



*République Algérienne Démocratique et Populaire*

*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

**Université L'Arbi Ben M'Hidi, Oum-El Bouaghi**

Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie

**Département des Sciences de la Nature et de la Vie**

N° d'ordre.....

N° de série.....

## **Mémoire**

Présenté pour l'obtention du diplôme de

## **MASTER**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Option : Biochimie appliquée**

**Thème**

*Évaluation de l'effet de l'ajout d'huile essentielle de Rosmarinus officinalis sur les paramètres de qualité et de prédiction de la durée de conservation du yaourt*

**Présenté par :**

**Mehri Maroua**

**Bouakaz Chahrazed**

**Allag Djihene**

**Devant le jury :**

**Président : Mourad Boudjouraf    MCA    Université d'Oum EL Bouaghi**

**Rapporteur : Wissam Mazouz    MAA    Université d'Oum El Bouaghi**

**Examineur : Samira Malki    MCA    Université d'Oum El Bouaghi**

**Année universitaire : 2022-2023**

## **(Page sans bordure externe) Résumé (1) langue du mémoire + mots clés**

Dans cette étude, nous avons exploré l'utilisation des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* comme conservateur alimentaire naturel, en mettant l'accent sur leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications dans la préservation des aliments.

D'après nos résultats, il est concluant que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* peut être efficacement utilisée comme agent de conservation pour le yaourt.

Nos recherches ont clairement démontré les propriétés conservatrices remarquables de cette huile essentielle sur le yaourt, avec une activité inhibitrice significative contre les microorganismes responsables de la détérioration de ce produit alimentaire

**Mots clés :** *Rosmarinus officinalis*, conservateur alimentaire, effet antibactérien

## **Résumé (2) Une deuxième langue + mots clés**

### **Abstract :**

In this study, we explored the use of *Rosmarinus officinalis* essential oils as a natural food preservative, focusing on their antimicrobial properties and applications in food preservation.

According to our results, it is conclusive that *Rosmarinus officinalis* essential oil can be effectively employed as a preservative agent for yogurt.

Our research has clearly demonstrated the remarkable preservative properties of this essential oil on yogurt, with significant inhibitory activity against the microorganisms responsible for the deterioration of this food product.

**Key words :** *Rosmarinus officinalis*, preservative agent, antibacterial effect

## *Remerciement*

*Tout d'abord, J'aimerais remercier Dieu de m'avoir donné la volonté et la patience pour mener à terme ce travail.*

*La création de ce mémoire a été un véritable plaisir et une belle découverte, et il n'aurait jamais pu voir le jour sans l'aide de plusieurs personnes que je tiens à remercier ici :*

*Nous souhaitons exprimer ma profonde gratitude à Mademoiselle MAZOUZ Wissam, Maitre assistant A au département de sciences de la nature et de la vie -université d'Oum El Bouaghi- pour avoir accepté de superviser ce mémoire.*

*Nous tenons à remercier dans le même contexte Mr. Boudjouraf Mourad maitre de conférence A au département de sciences de la nature et de la vie -université d'Oum El Bouaghi- et Mademoiselle Samira Malki maitre de conférence A au département de sciences de la nature et de la vie -université d'Oum El Bouaghi- pour avoir accepté examiner ce modeste travail .*

*Merci infiniment*

## **Introduction générale**

### **Résultats et Discussion**

<b>I- Matériel végétal – <i>Rosmarinus officinalis</i></b>	<b>3</b>
<b>II- Extraction des molécules bioactives</b>	<b>5</b>
<b>II-3- Extraction des huiles essentielles</b>	<b>10</b>
<b>II-3-1- Rendement des huiles essentielles</b>	<b>12</b>
<b>III- Détermination des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles</b>	<b>12</b>
<b>IV- Détermination des propriétés organoleptiques</b>	<b>14</b>
<b>V- Analyse qualitative des huiles essentielles par ultra-violet</b>	<b>15</b>
<b>VI- Évaluation de l'activité antibactérienne et ses applications</b>	<b>16</b>
<b>VI- 1- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)</b>	<b>17</b>
<b>VI- 1- 1- Méthode de microplaque avec résazurine</b>	<b>17</b>
<b>VI- 1- 1- 1- Protocole expérimental</b>	<b>18</b>
<b>IV-1-1-1- Les souches bactériennes</b>	<b>18</b>
<b>VI-1-1-1-2- Milieux de culture et solvants</b>	<b>19</b>
<b>VI-1-1-1-3- Test de la résazurine en microplaque</b>	<b>19</b>
<b>VI-3- Évaluation du potentiel de conservation des aliments d'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i></b>	<b>21</b>
<b>VI-3-1- Préparation du yaourt</b>	<b>21</b>

### **Résultats et Discussion**

<b>I- Détermination des propriétés physico-chimiques et organoleptiques</b>	<b>23</b>
<b>I-1- Détermination des propriétés physico-chimiques</b>	<b>23</b>
<b>I-2- Détermination des propriétés organoleptiques</b>	<b>23</b>
<b>II- Analyse qualitative par spectroscopie UV-Visible</b>	<b>24</b>
<b>III- Activité antibactérienne et détermination du CMI</b>	<b>25</b>
<b>IV- Evaluation de l'effet conservateur de l'huile essentielle</b>	<b>26</b>

### **Conclusion**

***Introduction  
générale***

## INTRODUCTION GENERALE

L'utilisation des huiles essentielles en tant que conservateurs alimentaires naturels a suscité un intérêt croissant en raison de leurs propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et antifongiques. Ces huiles sont extraites de plantes et contiennent divers composés bioactifs tels que les terpènes, les phénols et les esters. Leur utilisation remonte à l'Antiquité, où elles étaient utilisées pour préserver les aliments et améliorer leur qualité sensorielle.

La recherche scientifique a confirmé les propriétés conservatrices des huiles essentielles, en en faisant des alternatives naturelles aux conservateurs alimentaires synthétiques. Des études ont démontré leur capacité à inhiber la croissance de microorganismes responsables de la détérioration des aliments, tels que les bactéries, les levures et les moisissures. Cette action antimicrobienne est attribuée à leur capacité à perturber la membrane cellulaire des microorganismes, à inhiber leur croissance et à altérer leur métabolisme.

En plus de leur action antimicrobienne, les huiles essentielles possèdent également des propriétés antioxydantes. Elles peuvent neutraliser les radicaux libres responsables de l'oxydation des aliments, ce qui contribue à prolonger leur durée de conservation et à maintenir leur qualité nutritionnelle. De plus, elles apportent des arômes et des saveurs agréables aux produits alimentaires, ce qui ajoute une dimension sensorielle appréciée.

L'utilisation des huiles essentielles comme conservateurs alimentaires naturels présente plusieurs avantages. Elles sont d'origine naturelle, répondant ainsi à la demande croissante des consommateurs en faveur de produits alimentaires plus naturels et sains. De plus, elles sont considérées comme des alternatives plus durables et respectueuses de l'environnement par rapport aux conservateurs chimiques synthétiques.

Cependant, il est important de souligner que l'utilisation des huiles essentielles comme conservateurs alimentaires nécessite une compréhension approfondie de leurs propriétés, de leur composition et de leurs interactions avec les aliments. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les concentrations optimales, les conditions d'application et les effets sur les caractéristiques organoleptiques des aliments.

