

République algérienne démocratique et populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université Mentouri Constantine  
Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires  
(I.N.A.T.A.A.)  
Département de biotechnologie alimentaire

N° d'ordre :

Série :

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du Diplôme de Magister en Sciences Alimentaires

Option : biotechnologies alimentaire

Thème

---

Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines  
de *Foeniculum vulgare* Mill. en vue de son utilisation comme  
conservateur alimentaire

---

*Présenté par : M. Bouguerra Ali*

*Devant le jury :*

Président : <i>Pr.</i> Kabouche A.	Professeur	(INATAA, UMC)
Promotrice : <i>Dr.</i> Barkat M.	M.C.A.	(INATAA, UMC)
Examinatrice : <i>Dr.</i> Kharroub K.	M.C.A.	(INATAA, UMC)
Examineur : <i>Pr.</i> Kacem Chaouache N.	Professeur	Faculté des Sciences (U.M.C)

Année universitaire : 2011-2012.

## **Remerciements**

*Nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, le tout puissant pour le courage qu'il nous a donnés pour mener ce travail à terme.*

*Je commence par exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements au **Dr. BARKAT M.** qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire. J'ai été satisfait de votre qualité exceptionnelle de bonne enseignante, merci de m'avoir guidé avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit ; je ne peux, Madame, que sincèrement vous exprimer mon respect et mon gratitude.*

*Je tiens à remercier **Pr. KABOUHCHE A.** d'avoir accepté la présidence du jury de mon travail, qu'il trouve ici toutes mes expressions respectueuses.*

*Je tiens à remercier **Dr. KHAROUB K.** d'avoir accepté de faire partie des membres du jury de mon travail. Je tiens à vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté tout au long de mes études. Vous avez su faire partager votre expérience et vous m'avez guidé dans le monde de la recherche scientifique.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect au **Pr. KACEM CHAOUACHE N.**, d'avoir accepté de juger ce modeste travail, malgré toutes ses responsabilités et ses nombreuses occupations. Vous trouvez ici toutes mes expressions respectueuses.*

*Nos remerciements s'adressent au **Pr. BENTCHOUALA C.** Médecin chef et au **Pr. SMATI F.** chef de Service du laboratoire de la microbiologie du CHU de Constantine.*

*Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont aussi à **M<sup>le</sup> BEHCHECHI N.** du laboratoire ALNUTS à l'INATAA, et au **Dr. BECILA S.** du laboratoire technologie des viandes pour avoir mis à notre disposition le matériel demandé.*

*Je tiens à remercier également le Laboratoire de Biophysique, Biochimie, Biomathématiques et Scientométrie (BBBS) Université Abderrahmane Mira de Bejaia.*

Thème : **Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire**

Nature du diplôme : **Magister en sciences alimentaires**

Option : **Biotechnologie Alimentaire**

---

### **Résumé**

Les conservateurs alimentaires synthétiques ont été limités dans plusieurs pays, en raison de leurs effets indésirables sur la santé. En plus, la tendance actuelle des consommateurs à chercher une alimentation plus naturelle a augmenté durant ces dernières décennies. Plusieurs travaux de recherche ont été concentrés sur les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques. Les différents résultats publiés indiquent qu'elles sont douées de plusieurs propriétés biologiques. Dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer *in vitro* les activités antioxydante, antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle extraite des graines sèches des *Foeniculum vulgare* Mill.

L'extraction a été réalisée par hydrodistillation, le rendement a été voisin de  $0.79 \pm 0.02\%$ . L'évaluation de l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle des graines de fenouil a été évaluée par la méthode de la réduction du DPPH<sup>\*</sup>. La CE<sub>50</sub> (concentration efficace 50) obtenue est de  $752,65 \pm 32,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . L'huile essentielle des graines du fenouil a montré aussi une activité antioxydante très intéressante ( $81,74 \pm 3,92\%$ ) par la méthode de blanchiment du  $\beta$ -carotène.

La méthode des aromatogrammes montre que l'huile essentielle des graines du fenouil a une faible activité antibactérienne. Les concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) ont été estimées par la méthode de dilution d'agar. Les CMI obtenues sont comprises entre 20 000 et 45 000  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  et la CMB s'est avérée aussi élevée.

L'activité antifongique de l'huile essentielle des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. a été réalisée par la méthode de diffusion des disques et par la méthode des microaromatogrammes. Les résultats obtenus indiquent que l'huile essentielle des graines du fenouil a une capacité inhibitrice de la croissance mycélienne des souches testées. La méthode de dilution nous a permis d'évaluer les valeurs de la concentration minimale fongistatique (CMF<sub>S</sub>) et celles de la concentration minimale fongicide (CMF<sub>C</sub>). Ces concentrations sont comprises 625 et 1250  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . L'index antifongique (IA<sub>50</sub>) a été estimé, l'*Alternaria* est le genre le plus sensible où son IA<sub>50</sub> est voisin de  $26,22 \pm 0,693 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

A l'essor de cette étude, nous pouvons conclure que l'huile essentielle des graines du fenouil pourrait être considérée comme un agent conservateur très prometteur pour l'industrie alimentaire capable d'empêcher l'oxydation des aliments et de réduire la croissance mycélienne responsable d'altération des aliments.

**Mots clés :** Huile essentielle, activité antioxydante, activité antibactérienne, activité antifongique, *Foeniculum vulgare* Mill.

---

*Devant le jury :*

Président : *Pr. Kabouche A.*

Professeur (INATAA, UMC)

Promotrice : *Dr. Barkat M.*

M.C.A. (INATAA, UMC)

Examinatrice: *Dr. Kharroub K.*

M.C.A. (INATAA, UMC)

Examineur : *Pr. Kacem Chaouache N.*

Professeur Faculté des Sciences (U.M.C)

Theme: **Study of the biological activities of essential oil extracted from fennel seeds**  
(*Foeniculum vulgare* Mill.)

Nature of the diploma: **magister**

Option: **food biotechnology**

---

**Abstract**

The synthetic food conservatives are limited in several countries, because of their undesirable effects on health. Moreover, the current trend of the consumers seeks a more natural food increased during these last decades. Several research tasks have concentrated on the essential oils extracted from the aromatic plants. The various results published have indicated that they are endowed with several biological properties. In this context, we tried to evaluate antioxidant, antibacterial and antifungal activities of essential oil extracted from *Foeniculum vulgare* Mill. seeds.

The extraction was carried out by water distillation Clevenger's type apparatus, the yield was  $0.79 \pm 0.02\%$ . The evaluation of the antiradical activity of the fennel seeds essential oil was evaluated by the reduction of the DPPH• method. The EC<sub>50</sub> (efficiencies' concentration) obtained is  $752.65 \pm 32.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . The fennel seeds essential oil shows also a very interesting antioxidant activity ( $81.74 \pm 3.92\%$ ) by the of  $\beta$ -Carotene bleaching method.

Diffusion Method has demonstrated that the fennel seeds essential oil has a feeble antibacterial activity. Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) are estimated by agar dilution method, the MIC obtained are included between 20 000 and 45 000  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , the MBC proved also raised.

The antifungal activities of the essential oil against fungi were undertaken using inverted petriplate. The results obtained indicate that the fennel seeds essential oil has strong activity. Minimum fungistatic concentrations (MFC<sub>S</sub>), and minimum fungicidal concentration (MFC<sub>C</sub>) were estimated by broth dilution method, the MFC<sub>S</sub> obtained are included between 625 and 1250  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , the MFC<sub>C</sub> obtained is 1250  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . The antifungal index (AI<sub>50</sub>) were estimated, the *Alternaria* was most sensitive where his AI<sub>50</sub> was  $26.22 \pm 0,693 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

With the rise of this study, we can conclude that the fennel seeds essential oil could be regarded as a very promising preservative for food industry able to prevent the oxidation of food and to reduce growth in of deterioration of food and producing mycotoxins mycelial.

**Keywords:** Essential oil, antioxidant activity, antibacterial activity, antifungal. *Foeniculum vulgare* Mill.

---

الأطروحة : دراسة الفاعلية البيولوجية للزيوت الأساسية المستخلصة من بذور الشمرة الجافة "البسباس"  
(*Foeniculum vulgare Mill.*) من أجل استعماله كحافظ غذائي.

طبيعة الشهادة : ماجستير في العلوم الغذائية

اختصاص : بيوتكنولوجيا الغذائية

### الملخص

نلاحظ في هذه الأعوام الأخيرة منع استعمال الحوافظ الغذائية الصناعية في الكثير من دول العالم، لما تسببه من أعراض جانبية على الصحة. كما نلاحظ أن المستهلك أصبح يبحث عن الأغذية التي لا تحتوي على المواد مصنعة. و لاكتشاف مواد طبيعية جديدة لاستبدال الحوافظ الغذائية الصناعية، تركّزت الكثير من الأبحاث على دراسة الزيوت الأساسية. توضح معظم نتائج هذه الأبحاث أن الزيوت الأساسية تملك فعاليات بيولوجية مهمة. في هذا الإطار حاولنا دراسة الفاعلية المضادة للأكسدة، للبكتيريا و للفطريات للزيوت الأساسية المستخلصة من بذور الشمرة الجافة (*Foeniculum vulgare Mill.*)

لاستخلاص الزيوت الأساسية، استعملنا التقطير المائي، و كانت المرودية تساوي  $0.02 \pm 0.70\%$ . و لتقييم الفاعلية المضادة "للجذور الحرة"، استعملنا "طريقة الـ DPPH" حيث تمكنا من تقدير التركيز الفعال "CE<sub>50</sub>" بـ  $752,65 \pm 32,5$  مغ/مل. كما تم تقييم الفاعلية "المضادة للأكسدة" باستعمال "طريقة تبييض  $\beta$ -carotène"، فكانت نسبة الفاعلية عالية جدا ( $3.92 \pm 81,74\%$ ).

في ما يخص الفاعلية المضادة للبكتيريا بينت لنا طريقة "الاروماتوقرام" أن الزيوت الأساسية لبذور الشمرة لها فاعلية مضادة للبكتيريا ضعيفة. كما أن التراكيز الصغرى المثبطة كانت كبيرة جدا حيث كانت منحصرة بين 20000 و 45000 مغ/مل و كذا التراكيز الصغرى القاتلة كانت كبيرة جدا أيضا.

أما بما يخص الفاعلية المضادة للفطريات فقد درست "بطريقة النشر" و طريقة "الميكرواروماتوقرام". بينت لنا النتائج أن الزيوت الأساسية لبذرة البسباس لها فاعلية تثبيطية لتكاثر الفطريات المجرية. كما قيمت الفاعلية المضادة للفطريات "بطريقة التخفيف" فبينت لنا النتائج أن التراكيز الصغرى المثبطة و القاتلة منحصرة بين 625 و 1250 مغ/مل، و أن الـ *Alternaria* هي النوع الحساس من بين جميع الأنواع المجرية، حيث كان المؤشر المضادة للفطريات (IA<sub>50</sub>) يقارب  $0.693 \pm 26.22$  مغ/مل.

انطلاقا من النتائج التحصل عليها، يمكننا الاستنتاج أن الزيوت الأساسية لبذور الشمرة لها فاعلية بيولوجية قد تمكنا من استعمالها كحافظ غذائي لتحجيم أكسدة الأغذية و تكاثر الفطريات المسؤولة عن فساد الأغذية.

الكلمات الدالة : الزيوت الأساسية، الفاعلية المضادة للأكسدة، الفاعلية المضادة للبكتيريا، الفاعلية المضادة للفطريات، ذرة الشمرة (*Foeniculum vulgare Mill.*)

## TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

### SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Chapitre 1.</b> Généralités sur les huiles essentielles.....	3
1.1 Bref historique.....	3
1.2 Définition.....	3
1.3 Production mondiale.....	4
1.4 Biosynthèse et composition chimique.....	5
1.5 Caractéristiques et propriétés physiques.....	6
1.6 Analyses des huiles essentielles et critères de qualité.....	6
1.7 Extraction des huiles essentielles.....	7
1.8 Paramètres influençant la composition quantitative et qualitative des huiles essentielles.	8
1.8.1 Facteurs intrinsèques.....	8
1.8.2 Facteurs extrinsèques.....	8
1.9 Données toxicologiques.....	9
<b>Chapitre 2.</b> Activités biologiques des huiles essentielles.....	10
2.1 Activité antioxydante .....	10
2.1.1 Définition d'un antioxydant.....	10
2.1.2 Essais de l'activité antioxydante dans les aliments.....	11
2.1.3 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	11
2.2 Activité antimicrobienne .....	14
2.2.1 Définition d'un antimicrobien.....	14
2.2.2 Essais de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles dans les aliments.....	14
2.2.3 Mode d'action des huiles essentielles.....	17
2.2.4 Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	17
2.2.5 Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	22
<b>Chapitre 3.</b> Huiles essentielles du fenouil.....	27
3.1 Généralités sur le fenouil.....	27
3.1.1 Description morphologique .....	27

3.1.2 Origine et répartition géographique.....	27
3.1.3 Classification botanique.....	28
3.1.4 Utilisation des graines de fenouil.....	29
3.2 Huile essentielle des graines de fenouil.....	29
3.2.1 Localisation .....	29
3.2.2 Extraction et rendement.....	29
3.2.3 Caractéristiques physico-chimiques.....	29
3.2.4 Composition chimique.....	30
3.2.5 Utilisation.....	31

## **MATERIEL ET METHODES**

1. Matériel végétal.....	32
1.1 Choix du matériel végétal.....	32
1.2 Origine des graines du fenouil.....	32
1.3 Description des graines du fenouil.....	32
2. Méthodes.....	32
2.1 Extraction de l'huile essentielle des graines du fenouil.....	32
2.1.1 Dispositif d'extraction.....	32
2.1.2 Procédé d'extraction.....	33
2.1.3 Conservation de l'huile essentielle obtenue.....	34
2.1.4 Détermination du rendement d'extraction.....	34
2.2 Etude des activités antiradicalaire et antioxydante.....	34
2.2.1 Test de réduction du 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazine (DPPH <sup>•</sup> ).....	34
2.2.2 Méthode de blanchiment du $\beta$ -carotène.....	37
2.3 Evaluation de l'activité antibactérienne.....	38
2.3.1 Origine et choix des souches bactériennes .....	38
2.3.2 Choix des milieux de culture.....	38
2.3.3 Préparation des suspensions bactériennes.....	39
2.3.4 Préparation des disques.....	39
2.4.5 Tests de l'activité antibactérienne.....	39
2.4 Evaluation de l'activité antifongique.....	42
2.4.1 Origine et choix des souches fongiques.....	42
2.4.2 Choix des milieux de culture.....	42
2.4.3 Préparation des suspensions et préculture des souches fongiques.....	43

2.4.4 Préparation des dilutions d'huile essentielle.....	43
2.4.5 Tests de l'activité antifongique.....	43
2.5 Traitement statistique.....	47

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

1. Résultats.....	48
1.1 Rendement en huile essentielle.....	48
1.2 Activités antiradicalaire et antioxydante.....	48
1.2.1 Evaluation de l'activité antiradicalaire.....	48
1.2.2 Evaluation de l'activité antioxydante.....	49
1.3 Activité antibactérienne.....	50
1.3.1 Sensibilité des bactéries à l'huile essentielle des graines du fenouil.....	50
1.3.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB).....	51
1.4 Activité antifongique.....	56
1.4.1 Sensibilité des souches fongiques à l'huile essentielle des graines du fenouil....	56
1.4.2 Sensibilité des souches fongiques aux composés volatiles de l'huile essentielle des graines du fenouil.....	57
1.4.3 Détermination des concentrations minimales fongistatique (CMF <sub>S</sub> ) et fongicide (CMF <sub>C</sub> ).....	60
1.4.4 Détermination de l'index antifongique (IA <sub>50</sub> ).....	60
2. Discussion.....	64
 <b>Conclusion et perspectives.....</b>	 75
Références bibliographiques.....	77
Annexes	

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Récapitulation des principales huiles essentielles produites et des principaux pays producteurs dans le monde en 2008 (Perfumer & Flavorist, 2009).....	5
<b>Tableau 2.</b> Définition des concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB).....	20
<b>Tableau 3.</b> Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. (Garnéro, 1996).....	29
<b>Tableau 4.</b> Rendements obtenus dans différents pays.....	48
<b>Tableau 5.</b> Diamètres (mm) des zones d'inhibition de l'huile essentielle des graines du fenouil.....	50
<b>Tableau 6.</b> Concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricides (CMB) de l'huile essentielle des graines du fenouil.....	52
<b>Tableau 7.</b> Diamètres des zones d'inhibition des souches fongiques de l'huile essentielle des graines du fenouil.....	56
<b>Tableau 8.</b> Concentrations minimales fongistatique (CMF <sub>S</sub> ) et fongicide (CMF <sub>C</sub> ) de l'huile essentielle des graines du fenouil.....	60
<b>Tableau 9.</b> Récapitulation des index antifongiques (IA <sub>50</sub> ) de l'huile essentielle des graines du fenouil.....	61

