g MS)	(mg/100 g MS)	(mg EQ/g MS)
	17,03 min	20,82 min	24,14 min	19,30 min		27,86 min	
Oignon							
Frais	684,78± 15,12	423,44± 14,25	A	A	1108,22 ± 29,37	A	40,09 ± 0,76
Phase							
Aqueuse							
90 min	345,92 ± 9,43	374,49 ± 10,58	97,16 ± 5,83	10,65 ± 1,36	828,21 ± 27,20	A	48,34 ± 0,42
105 min	335,29 ± 7,26	365,05 ± 9,47	95,13 ± 5,73	10,42 ± 0,12	805,89 ± 22,58	A	48,08 ± 0,46
120 min	323,51 ± 8,54	359,59 ± 8,36	90,10 ± 6,65	10,31 ± 1,78	783,51 ± 25,33	A	47,75 ± 1,63
150 min	320,75 ± 9,25	347,08 ± 9,73	89,84 ± 4,26	9,51 ± 0,95	767,18 ± 24,19	A	47,67 ± 0,90
180 min	315,29 ± 8,26	335,05 ± 9,57	87,13 ± 6,21	9,41 ± 1,47	746,88 ± 25,51	A	47,58 ± 0,07
Phase Solide							
90 min	137,41 ± 7,98	204,20 ± 6,78	190,94 ± 5,76	7,85 ± 1,65	540,40 ± 22,17	10,77± 1,34	37,75 ± 1,08
105 min	144,35 ± 5,75	220,30 ± 5,54	207,55 ± 4,93	8,36 ± 0,34	580,56 ± 16,56	10,84± 2,15	38,29 ± 0,50
120 min	149,00 ± 6,53	226,80 ± 7,35	220,91 ± 6,98	8,69 ± 0,75	605,39 ± 21,61	10,87± 0,98	38,97 ± 0,48
150 min	156,37 ± 4,56	276,63 ± 5,45	233,31 ± 7,53	8,96 ± 2,35	675,27 ± 19,89	11,03± 1,63	41,31 ± 1,67
180 min	164,28 ± 5,87	297,92 ± 7,34	271,79 ± 7,56	8,99 ± 1,23	742,98 ± 22,00	11,06± 1,28	41,67 ± 1,72

a QDG= Quercétine-3,4'-diglucoside ; Q4G= Quercétine-4'- monoglucoside ; QA= Quercétine aglycone; Q3G=Quercétine 3-monoglucoside; KMF= Kaempférol

A= Absent

### **III.4. Conclusion**

La turbo hydrodistillation est utilisée pour la première fois pour l'extraction de l'huile essentielle et des composés phénoliques d'oignon dont les activités antioxydantes confèrent des effets bénéfiques sur la santé humaine. Avec la THD, il est possible d'extraire 68,90 mg de l'huile essentielle, 1500 mg de flavonols et 8925 mg de phénols totaux de 1 kg de matière végétale fraîche.

Bien que cette technologie conventionnelle soit utilisée pour l'extraction de l'huile essentielle, l'utilisation du THD permet une bonne extraction des phénols (95,86%) et des flavonoïdes (55,94%) contenus dans les déchets d'oignons qui sont normalement éliminés après distillation.

Cette technologie "verte" est d'une grande importance pour la chimie verte car elle réduit l'utilisation des solvants organiques et diminue les déchets. En outre, elle peut être valorisée dans l'industrie alimentaire pour répondre aux besoins des consommateurs pour des produits alimentaires plus sains car elle offre une valeur ajoutée aux déchets d'oignon, avec l'extraction des huiles essentielles, utilisant l'eau comme un solvant naturel respectueux de l'environnement.

## Références bibliographiques

- Aoyama, S., & Yamamoto, Y. (2007). Antioxidant activity and flavonoid content of Welsh onion (*Allium fistulosum*) and the effect of thermal treatment. *Food Science and Technology Research*, 13(1), 67–72.
- Armenta, S., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2008). Green Analytical Chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(6), 497–511.
- Beesk, N., Perner, H., Schwarz, D., George, E., Kroh, L. W., & Rohn, S. (2010). Distribution of quercetin-3,4'-O-diglucoside, quercetin-4'-O-monoglucoside, and quercetin in different parts of the onion bulb (*Allium cepa* L.) influenced by genotype. *Food Chemistry*, 122(3), 566–571.
- Boivin, D., Lamy, S., Lord-Dufour, S., Jackson, J., Beaulieu, E., Côté, M., Béliveau, R. (2009). Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study. *Food Chemistry*, 112(2), 374–380.
- Bonaccorsi, P., Caristi, C., Gargiulli, C., & Leuzzi, U. (2008). Flavonol glucosides in *Allium* species: A comparative study by means of HPLC–DAD–ESI–MS–MS. *Food Chemistry*, 107(4), 1668–1673.
- Bystrická, J., Musilová, J., Vollmannová, A., Timoracká, M., & Kavalcová, P. (2013). Bioactive components of onion (*Allium cepa* L.) — a Review. *Acta Alimentaria*, 42(1), 11–22.
- Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446–467.
- Crozier, A., Lean, M. E., McDonald, M. S., & Black, C. (1997). Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 590–595.
- Curylo, J., Wardencki, W., & Namieśnik, J. (2007). Green Aspects of Sample Preparation—a Need for Solvent Reduction. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(1), 5–16.
- Goupy, P., Amiot-Carlin, M., Escudier, J., Mikolajczak, M., & Martin, M. (2004). Method for extracting, fractionating and purifying polyphenol compounds originating from fresh vegetable culls using a high-absorption and elution resins US Patent 6,824,797 B2.
- Hamauzu, Y., Nosaka, T., Ito, F., Suzuki, T., Torisu, S., Hashida, M., Yamanaka, S. (2011). Physicochemical characteristics of rapidly dried onion powder and its anti-atherogenic effect on rats fed high-fat diet. *Food Chemistry*, 129(3), 810–815.
- Hertog, M. G., Hollman, P. C., & Venema, D. (1992). Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 1591–1598.

- Hirota, S., Shimoda, T., & Takahama, U. (1999). Distribution of flavonols and enzymes participating in the metabolism in onion bulbs: mechanism of accumulation of quercetin and its glucosides in the abaxial epidermis. *Food Science and Technology Research*, 5, 384–387.
- Hirota, S., Shimoda, T., & Takahama, U. (1998). Tissue and spatial distribution of flavonol and peroxidase in onion bulbs and stability of flavonol glucosides during boiling of the scales. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(9), 3497–3502.
- Hota, S. V., Kulkarni, G., & Perumal, P. (2012). In Silico Molecular Modelling and Docking of Quercetin- $\gamma$ -Cyclodextrin Inclusion Complex on SGLT of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int.J.Pharm.Phytopharmacol .Res*, 2(3), 167–175.
- Ioku, K., Aoyama, Y., Tokuno, A., Terao, J., Nakatani, N., & Takei, Y. (2001). Various Cooking Methods and the Flavonoid Content in Onion. *J Nutr Sci Vitaminol*, 47, 78–83.
- Isitec Lab-Seppal. Indice de Folin/Polyphénols totaux; Montauban, France.
- Kiassos, E., Mylonaki, S., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2009). Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 246–252.
- Ko, M. J., Cheigh, C. I., Cho, S. W., & Chung, M. S. (2011). Subcritical water extraction of flavonol quercetin from onion skin. *Journal of Food Engineering*, 102(4), 327–333.
- Lachman, J., Pronek, D., Hejtmankova, A., Dudjak, J., Pivec, V., & Faitová, K. (2003). Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (*Allium cepa* L.) varieties. *Horticultural Science*, 30(4), 142–147.
- Lindahl, S., Liu, J., Khan, S., Karlsson, E. N., & Turner, C. (2013). An on-line method for pressurised hot water extraction and enzymatic hydrolysis of quercetin glucosides from onions. *Analytica Chimica Acta*, 785, 50–59.
- Lombard, K., Peffley, E., Geoffriau, E., Thompson, L., & Herring, A. (2005). Quercetin in onion (*Allium cepa* L.) after heat-treatment simulating home preparation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(6), 571–581.
- Ly, T. N., Hazama, C., Shimoyamada, M., Ando, H., Kato, K., & Yamauchi, R. (2005). Antioxidative Compounds from the Outer Scales of Onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8183–8189.
- Makris, D. P., & Rossiter, J. T. (2001). Domestic Processing of Onion Bulbs (*Allium cepa*) and Asparagus Spears (*Asparagus officinalis*): Effect on Flavonol Content and Antioxidant Status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3216–3222.
- Małgorzata, M. (2008). Quercetin and its derivatives: Chemical structure and bioactivity- A review. *J. Food Nutr. Sci.*, 58(4), 407–413.

- Martino, K., & Guyer, D. (2004). Supercritical fluid extraction of quercetin from onion skins. *Journal of Food Process Engineering*, 27, 17–28.
- Miean, K. H., & Mohamed, S. (2001). Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 3106–3112.
- Nuutila, A. M., Kammiovirta, K., & Oksman-Caldentey, K. M. (2002). Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*, 76, 519–525.
- Nuutila, A. M., Puupponen-Pimia, R., Aarni, M., & Oksman-Caldentey, K. M. (2003). Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 81, 485–493.
- Patil, B. S., Pike, L. M., & Yoo, K. S. (1995). Variation in the quercetin content in different colored onions (*Allium cepa* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(6), 909–913.
- Périno-Issartier, S., Abert-Vian, M., Petitcolas, E., & Chemat, F. (2010). Microwave turbo hydrodistillation for rapid extraction of the essential oil from *Schinus terebinthifolius* Raddi Berries. *Chromatographia*, 72(3-4), 347–350.
- Prakash, D., Singh, B., & Upadhyay, G. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). *Food Chem*, 102, 1389–1393.
- Price, K. R., Bacon, J. R., & Rhodes, M. J. (1997). Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*Allium cepa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 938–942.
- Rhodes, M. J., & Price, K. R. (1996). Analytical problems in the study of flavonoid compounds in onions. *Food Chemistry*, 57(1), 113–117.
- Roldán-Marín, E., Sánchez-Moreno, C., Lloría, R., de Ancos, B., & Cano, M. P. (2009). Onion high-pressure processing: Flavonol content and antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 42(4), 835–841.
- Romeilah, R., Sayed, F. A., & Mahmoud, G. (2010). Chemical Compositions, Antiviral and Antioxidant Activities of Seven Essential Oils. *Journal of Applied Sciences Research*, 6(1), 50–62.
- Santas, J., Carbo, R., Gordon, M., & Almajano, M. (2008). Comparison of the antioxidant activity of two Spanish onion varieties. *Food Chemistry*, 107(3), 1210–1216.
- Singh, B., Singh, B., Singh, R., Prakash, D., Singh, D., Sarma, B., Singh, H. (2009). Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food Chemistry, Toxicol*, 47, 1161–1167.