Dans cette étude, nous avons exploré l'utilisation des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* comme conservateur alimentaire naturel, en mettant l'accent sur leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications dans la préservation des aliments. Nous avons adopté une approche méthodologique IMRAD (Introduction, Méthodes, Résultats et Discussion) pour

## ***INTRODUCTION GENERALE***

présenter notre travail et partager nos résultats. Cette structure nous a permis de fournir une introduction complète, de décrire nos méthodes expérimentales, de présenter nos résultats et de les discuter, et enfin de conclure sur les principales conclusions et les perspectives de recherche future.

*Matériels et  
Méthodes*

Dans cette section, nous présenterons en détail les méthodes que nous avons utilisées dans notre étude pour atteindre nos objectifs. Nous décrirons en profondeur les procédures expérimentales ainsi que les techniques que nous avons employées. De plus, nous fournirons une explication approfondie des concepts et des définitions essentiels liés à notre domaine de recherche.

### **I- Matériel végétal – *Rosmarinus officinalis* - :**

*Rosmarinus officinalis*, également connu sous le nom de romarin, est une plante herbacée aromatique appartenant à la famille des Lamiacées. Originaire de la région méditerranéenne, le romarin est largement cultivé et utilisé à des fins culinaires, médicinales et aromatiques.

Cette plante présente de petites feuilles persistantes et étroites, souvent recouvertes d'un duvet argenté. Elle produit de petites fleurs bleu-violet ou blanches, qui ajoutent une touche décorative à la plante. Le romarin est apprécié pour son parfum distinctif, à la fois frais et boisé.

Le romarin est utilisé depuis des siècles dans la cuisine pour aromatiser une variété de plats, notamment les viandes, les poissons, les sauces et les marinades. Ses feuilles peuvent être utilisées fraîches ou séchées, et elles ajoutent une saveur intense et parfumée aux préparations culinaires.

En plus de son utilisation culinaire, le romarin est également réputé pour ses propriétés médicinales. Il contient des composés actifs tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques et les terpènes, qui lui confèrent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Le romarin est souvent utilisé en phytothérapie pour soulager les troubles digestifs, stimuler la circulation sanguine, améliorer la mémoire et favoriser la relaxation.

Sur le plan aromatique, l'huile essentielle de romarin est populaire dans l'industrie des parfums et des produits de soins personnels. Son parfum frais et vivifiant est souvent utilisé dans les produits capillaires, les lotions et les savons.



**Figure 1 :** *Rosmarinus officinalis*

### **I- 1- Taxonomie du *Rosmarinus officinalis* :**

La classification taxonomique du *Rosmarinus officinalis* est comme se suit :

**Règne :** Plantae (Plantes)

**Division :** Magnoliophyta (Plantes à fleurs)

**Classe :** Magnoliopsida (Dicotylédones)

**Ordre :** Lamiales

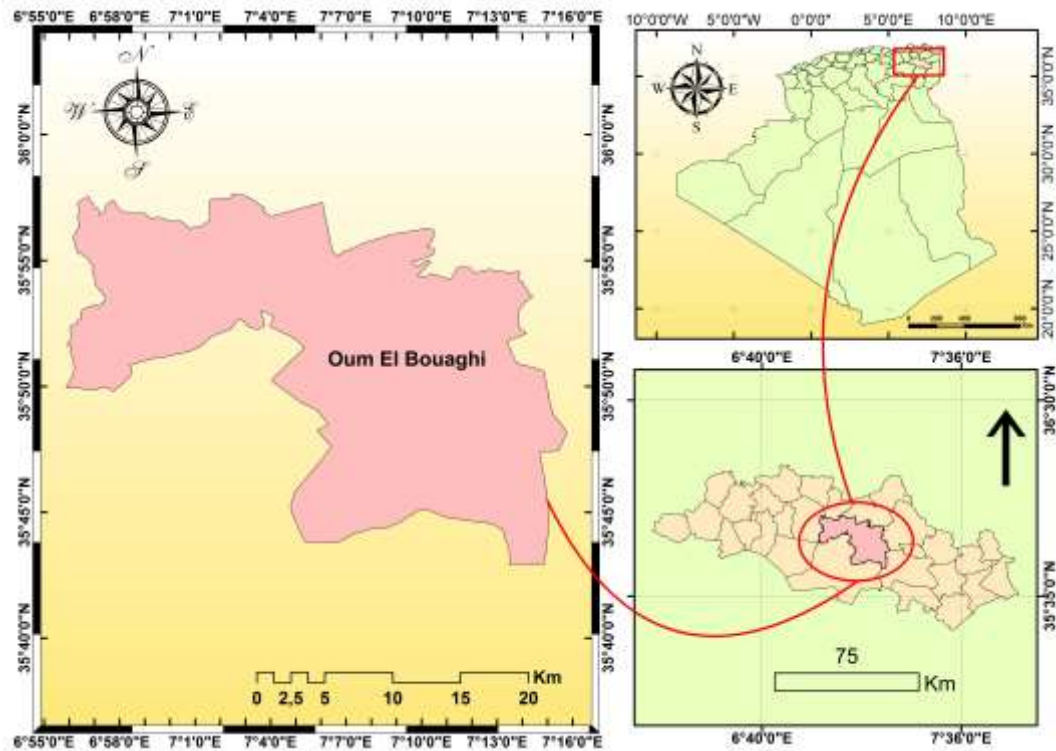
**Famille :** Lamiaceae (Lamiacées)

**Genre :** *Rosmarinus*

**Espèce :** *Rosmarinus officinalis*

### **I-2- Collecte du matériel végétal :**

Les parties aériennes de *Rosmarinus officinalis* ont été collectées dans la région d'Oum El Bouaghi (Est de l'Algérie) en Février 2023. Après la récolte de la plante, celle-ci a été séchée naturellement à température ambiante (environ 24°C) dans un environnement sombre et sec. Pour faciliter l'extraction, le matériel végétal a été finement broyé en poudre à l'aide d'un moulin électrique afin d'augmenter la surface d'interaction entre le solide et le solvant. Par la suite, la poudre a été conservée dans un flacon en vue d'une utilisation ultérieure.



**Figure 2 :** Localisation géographique d'Oum El Bouaghi

### II- Extraction des molécules bioactives :

L'extraction des molécules bioactives est une étape cruciale dans divers domaines, notamment la pharmacie, la nutraceutique et la recherche sur les produits naturels. Elle implique l'isolement et la purification de composés biologiquement actifs à partir de sources naturelles telles que les plantes, les microorganismes et les organismes marins.

Ces molécules bioactives possèdent des propriétés thérapeutiques potentielles, antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et d'autres propriétés bénéfiques.

Le processus d'extraction vise à obtenir une forme concentrée et pure des composés bioactifs souhaités à partir de la matrice complexe du matériau source. Plusieurs techniques d'extraction sont utilisées, notamment l'extraction par solvant, la distillation à la vapeur, l'extraction par fluide supercritique et l'extraction en phase solide. Chaque méthode présente ses avantages et limites, et le choix de la technique d'extraction dépend de facteurs tels que la nature des composés ciblés, leur solubilité, leur stabilité et leur faisabilité économique.

Ces dernières années, l'intérêt pour l'extraction des molécules bioactives a augmenté en raison de leurs applications potentielles dans diverses industries. Celles-ci comprennent le

développement de nouveaux médicaments, d'aliments fonctionnels, de compléments alimentaires et de produits naturels pour les cosmétiques et les soins personnels. Dans notre recherche, nous nous sommes concentrés sur l'extraction des huiles essentielles. Avant d'entrer dans les détails de la méthode d'extraction, nous présentons une brève revue de littérature sur les huiles essentielles.