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Réaction du 2, 2-diphényl-1-picryl-hydrazine (DPPH <sup>*</sup> ) avec un antioxydant (Prakash, 2001; Molyneux, 2004).....	13
<b>Figure 2.</b> Structure chimique de <i>trans</i> -anethole, d'estragole et du fenchone (Vienna <i>et al.</i> , 2005).....	30
<b>Figure 3.</b> Montage de l'hydrodistillateur.....	33
<b>Figure 4.</b> Préparation des dilutions de la vitamine C.....	35
<b>Figure 5.</b> Préparation des dilutions de l'huile essentielle des graines du fenouil.....	36
<b>Figure 6.</b> Cinétique de blanchiment du $\beta$ -carotène pour l'huile essentielle des graines du fenouil, la vitamine C et le contrôle négatif.....	49
<b>Figure 7.</b> Activité antioxydante de l'huile essentielle des graines du fenouil et de la vitamine C.....	49
<b>Figure 8.</b> Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil et de l'amoxicilline sur les souches bactériennes testées.....	51
<b>Figure 9.</b> Evaluation des concentrations minimales inhibitrice de l'huile essentielle des graines du fenouil par la méthode de dilution après incubation pendant 24h.....	53
<b>Figure 10.</b> Témoin et contrôle négatif (5% diméthylsulfoxyde).....	54
<b>Figure 11.</b> Evaluation des concentrations minimales bactéricide de l'huile essentielle des graines du fenouil par la méthode de dilution après 5 jours d'incubation.....	55
<b>Figure 12.</b> Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil (5 $\mu$ l/disque) sur les souches fongiques testées.....	57
<b>Figure 13.</b> Effet inhibiteur de la vapeur d'huile essentielle des graines du fenouil (5 $\mu$ l) sur la croissance mycélienne.....	58
<b>Figure 14.</b> Effet de la vapeur de l'huile essentielle des graines de fenouil (5 $\mu$ l) sur les souches fongiques testées.....	59
<b>Figure 15.</b> Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil sur <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> et <i>Trichophyton rubrum</i> à différentes concentrations.....	62
<b>Figure 16.</b> Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil sur <i>Aureobasidium</i> , <i>Fusarium</i> et <i>Rhizopus</i> à différentes concentrations.....	63

## Liste des abréviations

<b>AFNOR</b>	Association Française de <b>N</b> ormalisation
<b>AMH</b>	Agar de <b>M</b> ueller <b>H</b> inton
<b>ATCC</b>	American <b>T</b> ype <b>C</b> ulture <b>C</b> ollection
<b>BHA</b>	<b>B</b> utyl <b>H</b> ydroxy <b>A</b> nisole
<b>BHT</b>	<b>B</b> utyl <b>H</b> ydroxy <b>T</b> oluène
<b>CCM</b>	Chromatographie sur <b>C</b> ouches <b>M</b> inces
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentration <b>E</b> fficace à 50%
<b>CFU</b>	Colony <b>F</b> orming <b>U</b> nits
<b>CHU</b>	Centre <b>H</b> ospitalo- <b>U</b> niversitaire
<b>CMB</b>	Concentration <b>M</b> inimale <b>B</b> actéricide
<b>CMF<sub>C</sub></b>	Concentration <b>M</b> inimale <b>F</b> ongicide
<b>CMF<sub>S</sub></b>	Concentration <b>M</b> inimale <b>F</b> ongistatique
<b>CMI</b>	Concentration <b>M</b> inimale <b>I</b> nhibitrice
<b>d'</b>	Densité prise à la température <i>t</i> par rapport à la densité de l'eau à la température <i>t'</i> ( <i>t</i> et <i>t'</i> en °C)
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose <b>L</b> étale à 50%
<b>DMSO</b>	<b>D</b> iméthylsulfo <b>x</b> ide
<b>DO</b>	Densité <b>O</b> ptique
<b>DPPH'</b>	<b>D</b> iphenylpicryl <b>h</b> ydrazine
<b>GC/MS</b>	Chromatographique en phase <b>G</b> azeuse couplée au <b>S</b> pectroscopie de <b>M</b> asse
<b>GRAS</b>	<b>G</b> enerally <b>R</b> ecognized <b>A</b> s <b>S</b> afe
<b>HE</b>	<b>H</b> uile <b>E</b> ssentielle
<b>IA<sub>50</sub></b>	<b>I</b> ndex <b>A</b> ntifongique à 50%
<b>IA<sub>vap</sub></b>	<b>I</b> ndex <b>A</b> ntifongique des composés volatiles de l' <b>H</b> E
<b>ISO</b>	<b>I</b> nternational <b>S</b> tandard <b>O</b> rganization
<b>n</b>	Indice de réfraction à la température de 20°C (sauf indication contraire) pour la longueur d'onde de 589 nm (raie D du Sodium)
<b>ND</b>	<b>N</b> on <b>D</b> éterminée
<b>PDA</b>	<b>P</b> otato <b>D</b> extrose <b>A</b> gar
<b>PDB</b>	<b>P</b> otato <b>D</b> extrose <b>b</b> roth
<b>PR</b>	<b>P</b> ouvoir de la <b>R</b> éduction en %
<b>α</b>	<b>P</b> ouvoir rotatoire à la température de 20°C (sauf indication contraire) pour la longueur d'onde de 589 nm (raie D du Sodium).

# *Introduction*

---

La qualité microbiologique d'un aliment constitue l'une des bases essentielles de son aptitude à satisfaire la sécurité du consommateur. Un aliment, exposé à la détérioration par les bactéries et les moisissures peut voir diminuer ses caractéristiques sensorielles, nutritives et sanitaires (Rozier *et al.*, 1986; Guiraut, 2003). Malgré l'amélioration des techniques de conservation des aliments, la nature des conservateurs alimentaires reste une des questions les plus importantes pour la santé publique (Burt, 2004).

L'un des principaux problèmes de l'industrie agro-alimentaire est d'assurer une bonne conservation des aliments. Les phénomènes d'oxydation sont notamment redoutés. En effet, au niveau des lipides, les dégradations oxydantes conduisent à une perte en vitamines, une diminution de la valeur nutritionnelle, une détérioration du goût et même parfois à l'apparition de substances toxiques (Pascal, 1979; Nessrien & Mohamed, 2007). Des quantités substantielles de produits alimentaires stockés sont attaquées par des bactéries et des moisissures dans le monde entier. En particulier dans les pays en voie de développement, les aliments stockés subissent des dommages sérieux, menant aux pertes économiques et au risque sanitaire. Les moisissures sont également responsables de la formation de goût et de la production des composés et des mycotoxines allergéniques (Ownagh *et al.*, 2010).

Pour faire face aux problèmes d'oxydation et de contamination des denrées alimentaires, l'essor de la chimie a permis l'apparition et l'application de nouvelles substances chimiques en tant que conservateurs alimentaires synthétiques (Moll, 1998). Ces derniers ont été employés couramment pour empêcher la détérioration des aliments (Nakahara *et al.*, 2003). Par la suite, plusieurs conservateurs synthétiques ont été limités dans plusieurs pays, en raison de leurs effets toxicologiques indésirables à long terme, y compris la cancérogénicité (Ho *et al.*, 2009; Chahardehi *et al.*, 2010). De même, la tendance actuelle des consommateurs à chercher une alimentation plus naturelle a incité la recherche, le développement et l'application de nouveaux produits naturels ayant des activités antimicrobiennes et antioxydante dans le but de les utiliser comme alternatives aux conservateurs synthétiques dans le domaine des industries agro-alimentaires.

Les plantes aromatiques ont été traditionnellement employées pour l'assaisonnement et la prolongation de la durée de conservation des aliments (Wang *et al.*, 2010). La plupart de leurs propriétés sont dues aux huiles essentielles produites par leur métabolisme secondaire (Rashid *et al.*, 2010). Ces huiles sont d'intérêt croissant pour les industries et la recherche scientifique en raison, d'une part, de leurs activités antioxydante, antibactérienne et antifongique (Dung *et al.*, 2008), d'autre part, la plupart des huiles essentielles sont classées dans la liste des substances GRAS, qui les rendent utiles en tant que conservateurs naturels dans les industries agroalimentaires (Gachkar *et al.*, 2007; Rasooli *et al.*, 2008).

Sur le plan économique, la complexité des huiles essentielles explique actuellement pourquoi les industriels agroalimentaires ont toujours préféré les composés synthétiques. Ils sont principalement intéressés par la découverte des structures chimiques actives à partir desquelles ils peuvent développer et préparer des analogues synthétiques. Ce sont plus contrôlables du point de reproductibilité, brevetabilité, et sont plus économiquement viables. En conséquence, les différents composants d'huiles essentielles sont actuellement sous la recherche spécifique pour élucider leur activité particulière (Svoboda & Hampson, 1999).

Parmi les plantes aromatiques, figure le fenouil, dont les graines ont plusieurs utilisations (culinaire, pharmaceutique, etc.). Une recherche dans la littérature scientifique indique qu'il y a peu de rapports d'études sur les propriétés antioxydante et antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des graines du fenouil. Dans ce contexte, cette étude a été menée pour évaluer les activités antioxydante, antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle extraites des graines du fenouil en vue de la proposer comme conservateur dans l'industrie agroalimentaire.

La revue bibliographique de cette étude est articulée en trois chapitres. Le premier chapitre aborde des généralités sur les huiles essentielles. Le deuxième chapitre traite les activités biologiques des huiles essentielles. Le troisième chapitre expose des généralités sur le fenouil et ses huiles essentielles. Cet aperçu bibliographique nous a apparu un appui à la partie expérimentale et à l'interprétation de nos résultats.

La deuxième partie illustre le matériel et les méthodes mis en œuvre pour l'extraction et l'évaluation des activités biologiques (antioxydante, antibactérienne et antifongique) de l'huile essentielle extraite des graines sèches du fenouil. Dans cette partie, nous avons jugé important d'estimer certains paramètres : la concentration efficace à 50% ( $CE_{50}$ ) ; la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration minimale bactéricide (CMB) ; la concentration minimale fongistatique ( $CMF_S$ ), la concentration minimale fongicide ( $CMF_C$ ) et l'index antifongique ( $IA_{50}$ ). L'estimation de ces paramètres est justifiée par le fait qu'avant d'utiliser une molécule comme conservateur dans un aliment, les concentrations minimales efficaces doivent être connues, puisque, il est intolérable quand les doses antioxydante et/ou antimicrobienne efficaces dépassent les niveaux acceptables organoleptiques.

La troisième partie expose les résultats obtenus suivis des interprétations et quelques fois des comparaisons sont faites avec certains travaux réalisés dans le même contexte et d'une conclusion générale avec des perspectives.

*Synthèse*  
*Bibliographique*

---

## **Chapitre 1. Généralités sur les huiles essentielles**

---

### **1.1 Bref historique**

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C. (Baser & Buchbauer, 2010). Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses. Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. Ces utilisations concernaient différents domaines : parfumerie, médecine, rites religieux, coutumes païennes, alimentation, etc.

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation et, avec l'ère arabe de la civilisation, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, Avicenne, médecin et scientifique persan, a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques.

Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique. Parallèlement, leur utilisation a aussi tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie. René-Maurice GATTEFOSSE a créé, en 1928, le terme de l'aromathérapie et il a mené de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment leurs propriétés ; ces résultats seront à l'origine de nombreuses autres recherches (Besombes, 2008).

### **1.2 Définition**

Le terme « huile essentielle » a été inventé au 16<sup>ième</sup> siècle par le médecin Suisse Paracelsus Von HOHENHEIM pour désigner le composé actif d'un remède naturel (Burt, 2004). De très nombreux auteurs ont tenté de donner une définition des huiles essentielles. D'après William Naves [1874-1936], aucune des définitions des huiles essentielles n'a le mérite de la clarté, ni celui de la précision. Cet auteur définit les huiles essentielles comme « des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passent avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau » (Garnéro, 1996). Cette définition a été reprise à peu de choses près par AFNOR et ISO : « l'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe frais de certains agrumes, soit par distillation. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » (ISO, 1997; AFNOR, 2000).

Pour certains auteurs comme Carette (2000), il est important de distinguer huile essentielle et essence ; cette dernière est une sécrétion naturelle élaborée par l'organisme végétal, contenue dans divers types d'organes producteurs, variables selon la partie de la plante considérée. En revanche, une huile essentielle est un extrait naturel de matières premières d'origine végétale, obtenu par distillation par la vapeur d'eau, c'est-à-dire que l'huile essentielle est l'essence distillée.

Les huiles essentielles n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Parmi les 1 500 000 espèces végétales, 10% seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essence aromatique (Bruneton, 1999; Degryse *et al.*, 2008). Certaines familles se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles regroupent, en particulier les Labiés, les Ombellifères, les Myrtacées et les Lauracées (Benayad, 2008).

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles, dans des poils sécréteurs, dans des poches sécrétrices ou dans des canaux sécréteurs (Bruneton, 1999; Hazzit, 2002; Boz *et al.*, 2009). Elles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : les fleurs, les feuilles, les racines, les rhizomes, les fruits, le bois et/ou les graines (Bruneton, 1993; Anton et Lobstein, 2005).

### **1.3 Production mondiale**

Plusieurs pays tirent une grande partie de leurs ressources de l'exploitation des plantes à huiles essentielles. On estime aujourd'hui à environ 40 000 le nombre d'espèces aromatiques croissant dans le monde dont 3 000 ont été étudiées et 300 sont exploitées industriellement (Souza *et al.*, 2006b). Plus de 90 % des espèces à étudier et à valoriser poussent dans les pays tropicaux (Ouamba, 1991). Les principales huiles essentielles produites et les principaux pays producteurs sont résumés dans le tableau 1.

**Tableau 1.** Récapitulation des principales huiles essentielles produites et des principaux pays producteurs dans le monde en 2008 (Perfumer & Flavorist, 2009).

Huiles essentielles	Production (Tonnes)	Principaux pays producteurs
Huiles d'oranges	51000	USA, Brésil, Argentine
Huiles du citron	9200	Argentine, Italie, Espagne
Huiles de l'eucalyptus	4000	Chine, Inde, Australie, Afrique du Sud
Huile de la menthe poivrée	3300	Inde, USA, Chine
Huile du clou de girofle	1800	Indonésie, Madagascar
Essence de la citronnelle	1800	Chine, Sri Lanka
Huiles de la menthe verte	1800	USA, Chine
Huiles du bois de cèdre	1650	USA, Chine
Huile du patchouli	1200	Indonésie, Inde
Huile de la lavande	1100	France

#### 1.4 Biosynthèse et composition chimique

La cellule végétale est le siège de la biosynthèse des composés fondamentaux de la matière vivante. Elle est capable de coordonner les multiples réactions enzymatiques conduisant à la production d'huiles essentielles. Certaines cellules prennent en charge ces biosynthèses et également le stockage des métabolites formés. Il s'agit là de tout un ensemble de réactions biochimiques participant à la vie des plantes : respiration, photosynthèse, etc. (Garnéro, 1996). Il en résulte que les huiles essentielles, constituées des mélanges complexes de composés organiques, possèdent des structures et des fonctions chimiques très diverses (Lahlou, 2004). Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (isopréniques, monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes) (Bruneton, 1999; Seguin, 2001; Rhayour, 2002; Bowles, 2003; Chami, 2005; Clarke, 2008; Baser & Buchbauer, 2010) d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents, d'autre part. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (Bruneton, 1993; Bruneton, 1999).

## 1.5 Caractéristiques et propriétés physiques

Les huiles essentielles sont constituées de molécules aromatiques de très faible masse moléculaire (Degryse *et al.*, 2008). Elles sont très inflammables et très odorantes, liquides à température ambiante. Exposées à l'air, les huiles essentielles se volatilisent. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau sauf les huiles essentielles de sassafras, de girofle et de cannelle. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée (optiquement active) (Bruneton, 1999; Rhayour, 2002; Desmares *et al.*, 2008).

Elles ont parfois un toucher gras ou huileux mais ce ne sont pas des corps gras. Par évaporation, peuvent retourner à l'état de vapeur sans laisser de traces, ce qui n'est pas le cas des huiles fixes (olive, tournesol ...) qui ne sont pas volatiles et laissent sur le papier une trace grasse persistante (Bernadet, 2000).

Les huiles essentielles ne sont que très peu solubles ou pas du tout dans l'eau. Entraînables à la vapeur d'eau, elles se retrouvent dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable qui tend à se collecter en gouttelettes de grosse taille (Rhayour, 2002; Benini, 2007; Benayad, 2008). Par contre, elles sont solubles dans les solvants organiques usuels (Bruneton, 1999).

## 1.6 Analyses des huiles essentielles et critères de qualité

Selon Buchbauer (2000), seulement une connaissance détaillée des constituants d'huile essentielle mènera à une utilisation appropriée. Selon la Pharmacopée française et européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais. Ce contrôle a pour but de définir les caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle comme masse volumique, indice de réfraction, indice d'acide, indice d'ester, etc. Ces caractéristiques propres à chaque huile seront ensuite utilisées pour décrire l'huile essentielle et servir de critère de qualité. Les méthodes de détermination des caractéristiques physico-chimiques à utiliser sont décrites avec précision dans le recueil de normes publiées par l'Association Française de Normalisation (AFNOR, 1996), elles-mêmes identiques aux normes internationales de l'ISO (ISO, 1997).

Deux autres types d'analyse qui ont pour but d'identifier les différents constituants de l'huile essentielle afin d'en connaître la composition chimique: la chromatographique en phase gazeuse GC et la chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse GC/MS. La chromatographique en phase gazeuse GC est utilisée pour l'analyse quantitative et la chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse GC/MS pour l'analyse qualitative (Lamarti *et al.*, 1993; Marriott *et al.*, 2001; Lahlou, 2004; Bourkhiss *et al.*, 2007).

La GC et la GC/MS permettent, en plus de connaître très exactement la composition chimique, la recherche d'éventuelles traces de produits indésirables tels des pesticides ou des produits chimiques ajoutés (Renata *et al.*, 2006 ; Baser & Buchbauer, 2010). Des composés qui ne sont pas facilement séparés par GC, et les molécules structurellement semblables comme les composés stéréoisomériques d'huiles essentielles sont analysés par  $^{13}\text{C}$ -NMR (Nuclear Magnetic Resonance),  $^1\text{H}$ -NMR, etc. (Lahlou, 2004; Baser & Buchbauer, 2010).