- Slimestad, R., Fossen, T., & Vågen, I. M. (2007). Onions: A Source of Unique Dietary Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(25), 10067–10080.
- SØltoft, M., Christensen, J., Nielsen, J., & Knuthsen, P. (2009). Pressurized liquid extraction of flavonoids in onions. Method development and validation. *Talanta*, *80*, 269–278.
- Stajner, D., & Varga, I. S. (2003). An evaluation of the antioxidant abilities of *Allium* species. *Acta Biologica Szegediensis*, *47*(1-4), 103–106.
- Stratil, P., Klejdus, B., & Kubáň, V. (2006). Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables, Evaluation of Spectrophotometric Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(3), 607–616.
- Subhasree, B., Baskar, R., Laxmi Keerthana, R., Lijina Susan, R., & Rajasekaran, P. (2009). Evaluation of antioxidant potential in selected green leafy vegetables. *Food Chemistry*, *115*(4), 1213–1220.
- Sun, T., Powers, J., & Tang, J. (2007). Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. *Food Chemistry*, *105*(1), 101–106.
- Takahama, U., Oniki, T., & Hirota, S. (2001). Phenolic components of brown scales of onion bulbs produce hydrogen peroxide by autooxidation. *Journal of Plant Research*, *114*(4), 395–402.
- Takahashi, M., & Shibamoto, T. (2008). Chemical Compositions and Antioxidant/Anti-inflammatory Activities of Steam Distillate from Freeze-Dried Onion (*Allium cepa* L.) Sprout. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(22), 10462–10467.
- Turner, C., Turner, P., Jacobson, G., Almgren, K., Waldebäck, M., Sjöberg, P., & et al. (2006). Subcritical water extraction and b-glucosidase-catalyzed hydrolysis of quercetin glycosides in onion waste. *Green Chemistry*, *8*, 949–959.
- Yang, J., Meyers, K. J., van der Heide, J., & Liu, R. H. (2004). Varietal Differences in Phenolic Content and Antioxidant and Antiproliferative Activities of Onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(22), 6787–6793.
- Ye, C. L., Dai, D. H., & Hu, W. L. (2013). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.). *Food Control*, *30*(1), 48–53.
- Zill-e-Huma, Abert Vian, M., Maingonnat, J. F., & Chemat, F. (2009). Clean recovery of antioxidant flavonoids from onions: Optimising solvent free microwave extraction method. *Journal of Chromatography A*, *1216*(45), 7700–7707.
- Zill-e-Huma, Abert Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Elmaataoui, M., Dangles, O., & Chemat, F. (2011). A remarkable influence of microwave extraction: Enhancement of antioxidant activity of extracted onion varieties. *Food Chemistry*, *127*(4), 1472–1480.

**Chapitre IV. Extraction d'éco-concrète et d'éco-absolue utilisant la technologie aux ultrasons pour l'application en Agroalimentaire**

## Résumé

La concrète et l'absolue sont les arômes des plantes largement utilisés dans l'agroalimentaire et la parfumerie. L'extraction utilisant des solvants pétroliers constitue la méthode classique pour l'obtention de ces arômes. Cependant, cette méthode d'extraction peut laisser des traces de solvants qui sont indésirables pour la parfumerie. Dans ce travail, une nouvelle approche «verte» est mise au point utilisant les ultrasons (US) avec de l'huile de tournesol (HT) comme solvant naturel pour produire l'éco-absolue de thym (*Thymus vulgaris*). Afin de considérer la performance du procédé dans l'extraction des absolues, une méthodologie en surface de réponse (MSR) est expérimentée. Les rendements des absolues extraites avec les paramètres optimaux sont comparés avec ceux obtenus par extraction conventionnelle à l'huile de tournesol (HT-CV) et à l'hexane (Hex-CV). La composition chimique des absolues obtenues par les différentes méthodes est analysée par GC-MS et comparée à celle de l'huile essentielle (HE) et les extraits de Soxhlet (ES). Les absolues sont également testées pour leurs activités antioxydantes (phénols totaux, DPPH et le test de friture).

Les conditions optimales obtenues par MSR pour le rendement d'absolue sont  $T = 50\text{ °C}$ ,  $t = 22\text{ min}$ ,  $P = 98\text{ W}$ . La technique aux ultrasons utilisant l'huile de tournesol comme solvant offre des avantages importants: un temps d'extraction plus court, une augmentation de 47% du rendement d'absolue par rapport à HT-CV. Bien que l'absolue obtenue par l'extraction à l'hexane fournit une amélioration du rendement (8,64 g/100 g MS), elle contient environ 75% de cire. L'analyse GC-MS a montré de faibles variations dans la composition chimique des absolues par rapport à celles obtenues par extraction à l'hexane. En outre, la méthode aux US est sélective pour les phénols monoterpéniques tout en assurant la teneur la plus élevée en thymol et carvacrol (86,2%) parmi tous les extraits de thym. L'absolue obtenue par US est dépourvue de cires et des résidus de solvants organiques et montre l'activité antioxydante la plus élevée. Les résultats montrent que l'extraction aux ultrasons utilisant l'huile de tournesol comme solvant est une bonne alternative. Elle offre la possibilité de la production d'éco-absolue à l'échelle pilote et industrielle.

Mots-clés: Extraction verte, ultrasons, extraits de thym, solvant alternatif, activité antioxydante.

#### IV.1. Introduction

L'industrie agroalimentaire et du parfum s'intéresse aux composés aromatiques des plantes tels que la concrète et l'absolue. L'extraction classique de ces arômes consiste à obtenir la concrète par des solvants pétroliers, tels que l'hexane ou le pentane. Ensuite, la concrète est dissoute dans une solution d'éthanol pour réduire les composés cireux qui perturbent la formulation de parfum, permettant la formation de l'absolue, l'arôme le plus fidèle à l'odeur de la plante (Rout, Naik, & Rao, 2011). Cependant, cette méthode d'extraction peut laisser des traces de solvants organiques qui sont indésirables pour l'agroalimentaire et la parfumerie, étant nocifs pour la santé humaine et l'environnement (Yang, Wei, & Hong, 2014).

Dans le même temps, il y a un grand intérêt dans la chimie verte à chercher des techniques d'extraction vertes susceptibles de concilier les défis posés par l'économie, la société et l'environnement. Elle est basée sur le développement des procédés d'extraction qui réduisent la consommation d'énergie, permettent l'utilisation de solvants naturels comme alternative aux solvants à base de pétrole et assurent un extrait de qualité supérieure (Armenta, Garrigues, & de la Guardia, 2008; Li, Fabiano-Tixier, Vian, & Chemat, 2013).

Les extractions à l'aide des solvants pétrochimiques des différentes concrètes et absolues sont rapportées pour les fleurs telles que le narcisse (Remy, 2004), *Michelia Champaca* Linn, (Rout et al., 2011), *Tagetes patula* L. (Prakash, Rout, Chanotiya, & Misra, 2012), et *Mimusops elengi* L. (Rout, Sahoo, & Misra, 2010).

Le thym (*Thymus vulgaris*) est un arbuste herbacé vivace appartenant à la famille des Lamiacées. Il est répandu dans toute la région méditerranéenne (Goodner, Mahattanatawee, Plotto, Sotomayor, & Jordán, 2006). Cette plante aromatique est largement utilisée comme arôme alimentaire et elle est bien connue pour ses divers effets bénéfiques, par exemple, pour ses propriétés antiseptiques, carminatives, antimicrobiennes et antioxydantes (Lee, Umamo, Shibamoto, & Lee, 2005).

L'HE de thym est associée à de forte activité antioxydante (Chizzola, Michitsch, & Franz, 2008; Shabnum & Wagay, 2011), antimicrobienne (Kačaniová et al., 2012; Rota, Herrera, Martínez, Sotomayor, & Jordán, 2008), ainsi que d'autres propriétés fonctionnelles telles qu'insecticide, (Pavela, Vrchotová, & Tríska, 2009), antiseptique, analgésique et anti-inflammatoire (Priestley, Williamson, Wafford, & Sattelle, 2003). La plupart de ces activités est induite par le thymol et le carvacrol, les principaux phénols monoterpéniques de l'HE.

Différentes techniques d'extraction sont menées sur le thym. L'HE est obtenue par distillation à la vapeur (Grigore et al., 2010; Rota et al., 2008) et par hydrodistillation (Ghasemi Pirbalouti, Hashemi, & Ghahfarokhi, 2013; Shabnum & Wagay, 2011). Les composés actifs d'arôme de thym sont obtenus par différentes méthodes d'extraction tels que l'hydrodistillation assistée par micro-ondes (Golmakani & Rezaei, 2008), l'extraction par fluide supercritique (García-Risco, Vicente, Reglero, & Fornari, 2011), la microextraction en phase solide, l'extraction par liquide sous pression, l'extraction par Soxhlet (Dawidowicz, Rado, Wianowska, Mardarowicz, & Gawdzik, 2008) ainsi que l'utilisation de différents solvants (Roby, Sarhan, Selim, & Khalel, 2013).

Bien que les différentes caractéristiques des HE et des extraits de thym aient été largement analysées, jusqu'à présent, aucune étude sur la concrète et l'absolue de thym a été menée pour l'application dans l'agroalimentaire.

Les ultrasons (US) sont utilisés pour divers procédés dans l'industrie alimentaire. La technique est rapide et permet la réduction des solvants, conduisant ainsi à un produit plus pur et à des rendements plus élevés. Cette méthode est utilisée pour extraire des composés tels que les antioxydants (Virot, Tomao, Le Bourvellec, Renard, & Chemat, 2010), les arômes (Xia, Shi, & Wan, 2006), et d'autres composants organiques et inorganiques à partir de diverses matrices.

La forte vibration de l'US améliore le processus de cavitation et de la surface de contact qui se produit entre la matrice végétale et la phase du solvant liquide provoquant la rupture des parois cellulaires, améliorant par conséquent le rendement d'extraction du matériel végétal disponible (Pan, Qu, Ma, Atungulu, & McHugh, 2011; Vinatoru, 2001). Les ultrasons sont utilisés pour l'extraction des composés aromatiques de thym par extraction dynamique assistée par ultrasons (Roldangutierrez, Ruizjimenez, & Luquedecastro, 2008). Ils ont également assisté le processus de séchage de thym (Rodriguez, Melo, Mulet, & Bon, 2013) et la distillation à la vapeur de l'HE de thym (Kowalski & Wawrzykowski, 2009).

Dans ce travail, une nouvelle procédure verte utilisant les ultrasons, une méthode simple, peu coûteuse pour l'extraction d'éco-absolue de thym (*Thymus vulgaris*) est réalisée. L'huile de tournesol (HT) est utilisée comme alternative aux solvants organiques: un processus qui est en ligne avec les concepts d'extraction verte. La méthode d'extraction aux US en termes de rendement est optimisée en utilisant la méthodologie en surface de réponse (MSR) et comparée aux extractions classiques à l'huile de tournesol et à l'hexane. La composition chimique des

différentes absolues est analysée par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) et comparée à celle de l'huile essentielle (HE) et des extraits de Soxhlet (ES) de thym. Les différents tests antioxydants, Folin-Ciocalteu, 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et matériaux polaires totaux (TPM) sont également réalisés sur les absolues obtenues par les différentes méthodes d'extraction. L'objectif de cette étude était la mise en œuvre pour la première fois d'une nouvelle approche verte pour produire « l'éco-absolue » de thym pour l'agroalimentaire en utilisant les ultrasons et l'huile de tournesol comme solvant respectueux de l'environnement.

## **IV.2. Matériels et Méthodes**

### **IV.2.1 Matériel végétal et produits chimiques**

L'huile de tournesol provient d'un supermarché local, *Thymus vulgaris* (chénotype thymol) est acheté chez Flore en thym, SAS (sud de la France). L'éthanol absolu et l'hexane sont obtenus de VWR (CE), le réactif Folin Ciocalteu est acheté chez Chem-Lab (Belgique), le réactif DPPH et le thymol sont fournis par Sigma Aldrich (Allemagne), le méthanol est acheté chez Merck (Allemagne) et l'éthanol (96%) est fourni par Brenntag (Belgique).

### **IV.2.2 Procédures d'extraction**

*Rapport solide-liquide*: Les différents rapports (matériel végétal/solvant) varient selon le type de solvant et le matériel végétal utilisé. Dans ce travail, un rapport de poids (p) de 1/10 (p/p) est choisi pour les différentes techniques d'extraction des absolues. Pour un rapport supérieur à 1/10, la matière sèche absorbe la totalité du solvant disponible, gonfle, ce qui donne par conséquence un rendement plus faible. Étant donné que les ultrasons nécessitent une quantité minimale de solvant pour les procédures d'extraction, un bon compromis entre des rendements d'absolues élevés et des volumes de solvant disponibles a été choisi.