### **II- 1- Les huiles essentielles :**

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés volatils extraits de plantes. Elles sont largement utilisées en raison de leurs propriétés thérapeutiques, aromatiques et cosmétiques. Dans cette revue, nous examinerons la classification, la biosynthèse et l'intérêt des huiles essentielles, en nous appuyant sur des références scientifiques pertinentes.

#### **II-1-1- Classification des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles peuvent être classées en différentes catégories en fonction de leur composition chimique et de leurs caractéristiques botaniques. Certaines classifications courantes incluent :

- ✓ Les huiles essentielles à base de terpènes,
- ✓ Les huiles essentielles à base de phénols,
- ✓ Les huiles essentielles à base d'esters,
- ✓ Les huiles essentielles à base d'alcools, etc.

Chaque catégorie présente des propriétés spécifiques qui influencent leurs utilisations et leurs effets.

#### **II-1-2- Biosynthèse des huiles essentielles :**

La biosynthèse des huiles essentielles est un processus complexe qui se déroule dans les cellules spécialisées des plantes, appelées cellules glandulaires. Les composés volatils sont synthétisés à partir de précurseurs métaboliques tels que les acides aminés, les acides gras et les isoprénoides. Différentes voies de biosynthèse sont impliquées, telles que la voie du mévalonate et la voie du méthylérythritol phosphate. La régulation génétique et environnementale joue un rôle essentiel dans la production et la diversité des composés présents dans les huiles essentielles.

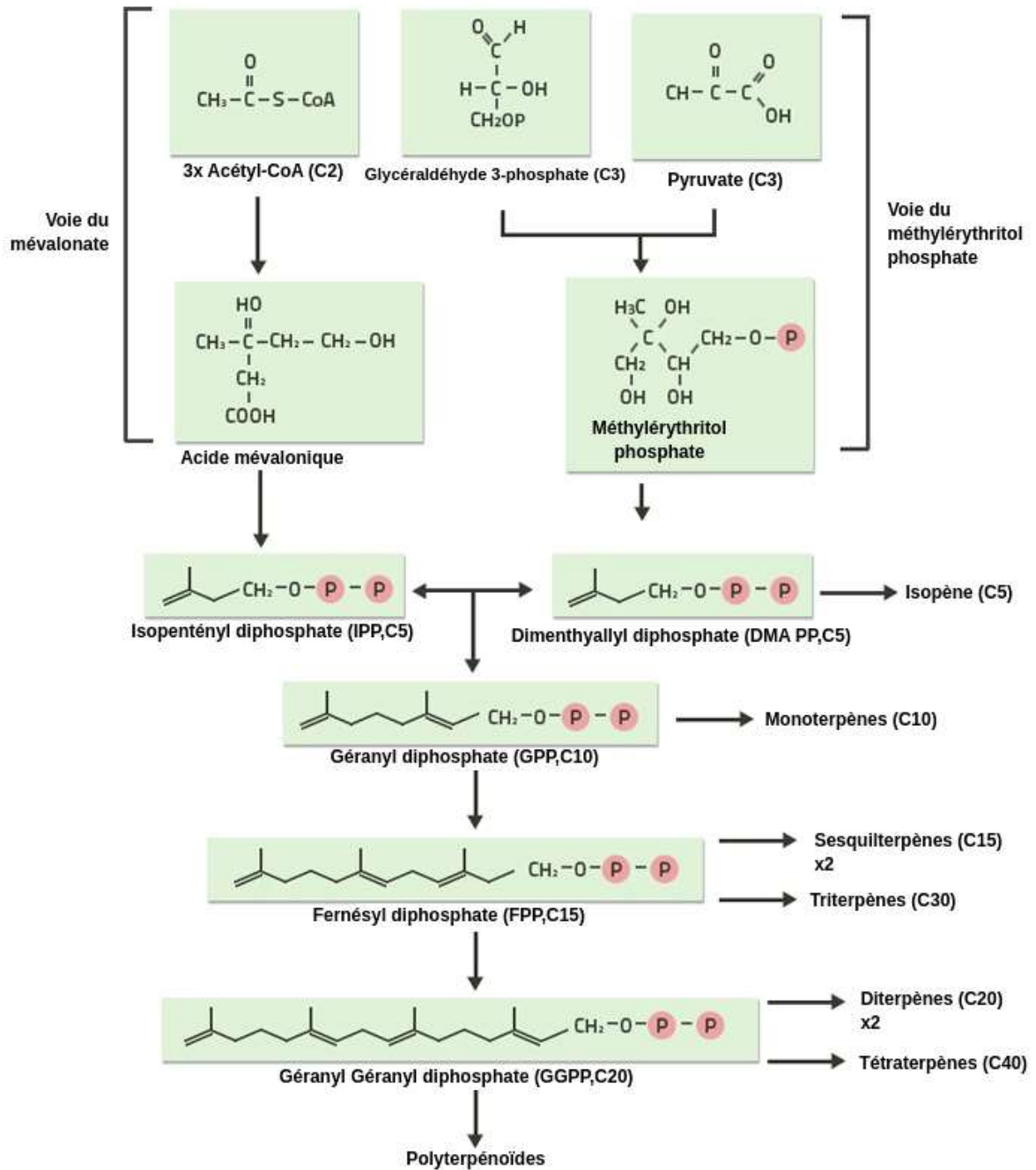


Figure 3: biosynthèse des terpénoïdes

### II-1-3- Intérêt des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont utilisées depuis des siècles pour leurs propriétés thérapeutiques et médicinales. Elles sont largement utilisées en aromathérapie pour soulager divers troubles tels que le stress, les problèmes respiratoires, les douleurs musculaires, etc. De plus, les huiles essentielles sont utilisées dans l'industrie cosmétique pour leurs propriétés aromatiques et leurs effets bénéfiques sur la peau et les cheveux. Elles peuvent également être utilisées comme agents antimicrobiens et antioxydants naturels dans l'industrie alimentaire.

### II-1-4- Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Les huiles essentielles peuvent être extraites à partir de plantes et de matières végétales par différentes méthodes d'extraction. Voici quelques-unes des méthodes couramment utilisées:

✓ **Distillation par entraînement à la vapeur** : C'est la méthode d'extraction la plus courante pour les huiles essentielles. Elle consiste à faire passer de la vapeur d'eau à travers les plantes, ce qui entraîne l'évaporation des composés volatils. La vapeur est ensuite refroidie et condensée pour former un mélange d'huile essentielle et d'eau, qui est ensuite séparé par décantation.

✓ **Expression à froid** : Cette méthode est principalement utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes tels que les oranges, les citrons et les pamplemousses. Elle implique de presser les écorces des fruits pour libérer les huiles essentielles qui s'y trouvent. Les huiles essentielles sont collectées à partir de la surface de l'eau de pressage.

✓ **Extraction par solvant** : Cette méthode est utilisée lorsque les composés volatils ne peuvent pas être extraits par distillation. Elle implique l'utilisation d'un solvant organique tel que l'éther de pétrole, l'hexane ou l'éthanol pour dissoudre les huiles essentielles des plantes. Le solvant est ensuite évaporé, laissant derrière lui les huiles essentielles.

✓ **Extraction par CO<sub>2</sub> supercritique** : Cette méthode utilise le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) dans un état supercritique, c'est-à-dire à une température et une pression spécifiques où il se comporte à la fois comme un gaz et comme un liquide. Le CO<sub>2</sub> supercritique agit comme un solvant pour extraire les huiles essentielles sans laisser de résidus de solvant. C'est une méthode respectueuse de l'environnement et qui préserve mieux les composés volatils.