### 1.7 Extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles mais, selon la définition de l'AFNOR et l'ISO, les méthodes utilisées pour extraire les huiles essentielles sont : l'hydrodistillation « *water distillation* » où le matériel végétal à extraire est en contact direct avec l'eau en ébullition, la vapeur d'eau produite entraîne avec elle les essences de la plante (Belleau, 1990; Pingot, 1998; Bruneton, 1999; Baser & Buchbauer, 2010), entraînement à la vapeur « *steam distillation* » à la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter (Lesley, 1996; Marriott *et al.*, 2001; Lahlou, 2004; Lucchesi, 2005) et l'expression à froid, ce procédé est réservé surtout aux agrumes (Lesley, 1996; AFNOR, 1996).

La distillation est la méthode la plus ancienne et, également, la plus utilisée (Bruneton, 1999). En revanche, une remarque s'impose dès à présent, la distillation ne permet pas d'extraire la totalité des principes actifs lourds d'un végétal mais seulement les composés volatils entraînés. De plus, ces procédés présentent des inconvénients dus principalement à l'action de la vapeur d'eau ou de l'eau à l'ébullition, certains organes végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau et par hydrodistillation (Garnéro, 1996).

Des techniques plus récentes, d'un emploi très limité, pourraient résoudre tous ces problèmes, comme l'enflourage, les fluides subcritiques ou supercritiques, les micro-ondes, les fluides sous pression, etc. (Kaufmann & Christen, 2002; Lucchesi *et al.*, 2004; Lucchesi, 2005 ; Piochon, 2008). Par exemple la distillation assistée par microonde fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée parce qu'elle présente beaucoup d'avantages : technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (Chiasson *et al.*, 2001; Kaufmann & Christen, 2002; Lahlou, 2004; Lucchesi *et al.*, 2004; Olivero-Verbel *et al.*, 2010).

## **1.8 Paramètres influençant la composition quantitative et qualitative des huiles essentielles**

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité est fondamentale car les activités biologiques qui découlent des huiles essentielles peuvent être très différentes (Garnéro, 1991; Bruneton, 1999; Benini, 2007). Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs d'origine intrinsèque, spécifiques du bagage génétique de la plante ou extrinsèque, liés aux conditions de croissance et de développement de la plante.

### **1.8.1 Facteurs intrinsèques**

Une huile essentielle doit avant tout autre chose être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue pour éviter toutes dénominations trompeuses du matériel végétal (Bruneton, 1999). L'influence du stade végétatif (Garnéro, 1991; Bruneton, 1999; Stefanini *et al.*, 2006a; Aprotosoiaie *et al.*, 2010), l'organe de la plante (Maffei et Sacco, 1987 ; Barry, 2001 ; Stefanini *et al.*, 2006a; Chowdhury *et al.*, 2009), les hybridations, les facteurs de mutation, la polyploïdie (Garnéro, 1991; Aprotosoiaie *et al.*, 2010) et le polymorphisme chimique « chimiotypes ou formes physiologiques » (Garnéro, 1991; Anton et Lobstein, 2005; Belyagoubi, 2006) sont les principaux facteurs intrinsèques qui influencent la composition et le rendement des huiles essentielles.

### **1.8.2 Facteurs extrinsèques**

Les conditions environnementales influencent aussi la composition des huiles essentielles. La température, la quantité de lumière, la pluviométrie et les conditions édaphiques représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique d'une plante aromatique donnée (Bruneton, 1999; Mohammad *et al.*, 2009; Olle et Bender, 2010; Aprotosoiaie *et al.*, 2010). Il n'y a pas eu mal des travaux ayant mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première (Barry, 2001; Mohammedi, 2006; Marzoukia *et al.*, 2009), les conditions culturales telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles (Barry, 2001; Lahlou, 2004; Stefanini *et al.*, 2006a; Benini, 2007; Aprotosoiaie *et al.*, 2010).

L'instabilité des constituants des huiles essentielles explique que la composition du produit obtenu par hydrodistillation soit, le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal. Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters mais aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations, des oxydations, etc. (Silou, 2003; Lucches, 2005).

La méthode d'extraction (Huang *et al.*, 1987; Weinreich et Nitz, 1996; Bruneton, 1999; Mohamed, 2005; Abramson *et al.*, 2007; Benini, 2007; Silano & Delbò, 2008) et l'état du matériel végétal (Pinto *et al.*, 2006; Hettiarachichi, 2008) influent aussi sur la composition et le rendement des huiles essentielles. Il faut aussi signaler que le stockage des matières premières avant distillation peut également influencer la composition et le rendement des huiles essentielles (Besombes, 2008).

### **1.9 Données toxicologiques**

Les huiles essentielles sont présentées, généralement comme « sans danger ». Mais ces substances naturelles sont aussi des composés puissants (Degryse *et al.*, 2008). Par leur composition chimique complexe, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome (Benzeggouta, 2005).

Les effets toxiques d'une huile essentielle varient considérablement selon sa nature (Traoré, 2006). Certaines huiles essentielles se révèlent cytotoxiques. Les huiles essentielles du thym et de la lavande, selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact ; à titre d'exemple, elles sont avérées cytotoxiques pour des cellules de hamster chinois. Par ailleurs, des huiles essentielles de différentes variétés d'origan ont montré une forte cytotoxicité sur des cellules humaines dérivées du cancer (Pibiri, 2006).

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë faible ou très faible par voie orale: une DL<sub>50</sub> comprise entre 2 et 5 g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées (anis, eucalyptus, girofle, etc.) ou le plus fréquemment supérieure à 5 g/kg (camomille, citronnelle, lavande, marjolaine, vétiver, etc.) ; d'autres ont une DL<sub>50</sub> inférieure à 1g/kg : l'huile essentielle de boldo (0.13 g/kg) ; l'essence de moutarde (0.34 g/kg) ; les essences d'origan et de la sarriette (1.37 g/kg) ; les huiles essentielles du basilic, de l'estragon et de l'hysopé (1.5 ml/kg). Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue (Bruneton, 1999; Benzeggouta, 2005).

## **Chapitre 2. Activités biologiques des huiles essentielles**

---

Les vertus des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles des plantes aromatiques.

### **2.1 Activité antioxydante**

#### **2.1.1 Définition d'un antioxydant**

Le progrès de l'oxydation a comme conséquence la détérioration complète des aliments. La dégradation oxydative des constituants de nature lipidique de nos aliments présente des inconvénients à la fois aux plans organoleptique, nutritionnel, fonctionnel, économique et hygiénique (Alais *et al.*, 2003, 2008; Rolland, 2004; Jeantet *et al.*, 2006 ; Sani, 2006; Nessrien & Mohamed, 2007; Rashid *et al.*, 2010). La lutte contre l'oxydation des lipides représente donc un enjeu considérable pour les industriels alimentaires. Pour supprimer ou ralentir l'oxydation des lipides, deux voies sont envisageables : tenter de réduire les facteurs favorables à cette oxydation et/ou trouver un réactif qui ralentit l'oxydation : c'est le rôle de l'antioxydant (Moll, 1998; Jeantet *et al.*, 2006). Ce dernier est défini comme une substance qui, à de faibles concentrations comparées à celles des substrats oxydables, prévient significativement ou retarde l'initiation du processus d'oxydation (Beirão & Bernardo-Gil, 2006).

L'anhydride sulfureux et ses combinaisons minérales ont été utilisés comme premiers antioxydants, mais ces composés possèdent un caractère fortement allergisant (Portes, 2008). On trouve aussi d'autres composés comme le gallate de propyle, le gallate d'octyle, le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT) et le tert-butylhydroquinone (TBHQ) (Bondet *et al.*, 1997). Le plus grand avantage de ces derniers est lié à leur coût bas d'une part, leurs propriétés chimiques et technologiques bien étudiées, qui satisfont dans la plupart des cas la demande des producteurs (Petkov *et al.*, 1984) d'autre part. En revanche, le BHA et le BTH ont été avérés cancérigènes (Nessrien and Mohamed, 2007; Gachkar *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2009; Rashid *et al.*, 2010; Olivero-Verbel *et al.*, 2010). Le TBHQ a été interdit au Japon, au Canada et en Europe. De même, le BHA a été également éliminé de la liste des composés GRAS (Rashid *et al.*, 2010). Par conséquent, il y a grand intérêt mondial pour la recherche de nouvelles sources d'antioxydants, naturelles et sûres (Kulevanova & Panovska, 2001; Caldefie-Chezet *et al.*, 2003; Bouhdid *et al.*, 2006; Pamphile *et al.*, 2009; Raza *et al.*, 2009; Dongmo *et al.*, 2010).

### 2.1.2 Essais de l'activité antioxydante dans les aliments

Quelques récentes publications ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que quelques antioxydants synthétiques (Hussain *et al.*, 2008, 2010). Les effets antioxydants d'huiles essentielles et d'extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique (Hussain, 2009).

Des études de l'équipe du Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation (Caillet et Lacroix, 2007).

Banias *et al.* (1992) ont étudié les activités antioxydantes de combinaison des extraits de plantes de thym, origan, marjolaine et sauge avec l'acide citrique en saindoux stockés à 75°C. Ils ont trouvé une efficacité synergique de l'acide citrique avec les extraits de thym.

Une étude a été conçue pour comparer l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Centella asiatica* et celle du BHA. Les teneurs en acide gras libre (FFA), les teneurs en peroxyde (PV), les teneurs en iode, les diènes conjugués (Cd) et les triènes conjugués (Ct) sont déterminés pour surveiller l'activité antioxydante de l'huile essentielle et du BHA dans l'huile de tournesol. L'huile essentielle a montré une activité antioxydante forte en interdisant l'augmentation des paramètres oxydants mentionnés ci-dessus (Raza *et al.*, 2009). Récemment, une autre étude a été réalisée pour essayer la formulation des margarines de table additionnées d'huiles essentielles de *Citrus limon*, en vue de les exploiter et de les substituer à un additif synthétique : le Tocoblend. L'évaluation de la stabilité oxydative est réalisée par les tests de Rancimat et Schaal, les résultats obtenus ont montré que les margarines à huiles essentielles de *Citrus limon* étaient plus résistantes que celle au Tocoblend vis-à-vis de l'oxydation forcée (Himed, 2011).

### 2.1.3 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

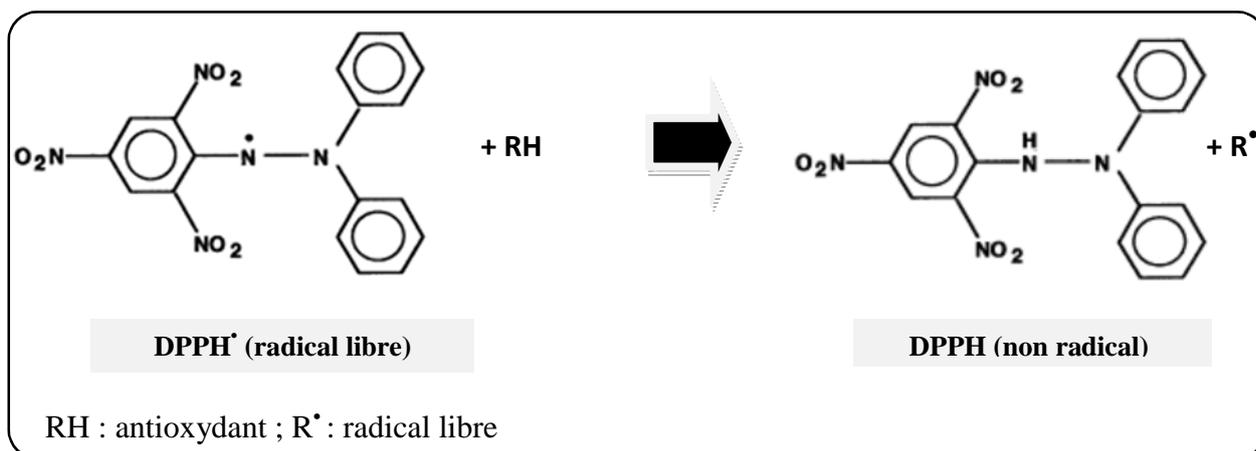
Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des huiles essentielles sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agent antioxydant (huile essentielle). Selon la bibliographie, les méthodes les plus utilisées sont celles de la réduction du 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH<sup>\*</sup>), de l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique, de la chélation des métaux et de blanchiment du  $\beta$ -carotène dans l'acide linoléique.

La mesure de l'inhibition de la peroxydation d'acide linoléique est une méthode efficace pour l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles. Cette activité est déterminée par le pourcentage d'inhibition de la peroxydation d'acide linoléique (Hussain *et al.* 2008). Cette méthode est utilisée par beaucoup des auteurs pour évaluer le potentiel antioxydant des huiles essentielles (Iqbal *et al.*, 2005; Yassa *et al.*, 2009; Hussain *et al.* 2008, 2010; Dongmo *et al.*, 2010).

La méthode de chélation des métaux est employée pour déterminer la puissance de réduction des huiles essentielles où les réductants (huiles essentielles) ramènent le complexe de  $Fe^{3+}$ /ferricyanide [ $FeCl_3/K_3Fe(NC)_6$ ] à la forme ( $Fe^{2+}$ ) ferreuse (Oyaizu, 1986; Wang *et al.*, 2010). Par conséquent, selon la puissance de réduction des huiles essentielles, la couleur jaune de la solution d'essai change en vert ou en bleu (Nikhat *et al.*, 2009). Cette méthode a été utilisée par beaucoup d'auteurs pour déterminer la puissance de réduction des huiles essentielles (Oyaizu, 1986; Faria *et al.*, 2006; Wangcharoen & Morasuk, 2007; Chairgulprasert *et al.*, 2008; Chua *et al.*, 2008; Nikhat *et al.*, 2009; Aiyegoro & Okoh, 2010; Wang *et al.*, 2010; Loganathan *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2010).

Le blanchiment du  $\beta$ -carotène dans l'acide linoléique et de la réduction de DPPH $\cdot$  sont des méthodes efficaces, simples, reproductibles et rapides pour évaluer les propriétés antioxydantes des huiles essentielles (Mayachiew & Devahastin, 2008; Hussain, 2009). L'analyse de balayage de DPPH $\cdot$  est la fréquemment utilisée pour la détermination de l'activité antioxydante des huiles essentielles (Cuendet *et al.*, 1997; Kirby & Schmidt, 1997; Burits et Bucar, 2000; Burits *et al.*, 2001; Gramza *et al.*, 2005; Gachkar *et al.*, 2006; Simionatto *et al.*, 2007; Shin & Baek, 2007; Ho *et al.*, 2008; Yen & Chang, 2008; Hussain *et al.*, 2008; Chairgulprasert *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2009; Nikhat *et al.*, 2009; Fayed, 2009; Dongmo *et al.*, 2010; Džamić *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2010; Imelouane *et al.*, 2010).

Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH $\cdot$ ) est un radical organique stable, coloré et centré sur l'azote (Blois, 1958). Le maximum de son absorption se situe vers 515 nm dans le méthanol et l'éthanol (Portes, 2008). Les antioxydants donneurs d'atome H (RH) sont capables de réduire DPPH $\cdot$ , ce qui conduit au 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH-H) et au radical R $\cdot$ . Le DPPH $\cdot$  a une couleur violette ou rouge pourpre mais cette couleur disparaît lorsqu'il est réduit par un capteur de radicaux (figure 1) (Hubert, 2006; Prakash, 2001).



**Figure 1.** Réaction du DPPH<sup>•</sup> avec un antioxydant (Prakash, 2001; Molyneux, 2004).

Le rapport DPPH<sup>•</sup>/antioxydant doit être adapté à la stœchiométrie du composé (nombre de radicaux réduits par molécule d'antioxydant) et le DPPH<sup>•</sup> doit être en excès. Ce test, largement utilisé, est rapide et facile à réaliser ; il permet de comparer un grand nombre de composés ou un seul composé à plusieurs dilutions. De plus, contrairement aux autres tests, les conditions utilisées (solvants organiques et faible température) évitent l'autooxydation des molécules testées (Portes, 2008). Le test du DPPH<sup>•</sup> permet aussi de déterminer un paramètre cinétique : la constante de vitesse du premier transfert d'atome H, et un paramètre statique : la stœchiométrie. Ces paramètres définissent l'activité antioxydante intrinsèque des molécules testées (Goupy *et al.*, 2003; Roche *et al.*, 2005).

Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de réduction de DPPH<sup>•</sup>, pour une concentration en extrait donné et un temps donné. Le test de réduction du DPPH<sup>•</sup> permet aussi de calculer la CE<sub>50</sub> (Dongmo *et al.*, 2010). La valeur CE<sub>50</sub> est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH<sup>•</sup> (Simionatto *et al.*, 2007).

Ce test peut se faire sur Chromatographie sur couche mince ; les extraits à tester sont déposés sur des CCM de gel de silice GF<sub>254</sub> en aluminium et développés dans des systèmes appropriés. Après le séchage, les CCM sont giclées avec une solution méthanolique à 2mg/ml de DPPH<sup>•</sup>. Les activités antiradicalaires apparaissent sous forme de spots de couleur jaune blanc sur fond violet (Calvin, 2001; Braca *et al.* 2002; Raza *et al.*, 2009; Dramane *et al.*, 2010). Ce test a été utilisé par beaucoup d'auteurs pour évaluer le potentiel antioxydant d'huiles essentielles (Simionatto *et al.*, 2007; Salazar-Aranda *et al.*, 2009; Paramapojn & Gritsanapan, 2009; Ho *et al.*, 2009, 2010).