*Extraction conventionnelle des absolues avec l'hexane et l'éthanol (Hex-CV)*: Dix grammes de matière sèche de thym sont trempés dans l'hexane (100 mL) et soumis à un chauffage à reflux pendant 2 heures. La solution est filtrée, l'hexane est ensuite évaporé sur un évaporateur rotatif à 40 °C pour obtenir la concrète. L'éthanol absolu (20 mL) est ajouté à la concrète, puis chauffé à 50 °C pendant 5 min pour obtenir un mélange homogène. Une filtration du précipité suivie de l'évaporation de l'éthanol à 40 °C fournit une absolue verte. Les extractions sont réalisées trois

fois et les valeurs moyennes de rendement exprimées en g/100 g de matière sèche de thym (MS) sont rapportées.

*Extraction de l'absolue avec l'huile de tournesol et l'éthanol:* Dix grammes de matière sèche de thym sont trempés dans 100 mL de l'huile de tournesol pour l'extraction de l'oléo-concrète (OC) par ultrasons et par macération classique. Puis, l'oléo-concrète est filtrée; l'éthanol absolu (250 mL) est ajouté à la solution, agité vigoureusement puis laissé au repos pour 1 heure. La solution éthanolique est recueillie, évaporée partiellement et réfrigérée à -14 °C pendant 12 heures pour éliminer les résidus de l'huile de tournesol. Le surnageant est recueilli et évaporé à 40 °C donnant un extrait jaune, l'éco-absolue. Les extractions sont réalisées trois fois et les rendements d'absolues (g/100 g MS) sont rapportés.

*Extraction aux ultrasons (HT-US) et extraction classiques (HT-CV):* Les extractions aux ultrasons sont effectuées pour obtenir les oléo-concrètes dans un réacteur en pyrex de dimension interne 4 x 12,5 cm et de capacité maximale de 250 mL. Le dispositif à ultrasons utilisé consiste en une sonotrode en titane de 6 mm de diamètre de bout (Ultrasonic Processor, Fisher Bioblock Scientific, France) fonctionnant à une fréquence et une puissance maximale de 20 kHz et 130 W respectivement. Le réacteur à double paroi (avec la circulation d'eau) permet le contrôle de la température d'extraction par les systèmes de refroidissement/chauffage (Ministat 125, Allemagne). L'extraction aux ultrasons est comparée à l'extraction classique en remplaçant la sonde avec l'agitation magnétique.

D'autres extractions conventionnelles sont également réalisées afin de comparer la composition chimique des absolues à celle de l'huile essentielle et des extraits Soxhlet. L'HE est obtenue par hydrodistillation: deux cents grammes de matière sèche de thym sont trempés dans l'eau distillée (5000 mL) et soumis à l'hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger pendant 6 heures. L'HE est recueillie, séchée avec le sulfate anhydre et stockée à 4 °C à l'obscurité. Les extractions sont réalisées trois fois et la valeur moyenne de rendement était de  $2,37 \pm 0,20$  g/100 g MS. Pour l'extraction au Soxhlet, la matière sèche de thym (30 g) est extraite avec 300 mL d'hexane pendant 8 heures en continu à une température maximale de 70 °C dans un appareil Soxhlet (Soxhlet, 1879). Après l'extraction, le solvant est éliminé sous un évaporateur rotatif sous vide. Les extractions sont réalisées trois fois et la valeur moyenne de rendement était de  $9,67 \pm 0,15$  g/100 g MS.

### IV.2.3 Plan d'expériences

Afin d'étudier l'influence et la pertinence des paramètres impliqués dans l'extraction aux ultrasons, un plan composite centré (PCC) est utilisé pour analyser les rendements d'absolues de thym. Trois facteurs indépendants (la température (T), le temps de sonication (t) et la puissance d'ultrasons (P)) sont évalués, ainsi que l'interaction éventuelle entre ces variables.

L'uniforme PCC complet de rotabilité présente les caractéristiques suivantes (Bezerra, Santelli, Oliveira, Villar, & Escaleira, 2008): (1) le nombre total d'expériences (N) est donné  $N = k^2 + 2k + cp$ , où k est le nombre de variables et cp est le nombre de répétitions du point central; (2) les « point étoiles » sont à une distance  $\alpha$  du centre du domaine et les valeurs de  $\alpha$  sont calculées par  $\alpha = 2(k-p)/4$ ; et (3) tous les facteurs sont étudiés à cinq niveaux ( $-\alpha$ , -1, 0, +1,  $+\alpha$ ). Par conséquent, dans le cas de trois variables, le nombre d'expériences est 20, le nombre de répétitions au centre est 6 et la valeur  $\alpha$  est de 1,68. Des expériences préliminaires nous ont permis de distinguer les variables impliquées dans le modèle à cinq niveaux codés séparés: -  $\alpha$  (= -1,68), -1, 0, +1, +  $\alpha$  (= +1,68). Les valeurs limites de chaque gamme de variable sont choisies en fonction des limitations de l'appareil à ultrasons (puissance minimale et maximale disponible dans le dispositif), la température de l'extraction des absolues (les composés aromatiques peuvent se dégrader au-dessus de 50 °C) et le temps de traitement par ultrasons. Les valeurs sont présentées dans le Tableau IV.1 avec un total de 20 expériences; y compris six répétitions au centre pour évaluer l'erreur expérimentale et les essais sont exécutés de façon aléatoire pour éviter les effets des variables externes.

Tableau IV.1: Variables impliquées dans le plan composite centré et les réponses obtenues pour les rendements d'absolues.

No	Température (°C)	Puissance (W)	Temps de sonication (min)	Rendement d'absolue (g/100 g)
1	18	45	10	2,438
1	18	85	10	2,475
1	30	65	15	2,719
1	30	65	23	4,334
1	30	98	15	5,428
1	30	65	15	2,860
1	18	45	20	3,306
1	30	32	15	1,975
1	30	65	15	3,007
1	42	85	20	5,256
1	30	65	15	2,688
1	42	85	10	4,271
1	10	65	15	2,017
1	50	65	15	5,345
1	42	45	20	4,891
1	30	65	7	2,181
1	30	65	15	2,869
1	30	65	15	2,931
1	18	85	20	4,994
1	42	45	10	3,583

Les variables sont codées selon l'équation suivante (1), où  $X_i$  est la valeur codée,  $x_i$ , la valeur réelle d'une variable,  $\bar{x}_i$  la valeur réelle d'une variable au centre et  $\Delta x_i$  la variation de l'étape:

$$X_i = \frac{x_i - \bar{x}_i}{\Delta x_i} \quad (1)$$

Les données expérimentales pour prévoir les rendements d'absolue sont ensuite représentées à l'aide d'une équation polynomiale de second degré (2) comme suit:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=2}^n \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

Où: Y est la réponse exprimée en rendement d'absolue (g d'absolue par 100 g/MS de thym),  $\beta_0$  est la moyenne des réponses obtenues des répliques du centre du domaine expérimental,  $\beta_i$ ;  $\beta_{ii}$ ;  $\beta_{ij}$  sont les effets linéaires, quadratiques et d'interaction des variables respectivement,  $X_i$  et  $X_j$  sont les variables codées indépendantes. Les résultats sont analysés en utilisant le logiciel Statgraphics XV®.

#### **IV.2.4 Etude de cinétique**

Des études de cinétique sont effectuées pour comparer les rendements des absolues extraites par HT-US et HT-CV selon les valeurs optimales de température, de temps de sonication et de puissance, obtenues par le plan d'expériences. Les cinétiques sont réalisées et des points sont relevés à des temps d'extraction différents (5, 15, 20 et 30 min). Les résultats sont représentés graphiquement en fonction du temps. Les expériences sont réalisées trois fois et les rendements des absolues obtenues par les extractions avec l'huile de tournesol sont comparés à ceux obtenus par l'hexane.

#### **IV.2.5 Analyse GC-MS**

Les extraits de thym qui sont analysés par GC-MS pour identifier leurs constituants chimiques sont les suivants: les absolues obtenues par l'extraction conventionnelle à l'hexane (Abs-Hex-CV), par l'extraction conventionnelle à l'huile de tournesol (Abs-HT-CV), par combinaison huile de tournesol/ultrason (Abs-HT-US) dans les conditions optimales, ainsi que l'huile essentielle et les extraits Soxhlet. Tout d'abord, les échantillons sont soumis à une dilution standard de 10% (p/p) dans l'éthanol (96%). Une filtration sur des filtre-seringues en nylon (0,45  $\mu\text{m}$ ) est réalisée pour l'ensemble des échantillons avant l'injection en GC. L'analyse par GC est effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse Agilent 7890 couplé avec un détecteur à ionisation de flamme (FID) équipé d'un échantillonneur automatique de liquide. Deux types de colonne capillaire sont utilisés: VF-1 et VF-WAX (20 m x 0,15 mm x 0,15  $\mu\text{m}$ ) d'Agilent. L'hydrogène est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1mL/min; la température du four est programmée de la manière suivante: départ à partir de 60 °C puis augmentation de 15 °C/min jusqu'à 250 °C pendant 7,5 min. L'injecteur et le détecteur de température sont fixés à 250 °C. La méthode de normalisation interne est utilisée pour la quantification des composants des extraits.

L'analyse GC-MS est effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890 couplé à un détecteur sélectif de masse 5973N équipé d'un échantillonneur automatique de liquide. L'identification est réalisée en utilisant la combinaison d'une colonne capillaire polaire (VF-WAXms) et apolaire (VF-1 ms) de 20 m x 0,15 mm x 0,15  $\mu\text{m}$  d'Agilent. Le gaz vecteur est l'hélium à un débit constant de 0,8 mL/min et la température du four est programmée de la manière suivante: départ à partir de 60 °C puis augmentation de 10 °C/min jusqu'à 250 °C

pendant 11 min. Une injection de 1  $\mu$ L est effectuée en mode split avec un ratio de 1:200 avec une température de l'injecteur de 250 °C. La température de la source de spectre de masse est de 230 °C; du quadripôle est de 150 °C; la gamme de masse entre 40-400 amu est scannée. Les composants sont identifiés à l'aide de base de données NIST 2005 et de la bibliothèque interne de Payan Bertrand de spectres de masse.

#### **IV.2.6 Composés phénoliques totaux**

Les Abs-Hex-CV, Abs-HT-CV et Abs-HT-US obtenues dans des conditions optimales sont étudiées pour leur teneur en phénols totaux (CPT) à l'aide de Folin Ciocalteu (Singleton, & Rossi, 1965).

Un volume de 100  $\mu$ L de la solution éthanolique filtrée d'absolues (5 mg/mL) est introduit dans des tubes à essais suivi de 1250  $\mu$ L de réactif de Folin-Ciocalteu et 1 mL d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 10%. Les tubes sont mis à l'obscurité pendant 1 heure. L'absorbance est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway 6300, RU) à 760 nm et comparée à une courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en mg équivalents thymol par g d'absolue. Chaque essai est réalisé en trois répétitions.

#### **IV.2.7 DPPH**

Les activités antioxydantes des absolues sont mesurées en termes de capacité réductrice ou piégeage des radicaux par la décoloration de la solution méthanolique de radical stable DPPH de couleur pourpre (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

Les solutions diluées sont préparées dans l'éthanol absolu (solution-mère: 5 mg/mL) pour obtenir des concentrations finales dans les tubes à essais allant de 0,5 à 3 mg/mL pour les Abs-Hex-CV et les Abs-HT-CV et de 0,25 à 1,5 mg/mL pour les Abs-HT-US.

Deux millilitres de solution méthanolique fraîche de DPPH à une concentration de  $6 \times 10^{-5}$  M sont ajoutés. Les échantillons sont agités dans l'obscurité pendant quatre heures.

La diminution de l'absorbance à 517 nm est déterminée en utilisant un spectrophotomètre (Jenway 6300, RU) pour tous les échantillons. L'éthanol absolu est utilisé comme blanc; l'éthanol absolu avec DPPH est utilisé comme contrôle négatif. Tous les échantillons sont testés en trois répétitions.