✓ **Enfleurage** : Cette méthode traditionnelle est utilisée pour extraire les huiles essentielles des fleurs délicates et fragiles telles que le jasmin et la rose. Les fleurs sont placées sur une couche de graisse animale ou végétale, qui absorbe les huiles essentielles pendant

## ***MATERIAL ET METHODES***

plusieurs jours. Ensuite, la graisse est saturée d'huiles essentielles, qui sont ensuite extraites avec de l'alcool.

Ces méthodes d'extraction des huiles essentielles ont leurs avantages et leurs limites, et le choix de la méthode dépend des propriétés spécifiques des plantes et des composés ciblés. Il est important de prendre en compte la qualité, la pureté et l'efficacité des huiles essentielles extraites lors de leur utilisation dans différents domaines tels que la médecine, la cosmétique et l'industrie alimentaire

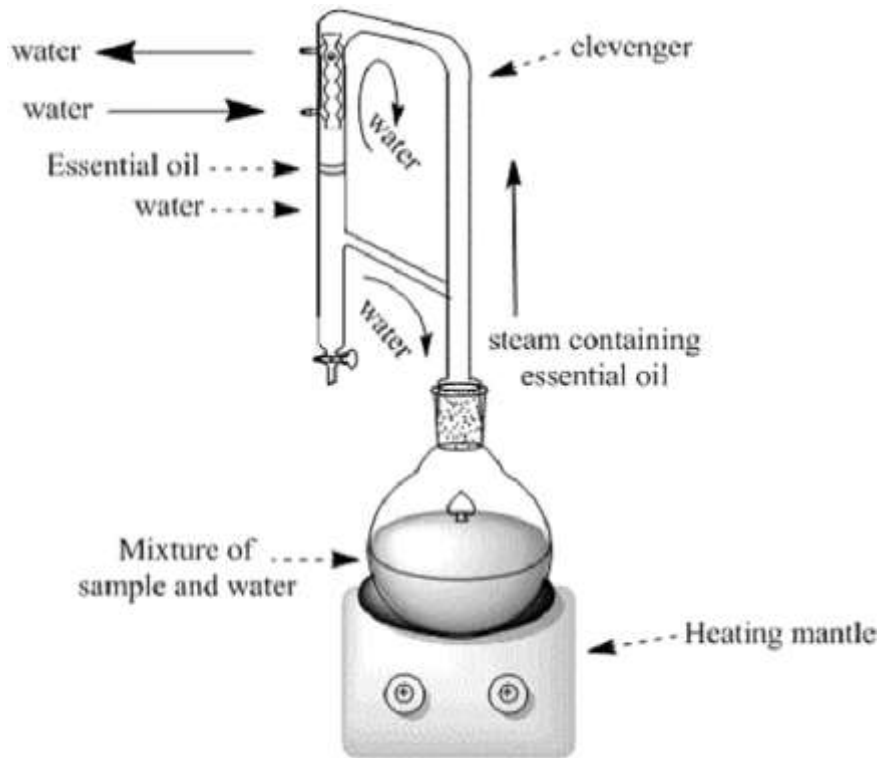
### II-3- Extraction des huiles essentielles :

Pour extraire les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*, nous avons utilisé la méthode d'hydrodistillation. L'hydrodistillation est une méthode d'extraction des huiles essentielles à partir de plantes aromatiques. Le principe de l'hydrodistillation repose sur la vaporisation des composés volatils présents dans les plantes par la vapeur d'eau.

#### II-3-1- Protocol expérimental :

Le processus d'hydrodistillation que nous avons suivi est le suivant :

- ✓ Tout d'abord, nous avons nettoyé le Clevenger à l'acétone et l'avons rincé à l'eau distillée pour éliminer toute poussière ou graisse pouvant contaminer l'huile essentielle lors du processus.
- ✓ Ensuite, nous avons préparé notre matériel végétal en utilisant uniquement des écorces d'orange écrasées. Nous avons utilisé 50 grammes de matière végétale que nous avons complètement immergée dans l'eau.
- ✓ Nous avons placé le matériel végétal dans un ballon, rempli d'eau, qui était ensuite placé sur une source de chaleur, comme un chauffe-ballon.
- ✓ Le mélange d'eau et de matériel végétal a été porté à ébullition et maintenu à cette température pendant 3 heures. Pendant ce temps, les composés volatils de l'écorce d'orange se sont évaporés avec la vapeur d'eau.
- ✓ Les vapeurs chargées d'huile essentielle ont traversé un condenseur, où elles ont été refroidies et sont retombées dans une ampoule à décanter.
- ✓ L'huile essentielle s'est séparée de l'eau dans l'ampoule à décanter en raison de leur différence de densité. L'huile essentielle, étant moins dense, flotte à la surface, tandis que l'eau reste en bas.
- ✓ Nous avons recueilli l'huile essentielle dans un flacon approprié, prête à être utilisée, tandis que l'eau a été séparée et éliminée.



**Figure 4 :** L'appareil Clevenger

### II-3-2- Rendement des huiles essentielles :

Le rendement en huile essentielle (HE) est calculé en utilisant le rapport entre le poids de l'huile essentielle extraite et le poids de la biomasse végétale traitée. Il est exprimé en pourcentage (%) et peut être calculé à l'aide de la formule suivante :

$$R_{HE} = \frac{M'}{M} * 100$$

**$R_{HE}$**  : rendement des huiles essentielles

**$M'$**  : masse d'huile en gramme

**$M$**  : masse de la plante en gramme

### **II-3-3- Rendement des huiles essentielles :**

Nous avons opté pour une méthode de conservation de l'huile essentielle à basse température afin de préserver ses propriétés et sa qualité. Pour ce faire, nous avons utilisé un tube en verre transparent scellé hermétiquement, offrant ainsi une protection efficace contre l'oxygène et la lumière qui pourraient altérer la stabilité et les composés actifs de l'huile essentielle.

### **III- Détermination des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles présentent diverses propriétés physico-chimiques comme : l'indice de réfraction, la densité, point d'ébullition..... Il convient de noter que les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles peuvent varier en fonction de plusieurs facteurs, tels que la plante d'origine, les conditions de culture, le mode d'extraction et de conservation, ainsi que la présence de contaminants éventuels. Il est donc important de prendre en compte ces facteurs lors de l'utilisation et de la manipulation des huiles essentielles.

Dans notre étude, on a évalué l'indice de réfraction et la densité relative :

#### **III-1- L'indice de réfraction :**

##### **III-1-1- Principe :**

L'indice de réfraction d'une huile essentielle mesure la vitesse de propagation de la lumière à travers celle-ci. Chaque huile essentielle a un indice de réfraction spécifique qui peut être utilisé pour identifier et caractériser l'huile.

##### **III-1-2- Mode opératoire :**

- ✓ On nettoie la lame du réfractomètre à l'aide d'un coton imbibé d'éthanol.
- ✓ On ouvre le prisme mobile du réfractomètre, puis on dépose deux gouttes d'huile d'orange à la surface du prisme, en veillant à ne pas rayer celui-ci. Ensuite, on referme le prisme mobile.
- ✓ En regardant à travers l'oculaire du réfractomètre, on ajuste la mesure en tournant la molette de réglage de manière à positionner les zones sombres et lumineuses au centre du champ de vision.