Cependant, le test de réduction au DPPH<sup>•</sup> peut poser des difficultés d'interprétation lorsque les composés testés possèdent une bande d'absorption dans le visible vers 515 nm, interférant avec celle du DPPH<sup>•</sup>. Le test avec l'ABTS<sup>+</sup> est alors recommandé car on peut interpréter les résultats sur la bande à 734 ou 815 nm (Schlesier *et al.*, 2002), n'interférant plus avec celle du composé testé, tandis que le DPPH<sup>•</sup> ne possède pas d'autres bandes d'absorption à plus grande longueur d'onde. De plus, ce radical est instable à la lumière et son absorbance à 515 nm décroît sans l'intervention d'un quelconque antioxydant ; c'est pourquoi les tests réalisés avec le DPPH<sup>•</sup> doivent impérativement se faire à l'obscurité (Portes, 2008).

## **2.2 Activité antimicrobienne**

### **2.2.1 Définition d'un antimicrobien**

La qualité microbiologique des aliments constitue l'une des bases essentielles de leur aptitude à satisfaire aussi bien la sécurité des consommateurs que la conservation des aliments. Un aliment, exposé à la détérioration par les bactéries et les moisissures peut voir diminuer ses caractéristiques sensorielle, nutritive et sanitaire (Rozier *et al.*, 1986; Guiraut, 2003).

L'essor de la chimie a permis l'apparition de nouvelles substances antimicrobiennes. Ces dernières sont définies comme étant des substances utilisées pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens et antifongiques (CE, 2001). Ces substances synthétiques ont été employées couramment. Cependant, en raison du souci croissant des consommateurs aux denrées contenant de tels additifs chimiques, la recherche des additifs naturels, particulièrement d'origine végétale, a notamment augmenté ces dernières années. Par conséquent, le développement des produits naturels possédant une activité antibactérienne s'avère nécessaire et utile (Rožman & Jeršek, 2009).

Les huiles essentielles sont connues pour posséder l'activité antimicrobienne et certaines sont classées comme des substances sûres et pourraient donc être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants (Gachkar *et al.*, 2007; Rasooli *et al.*, 2008).

### **2.2.2 Essais de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles dans les aliments**

Les plantes aromatiques et leurs huiles essentielles ont été employées pendant des milléniums pour fournir des saveurs caractéristiques pour les aliments et les boissons (Baydar *et al.*, 2004).

En plus de la saveur contribué aux aliments, beaucoup de plantes aromatiques et leurs huiles essentielles montrent une activité antimicrobienne et pourraient empêcher la croissance des microorganismes d'altération et pathogènes, améliorant de ce fait la sécurité alimentaire (Sacchetti *et al.*, 2005; Hadizadeh *et al.*, 2009; Piyo *et al.*, 2009; Udomsilp *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2009). La plupart des publications ont confirmé la possibilité d'employer les huiles essentielles dans les aliments pour prolonger la durée de conservation des aliments (Bagamboula *et al.*, 2004; Piyo *et al.*, 2009; Hadizadeh *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2009; Foda *et al.*, 2010; Ghasemi *et al.*, 2010). Par exemple l'origan, le romarin, la sauge et le thym sont les assaisonnements typiques particulièrement dans la région méditerranéenne. Ces herbes ont un statut de GRAS donné par Food and Drug Administration (2006), signifiant qu'elles sont généralement sûres et sans danger pour la consommation humaine (Rasooli *et al.*, 2008).

Parmi le groupe diversifié des constituants chimiques des huiles essentielles, le carvacrol, qui exerce une action antimicrobienne bien distinguée, est additionné à différents produits alimentaires en industrie agro-alimentaire (Fenaroli, 1995). Il y est rajouté pour améliorer le goût et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires (Rhayour, 2002).

Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles de thym, d'origan, de cannelle et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxinogénèse de plusieurs bactéries et champignons responsables de toxi-infections alimentaires (Bilgrami *et al.*, 1992; Beraoud, 1990; Nielsen & Rios, 2000).

Dans certains cas, les concentrations des huiles essentielles nécessaires pour inhiber les micro-organismes dans un aliment dépassent celles *in vitro*. Quand un extrait est mélangé dans un aliment, l'effet antimicrobien est réduit par la réaction ou interaction avec les composants des aliments (Pandit et Shelef, 1997; Karatzas *et al.*, 2001). Une disponibilité d'éléments nutritifs est plus élevée dans les aliments une fois comparée au bouillon ou à l'agar synthétique ce qui permet à quelques bactéries de devenir capables de réparer plus rapidement les dommages cellulaires provoqués par des composés d'huiles essentielles (Souza *et al.*, 2006b).

Des huiles essentielles d'eugénol, de clou de girofle, d'origan et du thym se sont avérées efficaces à un niveau de 5-10µl/g pour *Listeria monocytogenes* dans des produits à base de viande (Vrinda Menon et Garg, 2001). La teneur en graisse semble réduire nettement l'action d'huiles essentielles dans des produits à base de viande. Par exemple, l'huile essentielle de la menthe n'était pas efficace dans les produits avec un taux élevé de graisse (Tassou *et al.*, 1995; Gill *et al.*, 2002).

Plusieurs huiles essentielles des plantes aromatiques ont totalement empêché le développement fongique sur des grains de maïs (Montes-Belmont et Convajal, 1998) et sur des grains de riz (Piyo *et al.*, 2009).

L'application des huiles essentielles comme substances antimicrobiennes dans les aliments est souvent découragée en raison de la perte potentielle d'action antimicrobienne due à leur volatilité et lipophilicité. Une alternative serait d'examiner les aliments qui n'exigent pas l'incorporation directe d'huile essentielle, par exemple la décontamination des légumes frais (Bagamboula *et al.*, 2004; Hadizadeh *et al.*, 2009). Foda *et al.* (2010) ont proposé d'incorporer les huiles aux produits qui ont déjà une saveur forte, ou employer les composants les plus actifs au lieu de l'huile essentielle entière. Ceci réduirait les changements des propriétés organoleptiques, tout en maintenant l'activité antimicrobienne.

Peu de conservateurs contenant des huiles essentielles sont déjà disponibles dans le commerce. Le « DMC Base Natural » est un conservateur produit par *DOMCA S.A., AlhendIn, Granada, Spain* et comporte 50% des huiles essentielles du romarin, de la sauge et du citron. Les « Protecta One » et « Protecta Two » sont des mélanges d'extraits d'herbes produits par *Bavaria Corp. Apopka, FL, USA* et sont classés comme des additifs alimentaires GRAS aux USA (Burt, 2004).

Il est recommandé d'appliquer les huiles essentielles ou leurs composés en tant qu'élément d'un système d'obstacle et de les employer comme composant antimicrobien avec d'autres techniques de conservation, par exemple en combinaison avec la température et le pH réduits (Koutsoumanis *et al.*, 1999); d'employer une combinaison synergique d'huiles essentielles et de leurs composés (Ultee *et al.*, 1998; Bagamboula *et al.*, 2004; Yen & Chang, 2008; Patrone *et al.*, 2010), de ce fait permettant de diminuer leurs concentrations et de réduire au minimum des effets sensoriels défavorables. À cet égard, beaucoup de combinaisons avec d'autres composés (antimicrobiens) ont été examinées. La nisine, un agent antimicrobien, qui n'a pas une activité contre des bactéries Gram-, combinée avec le carvacrol ou le thymol a montré un effet synergique sur la viabilité des cellules de *Bacillus cereus* (Ettayebi *et al.*, 2000; Periago *et al.*, 2001) et *Bacillus subtilis* (Ettayebi *et al.*, 2000). D'ailleurs, des effets synergiques ont été rapportés entre l'HE de la cannelle et le benzoate de sodium ou le sorbate de potassium (Ceylan *et al.*, 2004) et entre l'HE de l'*Origanum vulgare* L. et l'acide citrique dans de la viande contre *Staphylococcus aureus* (Souza *et al.*, 2009).

### 2.2.3 Mode d'action des huiles essentielles

Dans la bibliographie scientifique, il n'y pas un grand nombre d'auteurs ayant rapporté le mécanisme d'action des huiles essentielles et leurs composants, et jusqu'à maintenant ils n'ont pas totalement compris le mécanisme. Mais quelques auteurs ont donné plusieurs suppositions selon leurs observations.

Du fait de la variabilité quantitative et qualitative des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Souza *et al.*, 2006b; Bajpai & Kang, 2010).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions ( $K^+$ ) (Cox *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2006b). Des conclusions similaires sont obtenues par d'autres auteurs (Rhayour, 2002; Chami, 2005).

Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP (Pavel *et al.*, 2009).

Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée (Wendakoon et Sakaguchi, 1995). Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de DNA, de RNA, des protéines et des polysaccharides (Malecky, 2007). D'autres auteurs pensaient que l'activité inhibitrice de ces composés serait due à leur affinité avec les groupements SH impliqués dans la division cellulaire (Rhayour, 2002).

### 2.2.4 Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles. Ces différentes techniques sont répertoriées et décrites dans des livres (Ahmad *et al.*, 2006a; Baser & Buchbauer, 2010), des mémoires de Magister et thèses de Doctorat (Rhayour, 2002; Benzeggouta, 2005; Pibiri, 2006; Traoré, 2006; Malecky, 2007; kechkar, 2008; Tepsorn, 2009) ainsi que dans différentes publications ( Caldefie-Chezet *et al.*, 2003; Baydar *et al.*, 2004; Burt, 2004; Chang *et al.*, 2008a, b; Oussou *et al.*, 2008; Derwich *et al.*, 2009; Derwich *et al.*, 2010). Ces aperçus édités prouvent qu'il n'y a pas une seule méthode qui est employée par tous les chercheurs pour déterminer quelle est la meilleure méthode pour des analyses *in vitro*.

#### **2.2.4.1 Evaluation de l'activité antibactérienne**

Les différents protocoles peuvent être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle et selon la nature du contact de l'huile essentielle avec le germe. La majorité de chercheurs ont employé une des trois analyses suivantes : diffusion sur disque, dilution d'agar et dilution de bouillon (Burt, 2004). Ces méthodes sont relativement rapides, peu coûteuses et n'exigent pas l'équipement de laboratoire sophistiqué ; cependant, elles ne sont pas sans inconvénients (Wilkinson, 2006).

##### **2.2.4.1.1 Méthode de l'aromatogramme**

En plus de l'appellation méthode de l'aromatogramme (Abdesselam, 2006), elle est appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme (Jacob, 1979), méthode de VINCENT (Pibiri, 2006), méthode de diffusion dans la gélose (agar) (Razakarivony *et al.*, 2009). Elle est particulièrement adaptée à l'étude de l'action antibactérienne. Elle permet de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes vis à vis de l'huile essentielle donnée. Elle peut être aussi adaptée pour tester d'autres agents antimicrobiens (Wilkinson, 2006).

La méthode de l'aromatogramme consiste à utiliser des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé convenable (10-25mL), déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. Des disques en papier filtre, papier buvard ou Wattman (6-8mm), préalablement imprégnés de quantités connues d'HE (5-30µL), sont alors placés en surface de la gélose (Wilkinson, 2006; Traoré, 2006; kechkar, 2008). Généralement, les micro-organismes seront classés susceptibles, intermédiaires ou résistants, selon le diamètre de la zone d'inhibition (Wilkinson, 2006).

Une autre technique de diffusion sans disque, elle consiste en l'aménagement d'une cavité dans la gélose. Cette cavité est ensuite remplie d'un volume donné d'huile essentielle qui va diffuser dans la gélose, et on procède, après incubation, à la mesure du diamètre d'inhibition comme dans la technique précédente (Rhayour, 2002; Wilkinson, 2006).

##### **2.2.4.1.2 Méthode de microatmosphères**

Dans cette méthode, les disques imprégnés par l'huile essentielle sont déposés au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience (couvercle en bas), cette méthode est appelée « Méthode de microatmosphères ». Le disque n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit après incubation, la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance (Beylier-Maurel, 1976; Inouye *et al.*, 2001; De Billerbeck *et al.*, 2002; Lahlou, 2004; Baser & Buchbauer, 2010). Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase vapeur sont encore peu nombreux.

### **2.2.4.1.3 Méthode de dilution**

La méthode par dilution à pour but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrice. Elle consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme (Oussou *et al.*, 2008; Derwich *et al.*, 2010). L'efficacité de l'huile essentielle testée est évaluée par la mesure de 2 concentrations : la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB). Ces concentrations nous permettent de connaître la nature de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle : bactériostatique ou bactéricide.

On ne dispose pas de définition officielle de ces grandeurs, les définitions données (tableau 2) sont celles utilisées dans les études scientifiques. Elles sont donc susceptibles de varier d'un auteur à un autre.

**Tableau 2.** Définition des grandeurs CMI et CMB.

Termes	Définition	Références
<b>CMI</b>	Plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 16 à 20 heures d'incubation à 37°C. Les microorganismes restent cependant viables.	Hammer <i>et al.</i> (1999); De Billerbeck <i>et al.</i> (2002); Bassole <i>et al.</i> (2002); Oussou <i>et al.</i> (2008); Yang <i>et al.</i> (2009).
	Concentration minimale d'huile essentielle qui produit une réduction de plus de 90% de la croissance des colonies microbiennes et est déterminée par la méthode de densité optique.	Ponce <i>et al.</i> (2003); Phattayakorn & Wanchaitanawong (2009).
	Plus basse concentration requise pour l'inhibition complète des microorganismes d'essai jusqu'à 48 heures d'incubation	Wan <i>et al.</i> (1998); Canillac & Mourey (2001)
<b>CMB</b>	Concentration minimale d'huile essentielle nécessaire pour détruire l'inoculum initial après incubation en conditions standards et les microorganismes ne sont plus viables	Ponce <i>et al.</i> (2003); Klaric <i>et al.</i> (2006); Derwich <i>et al.</i> (2010).
	Plus basse concentration à laquelle aucune croissance n'est observée après incubation pendant 5 jours.	Mayachiew & Devahastin (2008)
<b>Bactériostatique</b>	Concentration pour laquelle les bactéries ont échoué à se développer en bouillon, mais elles peuvent se développer quand elles sontensemencées en absence de l'huile essentielle.	Smith-Palmer <i>et al.</i> (1998)
<b>Bactéricide</b>	Concentration pour laquelle les bactéries ne se développent pas en bouillon et ont échoué pour se développer quand elles sontensemencées en absence de l'huile essentielle.	Smith-Palmer <i>et al.</i> (1998)

### A. Méthode de dilution d'agar

La méthode de dilution d'agar est plus économique que celle qui se pratique sur milieu liquide, parce qu'elle a beaucoup d'avantages : un grand nombre de souches peuvent être testées immédiatement, la contamination est facilement détectée et le milieu peut contenir des matériaux opaques. Elle consiste à réaliser des dilutions des huiles essentielles, et les incorporer dans le milieu gélosé fondu et refroidi à 45°C, et à tester sur ce milieu les souches bactériennes à étudier (Benzeggouta, 2005; Wilkinson, 2006; Traoré, 2006; Tepsorn, 2009). Ces dernières sontensemencées à la surface, soit en stries avec une anse calibrée (Benzeggouta, 2005), soit en point avec des micropipettes (De Billerbeck *et al.*, 2002; Mayachiew & Devahastin, 2008).

Cette méthode est utilisée comme un indicateur de l'activité antibactérienne, en plus de la recherche de la valeur réelle lorsque c'est possible. Dans la littérature, les études publiées sur la méthode de dilution d'agar pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de plante aromatiques ou de leurs huiles essentielles ont employé différents dissolvants pour incorporer les extraits dans le milieu (Gachkar *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2008).

### **B. Méthode de dilution de bouillon**

La méthode de dilution en bouillon est utilisée aussi pour déterminer les concentrations minimales inhibitrice. Une gamme de dilution de l'huile essentielle est additionnée à une série de tubes contenant un milieu de culture liquide, de composition convenable. Après inoculation des espèces microbiennes étudiées et incubation dans les mêmes conditions, la concentration minimale inhibitrice est indiquée par le tube de la dilution à partir de laquelle aucune croissance microbienne n'est constatée. C'est-à-dire qu'aucune turbidité ou trouble n'est observé dans le milieu (kechkar, 2008).

Des méthodes de micro-bouillon ont été également développées, utilisant des microplaques et de ce fait réduisant le volume de l'extrait requis (Del-Vechio-Vieira *et al.*, 2009).

Une mesure de turbidité ou une utilisation d'un indicateur de viabilité des microorganismes permettent la détermination des concentrations minimales inhibitrices « resazurine, methylthiazoldiphenyltetrazolium (MTT) » (Kamatou *et al.*, 2006; Caplin *et al.*, 2009; Imelouane *et al.*, 2009, 2010; Hussain *et al.*, 2010). Les méthodes de microplaques nécessitent moins de temps et de moyens que d'autres méthodes (Wilkinson, 2006).

#### **2.2.4.2 Évaluation de l'activité antifongique**

En général, les méthodes d'évaluation de l'activité antifongique sont rapides, moins coûteuses et facile à réaliser. L'activité contre les mycètes filamenteux peut être évaluée par la méthode de diffusion et de la dilution avec les mêmes inconvénients et avantages pour les analyses antibactériennes (Wilkinson, 2006). L'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles peut être effectuée par la méthode de microatmosphères (De Billerbeck *et al.*, 2002; Mohammedi & Fouzia, 2007; Mohammedi *et al.*, 2010; Bajpai & Kang, 2010).