La concentration de l'échantillon nécessaire pour diminuer l'absorption de DPPH de 50% (EC<sub>50</sub>) est calculée graphiquement. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculé selon la formule du Yen et Duh (Yen & Duh, 1994):

$$I = (A_0 - A_i) / A_0 \times 100$$

où I = inhibition de DPPH (%),

A<sub>0</sub> = absorbance de contrôle (Pas antioxydant) t = 0,

et A<sub>i</sub> = absorbance de l'échantillon testé à la fin de la réaction (t = 4 h).

#### **IV.2.8 Test de l'huile de friture**

L'effet de chauffage est étudié par la détermination des matériaux polaires totaux (TPM). Les oléo-concrètes traitées par US et par macération classique (100 mL), ainsi que les échantillons de l'huile de tournesol (100 mL) auxquels sont ajoutés différentes absolues et HE de thym (0,80 g) sont chauffés dans des conditions domestiques de friture, c'est-à-dire à 180 ± 5 °C pendant plusieurs heures (Casal, Malheiro, Sendas, Oliveira, & Pereira, 2010).

La température est contrôlée par un thermocouple (ATC-300) inséré directement dans les friteuses électriques. Tous les échantillons sont évalués avant les premières séances de chauffage et puis après chaque heure de friture jusqu'à ce que l'huile devienne non utilisable. La fin des essais de chauffage est déterminée par la valeur de TPM, où un pourcentage maximal de 25% est toléré, conformément à la loi française (article 3-3 du décret N° 86-857 du 18/07/86). Cette valeur légale maximale des matériaux polaires totaux dans les huiles de friture, y compris les produits d'hydrolyse (diglycérides, monoglycérides et les acides gras libres) et une distribution complexe des produits d'oxydation englobant les polymères, est formée à des températures inférieures à 180 °C (la loi française N° 86-857). La valeur des matériaux polaires totaux, habituellement évaluée dans les restaurants et l'industrie agroalimentaire par des tests commerciaux rapides (principalement basée sur les lectures colorimétriques) a démontré une bonne corrélation avec les valeurs obtenues par les normes officielles (Casal et al., 2010).

### **IV.3. Résultats et discussion**

#### **IV.3.1 Etudes de plan d'expériences**

Trois variables clés qui affectent l'extraction des rendements d'absolue sont étudiées dans un plan composite centré: la puissance, la température et le temps de traitement par ultrasons. La

puissance des ultrasons varie de 32 à 98 W. Les limites de puissance d'ultrasons choisies sont fonction des limites de la régulation de l'appareil à ultrasons. Étant donné qu'un réglage des paramètres de température approprié est nécessaire pour éviter la destruction des composés aromatiques, des températures modérées sont choisies avec une gamme allant de 10 à 50 °C. En outre, l'augmentation des phénomènes de cavitation est directement proportionnelle à l'augmentation de la température du système. Cependant, une diminution des ondes est observée à des températures trop élevées, réduisant l'effet de l'US (Lorimer & Mason, 1987), par conséquent, une température maximale de 50 °C est choisie. La gamme de temps de sonication choisie (de 7 à 23 min) est courte, même compétitive avec l'extraction classique, montrant une potentielle application industrielle dans le futur. Puisqu'après un certain temps, les bulles de cavitation ne continuent pas à absorber l'énergie pour se développer et s'imploser (Ozcan, 2006) et le temps utilisé normalement pour l'extraction des ultrasons dans l'industrie ne dépassent pas 60 min (Chemat, Zill-e-Huma, & Khan, 2011), une durée de 23 min est choisie comme limite maximale. Ces trois variables contrôlées sont analysées dans une étude multivariée de 20 expériences comme indiqué dans le Tableau IV.1.

#### **IV.3.1.1 Résultats des rendements d'absolues**

Les expériences codées et les réponses obtenues pour chaque essai du plan composite centré sont présentées dans le Tableau IV.1. Les réponses varient considérablement en fonction du réglage des paramètres de l'expérimentation (de 1,975 à 5,428 g d'absolue par 100 g de matière sèche de thym). L'importance et la pertinence du plan sont ensuite étudiées en utilisant une analyse de variance (ANOVA) dans le Tableau IV.2. La signification statistique de chaque effet (y compris les interactions, les effets linéaires et quadratiques) est testée en comparant les carrés moyens avec une valeur estimée de l'erreur expérimentale. En fonction du degré de liberté (Ddl) impliqué, le ratio-F peut être calculé (rapport entre l'erreur des carrés moyens et l'erreur pure). Avec un niveau de confiance de 95%, la signification du ratio-F peut être évaluée en utilisant la colonne *valeur-p* (les effets significatifs sont indiqués en gras).

Cinq effets se sont montrés significatifs à un niveau de confiance de 95% dans le domaine expérimental étudié. Cette observation peut également être réalisée sur un diagramme de Pareto des effets normalisés, présentés dans la Figure IV.1. La longueur des barres sur ce graphique 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 sont considérés comme étant statistiquement significatifs sur la variable réponse étudiée, à un niveau de confiance de 95%. L'analyse de ce diagramme montre que les effets linéaires des trois variables clés (T, P, t) sont très significatifs. Les effets quadratiques de la température ( $T^2$ ) et de la puissance ultrasonique ( $P^2$ ) présente également une influence significative mais moins importante que les effets linéaires.

L'absence des effets significatifs des termes croisés ( $P \times T$  ;  $T \times t$  ;  $P \times t$ ) suggère l'absence d'interactions entre les variables. Les données expérimentales obtenues à partir du PCC ont permis de déterminer une relation empirique reliant la réponse étudiée (rendement d'absolue) et les variables clés impliquées dans le modèle (en unités codées). Ainsi, une équation polynomiale de second degré est obtenue:

$$Y = 4,81 - 0,030T - 0,102P - 0,157t + 0,002 T^2 + 0,92 \times 10^{-3} P^2$$

Où, Y représente le rendement d'absolue (exprimée en g par 100 g MS), P représente la puissance ultrasonore utilisée, t est le temps de sonication et T est la température dans les unités codées. Seules les variables significatives sont présentées ( $p < 0,05$ ). Le modèle utilisé semble être adéquat avec nos résultats expérimentaux au niveau de confiance de 95%. Plus de 89% de la variabilité des réponses est expliqué ( $R^2 > 0,890$ ), affirmant de bonnes précision et capacité du modèle établi dans les limites des gammes utilisées (Mirhosseini, Tan, Hamid, & Yusof, 2007).

Tableau IV.2: Analyse de variance du rendement d'absolue du modèle statistique.

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carrés moyens</i>	<i>Ratio-F</i>	<i>Valeur-p</i>
A: temperature	0,0789702	1	0,0789702	26,99	<b>0,0004</b>
B: Puissance	0,0539701	1	0,0539701	18,45	<b>0,0016</b>
C: Temps	0,0633429	1	0,0633429	21,65	<b>0,0009</b>
AA	0,0188115	1	0,0188115	6,43	<b>0,0296</b>
AB	0,00056448	1	0,00056448	0,19	0,6698
AC	0,00149605	1	0,00149605	0,51	0,4909
BB	0,0195737	1	0,0195737	6,69	<b>0,0271</b>
BC	0,00220448	1	0,00220448	0,75	0,4057
CC	0,00645025	1	0,00645025	2,20	0,1684
Erreur Totale	0,0292591	10	0,00292591		
Total	0,267839	19			

$$R^2 = 0,890$$

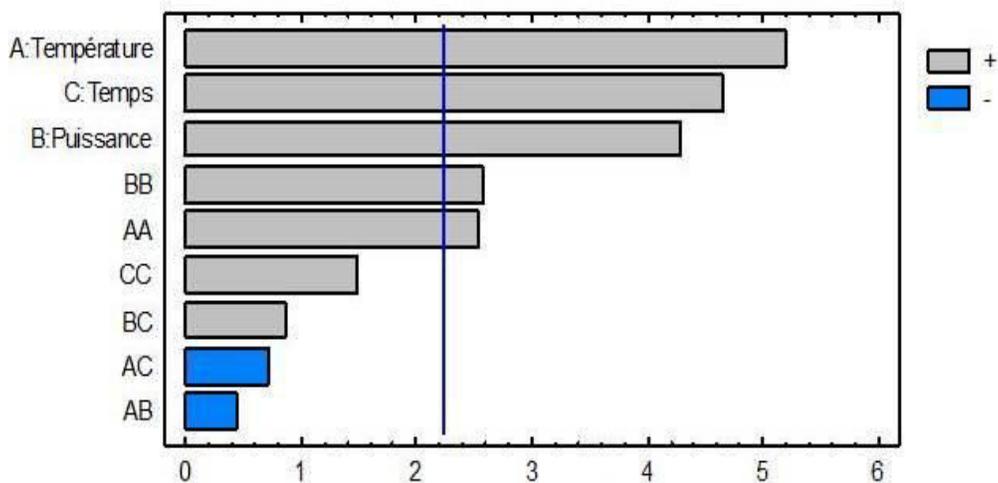


Figure IV.1: Diagramme de Pareto présentant l'influence standardisée de chaque effet.

#### IV.3.1.2 Optimisation de l'extraction aux ultrasons

Une représentation graphique peut être introduite afin de visualiser la surface de réponse des effets combinés des variables obtenues pour la réponse étudiée (rendement d'absolue).

La Figure IV.2 représente la surface en trois dimensions, chaque surface mettant en évidence le comportement de réponse de deux variables avec la troisième variable fixée à son point central. Les variables les plus influentes sont les termes linéaires de la température (T), du temps de sonication (t) et de la puissance ultrasonique (P): le rendement d'absolue augmente quand la température, le temps de sonication et la puissance augmentent. L'effet quadratique de la puissance ultrasonique ( $P^2$ ) et de la température ( $T^2$ ) est illustré sur ces surfaces, mais avec une moindre influence telle qu'il est observé dans le diagramme de Pareto (présence de faible courbure de la surface lorsque la température et la puissance augmentent).

Les paramètres optimaux (Figure IV.2) pour maximiser le rendement d'absolue sont de 98,63 W pour la puissance, 50,18 °C pour la température et 22 min pour le temps. Le rendement d'absolue (8,31 g d'absolue par 100 g MS de thym) prédit par le modèle est vérifié expérimentalement puisque le rendement le plus élevé est obtenu en utilisant les paramètres optimisés avec une valeur de 5,92 g/100 g MS.

Ceci montre l'importance de l'optimisation des paramètres quand une modification est effectuée sur un ou plusieurs paramètres tels que le rapport solide/liquide, la température ou le solvant. Les absolues sont obtenues et optimisées par l'extraction aux ultrasons, montrant la viabilité de cette procédure avec des rendements élevés utilisant l'huile de tournesol comme solvant.