Une formule empirique peut être utilisée pour estimer l'indice de réfraction d'un liquide à 20°C, à partir de la mesure effectuée à une température légèrement différente :

$$I_{r20} = I_{\theta} + 0.00045 (\theta - 20)$$

$I_{r20}$  : Indice à 20°C

$I_{\theta}$  : Indice à la température ambiante ou de mesure.

$\theta$  : Température ambiante.

### III-2- La densité relative :

#### III-2-1- Principe :

La densité d'une huile essentielle est déterminée par le rapport entre la masse et le volume de l'huile, et la masse d'un même volume d'eau distillée pris à la même température.

#### II-4-2-2- Mode opératoire :

La détermination de la densité des essences de la plante étudiée est réalisée à l'aide d'une seringue d'une capacité de 5 ml. Le volume prélevé est de 0,20 ml pour l'huile ainsi que pour l'eau.

$$d_{20} = d_{\theta} + 0.00068 (\theta - 20^{\circ}\text{C})$$

$d_{20}$  : Densité à 20°C

$d_{\theta}$  : densité à température de mesure =  $m_1 - m_0 / m - m_0$

$m_1$  : masse en g de la seringue contenant 0.20 ml d'huile

$m_0$  : masse en g de la seringue vide

$m$  : masse en g de la seringue contenant 0.20 ml d'eau

$\theta$  : température de mesure.

#### **IV- Détermination des propriétés organoleptiques :**

La détermination des propriétés organoleptiques des huiles essentielles se fait à travers une évaluation sensorielle. Les principales propriétés organoleptiques étudiées sont l'arôme, le goût et la couleur de l'huile essentielle.

✓ Pour évaluer l'arôme, on utilise la technique de l'olfaction. Un échantillon d'huile essentielle est présenté à un panel d'évaluateurs formés, qui inhalent délicatement l'odeur et évaluent les caractéristiques aromatiques telles que l'intensité, la qualité, les nuances et les notes olfactives.

✓ Pour évaluer le goût, on utilise la technique de la gustation. Un échantillon d'huile essentielle est pris en petite quantité et placé sur la langue des évaluateurs. Ils évaluent les caractéristiques gustatives telles que l'intensité, la qualité, la douceur, l'amertume, l'acidité ou toute autre sensation gustative particulière.

✓ La couleur de l'huile essentielle est évaluée visuellement en utilisant des références de couleur standard. Les évaluateurs comparent la couleur de l'échantillon avec les références et attribuent une valeur correspondante.

Ces évaluations organoleptiques sont réalisées dans des conditions contrôlées, en évitant toute interférence ou contamination sensorielle. Les évaluateurs sont souvent des professionnels formés dans l'analyse sensorielle des huiles essentielles.

Il est important de noter que les propriétés organoleptiques peuvent varier d'une huile essentielle à une autre en raison de la composition chimique spécifique de chaque huile. Ces propriétés organoleptiques sont utilisées pour évaluer la qualité, l'authenticité et la fraîcheur des huiles essentielles.

### **V- Analyse qualitative des huiles essentielles par ultra-violet :**

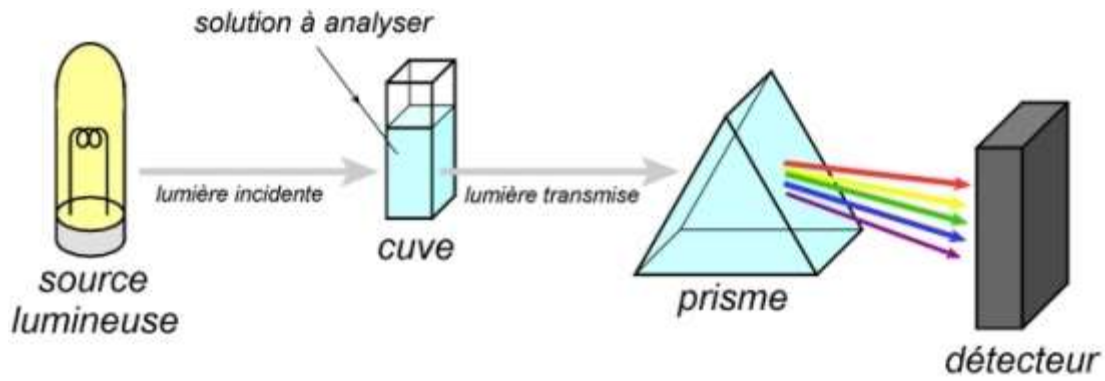
L'analyse qualitative des huiles essentielles par ultraviolet (UV) est une méthode couramment utilisée pour évaluer la présence de certains composants dans les échantillons d'huiles essentielles. Cette méthode repose sur l'interaction des composés chimiques avec la lumière ultraviolette.

L'analyse est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis, qui mesure l'absorption de la lumière dans la plage des ultraviolets. Les échantillons d'huiles essentielles sont préparés en les diluant dans un solvant approprié. Ensuite, les solutions sont placées dans des cuvettes spéciales et insérées dans le spectrophotomètre.

Les composés chimiques présents dans les huiles essentielles peuvent absorber la lumière UV à des longueurs d'onde spécifiques. L'analyse UV permet de détecter et d'identifier certains groupes de composés, tels que les terpènes, les phénols, les cétones, les aldéhydes, etc. Chaque groupe de composés peut avoir des pics d'absorption caractéristiques à des longueurs d'onde particulières.

En comparant les spectres d'absorption UV des échantillons d'huiles essentielles avec des spectres de référence, il est possible d'identifier certains composants spécifiques. Cette méthode permet donc une évaluation qualitative des huiles essentielles, en fournissant des indications sur les composés présents dans l'échantillon.

Il est important de noter que l'analyse qualitative par UV ne fournit pas d'informations quantitatives sur la concentration des composés. Elle est plutôt utilisée comme un outil complémentaire pour l'identification et la comparaison des profils chimiques des huiles essentielles (**Adams, 2007**).



**Figure 5:** principe de base de la spectroscopie ultraviolet-visible

## **VI- Évaluation de l'activité antibactérienne et ses applications :**

L'activité antibactérienne des extraits de plantes est attribuée à la présence de métabolites secondaires tels que les composés phénoliques, les alcaloïdes, les terpénoïdes, les flavonoïdes et les huiles essentielles. Ces composés possèdent des propriétés antimicrobiennes et peuvent perturber la croissance et la survie des bactéries par divers mécanismes, notamment en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire, en endommageant les membranes cellulaires, en interférant avec les enzymes bactériennes et en perturbant les processus cellulaires essentiels.

Les applications des extraits de plantes ayant une activité antibactérienne sont vastes. Ils sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour le développement de nouveaux médicaments antimicrobiens ou comme traitements alternatifs pour lutter contre les infections bactériennes. Les extraits de plantes peuvent également être incorporés dans des produits de soins personnels tels que des savons, des lotions et des produits d'hygiène buccale, pour fournir des effets antibactériens naturels. De plus, ces extraits ont montré un potentiel dans la conservation des produits alimentaires, en tant qu'agents antimicrobiens naturels pour inhiber la croissance des bactéries de détérioration et pathogènes.