Dans la méthode de dilution d'agar, l'huile essentielle à tester est incorporée à l'agar et alors un disque mycélien activement grandissant est placé au centre de la boîte de Pétri. La croissance radiale du mycète après un temps approprié, selon les caractéristiques de croissance du mycète, est alors mesurée et comparée aux échantillons témoins (Wilkinson, 2006).

Alternativement une suspension fongique de cellules peut être inoculée sur le milieu de culture et les concentrations minimales sont déterminées (Ponce *et al.*, 2003; Klaric *et al.*, 2006; Derwich *et al.*, 2010; Zarrin *et al.* 2010).

### 2.2.4.3 Bioautographie sur CCM

Dans cette technique, la séparation des huiles essentielles en fraction et l'identification de la bioactivité sont réalisées simultanément. Dans cette méthode, la CCM est réalisée pour des huiles essentielles entières ou leurs fractions (Wilkinson, 2006; Tabanca *et al.*, 2007). La CCM développée est alors pulvérisée avec une suspension bactérienne ou fongique ou recouverte avec l'agar semé par les microorganismes (Faria *et al.*, 2006; Özek *et al.*, 2010). La dernière méthode a été, en particulier, employée pour déterminer l'activité des huiles essentielles contre des levures telles que *Candida albicans* (Diallo, 2000, 2005a, b) et des moisissures pathogènes (Faria *et al.*, 2006). Après incubation, on observe les zones d'inhibition (avec ou sans indicateurs de viabilité des microorganismes) autour de ces composés qui indiqueraient l'existence des activités antibactérienne et antifongique (Wilkinson, 2006).

Tandis que cette méthode a l'avantage de combiner la séparation des constituants des huiles essentielles et l'identification simultanée de la bioactivité de ces fractions, elle n'est pas appropriée pour la détection de l'activité d'un produit mélange entre deux composés ou plus. De plus, les résultats seront affectés par la panne ou le changement de composés pendant la phase de fractionnement (Wilkinson, 2006).

Il y a eu beaucoup de publications ayant appliqué cette méthode pour étudier l'activité antimicrobienne des huiles essentielles notamment Nakamura *et al.* (1999); Meazza *et al.* (2003); Tabanca *et al.* (2005; 2007; 2008; 2010) et Fokialakis *et al.* (2006).

### 2.2.5 Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

Les résultats concordants des différentes études permettent de conclure à l'existence d'une activité antibactérienne et antifongique *in vitro* des huiles essentielles. Cette activité, qui entraîne l'inhibition de la croissance, voire la destruction des cellules microbiennes, a été relativement bien étudiée par de nombreuses publications et les auteurs s'accordent sur les résultats obtenus. En revanche, ces résultats obtenus, que se soit au niveau antibactérien ou antifongique, dépendent de plusieurs facteurs. L'activité biologique d'une huile essentielle ne serait pas la même, ce qui rend l'évaluation des activités biologiques difficiles.

#### 2.2.5.1 Dispersion et solubilité des huiles essentielles

Généralement, les huiles essentielles sont médiocrement solubles dans l'eau, et ceci pose beaucoup de problèmes pour étudier leurs propriétés biologiques. Ceci a été confirmé par Griffin (2000) et Southwell *et al.* (1993) qui ont démontré que beaucoup de terpénoïdes, ayant une solubilité médiocre dans l'eau, n'ont pas répandu dans les milieux aqueux et par conséquent

les huiles essentielles riches en ces terpénoïdes ont donné des résultats « faux » dans ces analyses. Afin de surmonter ces problèmes, beaucoup d'auteurs ont recommandé l'utilisation de divers dissolvants dans la dilution d'huiles essentielles telles que l'hexane (Del-Vechio-Vieir *et al.*, 2009), l'acétone, l'alcool, l'éthylène-glycol, l'éther isobutylique (Su *et al.*, 2006), l'éthanol (Chang *et al.*, 2008a, b), le méthanol (Armando & Rahma, 2009) et le DMSO (Ahmed & Abdelgaleil, 2005) et l'emploi d'un émulsifiant comme le Tween 20 ou le Tween 80 dans des pourcentages différents (Fu *et al.*, 2007; Caplin *et al.*, 2009).

### **2.2.5.2 Effet du dissolvant et émulsifiant**

Les dissolvants les plus utilisés dans le laboratoire sont toxiques aux microorganismes et par conséquent influencent les activités biologiques étudiées (Hammer *et al.*, 2003). D'autre part les interactions entre les agents émulsifiants et les constituants des huiles essentielles représentent un facteur important pour la mesure de leur activité antimicrobienne car les agents utilisés pour la solubilisation et la dispersion des huiles essentielles dans le milieu de culture bactérien peuvent diminuer l'activité antimicrobienne. C'est le cas pour le Tween-80, solvant qui neutralise les groupes fonctionnels phénoliques et réduit leur activité antimicrobienne (Inouye *et al.*, 2000; Malecky, 2007). Le choix de dissolvant adéquate (ou du détergent) est indispensable avant d'envisager un essai biologique d'une huile essentielle.

D'autres auteurs ont proposé l'utilisation de 0.2% de l'agar (Remmal *et al.*, 1993a; Satrani *et al.*, 2007). Dans ce cas, la CMI et la CMB trouvées pour différentes espèces bactériennes en présence de l'agar étaient sensiblement inférieures à ceux observées en présence du Tween 80 ou de l'éthanol.

### **2.2.5.3 Méthodes d'évaluation des activités antimicrobiennes**

Une des difficultés pour les chercheurs dans ce secteur est l'absence d'une méthode normalisée pour examiner les activités biologiques des huiles essentielles (Wilkinson, 2006). L'insolubilité des huiles essentielles dans les milieux utilisés en microbiologie, explique la variété des techniques employées. L'analyse fine des méthodes montre des variations de protocole.

En plus de l'insolubilité des huiles essentielles, d'autres facteurs, tels que le volume de l'extrait placé sur le disque, l'épaisseur de la couche d'agar, l'emploi ou non de dissolvant, l'utilisation de différents milieux de culture, les durées d'incubations, etc., varient considérablement entre les études (Inouye *et al.*, 2000; Hammer *et al.*, 2003; Lahlou, 2004; Tepsorn, 2009). L'emploi de ces différentes méthodes peut donc induire des biais dans la comparaison des résultats des différentes études (Degryse *et al.*, 2008).

Inouye *et al.* (2000, 2001) ont étudié l'activité antifongique de plusieurs huiles essentielles et ont prouvé que les valeurs des concentrations minimales inhibitrice peuvent être calculées par une gamme de méthodes. Ils ont prouvé aussi que les ces concentrations trouvées par des analyses qui sont faites dans des conditions fermées (boîtes de Pétri scellées), étaient inférieures à celles ayant été réalisées par des analyses dans les conditions ouvertes.

#### **2.2.5.4 Matrice biologique**

Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles sont différentes en fonction de la matrice à laquelle elles sont ajoutées, ou du fait du contact avec les macromolécules comme les lipides ou les protéines qui protègent les bactéries de l'action des huiles essentielles. Ainsi les huiles essentielles diluées dans la phase lipidique des aliments seront moins efficaces sur des bactéries de la phase aqueuse (Mejlholm et Dalgaard, 2002).

Généralement les concentrations des huiles essentielles et leurs composés nécessaires pour empêcher la croissance microbienne sont plus élevées dans les aliments que dans des milieux de culture. Ce serait dû aux interactions entre les composés phénoliques et la matrice de l'aliment (Karatzas *et al.*, 2001). Le repartitionnement des composants antibactériens hydrophobes d'huile essentielle dans les composés grasses de la nourriture peut les empêcher d'entrer en contact avec les bactéries dans les régions hydrophiles dans les aliments (Gill *et al.*, 2002).

#### **2.2.5.5 Expression des résultats**

La plupart des méthodes utilisées ont été critiquées par plusieurs auteurs. Ces critiques ont été basées sur la discordance observée dans les résultats obtenus concernant l'étude de la zone d'inhibition et l'étude de l'inhibition de la croissance à différentes concentrations d'huiles essentielles.

Les notions de CMI, CMB, CMF<sub>S</sub> et CMF<sub>C</sub> ne sont pas définies de façon précise et universelle, les auteurs ont exprimé les résultats avec différentes unités. Ces concentrations peuvent être exprimées en µg/ml (Oussou *et al.*, 2008), en µl/ml (De Billerbeck *et al.*, 2002) ou en % (vol/vol) (Bourkhis *et al.*, 2007), ce qui rend la comparaison des résultats entre eux difficile.

L'action des composés volatils d'huiles essentielles sur la croissance fongique a été démontrée et a des implications importantes pour le criblage de l'activité antifongique. De ce fait, les résultats des activités antifongiques des huiles essentielles dépendront non seulement du contact direct mais également de la présence et la concentration des composés volatils (Wilkinson, 2006).

### 2.2.5.6 Variation de composition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes des dizaines ou des centaines de composés qui ne peuvent pas agir comme prévus dans l'essai bactériologique. La plupart des publications ne citent pas, souvent, la composition exacte d'huile essentielle étudiée, à cause du manque de l'accès au placement ou à l'équipement pour réaliser la GC-MS et d'autres analyses chimiques des extraits (Marriott *et al.*, 2001; Lahlou, 2004; Wilkinson, 2006).

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (Lahlou, 2001; 2004) et les effets synergiques entre les composants. Ainsi la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant (Pibiri, 2006).

Il est possible de distinguer différents chémotypes au sein d'une même famille botanique de plantes. La composition exacte des huiles étudiées n'est pas toujours précisée dans les articles et on peut supposer que les différences de composition induites par la zone de provenance de l'huile peuvent influencer sur son activité (Degryse *et al.*, 2008).

Le type et la structure moléculaire des composants actifs présents dans les huiles essentielles sont les principaux facteurs modifiant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Ainsi *in vitro*, une activité antimicrobienne plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison des terpènes hydrocarbures a été observée. Les composants oxygénés purs ont aussi montré une activité supérieure par rapport aux huiles essentielles dans lesquelles ils se trouvent (Cox *et al.*, 2001).

L'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Évalués séparément sous la forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'huile essentielle de composition semblable. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à son « *totum* », c'est à dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires. Certaines études ont montré que l'activité des huiles essentielles est supérieure à celle de ses composés majoritaires testés séparément (Lahlou, 2004).

### 2.2.5.7 Type des microorganismes

Un autre paramètre important déterminant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est le type des microorganismes ciblés. En général, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis-à-vis des huiles essentielles.

Les champignons montrent généralement une sensibilité supérieure par rapport aux bactéries et parmi les bactéries, les Gram – apparaissent plus résistants que les Gram + vis-à-vis des huiles essentielles (Cox *et al.*, 2000). Plusieurs travaux notamment ceux de Ouattara *et al.* (1997); Hammer *et al.* (1999); De Billerbeck *et al.*, (2002); Moreira *et al.* (2005); Souza *et al.* (2006a); Ahmad *et al.* (2006b); Ağaoğlu *et al.* (2007); Bouguerra et Zeghou (2009) Derwich *et al.* (2010) et Bari *et al.* (2010), ont confirmé la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-).

## Chapitre 3. Huiles essentielles du fenouil

---

Le fenouil est une herbe avec une grande histoire d'utilisations médicinale et culinaire (Hendawy *et al.*, 2010). Le nom de *Foeniculum* a été donné à cette plante par les Romains et est dérivé du mot latin *foenum*, c'est-à-dire herbe (Kaur & Arora, 2010). Il était bien connu aux anciens et a été cultivé par les Romains antiques pour ses graines aromatiques (Vienna *et al.*, 2005). Le fenouil est communément appelé "besbes" par les populations locales. Ses huiles essentielles sont très utilisées par les industries pharmaceutique, cosmétique et également alimentaire (Lazouni *et al.*, 2007).

### 3.1 Généralités sur le fenouil

#### 3.1.1 Description morphologique

Le fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.) est une herbe aromatique semblable dans l'aspect à l'aneth (Murdock, 2002), bisannuelle ou éternelle. Les tiges sont droites, jaunâtre-vertes pâles, sillonnées et embranchées et s'élève jusqu'à 2m de longueur (Vienna *et al.*, 2005; Kaur & Arora, 2010). Les feuilles élèvent jusqu'à 40cm de longueur ; elles sont finement disséquées, avec des segments finaux filiformes, environ 0.5mm de largeur (Vienna *et al.*, 2005). Les fleurs sont produites dans les ombelles, composés terminaux de 5-15cm de largeur, chaque section d'une ombelle contient 20-50 fleurs jaunes claires minuscules sur des courts pédicules (Stefanini *et al.*, 2006).

Les graines de fenouil sont variées infiniment en longueur, largeur, goût et d'autres caractères. En général, ils ont une forme presque cylindrique avec une base arrondie et un sommet plus étroit couronnés avec un grand stylopede. Ce sont généralement de 3-12mm de longueur et de 3 à 4mm de largeur (Vienna *et al.*, 2005) avec une odeur forte et douce et sont vert bleu d'abord, puis, elles se transforment en brun verdâtre quand ils sont mûris (Kaur & Arora, 2010).

#### 3.1.2 Origine et répartition géographique

*Foeniculum vulgare* Mill., est une plante originaire de l'est du bassin méditerranéen, il est distribué en Europe Centrale et la région méditerranéenne (Vienna *et al.*, 2005; Zahid *et al.*, 2009; Aprotosoiaie *et al.*, 2010). Il est largement cultivé dans toutes les régions tempérées et tropicales du monde, et est employé comme épice culinaire (Singh *et al.*, 2006; EFSA, 2009; Aprotosoiaie *et al.*, 2010).

Le fenouil est également trouvé aujourd'hui en Iran, Inde, Indonésie, Pakistan, Japon et en Chine. Il est cultivé à large échelle en Egypte, Inde, Chine, Australie et en Europe en France, l'Allemagne, la Hongrie et la Pologne (Garnéro, 1996; Vienna *et al.*, 2005; Zahid *et al.*, 2009).

### 3.1.3 Classification botanique

*Foeniculum vulgare* Mill. (Syn. *Anethum foeniculum* L., *Anethum foeniculum* L. et *Foeniculum officinale*) appartient à la famille *Apiaceae* (ou *Ombellifères*), cette dernière est considérée l'une des familles riche en huiles essentielles (Amimar *et al.*, 2001; Olle et Bender, 2010), le genre *Foeniculum* est très polymorphe et représenté seulement par cette espèce qui se divise en deux sous-espèces ssp. *piperitum* et ssp. *vulgare* (Badoc *et al.*, 1995; Vienna *et al.*, 2005; EFSA, 2009). *Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *vulgare* est formée de trois variétés : var. *vulgare* (fenouil amer, commun, sauvage ou médicinal), var. *dulce* (fenouil doux) et var. *azoricum* (fenouil bulbeux) (Amimar *et al.*, 2001; Vienna *et al.*, 2005; Kothe, 2008). Le fruit de cette dernière variété mesure plus de 10cm et pese jusqu'à 400g, formé par les feuilles basales qui ont grandi les uns avec les autres. En revanche, le fenouil doux développe des graines très aromatiques et légèrement sucrées.

Tandis que les deux variétés de fenouil présentées précédemment sont des plantes de jardin appréciées, le fenouil commun pousse également à l'état sauvage. On n'utilise en général que les graines de cette variété (Kothe, 2008).

### 3.1.4 Utilisation des graines de fenouil

Les graines sèches de fenouil ont un goût aromatique et sont utilisées pour assaisonnement des potages et des sauces (Hendawy *et al.*, 2010). Ils sont utilisés aussi pour assaisonner des boissons alcoolisées, pain, poisson, salade, fromage et pour la fabrication des conserves au vinaigre (Vienna *et al.*, 2005; Zahid *et al.*, 2009).

Le fenouil est utilisé comme carminatif (Kothe, 2008; Zahid *et al.*, 2009), stimulant l'appétit, stomachique et diurétique (Stefanini *et al.*, 2006b; Ebeed *et al.*, 2010). Les propriétés analgésique, anti-diarrhéique, antispasmodique, antipyrétique et anti-inflammatoire ont été également rapportées par plusieurs auteurs (Tanira *et al.*, 1996; Stefanini *et al.*, 2006b; Pradhan *et al.*, 2008; Kothe, 2008).

## 3.2 Huile essentielle des graines de fenouil

### 3.2.1 Localisation

Les huiles essentielles de fenouil sont principalement concentrées dans les méricarpes des graines (Stefanini *et al.*, 2006a). Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées dans des canaux sécréteurs (Bruneton, 1993), et sont présentes sous forme de vésicules minuscules localisées entre les cellules, où elles agissent en tant qu'hormones, régulateurs et catalyseurs dans le métabolisme végétal (Mohamed & Abdu, 2004).

### 3.2.2 Extraction et rendement

Les huiles essentielles des graines sèches et mûres de fenouil sont obtenues par hydrodistillation (Vienna *et al.*, 2005) et par entraînement à la vapeur (Clarke, 2008; Garnéro, 1996). L'huile essentielle obtenue par cette dernière méthode est référée en tant que « huile de fenouil », utilisée dans les pays occidentaux pour l'assaisonnement (Singh *et al.*, 2006).

Selon le matériel, la variété, l'origine, le lieu de production et d'autres facteurs extrinsèques et intrinsèques, le rendement en huile essentielle des graines de fenouil varie de 2,5 à 6 % avec une moyenne de 3,5 % (Garnéro, 1996; Kaur & Arora, 2010). Selon Olle & Bender (2010), les huiles essentielles aident la plante à s'adapter à son environnement, par conséquent, les plantes les produisent en quantité plus élevée quand elles sont cultivées dans des conditions extrêmes.