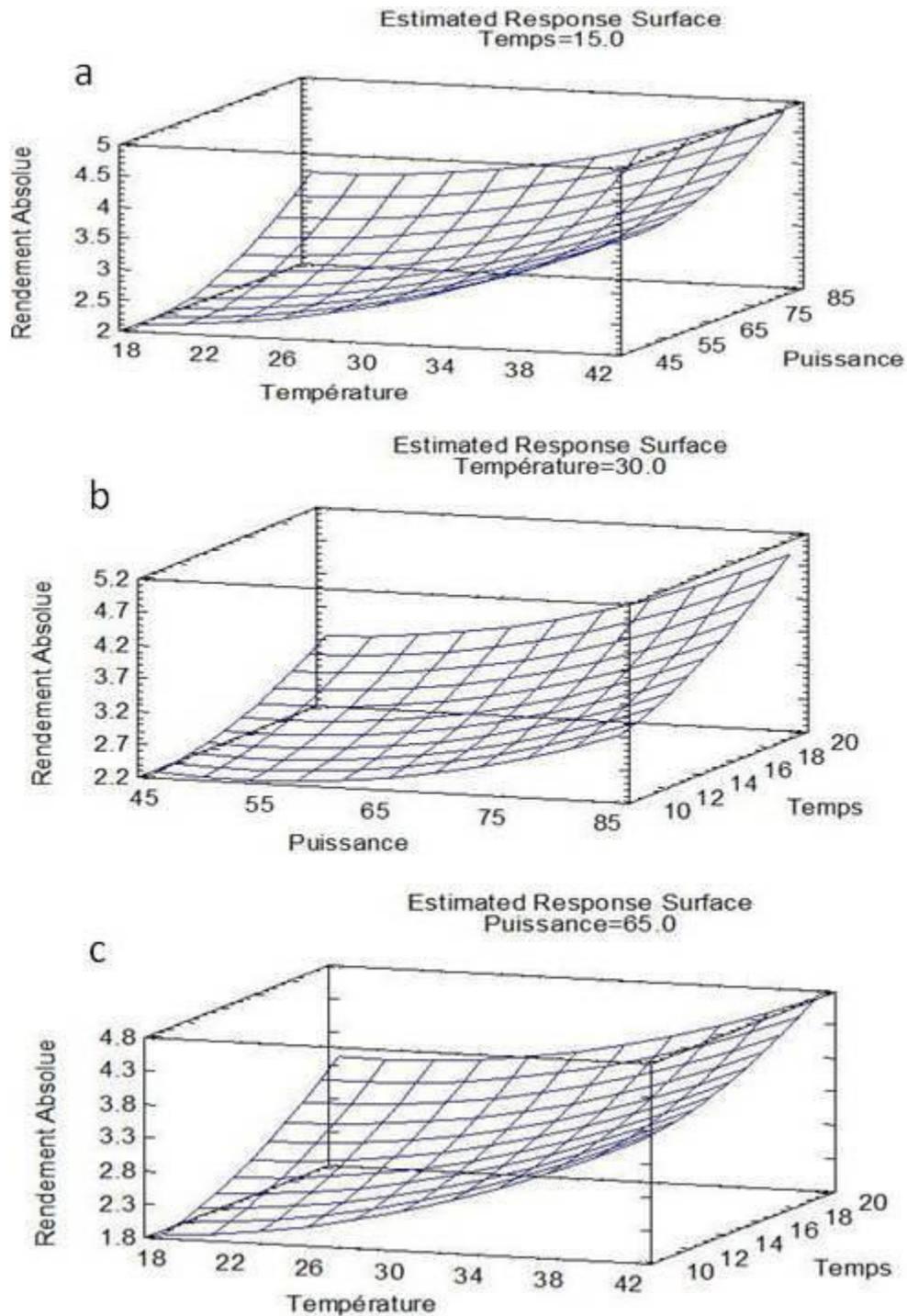


Figure IV.2: Optimisation de l'extraction aux ultrasons avec l'huile de tournesol des rendements d'absolues: Etude de la surface de réponse: (a) Rendement d'absolu en fonction de la température et de la puissance, (b) Rendement d'absolu en fonction du temps et de la puissance et (c) Rendement d'absolu en fonction de la température et du temps.

### IV.3.2 Etude de cinétique

Afin d'évaluer l'effet de l'extraction aux ultrasons dans les conditions optimales obtenues à partir de la méthode de surface de réponse, une étude comparative est réalisée entre les méthodes HT-US et HT-CV (Figure IV.3). À 20 min, la phase d'extraction commence à atteindre un plateau, indiquant la fin des deux procédés d'extraction. D'après la Figure IV.3, il est possible de constater que l'extraction aux ultrasons permet une augmentation de rendement d'absolue de plus de 47% par rapport à l'extraction conventionnelle (4,03 et 5,93 g d'absolue par 100 g MS pour HT-CV et HT-US respectivement). La comparaison montre une nette amélioration de l'extraction, qui est attribuée à la cavitation ultrasonore, puisque c'est la seule variable de traitement qui diffère dans les deux expériences. Ce résultat montre que l'extraction aux ultrasons permet l'obtention d'un meilleur rendement qui est en accord avec les différentes études (Samaram, Mirhosseini, Tan, & Ghazali, 2014; Vinatoru, 2001). En effet, l'implosion des bulles de cavitation de la sonde à ultrasons détruit les glandes de la plante aromatique, libère leurs contenus dans le milieu et augmente par conséquent leur rendement d'extraction (Pan et al., 2011; Veillet, Tomao & Chemat, 2010).

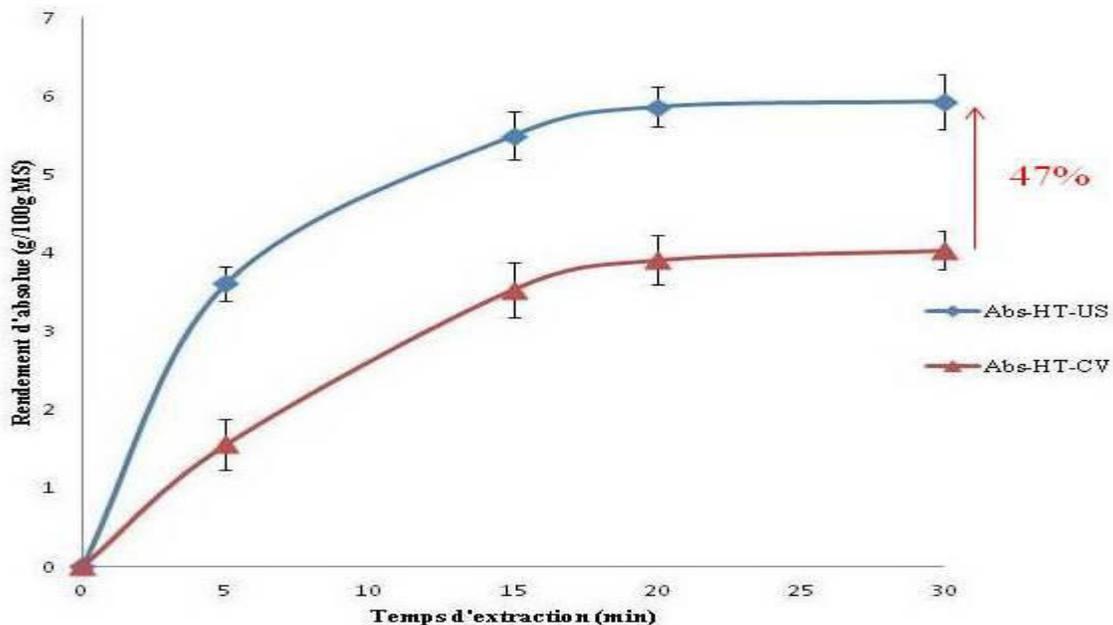


Figure IV.3: Comparaison entre les extractions conventionnelles (CV-▲) et aux ultrasons (US-◆).

### IV.3.3 Rendements et qualité des absolues

Les rendements d'absolue obtenus par les méthodes HT-US et HT-CV à 30 min sont comparés à ceux extraits par l'hexane (Hex-CV) (Tableau IV.3). Le rendement d'absolue le plus élevé est obtenu par l'Abs-Hex-CV avec une valeur de 8,64 g/100 g MS, suivi par l'Abs-HT-US (5,93 g/100 g MS), tandis que l'Abs-HT-CV a le rendement le plus faible (4,03 g/100 g MS).

Bien que l'extraction à l'hexane ait donné un rendement élevé, l'absolue obtenue par ce procédé contient encore environ 74,27% de composés cireux. Les cires sont détectées par précipitation dans une solution éthanolique en dessous de -1 °C pendant 12 heures. En fait, leur solubilité limitée rend l'absolue trouble et par conséquent inappropriée pour certaines formulations. Bien que la filtration soit effectuée pour éliminer la majorité des cires, un pourcentage élevé est observé. En effet, différentes études indiquent que l'absolue n'est pas totalement dépourvue de cires lors de son extraction par des solvants tel que le pentane ou l'hexane (Prakash et al., 2012; Rout, Naik, Rao, Jadeja, & Maheshwari, 2007; Rout et al., 2011, 2010). Toutefois, dans les absolues obtenues par les deux extractions à l'huile de tournesol, les cires ne sont pas détectées, après congélation des solutions éthanoliques d'absolues.

En conséquence, l'absolue obtenue par l'hexane fournit le rendement le plus élevé, mais présente une qualité inférieure à celles obtenues par les deux extractions à l'HT. L'huile de tournesol utilisée comme solvant naturel permet l'obtention d'une absolue totalement décirée et qui est plus appropriée dans les formulations d'agroalimentaire et de parfumerie.

Tableau IV.3: Rendements des absolues obtenues par les différentes méthodes d'extraction.

	Rendement $\pm$ ET*(g/100 g MS)
Abs-Hex-CV	8,64 $\pm$ 0,23
Abs-HT-US	5,93 $\pm$ 0,35
Abs-HT-CV	4,03 $\pm$ 0,25

\* Ecart-type

#### **IV.3.4 Identification par GC-FID et GC-MS**

L'analyse GC-MS est réalisée pour identifier les extraits de thym et comparer les performances des différentes méthodes d'extraction (Tableau IV.4).

Dans les HE obtenues par hydrodistillation, 19 composés qui constituent 97% de l'HE sont identifiés. Le thymol est le composé principal représentant 50,2% de l'HE suivie par le p-cymène (23,5%), le carvacrol (3,7%) et le linalol (3,6%). Ces résultats sont en accord avec les différentes études montrant que ces constituants sont les principaux composés, le thymol étant le plus majoritaire dans l'HE de thym (Ghasemi Pirbalouti et al., 2013; Golmakani & Rezaei, 2008; Grigore et al., 2010; Shabnum & Wagay, 2011).

Dans les extraits de thym obtenus par l'extraction au Soxhlet, deux composés sont identifiés. Le thymol est le composant principal (84,9%), suivi par le p-cymène (15,1%) représentant 100% de l'extrait. Dawidowicz et al., (2008) ont rapporté également la présence de ces deux composés lors de l'extraction réalisée par Soxhlet en utilisant l'hexane comme solvant.

Dans l'absolue extraite par Hex-CV, deux phénols monoterpéniques sont identifiés représentant 85,6% de l'extrait. Le thymol constitue le composé majeur (79,6%), suivi par le carvacrol (6,0%).

L'analyse GC-MS des absolues obtenues par HT-US identifie trois composés majoritaires qui constituent 88,8% de l'extrait. Le thymol est le composant principal représentant 80,5%, suivi par le carvacrol (5,7%). La présence du linalol (2,6%) est également observée.

L'analyse GC-MS de l'absolue obtenue par la méthode HT-CV a montré aussi la présence de ces deux phénols monoterpéniques représentant 63,4% de l'extrait, mais avec des proportions inférieures en thymol (59,7%) et en carvacrol (3,7%) comparées aux autres absolues.

Une variation considérable dans la composition des absolues par rapport aux composés de l'huile essentielle est observée. Les terpènes détectés dans l'HE sont presque absents dans les fractions d'absolues. Il est probable que ces composants ont une meilleure volatilité dans l'eau lors de la distillation et sont par conséquent accumulés dans l'HE. Cependant, les méthodes d'extraction des absolues permettent une faible récupération de ces composants, ce qui pourrait être dû à leur faible solubilité dans les différents solvants utilisés ou à leur dégradation au cours des procédés d'extraction. En outre, les résultats montrent une augmentation de plus de 1,5 fois de thymol dans les Abs-HT-US et Abs-Hex-CV et une légère augmentation dans l'Abs-HT-CV. La plus forte concentration de thymol, un phénol monoterpène dans le thym qui joue un rôle important dans

l'activité biologique globale de la plante ou de ses extraits (Hudaib, Speroni, Di Pietra, & Cavrini, 2002), est observée dans l'absolue obtenue par les ultrasons (80,5%), tandis que la teneur la plus faible est trouvée dans l'HE (50,2%). En fait, les extractions des absolues sont effectuées à une température modérée par rapport à l'hydrodistillation, où une température élevée est exigée provoquant la dégradation de thymol. En effet, Reverchon & De Marco, (2006) ont rapporté que la température élevée au cours de la distillation peut dégrader les composants des huiles essentielles tels que le thymol, résultant en une concentration plus faible.