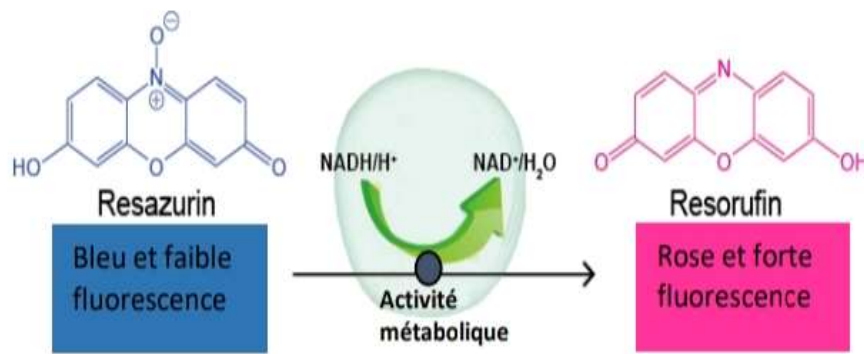
L'utilisation d'extraits de plantes en tant qu'agents antibactériens présente plusieurs avantages, notamment leur origine naturelle, leur activité à large spectre potentielle et la possibilité de cibler les bactéries résistantes aux antibiotiques. Cependant, il est important d'évaluer la sécurité et l'efficacité de ces extraits avant leur application généralisée. Dans notre recherche, nous avons évalué le potentiel antibactérien des huiles essentielles d'*Eucalyptus camaldulensis* et ses applications dans la conservation des aliments et en synergie avec un antibiotique.

### **VI- 1- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :**

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) est basée sur le principe d'évaluation de la plus faible concentration d'une substance qui inhibe la croissance visible des microorganismes. La CMI est un paramètre important utilisé pour évaluer l'activité antimicrobienne des composés. Il existe plusieurs méthodes disponibles pour déterminer la CMI, notamment la méthode de dilution en milieu liquide, la méthode de dilution en agar et la méthode de microdilution. Chaque méthode présente ses avantages et ses limites, et le choix de la méthode dépend de divers facteurs tels que le type de microorganisme, la nature de la substance testée et les objectifs spécifiques de l'étude (**Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018**).

#### **VI- 1- 1- Méthode de microplaque avec résazurine :**

Dans notre travail, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) en utilisant la méthode de microplaque avec résazurine. La méthode de microplaque avec résazurine est un test colorimétrique qui permet une détermination rapide et quantitative des valeurs de CMI. Pour réaliser le test, une série de dilutions de la substance testée a été préparée dans un milieu de croissance contenant les microorganismes. La résazurine, un colorant bleu, a été ajoutée aux puits contenant les échantillons testés. Les microplaques ont ensuite été incubées pendant une période spécifique, permettant la croissance des microorganismes. Après l'incubation, le changement de couleur de la résazurine a été observé. La couleur bleue de la résazurine est réduite à une couleur rose en présence de microorganismes métaboliquement actifs. La plus faible concentration de la substance testée qui ne montre pas de changement de couleur (indiquant l'absence de croissance microbienne) est considérée comme la CMI. La méthode de microplaque avec résazurine présente plusieurs avantages, notamment sa simplicité, sa rapidité et son coût abordable. C'est une méthode largement utilisée pour déterminer les valeurs de CMI dans différents domaines de recherche (**Bala et al., 2016**).



**Figure 6:** principe de la réaction du résazurine

### **VI- 1- 1- 1- Protocole expérimental:**

#### **IV-1-1-1-1- Les souches bactériennes:**

✓ *Escherichia coli* (*E. coli*) : est une bactérie Gram-négative appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Elle est souvent présente dans le tractus intestinal des animaux à sang chaud, y compris les humains. Certaines souches d'*E. coli* sont considérées comme des agents pathogènes, pouvant provoquer des infections intestinales, des infections des voies urinaires, des infections respiratoires, et d'autres problèmes de santé. Cependant, la plupart des souches d'*E. coli* sont inoffensives et font partie de la flore intestinale normale.

✓ *Bacillus subtilis*: est une bactérie Gram-positive, appartenant à la famille des Bacillaceae. Elle est largement répandue dans la nature, se retrouvant dans le sol, l'eau et divers environnements terrestres.



*Escherichia coli*



*Bacillus subtilis*

**Figure 7 :** les souches bactériennes utilisés

**Tableau 1** : Références et origine des souches bactériennes utilisées

Bacterial strains	ATCC	Gram
<i>Escherichia coli</i>	25922	-
<i>Bacillus subtilis</i>	0486	+

### VI-1-1-1-2- Milieux de culture et solvants :

Les milieux de culture et les solvants utilisés dans les tests antibactériens étaient composés des éléments suivants :

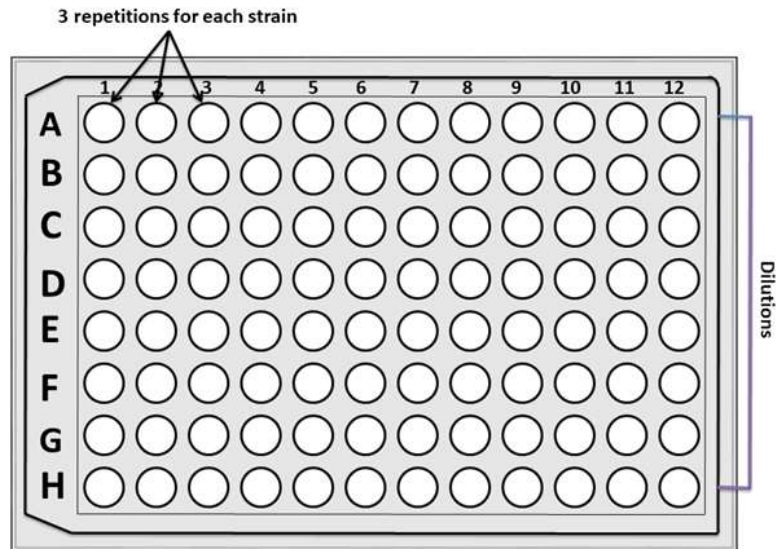
- ✓ Agar nutritif
- ✓ Bouillon de Mueller-Hinton

Produits chimiques et solvants :

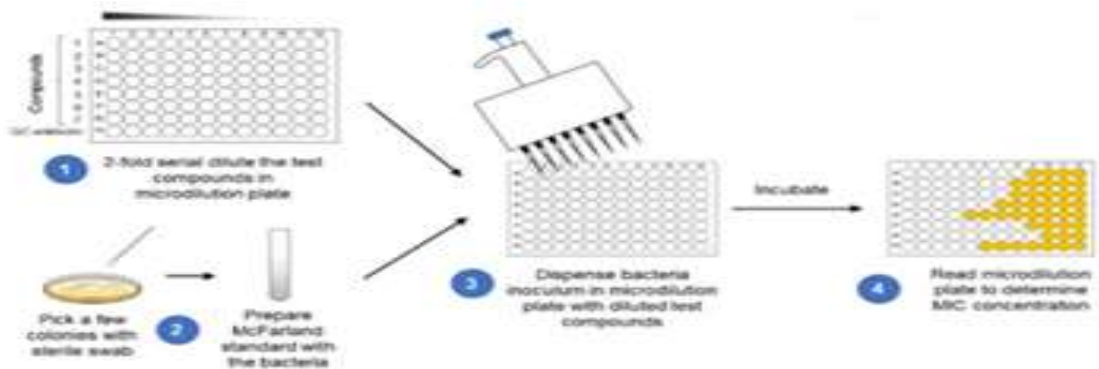
- ✓ L'eau distillée stérile a été utilisée pour préparer les dilutions de l'extrait.
- ✓ DMSO (Diméthylsulfoxyde)
- ✓ Résazurine.