### 3.2.3 Caractéristiques physico-chimiques

Le tableau 3 récapitule les principales caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle des graines de *Foeniculum vulgare* Mill.

**Tableau 3.** Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* Mill. (Garnéro, 1996).

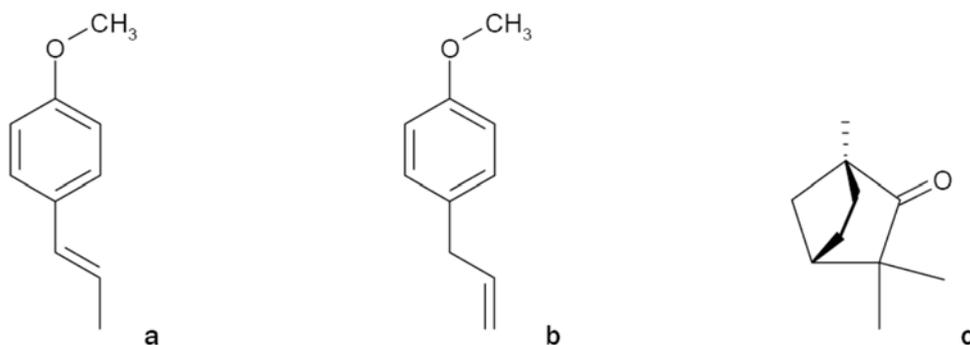
	Caractères
Aspect	Liquide mobile, limpide ; Couleur jaune pâle ; Odeur aromatique anisée, épicée, légèrement camphrée.
Densité $d_4^{20}$	0,889 à 0,921
Indice de réfraction $n_D^{20}$	1,484 à 1,508
Pouvoir rotatoire $\alpha_D^{20}$	+ 20° à + 68°

### 3.2.4 Composition chimique

Les proportions des constituants de l'huile essentielle des graines de fenouil dépendent des facteurs extrinsèque et intrinsèque comme : les conditions climatiques et environnementales, la saison de collection, l'étape de la maturation des fruits, les données génétiques, etc. D'après Özcan & Akgül (2001); Mimica-Dukic *et al.* (2003); Özcan *et al.* (2006); Singh *et al.* (2006); Pitasawat *et al.* (2007); Silano & Delbò (2008); Clarke (2008); Aprotosoiaie *et al.* (2010); et Kaur & Arora (2010), quelque soit la variété de fenouil, les principaux constituants de l'huile essentielle des gaines de fenouil sont : le *Trans*-anéthol, le Fenchone, l'Estragole et le Limonène.

Le *trans*-anéthol compte pour le goût d'anis, l'estragole fournit la douceur, alors que le fenchone donne le goût amer (Stefanini *et al.*, 2006a; Olle & Bender, 2010). Le fenchone est un liquide sans couleur possédant une odeur et un goût piquants et camphrés, ce serait le constituant responsable des propriétés biologiques, par conséquent seulement les variétés de fenouil contenant une bonne proportion de fenchone conviennent pour exploiter leurs activités biologiques (Vienna *et al.*, 2005).

D'autres hydrocarbures monoterpéniques sont également présents en proportions mineurs : l' $\alpha$  et le  $\beta$  fenchène, l' $\alpha$ -pinène, le camphène, le sabinène, le terpinolène, le  $\delta$ -3-carène, les  $\alpha$  et  $\beta$  phellandrène, le *cis* et le *trans* ocimène, le limonène ; le linalol ; le camphre ; le terpin-1-én-4-ol; le foeniculine ; l' $\alpha$ -terpinéol, l'aldéhyde anisique, etc. (Garnéro, 1996; Silano & Delbò, 2008; Clarke, 2008; Chowdhury *et al.*, 2009; Ebeed *et al.*, 2010).



**Figure 2.** Structure chimique du *trans*-anethole (a), de l'estragole (b) et du fenchone(c) (Vienna *et al.*, 2005).

### 3.2.5 Utilisation

Les huiles essentielles des graines de fenouil sont employées en tant qu'aromatisants dans des produits alimentaires comme constituants des produits pharmaceutiques et cosmétiques. (Aprotosoiaie *et al.*, 2010). Elles sont également employées pour assaisonner les aliments préparés comprenant de la viande, de la crème glacée, de la sucrerie, des boissons non alcooliques, etc.

Plusieurs composants de l'huile essentielle de cette plante ont des applications importantes, à savoir, le fenchone est employé comme contre-irritant ; le limonène est employé comme agent de dissolvant, de résines, de mouillage et de dispersion ; le *trans*-anéthol est employé comme aromatisant en parfumerie, en produits de beauté, dans le savon ; l'estragole (méthyle-chavicol) est employé en parfumeries et comme saveur dans les aliments et boissons alcoolisées ; l' $\alpha$ -pinène est utilisé dans la fabrication du camphre, des insecticides, de dissolvants et comme bases des parfums (Stefanini *et al.*, 2006b).

# *Matériel et Méthodes*

---

## **1. Matériel végétal**

### **1.1 Choix du matériel végétal**

Le matériel ou l'organe végétal choisi dans la présente étude est représenté par les graines sèches du fenouil bulbeux (*Foeniculum vulgare* Mill.). Parmi les critères de choix de ces graines, figurent leur utilisation déjà dans l'assaisonnement de certains aliments (donc non toxiques) d'une part et le manque de travaux de recherche sur les propriétés biologiques en particulier les pouvoirs antioxydant et antimicrobien de leurs huiles essentielles d'autre part.

### **1.2 Origine des graines de fenouil**

Les graines de fenouil ont été achetées, sous forme séchée, chez un arboriste. Elles sont originaires d'Ain Ouelman, wilaya de Sétif. Elles ont été récupérées dans un sac propre pour servir ultérieurement à l'extraction.

### **1.3 Description des graines de fenouil**

Les graines sèches de fenouil ont une forme presque cylindrique avec une base arrondie et un sommet plus étroit couronné avec un grand stylopode. Elles sont de 4-6mm de longueur et de 2 à 3mm de largeur avec une odeur aromatique et sont de couleur verte brune (Annexe 3).

## **2. Méthodes**

L'extraction et l'étude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des graines du fenouil ont été réalisées aux laboratoires pédagogiques de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA). Cependant, l'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée au laboratoire de Microbiologie du centre hospitalo-universitaire de Constantine. Pour s'assurer du bon déroulement des tests expérimentaux, les essais sont répétés trois fois.

### **2.1 Extraction de l'huile essentielle des graines du fenouil**

#### **2.1.1 Dispositif d'extraction**

L'extraction de l'huile essentielle (HE) des graines du fenouil a été faite par un hydrodistillateur de type Clevenger (1928). Il est constitué d'un chauffe à plaque, un erlenmeyer à vide en verre pyrex où l'on place le matériel végétal et de l'eau distillée, d'une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement de l'erlenmeyer à vide et une ampoule à décanter qui reçoit les extraits de la distillation et d'un thermomètre pour contrôler la température et éviter le surchauffage (figure 3).



**Figure 3.** Montage de l'hydrodistillateur

### 2.1.2 Procédé d'extraction

Cent grammes (100g) des graines du fenouil sont mises dans un erlenmeyer à vide de 2000ml, additionnées de 600ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition, après l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur ; l'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par le condensateur, qu'est fixé par un support approprié en position inclinée pour faciliter l'écoulement du distillat. Le temps de cette extraction est d'environ trois heures.

Le distillat obtenu est récupéré dans une ampoule à décanter. Le mélange est laissé au repos quelques minutes, ce qui résulte l'apparition de deux phases, l'une est organique (huile essentielle) et l'autre est aqueuse. En fin, le distillat est recueilli dans le collecteur (erlen en verre pyrex) et l'huile essentielle des graines du fenouil sera par la suite récupérée dans un flacon approprié.

### 2.1.3 Conservation de l'huile essentielle obtenue

La conservation de l'huile essentielle exige certaines précautions indispensables (Burt, 2004). C'est pour cela nous avons déshydraté l'huile essentielle des graines du fenouil par le sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (Bajpai *et al.*, 2008) et la conservée à une température voisine de  $4^\circ\text{C}$ , dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement pour la préserver de l'air et de la lumière.

### 2.1.4 Détermination du rendement d'extraction

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle ( $R_{HE}$ ), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction ( $M'$ ) et la masse de la matière végétale utilisée ( $M$ ). Il est donné par la formule suivante :

$$R_{HE} = M'/M.100$$

$R_{HE}$  : rendement en huile essentielle des graines du fenouil ;

$M'$  : masse de l'huile essentielle obtenue en gramme;

$M$  : masse des graines du fenouil utilisée en gramme et qui vaut 100 g.

## 2.2 Etude des activités antiradicalaire et antioxydante

Pour étudier les activités antiradicalaire et antioxydante de l'huile essentielle des graines du *Foeniculum vulgare* Mill., deux méthodes ont été employées : la méthode de réduction du  $\text{DPPH}^\bullet$  pour évaluer l'activité antiradicalaire et la méthode de blanchiment du  $\beta$ -carotène pour évaluer l'activité antioxydante.

### 2.2.1 Méthode de réduction du $\text{DPPH}^\bullet$

#### o Principe

Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazine ( $\text{DPPH}^\bullet$ ) est un radical organique stable de couleur rouge pourpre. En présence de composés antiradicalaires, le radical  $\text{DPPH}^\bullet$  est réduit et change de couleur en virant au jaune, ce qui entraîne une diminution de son absorbance (Gachkar *et al.*, 2006).

#### o Protocole

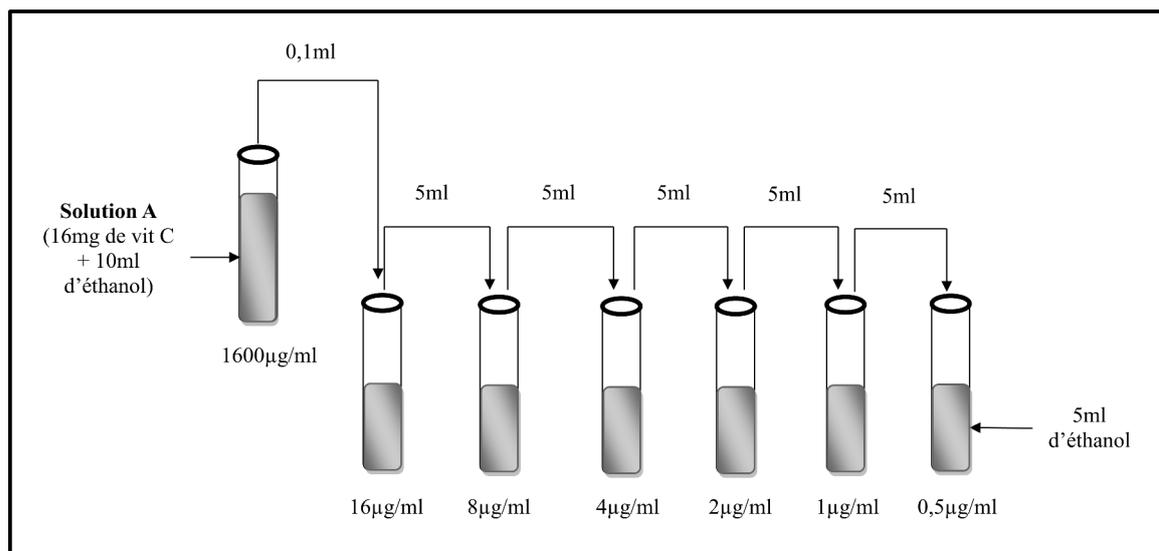
L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle des graines du fenouil a été mesurée par la méthode décrite par Archana *et al.* (2005) et Dung *et al.* (2008). Cent microlitres (100 $\mu\text{l}$ ) de différentes dilutions d'huiles essentielles ont été mélangés avec 2.9ml de la solution d'éthanol de  $\text{DPPH}^\bullet$  de 0.004% (p/v) dans des tubes à essai secs. Après 30min d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517nm.

Le contrôle négatif est composé de 100 $\mu$ l d'éthanol et de 2.9ml de la solution de DPPH $\cdot$ . Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'absorbance de l'acide ascorbique est mesurée dans les mêmes conditions que celle de l'huile essentielle.

#### o Préparation des dilutions de la vitamine C

Les dilutions de la vitamine C (M. 176.13 ; 99,7%) ont été préparées selon Nikhat *et al.* (2009) :

- Peser 16mg de la vitamine C par une balance analytique (précision de 0.0001g) ;
- Introduire ces 16mg dans un tube à essai contenant 10ml d'éthanol (solution A) (1600 $\mu$ g/ml) ;
- Introduire 0,1ml de la solution (A) dans un tube contenant 9,9ml d'éthanol (16 $\mu$ g/ml) (solution B) ;
- Introduire ensuite 5ml de la solution (B) dans un tube contenant 5 ml d'éthanol (8 $\mu$ g/ml) ;
- Procéder de la même manière pour obtenir 4, 2, 1 et 0,5 $\mu$ g/ml (figure 4).



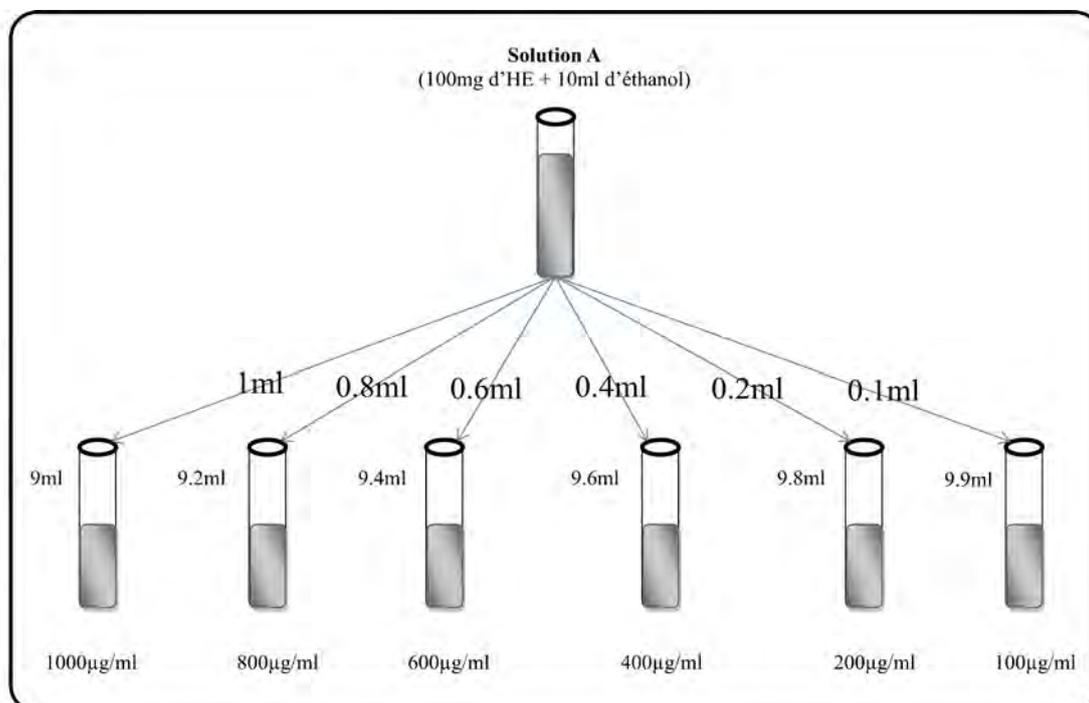
**Figure 4.** Préparation des dilutions de la vitamine C.

#### o Préparation des dilutions de l'huile essentielle des graines du fenouil

En se basant sur des essais préalables, une gamme de dilutions de concentrations allant de 100 $\mu$ g/ml à 1000 $\mu$ g/ml a été préparée comme suite :

- Peser 100mg de l'huile essentielle des graines du fenouil par une balance analytique (précision de 0.0001g) ;
- Introduire ces 100mg dans un tube à essai contenant 10 ml d'éthanol (solution A) (10 000 $\mu$ g/ml) ;
- Introduire ensuite 1 ml de la solution (A) dans un tube contenant 9ml d'éthanol (solution B) (1 000 $\mu$ g/ml) ;

- Introduire 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, et 0.1ml de la solution (B) dans des tubes contenant 9.2, 9.4, 9.6, 9.8 et 9.9ml d'éthanol, respectivement pour avoir les concentrations 800, 600, 400, 200 et 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (figure 5).



**Figure 5.** Préparation des dilutions de l'huile essentielle des graines du fenouil.

### o Expression des résultats

L'activité antiradicalaire est exprimée par le pouvoir de réduction de la solution d'éthanol de DPPH $\cdot$  (Rashid *et al.*, 2010). D'après Dung *et al.* (2008) et Eyob *et al.* (2008), le pouvoir de réduction est déterminé en appliquant la formule suivante :

$$\text{PR} = (A_C - A_E) / A_C \cdot 100$$

PR : pouvoir de la réduction en % ;

$A_E$  : absorbance de la solution de DPPH $\cdot$  en présence de l'huile essentielle ou de la vitamine C ;

$A_C$  : absorbance de la solution de DPPH $\cdot$  en absence de l'huile essentielle et de la vitamine C.

La variation du pouvoir de réduction en fonction de la concentration de l'huile essentielle et de la vitamine C, nous permet de calculer le paramètre  $CE_{50}$ . La  $CE_{50}$  « Concentration Efficace » est définie comme étant la concentration de l'huile essentielle (ou de la vitamine C) nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel. Plus la valeur de  $CE_{50}$  est basse, plus l'activité antiradicalaire est élevée, et vice versa (Qian & Nihorimbere, 2004; Gramza *et al.*, 2005).