Par conséquent, les méthodes d'extraction des absolues sont sélectives pour les phénols monoterpènes à la différence de l'hydrodistillation, qui a montré une moindre sélectivité des composés de l'HE. Cela montre également que le thymol a une bonne solubilité dans les différents solvants utilisés soit par l'HT/éthanol ou par l'Hex/éthanol pour les extractions des absolues.

Par rapport à l'extraction au Soxhlet, la composition des phénols monoterpéniques est légèrement supérieure dans les absolues traitées par ultrasons (86,2% et 84,9% pour l'Abs-HT-US et ES respectivement). La teneur élevée de thymol (84,9%) dans ES peut être expliquée par la température moyenne utilisée par le procédé de Soxhlet.

Parmi les absolues, une variation modérée est observée dans la composition chimique de l'Abs-HT-US et l'Abs-HT-CV par rapport à l'Abs-Hex-CV. Plus précisément, le profil obtenu dans l'Abs-HT-US est relativement similaire à celui présenté par l'Abs-Hex-CV puisque les deux méthodes ont récupéré environ la même quantité de thymol (80,5% et 79,6% pour Abs-HT-US et Abs-Hex-CV respectivement). La méthode HT-CV a permis une plus faible extraction de ce composé (59,7%).

Les résultats montrent l'efficacité et la sélectivité des ultrasons avec l'huile de tournesol comme solvant à extraire les phénols monoterpéniques (thymol et carvacrol) donnant un extrait plus pur. La température contrôlée utilisée dans l'extraction des ultrasons a favorisé la récupération de ces composés thermosensibles. Ainsi, la technologie d'ultrasons utilisant l'huile de tournesol comme solvant est la meilleure méthode d'extraction puisqu'aucune variation remarquable dans la composition chimique de l'absolue est observée comparée à la méthode conventionnelle à l'hexane.

Tableau IV.4: Composition chimique des extraits de thym (huile essentielle, extrait Soxhlet et absolues) par GC-MS.

Composés	Huile essentielle (% ± ET)	Extrait Soxhlet (% ± ET)	Abs-Hex-CV (% ± ET)	Abs-HT-US (% ± ET)	Abs-HT-CV (% ± ET)
alpha thujene*	-	-	-	-	-
alpha pinene*	0,5 ± 0,1	-	-	-	-
Camphene	0,4 ± 0,1	-	-	-	-
beta pinene	-	-	-	-	-
Myrcene	0,5 ± 0,1	-	-	-	-
alpha terpinene	0,5 ± 0,1	-	-	-	-
Limonene	0,4 ± 0,0	-	-	-	-
cineol 1,8 gamma	1,2 ± 0,1	-	-	-	-
terpinene	2,5 ± 0,1	-	-	-	-
para cymene	23,5 ± 0,3	15,1 ± 0,2	-	-	-
1-octen-3-ol	0,5 ± 0,0	-	-	-	-
Camphre	1,3 ± 0,5	-	-	-	-
Linalool	3,6 ± 0,3	-	-	2,6 ± 0,1	-
acetate	-	-	-	-	-
isobornyl	-	-	-	-	-
thymol	-	-	-	-	-
methylether	-	-	-	-	-
beta	-	-	-	-	-
caryophyllene*	1,8 ± 0,4	-	-	-	-
carvacrol	-	-	-	-	-
methylether*	0,7 ± 0,0	-	-	-	-
terpinen-1-ol-4*	1,4 ± 0,1	-	-	-	-
alpha terpineol	0,6 ± 0,1	-	-	-	-
Borneol	1,7 ± 0,1	-	-	-	-
delta cadinene	-	-	-	-	-
gamma cadinene	-	-	-	-	-
beta	-	-	-	-	-
caryophyllene	-	-	-	-	-
oxide	2,0 ± 0,2	-	-	-	-
eugenol*	-	-	-	-	-
Thymol	50,2 ± 0,1	84,9 ± 1,6	79,6 ± 1,1	80,5 ± 1,3	59,7 ± 0,7
Carvacrol	3,7 ± 0,1	-	6,0 ± 0,4	5,7 ± 0,2	3,7 ± 0,1
Total	97,0	100,0	85,6	88,8	63,4

ET: Ecart-type

L'absence d'un composé est indiquée par "-"

\*Composés sont élués sur la colonne VF-1

### IV.3.5 Composés phénoliques totaux

Les valeurs des composés phénoliques totaux (CPT) des absolues obtenues par les différentes méthodes d'extraction sont présentées dans le Tableau IV.5. La teneur en phénols la plus élevée est observée dans l'Abs-HT-US avec une valeur de 171,22 mg d'équivalents thymol/g. L'Abs-Hex-CV a un teneur inférieure (123,53 mg d'équivalents thymol/g), tandis que l'Abs-HT-CV a montré la plus faible teneur en phénols totaux (73,64 mg d'équivalents thymol/g).

Différentes études sur les extraits de thym ont montré leurs riches contenus en phénols et flavonoïdes (Chizzola et al., 2008; Roby et al., 2013; Zeghad & Merghem, 2013).

La teneur la plus élevée en phénols de l'Abs-HT-US pourrait être attribuée au thymol et au carvacrol contenus dans sa composition (86,2%), suivie par l'Abs-Hex-CV (85,6%) alors que l'Abs-HT-CV possède la teneur la plus faible (63,4%). Elle pourrait être également liée à la présence d'autres composés phénoliques observés dans l'Abs-HT-US, qui contribueraient à augmenter son activité antioxydante.

Ce résultat permet de conclure que l'extraction aux ultrasons n'a pas dégradé les phénols; au contraire, les teneurs ont augmenté par rapport aux échantillons non traités par ultrasons. En effet, la dégradation des phénols par ultrasons est normalement lente en comparaison avec d'autres composés aromatiques volatils qui diffusent plus facilement dans les bulles de cavitation pour la décomposition (Chowdhury & Viraraghavan, 2009).

Tableau IV.5: Composés phénoliques totaux des absolues obtenues par les différentes méthodes d'extraction.

	CPT équivalents thymol (mg/g)*
Abs-Hex-CV	123,53 ± 1,11
Abs-HT-US	171,22 ± 0,71
Abs-HT-CV	73,64 ± 0,95

Les valeurs sont les moyennes ± Ecart-type (n=3).

### IV.3.6 DPPH

La capacité des absolues à donner un atome d'hydrogène est testée en utilisant le radical libre stable DPPH. Le Tableau IV.6 montre le pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les différentes concentrations des absolues. L'activité de piégeage est dépendante des concentrations pour toutes les absolues étudiées. Toutes les absolues sont capables de réduire le radical stable 2,20-diphényl-1-picrylhydrazyl libre (DPPH) en diphenylpicrylhydrazine jaune. Plus la

décoloration est forte, plus l'activité antioxydante est élevée, reflétant une EC<sub>50</sub> plus basse (Tableau IV.6).

Les absolues traitées aux ultrasons ont une EC<sub>50</sub> plus faible (0,95 mg/mL), représentant une meilleure activité antioxydante de ces échantillons par rapport à l'activité des extraits obtenus par les extractions Hex-CV (1,80 mg/mL) et HT-CV (2,03 mg/mL).

Ceci est en accord avec sa forte concentration en composés phénoliques, confirmant la corrélation connue entre l'activité antioxydante et CPT (Artajo, Romero, Morelló, & Motilva, 2006).

L'activité antioxydante de ces extraits pourrait être principalement attribuée aux phénols monoterpéniques, qui représentent les principaux constituants des absolues. Il est possible d'observer que l'activité antioxydante des absolues est principalement dépendante de la teneur en thymol dans leur composition. En effet, différentes études ont montré la forte activité antioxydante de ce composé (Aman, Moin, Owais, & Siddiqui, 2013; Esmaili & Khodadadi, 2012), ce qui est en accord avec nos résultats.

Par conséquent, l'extraction aux ultrasons avec l'huile de tournesol est une méthode efficace pour l'extraction des absolues donnant des extraits de forte capacité antioxydante.

Tableau IV.6: Activité antioxydante des absolues à des différentes concentrations mesurées par la méthode DPPH.

	Inhibition du DPPH (% ± ET*)						EC <sub>50</sub> (mg/mL)
	0,25 mg/mL	0,5 mg/mL	0,75 mg/mL	1 mg/mL	1,25 mg/mL	1,5 mg/mL	
Abs-HT-US	14,61±0,86	31,28 ±0,33	41,34± 1,62	50,70± 0,95	61,83±0,55	77,59± 1,48	0,95
Abs- Hex-CV	19,40 ± 2,54	35,31± 0,70	44,05± 0,66	53,72± 0,50	65,00± 1,40	75,14± 1,86	1,80
Abs-HT-CV	15,24± 0,99	25,01± 1,32	40,09± 0,11	49,19± 1,32	60,79± 0,09	70,72± 0,59	2,03

\*ET: Ecart-type

### IV.3.7 Test de friture

L'utilisation possible des extraits de thym dans le processus de friture pour prolonger la durée de vie de l'huile de tournesol et des oléo-concrètes obtenues par US et CV est réalisée par le suivi des valeurs de matériaux polaires totaux (TPM) pendant les séances de chauffage à 180 °C. Le Tableau IV.7 montre les heures de chauffage nécessaires pour atteindre une valeur de TPM de tolérance maximale de 25% dans l'huile de tournesol sans extraits de thym (utilisés comme contrôle), et les autres échantillons. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence entre les heures de friture de l'huile de tournesol (contrôle), ceux de leurs mélanges avec les extraits de thym et les échantillons d'oléo-concrètes, puisque leurs valeurs de TPM sont atteintes à une durée de chauffage proche de celle de l'échantillon de contrôle. L'ajout de n'importe quel extrait de thym n'a pas amélioré la durée de vie de l'huile de tournesol. Cela pourrait être expliqué par le processus prolongé de chauffage qui a causé la dégradation des antioxydants naturels (Roldangutierrez et al., 2008; Tomaino et al., 2005).

Tableau IV.7: Heures de friture pour une valeur de TPM de 25% pour les échantillons de l'huile de tournesol.

	HT	OC-US	OC-CV	HT+HE	HT+Abs- Hex-CV	HT+Abs- SO-US	HT+Abs- HT-CV
Heures de Friture pour 25% de TPM (h)	12	12	10	12	12	11	12

HT: Huile de tournesol utilisée comme contrôle

OC-US: Oléo-concrète obtenue par ultrasons

OC-CV: Oléo-concrète obtenue par extraction conventionnelle

HT+HE: Huile de tournesol + huile essentielle de thym

HT+Abs-Hex-CV: Huile de tournesol + absolue obtenue par l'extraction à l'hexane

HT+Abs-HT-US: Huile de tournesol + absolue obtenue par ultrasons avec l'huile de tournesol

HT+Abs-HT-CV: Huile de tournesol + absolue obtenue par extraction conventionnelle avec l'huile de tournesol

#### **IV.4. Conclusion**

Une extraction verte est toujours utile et stimulante avec quelques modifications dans la composition chimique et les caractéristiques des molécules d'un extrait. La technique ultrasons utilisant l'huile de tournesol comme solvant offre des avantages importants par rapport aux méthodes HT-CV et Hex-CV: une durée d'extraction plus courte, une bonne sélectivité et une meilleure extraction des phénols monoterpéniques, une pure absolue exempte de composés cireux et de résidus de solvants organiques présentant de plus forte activité antioxydante. De plus, la technique aux ultrasons est plus efficace que d'autres méthodes d'extraction conventionnelles telles que l'hydrodistillation car elle permet de résoudre la plupart de ses inconvénients à savoir: une longue durée d'extraction, une consommation d'eau importante, l'obtention de faibles rendements, la faible sélectivité du procédé et la dégradation thermique des composés. Elle réduit également l'utilisation des déchets et des solvants pétroliers utilisés dans les extractions à l'hexane et au Soxhlet donnant lieu à un arôme plus pur, plus fidèle et proche de l'odeur naturelle de la plante cible. L'utilisation de l'huile de tournesol comme solvant naturel avec l'éthanol facilite l'utilisation industrielle pour l'absolue comme un ingrédient naturel dans les formulations alimentaires. Ainsi, cette nouvelle approche écologique est d'un grand intérêt de la chimie verte. Elle offre une bonne alternative à l'extraction conventionnelle; elle peut être utilisée pour l'extraction des composés à haute valeur à partir d'un grand nombre de plantes aromatiques qui sont largement destinées à l'agroalimentaire mais aussi pourquoi pas à la parfumerie. Cela suggère la possibilité de production d'absolues « vertes » en utilisant la technologie des ultrasons à l'échelle pilote et industrielle.