### VI-1-1-1-3- Test de la résazurine en microplaque :

La technique de microdilution, avec de légères modifications, a été utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) dans des microplaques à 96 puits, comme décrit par **Rodi et al. (2019)**. L'huile essentielle a été diluée de manière sérielle dans du DMSO, qui servait d'émulsifiant. À partir d'une solution mère, une série de dilutions (incluant un témoin positif avec "sorbate de potassium") a été préparée dans un milieu de Mueller-Hinton, ce qui a donné un volume final de 50 µL pour chaque concentration. Ensuite, 50 µL d'inoculum bactérien, à une concentration finale de 10<sup>6</sup> UFC·ml<sup>-1</sup>, ont été ajoutés à chaque puits, suivi de l'ajout de 10 µL de résazurine en tant qu'indicateur de croissance bactérienne. Les microplaques ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 18 à 20 heures. La croissance bactérienne était indiquée par un changement de couleur de la résazurine, passant du violet au rose. La valeur de la CMI a été déterminée comme étant la plus faible concentration qui a empêché un changement de couleur dans la résazurine. Le douzième puits a été désigné comme témoin de croissance. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata.



**Figure 8:** microplaque à 96 puits



**Figure 9:** Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

### **VI-3- Évaluation du potentiel de conservation des aliments d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* :**

Dans notre recherche, nous avons évalué le potentiel de *Rosmarinus officinalis* pour la conservation du yaourt. Le yaourt est un produit laitier populaire qui est sujet au spoilage causé par divers microorganismes, notamment des bactéries et des champignons.

#### **VI-3-1- Préparation du yaourt :**

Le yaourt est un produit laitier fermenté obtenu par la fermentation bactérienne du lait. Le processus implique l'utilisation de cultures starter spécifiques contenant des bactéries lactiques, qui convertissent le lactose (sucre du lait) en acide lactique par fermentation. Cela confère au yaourt sa saveur caractéristique et sa texture épaisse.

Pour préparer le yaourt, nous avons suivi les étapes suivantes :

✓ **Sélection du lait** : Commencez par sélectionner du lait frais et de haute qualité. Vous pouvez utiliser différents types de lait, tels que le lait de vache, le lait de chèvre ou des alternatives à base de plantes comme le lait de soja ou le lait d'amande.

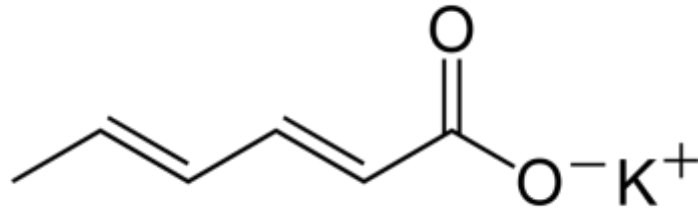
✓ **Chauffage** : Chauffez le lait à une température spécifique pour éliminer les éventuelles bactéries nocives et favoriser la dénaturation des protéines du lait. Cette étape s'appelle la pasteurisation. La température peut varier en fonction du type de lait utilisé, mais elle est généralement d'environ 85-90 °C.

✓ **Refroidissement** : Laissez le lait refroidir jusqu'à une température de fermentation appropriée, généralement d'environ 40-45 °C. Il est essentiel de maintenir cette plage de température pour favoriser la croissance des cultures starter.

✓ **Fermentation** : Introduisez les cultures starter de bactéries lactiques *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. Ces bactéries fermentent le lactose en acide lactique et confèrent au yaourt sa texture et sa saveur caractéristiques. La quantité recommandée de cultures starter peut varier, alors suivez les instructions du fabricant.

## MATERIAL ET METHODES

✓ **Inoculation** : Après la préparation du yaourt, il a été inoculé avec une concentration connue de la souche bactérienne *Bacillus subtilis*. Ensuite, une série de concentrations de l'huile de *Rosmarinus officinalis* a été ajoutée pour évaluer son effet de conservation sur le yaourt. Le sorbate de potassium a été utilisé comme témoin positif à des fins de comparaison.



**Figure 10:** structure de sorbate de potassium

# *Résultats et Discussion*

## RESULTATS ET DISCUSSION

### I- Détermination des propriétés physico-chimiques et organoleptiques :

#### I-1- Détermination des propriétés physico-chimiques :

##### Propriétés physico-chimiques

	Notre huile	Normes
<b>Indice de réfraction</b>	<b>1,469</b>	<b>1,45-1,47</b>
<b>Densité</b>	<b>0,76</b>	<b>0,82-0,99</b>

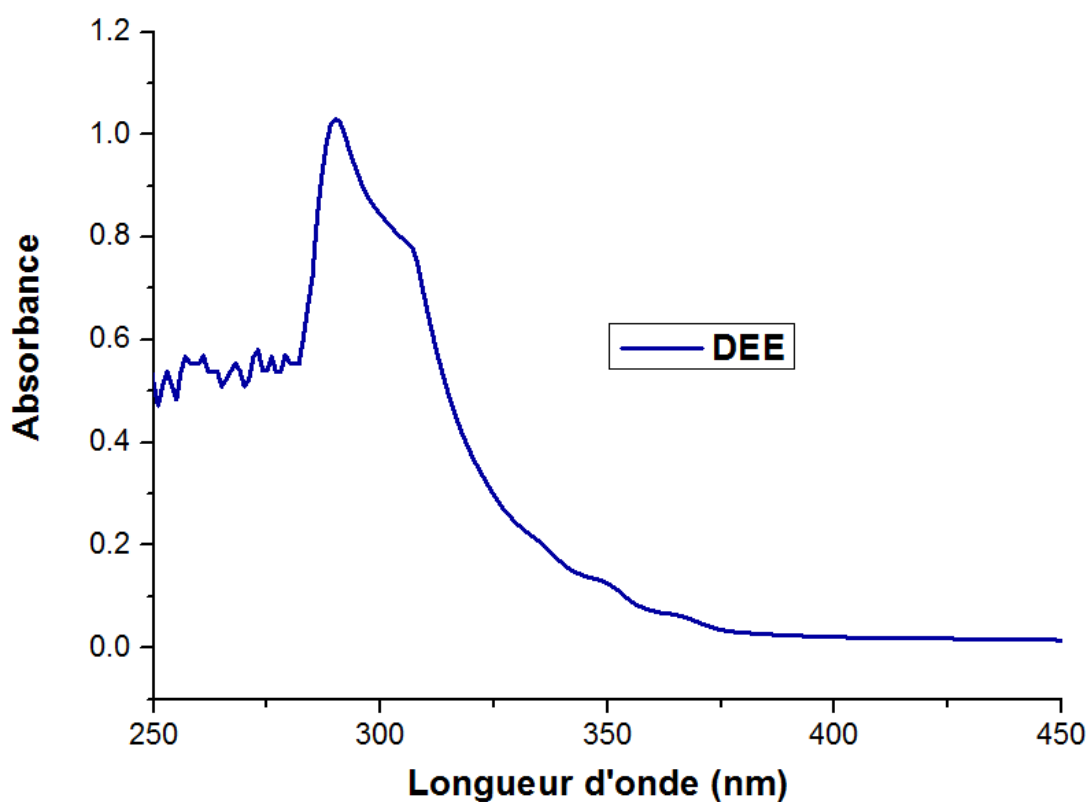
#### I-2- Détermination des propriétés organoleptiques :

##### Propriétés organoleptiques

Propriétés organoleptiques	Notre huile
<b>Aspect</b>	<b>Liquide</b>
<b>Couleur</b>	<b>Jaune clair</b>
<b>Odeur</b>	<b>Camphré</b>