Les valeurs  $CE_{50}$  moyennes ont été calculées graphiquement à partir de trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par le pouvoir de réduction en pourcentage (Portes, 2008).

### 2.2.2 Méthode de blanchiment du $\beta$ -carotène

#### o Principe

La capacité antioxydante de l'huile essentielle des graines du fenouil est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du  $\beta$ -carotène (décoloration) par les produits de l'acide linoléique.

Le  $\beta$ -carotène est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation ; l'ajout d'un deuxième antioxydant va permettre sa préservation (Portes, 2008). Plus l'efficacité d'un antioxydant est grande, plus la décoloration de la couleur du  $\beta$ -carotène sera lent et vice versa (Hussain, 2009; Moon & Shibamoto, 2009).

#### o Protocole

L'activité antioxydante de l'huile essentielle des graines du fenouil a été réalisée par la méthode de décoloration du  $\beta$ -carotène décrite par Kulisic *et al.* (2004) dérivée de la méthode originale de Pratt (1980).

Dix milligrammes de  $\beta$ -carotène ont été dissous dans 100ml de chloroforme. Un millilitre (1ml) de cette solution a été introduite dans un ballon contenant 20mg d'acide linoléique et 100 mg de Tween 40. Le chloroforme a été éliminé par un rotavapeur à 50°C pendant 5min et, au résidu, 50ml de l'eau oxygénée ont été ajoutés lentement, pour former l'émulsion (A). Deux cent microlitres (200 $\mu$ l) de d'huile essentielle des graines du fenouil, à une concentration de 4000 microgramme par millilitre d'éthanol, ont été mélangés dans 5ml de l'émulsion (A). Un contrôle négatif, sans huile essentielle, se composant de 200 $\mu$ l d'éthanol et de 5 ml d'émulsion (A) a été préparé.

Une deuxième émulsion (B) se composant de 20mg de l'acide linoléique, 100mg de Tween 40 et 50 ml de l'eau oxygénée ont été également préparée. Une solution constituant de 200 $\mu$ l d'éthanol et 5ml de l'émulsion (B) a été préparée et a été employée pour étalonner le spectrophotomètre. Les tubes ont été placés dans un bain Marie à 50°C et l'oxydation de l'émulsion a été surveillée spectrophotométriquement en mesurant l'absorbance à 470nm après 120min.

La vitamine C a été employée comme contrôle positif, le même protocole a été appliqué que celui de l'huile essentielle des graines du fenouil.

## o Expression des résultats

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant (contrôle négatif dans lequel l'échantillon est remplacé par 200µl d'éthanol) est suivie à 470 nm à des intervalles de temps réguliers (chaque 20min) pendant 120min.

L'activité antioxydante a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante décrite par Amin et Tan (2002) et Ismail *et al.* (2004):

$$AA (\%) = [1 - (A_{E0} - A_{Et}) / (A_{C0} - A_{Ct})] \times 100$$

AA (%): Activité antioxydante ;

$A_{E0}$ : valeur de l'absorbance de l'émulsion en présence de l'HE ou de la vitamine C mesurée à t=0;

$A_{C0}$ : valeur de l'absorbance de l'émulsion du contrôle négatif mesurée à t=0;

$A_{Et}$ : valeur de l'absorbance de l'émulsion en présence de l'HE ou de la vitamine C mesurée à t=120mn ;

$A_{Ct}$ : valeur de l'absorbance de l'émulsion du contrôle négatif mesurée à t=120 mn.

## 2.3 Evaluation de l'activité antibactérienne

### 2.3.1 Origine et choix des souches bactériennes

Les souches bactériennes choisies pour cette étude sont des bactéries pathogènes et impliquées fréquemment dans la contamination et l'altération des denrées alimentaires. Trois bactéries à Gram positif (*Bacillus cereus* CHU, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Listeria monocytogenes* CHU) et trois bactéries à Gram négatif (*E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Salmonella enterica* CHU). Ces souches nous ont été fournies par le service de Microbiologie du centre hospitalo-universitaire de Constantine.

### 2.3.2 Choix des milieux de culture

Le Bouillon cœur cerveau est le milieu d'enrichissement pour toutes les souches bactériennes (Benkeblia, 2004).

Pour obtenir une culture jeune des bactéries afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles des graines du fenouil, plusieurs milieux de culture ont été utilisés comme la gélose Hektoen pour les *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; la gélose chocolat pour les *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; la gélose au sang cuit pour *Listeria monocytogenes* CHU et la gélose nutritive pour *Bacillus cereus* CHU, *E. coli* ATCC 25922 et *Salmonella enterica* CHU.

Le milieu de culture utilisé pour étudier l'activité antibactérienne est l'Agar de Muller Hinton (AMH) parce que c'est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens (Gachkar *et al.*, 2006; Mayachiew & Devahastin, 2008; Hussain *et al.*, 2010).

### 2.3.3 Préparation des suspensions bactériennes

Les bactéries à tester sontensemencées sur des boites de Pétri contenant la gélose nutritive (GN) ou autres milieux selon les souches et incubées pendant 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées. A partir de ces boites, à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées et mises dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de sel (NaCl). La suspension bactérienne est bien homogénéisée, et la densité optique lue à 625 nm est justifiée à 0.08 à 0.10 nm. On admet que cette densité mesurée à 625 nm est équivalente à  $10^8$  CFU/ml (Mohammedi, 2006). L'inoculum est ajusté soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.

### 2.3.4 Préparation des disques

Les disques sont fabriqués à partir du papier Wattman №40, avec un diamètre de 6mm ( $0.28\text{cm}^2$  de surface) par l'emporte-pièce. Ensuite, ces disques sont mis dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave, puis stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé).

### 2.4.5 Tests de l'activité antibactérienne

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

Les concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) sont estimées par la méthode de dilution d'agar. Cette méthode nous permet également de savoir la nature de l'activité antibactérienne d'huile essentielle (bactériostatique ou bactéricide).

#### 2.4.5.1 Méthode de diffusion ou des aromatogrammes

La méthode des aromatogrammes est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle à tester. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Cette méthode nous permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'huile essentielle sur les bactéries, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de cette huile essentielle.

La méthode de diffusion des disques appliquée est celle décrite par Mayachiew & Devahastin (2008); Gachkar *et al.* (2006) et Hussain *et al.* (2010).

### ○ **Inoculation**

Vingt millilitres (20ml) de l'agar de Muller Hinton en surfusion sont coulés dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu de culture, 100µl de la suspension bactérienne à tester ( $10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup>) sont étalés en surface.

### ○ **Dépôt des disques**

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier Wattman №40 (2disques/boite) sont déposés sur l'agar, précédemment inoculé avec le micro-organisme choisi, puis les imbibés par 5µL d'huile essentielle des graines du fenouil.

Les boites sont maintenues à 4°C pendant 1h pour que l'huile essentielle puisse diffuser (Rožman & Jeršek, 2009).

### ○ **Contrôle positif**

L'amoxicilline (25µg/disque) a été utilisée comme contrôle positif, ce choix est dû à la sensibilité des souches choisies pour cet antibiotique.

### ○ **Incubation**

Les boites ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h.

### ○ **Expression des résultats**

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (y compris le diamètre de disque de 6mm). Dans la littérature relative aux huiles essentielles, les résultats de l'aromatogramme sont exprimés exclusivement à partir de la mesure du diamètre des halos d'inhibitions en mm (Baser & Buchbauer, 2010).

D'après Ponce *et al.* (2003), la sensibilité à l'huile a été classée par le diamètre des halos d'inhibition : non sensible (-) pour les diamètres moins de 8mm ; sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm ; très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20mm.

Les bactéries montrant une sensibilité à l'huile essentielle sont sélectionnées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) (Derwich *et al.*, 2010).

### 2.4.5.2 Méthode de dilution d'agar

Cette technique donne un intervalle de valeurs des concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) des souches qui présenteront une sensibilité. Cette technique est économique puisque elle nous permet de tester plusieurs souches bactériennes dans la même boîte.

Pour déterminer ces concentrations de l'huile essentielle du fenouil, nous avons employé la méthode de dilution d'agar rapportée par Hammer *et al.* (1999) et Mayachiew & Devahastin (2008).

#### ○ Préparation des dilutions de l'huile essentielle

Pour pouvoir obtenir différentes concentrations de l'huile essentielle des graines du fenouil, nous l'avons diluée dans le DMSO (diméthylsulfoxyde). Ce choix a été fait, parce que, le DMSO est le solvant préférable pour la majorité des auteurs, notamment, Gachkar *et al.* (2006) qui ont prouvé que le DMSO n'a aucun pouvoir antibactérien puissant.

#### ○ Préparation des dilutions d'agar

Dix-neuf millilitres (19ml) d'AMH fondus, additionnés de 0.5% (v/v) tween 80, ont été mis dans un tube à essai en lui rajoutant, aseptiquement, 1ml de chaque concentration (50 000, 45 000, 40 000, 35 000, 30 000, 25 000, 20 000, 15 000 et 10 000 µg/ml). Ces concentrations, dites concentrations finales, ont été choisies après des essais préliminaires, elles ont été calculées à partir de l'équation suivante :

$$C_f = C_i / 20$$

$C_f$ : concentration finale de l'huile essentielle dans l'agar

$C_i$ : est la concentration initiale de l'huile essentielle dans le DMSO.

Le mélange, constitué de l'AMH, du tween 80 et de l'huile essentielle, est homogénéisé et ramené à 45°C.

#### ○ Inoculation

Le mélange (différentes dilutions de l'huile essentielle+AMH+tween 80) est immédiatement coulé dans des boîtes de Pétri (90 mm de diamètre). Après solidification de la gélose, les boîtes de Pétri sont partagées en six parties dans les quelles sont mises les six souches bactériennes, sous forme de dépôts de 1µL contenant  $10^{+5}$  UFC.

Des témoins sont réalisés pour chaque souche. Le DMSO a été utilisé comme contrôle négatif.

## ○ Incubation

Les boîtes de Pétri (avec et sans huile essentielle) ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h.

## ○ Lecture et expression des résultats

Les boîtes de Pétri dont les concentrations ayant montré une absence totale de la croissance bactérienne ont été sélectionnées pour déterminer les concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB).

La CMI représente la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 24 heures d'incubation à 37°C (De Billerbeck *et al.*, 2002; Bassole *et al.*, 2002). Par ailleurs, la CMB représente la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 5 jours d'incubation à 37°C (Mayachiew & Devahastin, 2008).

Le rapport CMB/CMI nous a permis de déterminer les pouvoirs bactéricide et bactériostatique de l'huile essentielle étudiée. Lorsque ce rapport est supérieur à 4, l'huile essentielle a un pouvoir bactériostatique, et bactéricide quand il est inférieur ou égal à 4 (Canillac & Mourey, 2001).

## 2.4 Evaluation de l'activité antifongique

### 2.4.1 Origine et choix des souches fongiques

Les souches fongiques sont choisies dans cette étude sur la base pour leur implication fréquente dans la contamination et l'altération des denrées alimentaires. Les souches testées sont : *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Aspergillus fumigatus* CIP 1082.74, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus* et *Trichophyton rubrum* CIP 2043.92. Elles nous ont été fournies par le laboratoire de Génie Microbiologique et Applications de la Faculté des Sciences de la nature, Université Mentouri, Constantine.

### 2.4.2 Choix des milieux de culture

Pour évaluer l'activité antifongique, nous avons utilisé le PDA (Potato Dextrose Agar) et le PDB (Potato Dextrose broth) (Singh *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2006; Bajpai et Kang, 2010). En revanche, le milieu sabouraud est celui utilisé pour le criblage de l'activité antifongique (annexe 6) (Rasooli *et al.*, 2008).

### 2.4.3 Préparation des suspensions et préculture des souches fongiques

Dans des boîtes de Pétri, contenant le milieu PDA solide, on dépose un disque de 6mm de chaque souche fongique au centre de chaque boîte, et on les incube jusqu'à ce que la croissance mycélienne atteigne les bords des boîtes de Pétri. A partir de ces boîtes, on verse 10ml d'eau physiologique stérile à 0.9% pour obtenir de suspensions des spores, ensuite la densité optique lue à 625 nm est justifiée à 0.08 à 0.10nm, afin d'obtenir une suspension homogène. On admet que cette densité mesurée à 625 nm est équivalente à  $1 \times 10^6$  spores/ml (Braga *et al.*, 2007).

Dans des boîtes de Pétri, contenant 20ml de PDA, 100 $\mu$ l de la suspension fongique à tester ( $10^6$  spores.ml<sup>-1</sup>) ont été étalés en surface, en suite, ces biotes ont été incubées à 30°C, dans l'obscurité pendant 2 à 7, jours selon la souche fongique.

### 2.4.4 Préparation des dilutions d'huile essentielle

Afin d'obtenir différentes concentrations de l'huile essentielle des graines du fenouil, nous avons diluée l'huile essentielle pure dans le DMSO. Ce choix a été fait, parce que, le DMSO est le solvant préférable pour la majorité des auteurs, notamment, Alavi *et al.* (2005) Mohammadi (2006) et Ownagh *et al.* (2010) qui ont prouvé que le DMSO n'a aucun pouvoir antifongique puissant.

### 2.4.5 Tests de l'activité antifongique

L'essai antifongique de l'huile essentielle des graines du fenouil a été réalisé par la méthode de diffusion des disques pour tester la sensibilité des souches fongiques par la méthode des micro-aromatogrammes pour tester les composés volatiles de l'huile essentielle et par la méthode de dilution pour estimer l' IA<sub>50</sub> (index antifongique 50) et les concentrations minimales inhibitrice (CMF<sub>S</sub>) et fongicide (CMF<sub>C</sub>).

#### 2.4.5.1 Criblage de l'activité antifongique

Pour mettre en évidence l'activité antifongique de l'huile essentielle du fenouil, nous avons utilisé la méthode de diffusion comme rapportée par Rasooli *et al.* (2008).

##### o Ensemencement

Vingt millilitres (20ml) du sabouraud en surfusion sont coulés dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu de culture, 100 $\mu$ l de la suspension de spores ( $10^6$  spores/ml) ont été étalés en surface.

### ○ **Dépôt des disques**

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier Wattman N°40 (disque/boite) ont été déposés sur l'agar, qui a été précédemment inoculé avec les moisissures à tester, puis ces disques sont imbibés par 5µL de l'huile essentielle des graines du fenouil. Pour que l'huile essentielle puisse diffuser, les boîtes ont été maintenues à 4°C pendant 1h. Ensuite, elles ont été incubées à l'étuve à 30°C pendant 2 à 7 jours.

### ○ **Expression des résultats**

L'absence de la croissance mycélienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (y compris le diamètre de disque de 6mm). Les résultats sont exprimés en mm (Rasooli *et al.*, 2008).

Les moisissures montrant une sensibilité à l'huile essentielle sont sélectionnées pour déterminer l'IA<sub>50</sub>, les concentrations minimales inhibitrice (CMF<sub>S</sub>) et fongicide (CMF<sub>C</sub>) (Derwich *et al.*, 2010).

### **2.4.5.2 Méthode des microatmosphères**

L'activité antifongique des composés volatiles de l'huile essentielle des graines du fenouil a été testée par la méthode des microatmosphères décrite par Singh *et al.* (2006) et Siripornvisal *et al.* (2009).

### ○ **Inoculation**

Des boîtes de Pétri (90mm de diamètre) contenant 20ml de PDA ont été préparées. Une prise d'agar d'inoculum fongique (6mm de diamètre) a été enlevée d'une culture précédente de chaque souche fongique à tester et placée au centre des boîtes de Pétri.

### ○ **Dépôt des disques**

Un disque stérile de papier Wattman N°40 (6mm) imbibé par 5µL de l'huile essentielle a été placé au centre du couvercle de chaque boîte de Pétri. Les boîtes sont fermées par le parafilm (dépôt en position inversée, sur le couvercle de la boîte de Pétri).

### ○ **Incubation**

Les boîtes de Pétri ont été incubées (sur le couvercle de sorte que les composés volatiles puissent atteindre les souches fongiques) à 30°C pendant 2 à 14 jours, jusqu'à ce que la croissance dans les boîtes de contrôle atteigne les bords des boîtes de Pétri.

### ○ Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne, par comparaison au témoin, a été calculé par la formule suivante :

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

$IA_{vap}$  (%) : index antifongique des composés volatiles de l'huile essentielle ;

$D_C$  : diamètre des disques mycéliens de contrôle ;

$D_T$  : diamètre des disques mycéliens avec l'huile essentielle.

### 2.4.5.3 Méthode de dilution en bouillon

Les concentrations minimales fongistatique (CMF<sub>S</sub>) et fongicide (CMF<sub>S</sub>) de l'huile essentielle du fenouil ont été déterminées suivant la méthode de dilution en bouillon rapportée par Bajpai *et al.* (2008) et Bajpai et Kang (2010) dérivée de la méthode originale de Murray *et al.* (1995).

### ○ Préparation des dilutions d'huile essentielle

L'huile essentielle des graines du fenouil est d'abord diluée dans le DMSO pour avoir une concentration de 200 000 µg/ml. A partir de cette solution, on introduit 1ml dans un tube contenant 9ml de PDB, additionné 0.5% de tween 80, pour avoir une concentration de 20 000 µg/ml [A]. On procède ensuite à une dilution successive de PDB [A] de façon à obtenir successivement les dilutions 10 000, 5 000, 2 500, 1 250, 625, 312.5, 156.25, 78.125, 39.06 µg/ml. Ces concentrations ont été choisies après des tests préliminaires.