## Références bibliographiques

Aman, S., Moin, S., Owais, M., & Siddiqui, M. U. (2013). Antioxidant activity of thymol: protective role in AAPH-induced hemolysis in diabetic erythrocytes. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 2, 55–60.

Armenta, S., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2008). Green Analytical Chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(6), 497–511.

Artajo, L. S., Romero, M. P., Morelló, J. R., & Motilva, M. J. (2006). Enrichment of Refined Olive Oil with Phenolic Compounds: Evaluation of Their Antioxidant Activity and Their Effect on the Bitter Index. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 6079–6088.

Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*, 28, 25–30.

Casal, S., Malheiro, R., Sendas, A., Oliveira, B. P. P., & Pereira, J. A. (2010). Olive oil stability under deep-frying conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2972–2979.

Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835.

Chizzola, R., Michitsch, H., & Franz, C. (2008). Antioxidative Properties of *Thymus vulgaris* Leaves: Comparison of Different Extracts and Essential Oil Chemotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 6897–6904.

Chowdhury, P., & Viraraghavan, T. (2009). Sonochemical degradation of chlorinated organic compounds, phenolic compounds and organic dyes – A review. *Science of The Total Environment*, 407(8), 2474–2492.

Dawidowicz, A., Rado, E., Wianowska, D., Mardarowicz, M., & Gawdzik, J. (2008). Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. *Talanta*, 76(4), 878–884.

Esmaeili, A., & Khodadadi, A. (2012). Antioxidant activity of a solution of thymol in ethanol. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 14(7), 14–18.

García-Risco, M. R., Vicente, G., Reglero, G., & Fornari, T. (2011). Fractionation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) by supercritical fluid extraction and chromatography. *The Journal of Supercritical Fluids*, 55(3), 949–954.

Ghasemi Pirbalouti, A., Hashemi, M., & Ghahfarokhi, F. T. (2013). Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, 48, 43–48.

Golmakani, M.T., & Rezaei, K. (2008). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*, 109(4), 925–930.

Goodner, K. L., Mahattanatawee, K., Plotto, A., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2006). Aromatic profiles of *Thymus hyemalis* and Spanish *T. vulgaris* essential oils by GC–MS/GC–O. *Industrial Crops and Products*, 24(3), 264–268.

Grigore, A., Paraschiv, I., Colceru-Mihul, S., Bubueanu, C., Draghici, E., & Ichim, M. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. volatile oil obtained by two different methods. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(4), 5436–5443.

Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A. M., & Cavrini, V. (2002). GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29(4), 691–700.

Kačániová, M., Vukovič, N., Hleba, L., Bobková, A., Pavelková, A., Rovná, K., & Arpášová, H. (2012). Antimicrobial and antiradicals activity of *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* essential oils. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(1), 263–271.

Kowalski, R., & Wawrzykowski, J. (2009). Effect of ultrasound-assisted maceration on the quality of oil from the leaves of thyme *Thymus vulgaris* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 24(2), 69–74.

Lee, S.J., Umamo, K., Shibamoto, T., & Lee, K.G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91(1), 131–137.

Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., & Chemat, F. (2013). Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 47, 1–11.

Lorimer, J. P., & Mason, T. J. (1987). Sonochemistry. Part 1-The physical aspects. *Chemical Society Reviews* 16, 239.

Mirhosseini, H., Tan, C., Hamid, N., & Yusof, S. (2007). Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil on flavor release from diluted orange beverage emulsion. *Food Chemistry*, 107, 1161–1172.

Ozcan, E. (2006). Ultrasound assisted extraction of phenolics from grape pomace. Middle East Technical University, The graduate School of Natural and Applied Sciences, Ph.d., Chemical Engineering, Ankara.

- Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G. G., & McHugh, T. H. (2011). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(5), 1249–1257.
- Pavela, R., Vrchotová, N., & Tříška, J. (2009). Mosquitocidal activities of thyme oils (*Thymus vulgaris* L.) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, *105*(5), 1365–1370.
- Prakash, O., Rout, P. K., Chanotiya, C. S., & Misra, L. N. (2012). Composition of essential oil, concrete, absolute and SPME analysis of *Tagetes patula* capitula. *Industrial Crops and Products*, *37*(1), 195–199.
- Priestley, C. M., Williamson, E. M., Wafford, K. A., & Sattelle, D. B. (2003). Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA<sub>A</sub> receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *British Journal of Pharmacology*, *140*(8), 1363–1372.
- Remy, C. (2004). Narcissus in perfumery. In: Hanks, G.H. (Ed.), *Narcissus and Daffodil: The Genus Narcissus*. Taylor and Francis e-library, London, p. 452.
- Reverchon, E., & De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, *38*(2), 146–166.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A.H., & Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, *43*, 827–831.
- Rodriguez, J., Melo, E. C., Mulet, A., & Bon, J. (2013). Optimization of the antioxidant capacity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) extracts: Management of the convective drying process assisted by power ultrasound. *Journal of Food Engineering*, *119*(4), 793–799.
- Roldangutierrez, J., Ruizjimenez, J., & Luquedecastro, M. (2008). Ultrasound-assisted dynamic extraction of valuable compounds from aromatic plants and flowers as compared with steam distillation and superheated liquid extraction. *Talanta*, *75*(5), 1369–1375.
- Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, *19*(7), 681–687.
- Rout, P. K., Naik, S. N., Rao, Y. R., Jadeja, G., & Maheshwari, R. C. (2007). Extraction and composition of volatiles from *Zanthoxylum rhesta*: Comparison of subcritical CO<sub>2</sub> and traditional processes. *The Journal of Supercritical Fluids*, *42*(3), 334–341.
- Rout, P. K., Naik, S., & Rao, Y. R. (2011). Liquid CO<sub>2</sub> extraction of flowers and fractionation of floral concrete of *Michelia champaca* Linn. *The Journal of Supercritical Fluids*, *56*(3), 249–252.

- Rout, P. K., Sahoo, D., & Misra, L. N. (2010). Comparison of extraction methods of *Mimusops elengi* L. flowers. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 678–680.
- Samaram, S., Mirhosseini, H., Tan, C. P., & Ghazali, H. M. (2014). Ultrasound-assisted extraction and solvent extraction of papaya seed oil: Crystallization and thermal behavior, saturation degree, color and oxidative stability. *Industrial Crops and Products*, 52, 702–708.
- Shabnum, S., & Wagay, M. G. (2011). Essential oil composition of *Thymus Vulgaris* L. and their uses. *J Res Develop*, 11, 83–90.
- Singleton, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology Viticulture*, 16 (3), 144–158.
- Soxhlet, F. (1879). *Dinglers' Polytechnic Journal* 232, 461.
- Tomaiolo, A., Cimino, F., Zimbalatti, V., Venuti, V., Sulfaro, V., De Pasquale, A., & Saija, A. (2005). Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry*, 89(4), 549–554.
- Veillet, S., Tomao, V., & Chemat, F. (2010). Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. *Food Chemistry*, 123(3), 905–911.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 303–313.
- Virot, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. C. G., & Chemat, F. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6), 1066–1074.
- Xia, T., Shi, S., & Wan, X. (2006). Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion. *Journal of Food Engineering*, 74(4), 557–560.
- Yang, Y.-C., Wei, M.-C., & Hong, S.-J. (2014). Ultrasound-assisted extraction and quantitation of oils from *Syzygium aromaticum* flower bud (clove) with supercritical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A*, 1323, 18–27.
- Yen, G. C., & Duh, P. D. (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *J. Agric. Food Chem*, 42, 629–632.
- Zeghad, N., & Merghem, R. (2013). Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus vulgaris* L. *Medicinal and Aromatic Plant Research Journal*, 1(1), 5–11.

## **Conclusion générale et perspectives**

Les objectifs de nos travaux de recherche ont consisté en l'éco-extraction et la valorisation des produits naturels des plantes, ainsi qu'en l'optimisation et l'application de nouvelle approche écologique telle que les ultrasons pour l'extraction des composés aromatiques. Les études visaient à contribuer aux principes de la chimie verte en réduisant les temps d'extraction, en diminuant la consommation des solvants pétroliers, en réduisant les pertes et les déchets organiques et en assurant des extraits naturels de qualité supérieure pouvant remplacer les produits synthétiques dans différents domaines industriels.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux extraits des plantes de la famille des Alliées (ail, oignon, ciboule, poireau, échalote et ciboulette) qui sont largement réparties à l'échelle mondiale et constituent une partie importante dans notre alimentation. Ces plantes sont bien connues pour leurs propriétés médicinales. Par contre, leurs huiles essentielles ne sont pas bien évaluées malgré leur importance économique.

Les HE sont obtenues par turbo hydrodistillation, l'utilisation d'un agitateur électrique équipé de lames a favorisé et accéléré leurs extractions étant donné que ces dernières sont difficilement distillables. La présence des composés soufrés dans la composition chimique des HE leur confère de bonnes propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Les huiles essentielles de l'échalote et du poireau exercent l'activité antioxydante la plus élevée, tandis que celles de l'ail, de l'oignon, et de la ciboule montrent la plus forte activité antimicrobienne. Par conséquent, les différentes HE étudiées peuvent être utilisées comme des alternatives aux composés synthétiques dans le secteur agroalimentaire et bien d'autres. Des analyses plus approfondies des composés actifs présents dans leurs fractions seraient nécessaires afin de révéler des propriétés biologiques intéressantes.

Dans un deuxième temps, bien que la turbo hydrodistillation soit une technique conventionnelle pour l'obtention des huiles essentielles, nous nous sommes intéressés aux sous-produits obtenus au cours de l'extraction qui sont normalement considérés comme déchets et sont de ce fait éliminés après distillation. Suite à notre étude sur les plantes des Alliées, notre recherche est menée sur l'oignon qui est bien apprécié dans le monde entier et connu pour ses diverses vertus. La plupart de ses caractéristiques est associée à sa richesse en phénols et flavonoïdes. Afin de conserver ces extraits, nous avons étudié l'effet de la turbo hydrodistillation sur l'extraction de

ces composés. Ainsi, cette technique permet, en même temps que l'obtention des huiles essentielles, une bonne extraction des composés phénoliques (95,86% des phénols et 55,94% des flavonoïdes) utilisant l'eau comme solvant naturel. Cette technologie offre la possibilité d'extraction de 68,90 mg de l'huile essentielle, 1500 mg de flavonoïdes et 8925 mg de phénols par rapport à un kg d'oignon frais. Ces produits sains et naturels peuvent intéresser différents secteurs de l'industrie surtout le domaine agroalimentaire. De même, cette technique «verte» peut être utilisée sur une grande variété de plantes qui sont riches en composés phénoliques afin d'éviter leur perte et de les valoriser.