### II- Analyse qualitative par spectroscopie UV-Visible:

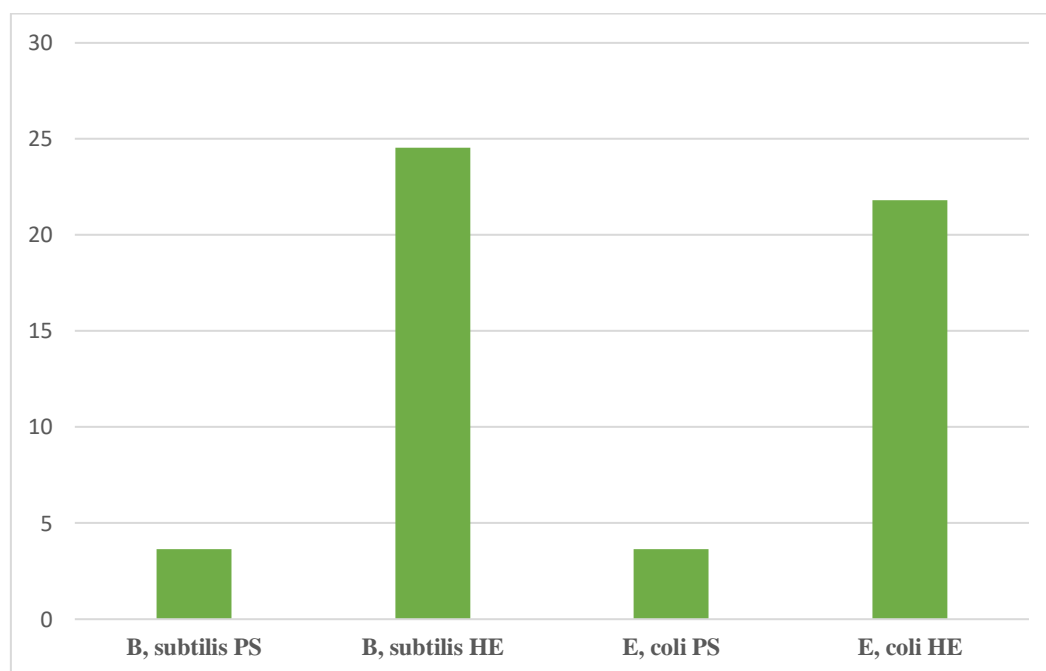
Le spectre d'absorption de l'HE dans le domaine ultraviolet qui s'étend de 250 à 450 nm réalisé dans l'éther diéthylique ; met en évidence une large bande d'absorption, avec un maximum d'absorption à  $\lambda = 290,00$  nm qui correspond à l'absorbance 1030 et un épaulement vers 346.8 nm. Ces derniers sont caractéristiques respectivement aux transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$  du système pi en délocalisation et  $n \rightarrow \pi^*$  relatif aux hétéroatomes porteurs de doublets électroniques libres et appartenant à un système insaturé tels que les chromophores C=O, C=N, N=O...etc



## RESULTATS ET DISCUSSION

### III- Activité antibactérienne et détermination du CMI

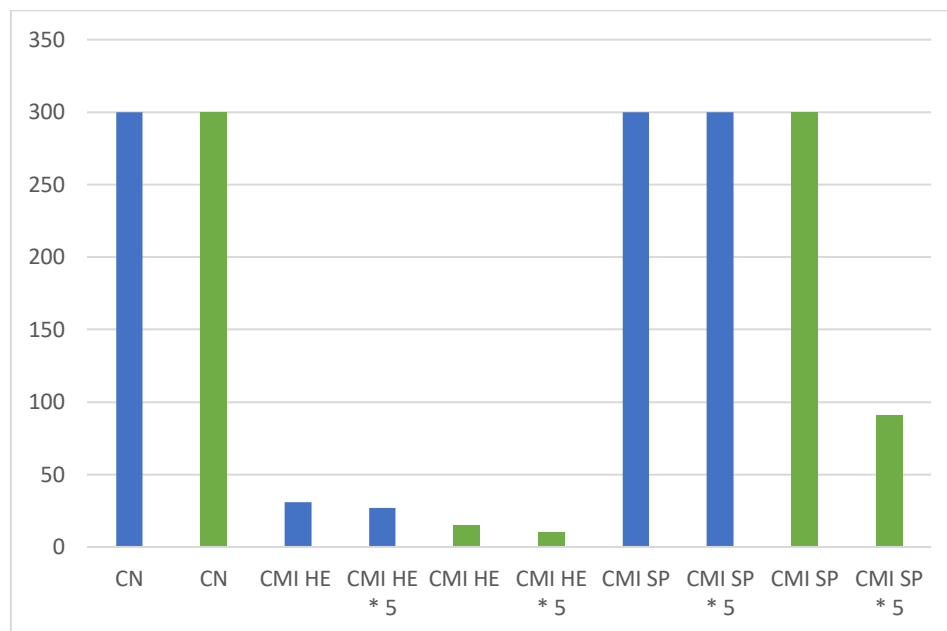
D'après les valeurs CMI obtenues, nous avons constaté que notre huile a une activité contre les deux souches testées, mais elle est moins active que le contrôle positif sorbate de potassium



## RESULTATS ET DISCUSSION

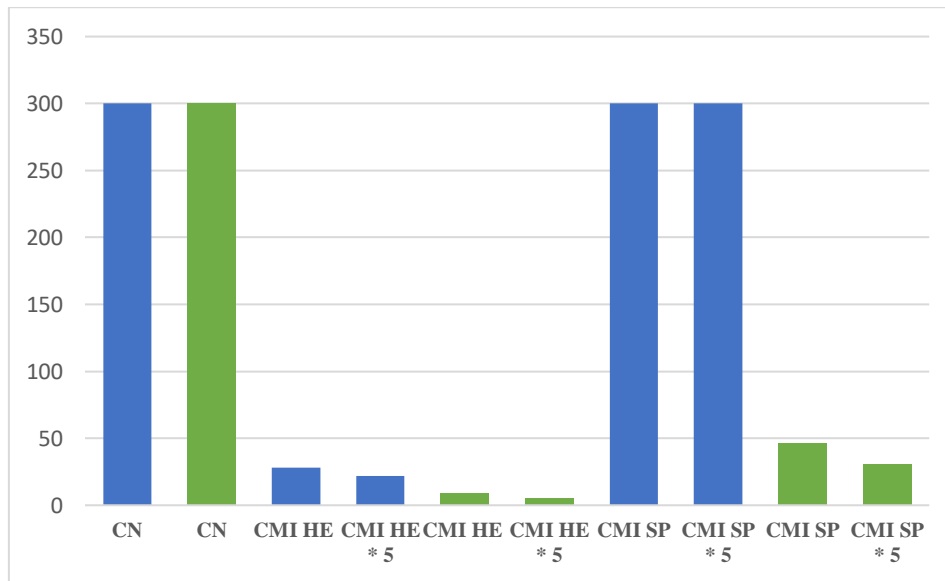
### IV- Evaluation de l'effet conservateur de l'huile essentielle :

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que notre huile a une activité conservatrice puissante par rapport au contrôle positif sorbate de potassium



*E. coli*

## RESULTATS ET DISCUSSION



*B. subtilis*

# *Conclusion*

## ***CONCLUSION***

D'après nos résultats, il est concluant que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* peut être utilisée comme agent de conservation pour le yaourt. Nos recherches ont démontré de manière significative les propriétés conservatrices de cette huile essentielle sur le yaourt. Elle a montré une activité inhibitrice remarquable contre les microorganismes responsables de la détérioration du yaourt