Dans un troisième temps, nous avons développé une nouvelle approche écologique utilisant les ultrasons et l'huile de tournesol comme solvant naturel pour l'extraction des composés aromatiques, les concrètes et les absolues. Les études sont menées sur le thym de la famille des Lamiacées. Le thym est très largement utilisé dans la région méditerranéenne, en raison de ses différentes propriétés biologiques intéressantes. Ainsi, notre recherche est conduite sur l'optimisation de l'extraction d'«éco-absolues» de thym par ultrason dans de l'huile de tournesol. La nouvelle approche verte s'est montrée très efficace et sélective dans l'extraction des monoterpènes phénols, avec la teneur la plus élevée en thymol (80,5%) parmi les absolues et les huiles essentielles obtenues par extraction classique à l'hexane et par hydrodistillation respectivement. L'absolue obtenue par cette méthode offre la meilleure activité antioxydante et elle est dépourvue de cire ainsi que de résidus de solvants organiques. Cette nouvelle approche verte, efficace et rapide, pourrait être utilisée à l'échelle pilote et industrielle sur un grand nombre de plantes aromatiques destinées à l'agroalimentaire et qui peuvent de même intéresser d'autres secteurs industriels tels que la parfumerie, l'aromathérapie, etc.

## Liste des Figures

	Page
<b>Figure I.1:</b> Représentation des structures des terpènes et des terpénoïdes.	7
<b>Figure I.2:</b> Structure des composés aromatiques dérivés de phénylpropane.	8
<b>Figure I.3:</b> Extraction par distillation à la vapeur.	9
<b>Figure I.4:</b> Extraction par hydrodistillation.	10
<b>Figure I.5:</b> Extraction par turbo hydrodistillation.	11
<b>Figure I.6:</b> Extraction par expression à froid.	11
<b>Figure I.7 :</b> Extraction aux ultrasons: bac et sonde.	13
<b>Figure I.8:</b> Extraction sans solvant assistée par micro-ondes.	14
<b>Figure I.9:</b> Extraction par détente instantanée contrôlée	15
<b>Figure I.10:</b> Méthode de disque.	27
<b>Figure I.11:</b> Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.	29
<b>Figure II.1:</b> Extraction des huiles essentielles par turbo hydrodistillation.	51
<b>Figure II.2:</b> Etude de l'activité antimicrobienne par la méthode de disque.	53
<b>Figure II.3:</b> Structure des principaux composés des huiles essentielles de l'ail, de l'oignon, du poireau, de la ciboule, de l'échalote et de la ciboulette.	64
<b>Figure II.4:</b> Valeurs des matériaux polaires totaux au cours du processus de friture à 180 °C de l'huile de tournesol.	74
<b>Figure III.1:</b> Profil température-temps au cours de la turbo hydrodistillation d'oignons.	87
<b>Figure III.2:</b> Rendements en huiles essentielles obtenues à des différentes périodes d'extraction.	88
<b>Figure III.3:</b> Cinétique des rendements de la matière sèche de la phase aqueuse pendant la turbo hydrodistillation de 180 min.	89
<b>Figure III.4:</b> Cinétique de valeurs de CPT de la phase aqueuse pendant le processus de la turbo hydrodistillation.	90
<b>Figure III.5:</b> Bilan de matière des phénols extraits des échantillons d'oignon pendant le processus de turbo hydrodistillation.	91
<b>Figure IV.1:</b> Diagramme de Pareto présentant l'influence standardisée de chaque effet.	115
<b>Figure IV.2:</b> Optimisation de l'extraction aux ultrasons avec l'huile de tournesol des rendements d'absolues: Etude de la surface de réponse.	116
<b>Figure IV.3:</b> Comparaison entre les extractions conventionnelles (CV-▲) et aux ultrasons (US-◆).	117

## **Liste des Tableaux**

	Page
<b>Tableau I.1:</b> Emploi des huiles essentielles et leurs constituants en tant qu'antioxydants en agroalimentaire.	23
<b>Tableau I.2:</b> Emploi des huiles essentielles et leurs constituants en tant qu'antimicrobiens en agroalimentaire.	32
<b>Tableau II.1:</b> Composition chimique des huiles essentielles de l'ail, de l'oignon, du poireau, de la ciboule, de l'échalote et de la ciboulette.	58
<b>Tableau II.2:</b> Propriétés et symptômes des bactéries testées.	66
<b>Tableau II.3:</b> Activités antibactériennes des huiles essentielles de l'ail, l'oignon, le poireau, la ciboule, l'échalote, la ciboulette et le contrôle positif après 48h.	67
<b>Tableau II.4:</b> Les composés phénoliques totaux des huiles essentielles de l'ail, de l'oignon, du poireau, de la ciboule, de l'échalote, de la ciboulette et du contrôle positif BHT.	71
<b>Tableau II.5:</b> Activité antioxydante des huiles essentielles de l'ail, de l'oignon, du poireau, de la ciboule, de l'échalote, de la ciboulette et du BHT à des différentes concentrations mesurées par la méthode DPPH.	73
<b>Tableau III.1:</b> Principaux composés d'oignon HE analysés par GC-MS.	88
<b>Tableau III.2:</b> Les flavonoïdes et les composés phénoliques totaux (CPT) des échantillons d'oignons obtenus dans des différentes périodes de turbo hydrodistillation.	96
<b>Tableau IV.1:</b> Variables impliquées dans le plan composite centré et les réponses obtenues pour les rendements d'absolues.	108
<b>Tableau IV.2:</b> Analyse de variance du rendement d'absolue du modèle statistique.	114
<b>Tableau IV.3:</b> Rendements des absolues obtenues par les différentes méthodes d'extraction.	118
<b>Tableau IV.4:</b> Composition chimique des extraits de thym (huile essentielle, extrait Soxhlet et absolues) par GC-MS.	121
<b>Tableau IV.5:</b> Composés phénoliques totaux des absolues obtenues par les différentes méthodes d'extraction.	122
<b>Tableau IV.6:</b> Activité antioxydante des absolues à des différentes concentrations mesurées par la méthode DPPH.	123
<b>Tableau IV.7:</b> Heures de friture pour une valeur de TPM de 25% pour les échantillons de l'huile de tournesol.	124

## **Liste des Abréviations**

A : Absorbance  
AA : Activité Antioxydante  
AAPH : 2,2'-Azobis (2Amidinopropane) Dihydrochloride  
Abs-Hex-CV : Absolues obtenues par Extraction Conventiennelle à l'Hexane  
Abs-HT-CV : Absolues obtenues par Extraction Conventiennelle à l'Huile de Tournesol  
Abs-HT-US : Absolues obtenues par Extraction aux Ultrasons avec l'Huile de Tournesol  
ABTS<sup>•+</sup> : 2,2'-Azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonique  
AFNOR : Association Francaise de Normalisation  
AFSSAPS : Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé  
AMDIS : *Automatical Mass Spectral Deconvolution and Identification System*  
ANOVA : Analyse de Variance  
AOC : Appellation d'Origine Contrôlée  
ATCC : *American Type Culture Collection*  
Aw: Activité de l'eau  
BHT : Butylhydroxytoluène  
CMB : Concentration Minimale Bactéricide  
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice  
CPT : Composés Phénoliques Totaux  
d : Densité  
DPPH : 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl  
EAG : Équivalents Acide Gallique  
EQ : Équivalents Quercétine  
ERO : Espèces Réactives Oxygénées  
ES : Extraits de Soxhlet  
ET : Écart-Type  
FDA : Food and Drug Administration  
Fe : Fer  
FID : Détecteur à Ionisation de Flamme  
FRAP : *Ferric reducing Antioxidant Power*  
GC-MS : Chromatographie en Phase Gazeuse - Spectrométrie de Masse  
GRAS : *Generally Recognized as Safe*  
H<sub>2</sub> : Hydrogène  
HE: Huile Essentielle

Hex: Hexane  
Hex-CV : Extraction Conventiennelle à l'Hexane  
HPLC : Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance  
HT : Huile de Tournesol  
HT-CV : Extraction Conventiennelle à l'Huile de Tournesol  
HT-US : Extraction aux Ultrasons à l'Huile de Tournesol  
IP : Indice de Peroxyde  
IpA : Indice de para-Anisidine  
ISO : Organisation internationale de normalisation  
KMF : Kaempférol  
MDA : Dialdéhyde Malonique  
MeOH : Méthanol  
MS : Matière Sèche  
MSR : Méthodologie en Surface de Réponse  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : Carbonate de Sodium  
OC : Oléo-Concrète  
OC-CV: Oléo-Concrète obtenue par Extraction Conventiennelle  
OC-US: Oléo-Concrète obtenue par Ultrasons  
ORAC : *Oxygen Radical Absorbance Assay*  
p: Niveau de Probabilité (statistiques)  
P: Puissance Ultrasonique  
PCC : Plan Composite Centré  
Q3G : Quercétine-3-Monoglucoside  
Q4G : Quercétine-4'-Monoglucoside  
QA : Quercétine Aglycone  
QDG : Quercétine-3,4'-Diglucoside  
QT : Quercétine Totale  
RI : Indices de Rétention  
RPE : Résonance paramagnétique électronique  
Sr-TBA : Substance Réactive Acide Thiobarbiturique  
T : Température  
t: Temps  
TEAC : *Trolox Equivalent Antioxydant Capacity*

THD : Turbo hydrodistillation

Totox : *Total Oxydation Value*

TPM : Matériaux Polaires Totaux

TPTZ-Fe<sup>3</sup> : Tripyridyltriazine Ferrique

TRAP : *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*

TVC : *Total Viable Count*

UFC : Unité Formant Colonie

UICPA : Union Internationale de la Chimie Pure et Appliquée

US : Ultrasons

UV : Ultraviolet

## **Résumé**

## Résumé

Les huiles essentielles et les arômes des plantes constituent un réel potentiel pour l'industrie dans le but de substituer aux composés synthétiques ayant des effets néfastes sur la santé et l'environnement. Afin de contribuer aux principes de la chimie verte, cette étude porte sur l'éco-extraction et la valorisation des extraits naturels des plantes et le développement d'une nouvelle technologie «verte» pour l'extraction des composés aromatiques naturels.

La première partie de ce manuscrit met en évidence les propriétés biologiques des huiles essentielles et des arômes et l'importance de leurs applications dans différents domaines surtout le domaine agroalimentaire.

Dans la deuxième partie, les études sur les propriétés biologiques des huiles essentielles des plantes des Alliaceés montrent leurs bonnes activités antioxydantes et antimicrobiennes.

Ces résultats encourageants ont permis dans la troisième partie de valoriser les sous-produits d'oignon issus de la turbo hydrodistillation et qui sont considérés normalement comme déchets. La technique offre une bonne extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes utilisant l'eau comme solvant naturel.

La quatrième et la dernière partie de ce travail s'est orientée vers l'optimisation et le développement d'une technologie «verte» utilisant les ultrasons et l'huile de tournesol comme solvant naturel pour l'extraction des composés aromatiques du thym. Cette nouvelle approche écologique permet l'extraction des absolues dépourvues de cire et des résidus de solvants pétroliers, contenant la teneur la plus élevée en thymol et exerçant la plus forte activité antioxydante.

**Mots-clés:** Extraction, huiles essentielles et arômes, activité antioxydante, turbo hydrodistillation, ultrasons, solvants alternatifs, chimie verte.

## Abstract

Plant essential oils and aromas are a real potential for the industry to substitute the synthetic compounds that might have harmful effects on the human health and the environment. In order to contribute to the green chemistry principles, this study focuses on the “eco-extraction” and valorization of natural plant extracts and the development of a new «green» technology for the extraction of aromatic compounds.

The first part of this manuscript highlights the biological properties of the essential oils and aromas and the importance of their applications in various sectors especially in the food industry. In the second part, studies on the biological properties of the essential oils from plants of the Alliaceae family show their good antioxidant and antimicrobial activities.

These encouraging results have allowed in the third part to evaluate the onion by-products resulting from the turbo hydrodistillation, which are normally considered as waste. The technique offers a good extraction of flavonoids and phenols using water as natural solvent.

The fourth and final part of this work deals with the optimization and the development of a «green» technology using ultrasound and sunflower oil as a natural solvent for the extraction of aromatic compounds from thyme. This new ecological approach allows the extraction of absolutes free from waxes and petroleum solvent residues, having the highest content in thymol and exerting the strongest antioxidant activity.

**Keywords:** Extraction, essential oils and aromas, antioxidant activity, turbo hydrodistillation, ultrasounds, alternative solvents, green chemistry.