### ○ Ensemencement

Dix microlitres (10 µL) de suspension de spores (10<sup>6</sup> spores/ml) des souches fongiques à tester ont été inoculés dans des tubes à essai contenant le milieu PDB à différentes concentrations. Le mélange, constituant le PDB, suspension fongique et l'huile essentielle, est homogénéisé et incubé à 30°C pendant 2-7 jours.

Des tubes témoins contenant le milieu de PDB, ont été inoculés seulement avec la suspension fongique. En parallèle, des tubes avec DMSO (5%) et tween 80 (0.5%) ont été employés comme contrôle négatif.

### ○ **Lecture et expression des résultats**

Après 2 à 7 jours d'incubation, les premiers tubes dont l'inhibition est totale (en les comparant aux témoins) sont réensemencés dans des boîtes qui contiennent 20ml du milieu de culture PDA neuf. Le suivi de la croissance est effectué pendant 1 à 4 jours à une température de 30°C. Lorsqu'il y a une reprise de la croissance mycélienne, la concentration est dite fongistatique (CMF<sub>S</sub>) (Bajpai *et al.*, 2010), en revanche, s'il n'y en a plus, elle est appelée fongicide (CMF<sub>C</sub>) (Manohar *et al.*, 2001; Zarrin *et al.*, 2010 ; Džamić *et al.*, 2010). Les CMF<sub>S</sub> et CMF<sub>C</sub> ont été exprimées en µg/ml (Bajpai *et al.*, 2010).

L'huile essentielle est dite fongicide lorsque le rapport CMF<sub>C</sub>/CMF<sub>S</sub> est inférieur à 4, par contre, lorsque ce rapport est supérieur ou égal à 4, elle est dite fongistatique (Derwich *et al.*, 2010).

#### **2.4.5.4 Méthode de dilution d'agar**

Les IA<sub>50</sub> de l'huile essentielle des graines du fenouil ont été déterminés selon la méthode rapportée par Chang *et al.* (1999) et Cheng *et al.* (2006).

### ○ **Préparation des dilutions d'agar**

Vingt millilitre (20ml) de PDA fondus, ont été mis dans un tube à essai en lui rajoutant, aseptiquement, 0.5ml de DMSO contenant différentes concentrations de l'huile essentielle du fenouil (4 000-7,312µg.ml<sup>-1</sup>) choisies après des essais préliminaires. Ces concentrations, dites concentrations finales, ont été calculées à partir de l'équation suivante :

$$C_f = C_i / 20$$

$C_f$  : concentration finale de l'huile essentielle dans le PDA ;

$C_i$  : concentration initiale de l'huile essentielle dans le DMSO.

Des témoins contenant 0.5ml de DMSO sont effectués. Le mélange, constitué du PDA et des différentes concentrations de l'huile essentielle, est homogénéisé et ramené à 45°C.

### ○ **Ensemencement**

Après agitation des tubes contenant le PDA et l'huile essentielle à tester avec différentes concentrations, le mélange est coulé dans des boîtes de Pétri de 90mm de diamètre. Après solidification de l'agar, des disques de 6mm contenant des souches fongiques, enlevées des cultures précédentes, ont été déposés au centre de chaque boîte de Pétri.

### ○ **Incubation**

Les boîtes de Pétri ont été incubées à 30°C pendant 2 à 14 jours, jusqu'à ce que la croissance dans les boîtes de contrôle atteigne les bords des boîtes de Pétri.

### ○ Lecture et expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est exprimé par l'index antifongique, cet index est calculé par la formule rapportée par Wanchaitanawong *et al.* (2005) et Yen et Chang (2008) :

$$IA (\%) = (D_C - D_E) / D_C \cdot 100$$

$IA$  (%) : index antifongique ;

$D_C$  : diamètre des disques mycéliens témoins ;

$D_E$  : diamètre des disques mycéliens avec l'huile essentielle.

La concentration qui inhibe 50% de la croissance mycélienne est exprimée par l' $IA_{50}$  (Ahmed & Abdelgaleil, 2005; Chang *et al.*, 2008a). Les valeurs moyennes des trois essais séparés de l' $IA_{50}$  ont été calculées graphiquement, où, l'abscisse est représentée par la concentration de l'huile essentielle et l'ordonnée par le pourcentage d'inhibition de la croissance des moisissures (annexe 5).

## 2.5 Traitement statistique

Pour chaque test ou méthode, les moyennes plus ou moins l'écart type de trois essais ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel Excel 2007.

# *Résultats et Discussion*

---

## 1. Résultats

### 1.1 Rendement en huile essentielle

Nous rappelons que l'huile essentielle a été extraite des graines sèches du fenouil par un hydrodistillateur de type Clevenger (1928). Nous avons obtenu une huile de couleur jaune pâle avec une odeur aromatique. Nous n'avons pas pu récupérer une quantité huileuse importante, le rendement obtenu est voisin de  $0.79 \pm 0.02\%$ . Il est très faible par rapport aux rendements cités dans la littérature (Tableau 4). En générale, le rendement en huile essentielle des graines du fenouil varie de 2,5 à 6 % avec une moyenne de 3,5 % (Garnéro, 1996).

**Tableau 4.** Exemple de rendements obtenus en huile essentielle extraite des graines du fenouil dans différents pays.

Origine	Algérie	Pakistan	Brasille	Turquie	Inde
Méthode d'extraction	Entrainement à la vapeur	Hydro-distillateur de type Clevenger (1928)	Hydro-distillateur	Hydro-distillateur de type Clevenger (1928)	Hydro-distillateur de type Clevenger (1928)
Rendement	2.7%	3.8 %	2.4%	6.01%	1.2%
Référence	Lazouni <i>et al.</i> (2007)	Gulfraz <i>et al.</i> (2008)	Moura <i>et al.</i> (2003)	Ozcan & Chalchat (2004)	Singh <i>et al.</i> (2006)

### 1.2 Activité antiradicalaire et antioxydante

#### 1.2.1 Evaluation de l'activité antiradicalaire

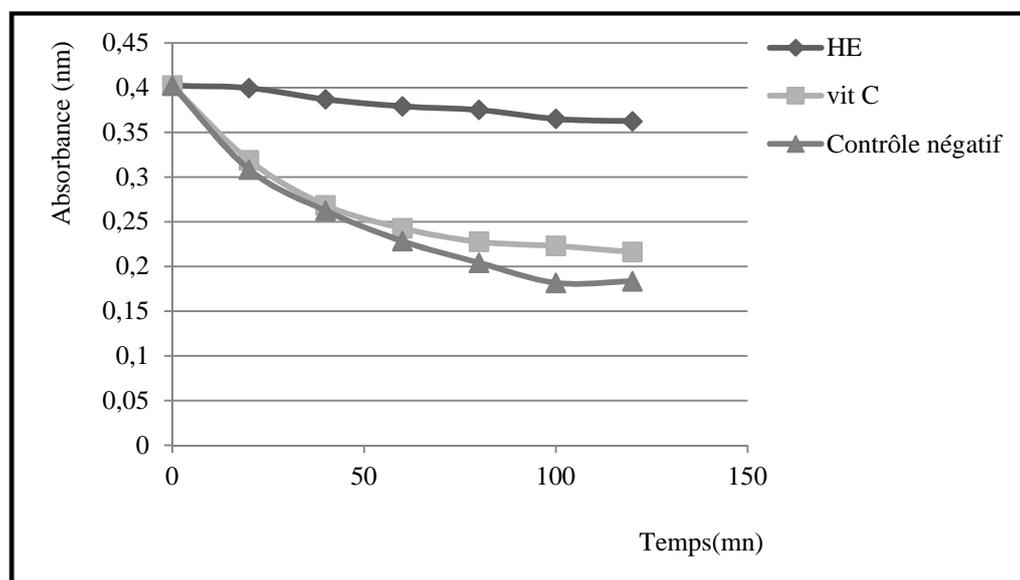
L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle des graines du fenouil est évaluée par la méthode de DPPH<sup>•</sup> en la comparant à l'acide ascorbique.

Les valeurs de CE<sub>50</sub> sont calculées, en vue de déterminer les concentrations qui réduisent 50% des radicaux libres. Les CE<sub>50</sub> moyenne sont obtenues par la moyenne des CE<sub>50</sub> évaluées graphiquement et séparément à partir des régressions des trois tests (annexe4).

Dans la présente étude, l'huile essentielle des graines du fenouil et la vitamine C ont pu réduire le radical DPPH<sup>•</sup> avec des valeurs de CE<sub>50</sub> de  $752,65 \pm 32,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  et de  $4,61 \pm 0,070 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , respectivement. L'huile essentielle des graine du fenouil a montré une activité de balayage du DPPH<sup>•</sup> moins élevée par comparaison à la vitamine C.

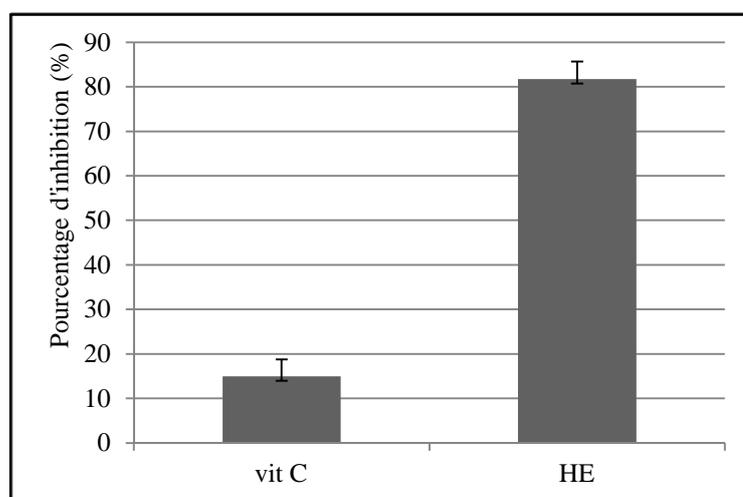
### 1.2.2 Evaluation de l'activité antioxydante

L'étude de l'activité antioxydante de l'huile essentielle des graines du fenouil est réalisée par la méthode de blanchiment du  $\beta$ -carotène. La propriété de décoloration du  $\beta$ -carotène est employée dans l'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle des graines du fenouil.



**Figure 6.** Cinétique de blanchiment du  $\beta$ -carotène pour l'huile essentielle des graines du fenouil, la vitamine C et le contrôle négatif.

La cinétique de blanchiment du  $\beta$ -carotène pour l'huile essentielle des graines du fenouil, la vitamine C et le contrôle négatif (absence de l'HE) est représentée dans la figure 6. D'après cette dernière, nous constatons que les valeurs de l'absorbance de l'émulsion du contrôle négatif et de celles de la vitamine C diminuent avec le temps d'incubation, par contre, l'émulsion contenant l'huile essentielle des graines du fenouil n'a pas montré une diminution importante de l'absorbance.



**Figure 7.** Activité antioxydante de l'huile essentielle des graines du fenouil et de la vitamine C à une concentration de 4 000 $\mu$ g/ml.

D'après la figure 7, nous constatons que la vitamine C a montré une activité antioxydante modeste ( $14,94 \pm 3,825\%$ ), théoriquement elle a dû avoir une activité importante pour qu'on puisse le comparer avec l'extrait étudié. Nous remarquons aussi facilement que, contrairement aux résultats obtenus par le test du DPPH<sup>\*</sup>, l'huile essentielle des graines du fenouil montre une activité antioxydante très intéressante ( $81,74 \pm 3,92\%$ ).

### 1.3 Activité antibactérienne

#### 1.3.1 Sensibilité des bactéries à l'huile essentielle du fenouil

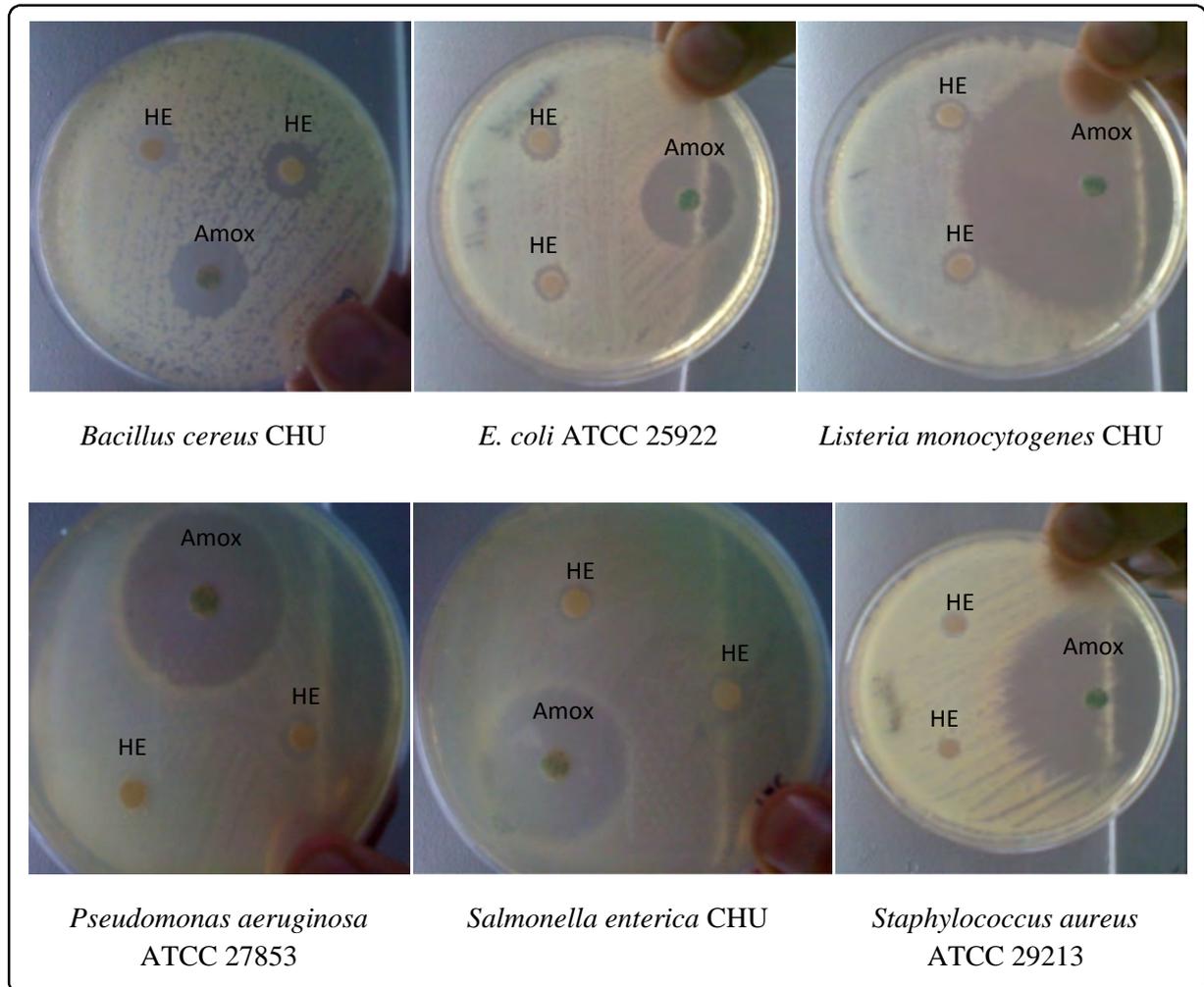
La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle des graines du fenouil vis-à-vis de six bactéries. Les zones d'inhibition sont indiquées dans le tableau 5. D'après la classification de Ponce *et al.* (2003), les zones d'inhibition, variant entre 8 et 13mm, indiquent que toutes les souches sont sensibles à l'huile essentielle des graines du fenouil.

**Tableau 5.** Diamètres (mm) des zones d'inhibition de l'HE des graines du fenouil.

	HE de fenouil (5µl/disque)	Amoxicilline (25µg/disque)
<i>Bacillus cereus</i> CHU	12,67±0,889	23,33±0,889
<i>E. coli</i> ATCC 25922	9±1,333	24,33±0,444
<i>Listeria monocytogenes</i> CHU	11,33±0,889	60,67±0,889
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	9,33±0,444	32,67±0,444
<i>Salmonella enterica</i> CHU	8,67±0,444	32,33±1,556
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	8,67±0,889	47,67±0,444

D'après le tableau 5 et la figure 8, nous constatons facilement que l'huile essentielle des graines du fenouil n'a pas une bonne activité si on la compare à l'antibiotique de contrôle. Nous constatons aussi que *Bacillus cereus* CHU et *Listeria monocytogenes* CHU sont les bactéries les plus sensibles.

Malgré l'existence des zones d'inhibition, relativement faibles, nos résultats prouvent l'existence d'activité antibactérienne contre les six souches testés, qui sont des microbes pathogènes impliqués dans les intoxications alimentaires. Donc, il est intéressant d'estimer les CMI.



**Figure 8.** Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil et de l'amoxicilline sur les souches bactériennes testées ; HE : Huile essentielle des graines du fenouil ; Amox : Amoxicilline.

### 1.3.2 Détermination des CMI et CMB

Avant d'utiliser une molécule antibactérienne comme conservateur dans un aliment, la concentration minimale inhibitrice (CMI) doit être estimée. Il est intolérable quand les doses antibactériennes efficaces dépassent les niveaux acceptables organoleptiques. Par conséquent, ces concentrations sont mesurées dans le but de définir les frontières de l'acceptabilité sensorielle et l'efficacité antibactérienne des huiles essentielles (Tiwari *et al.*, 2009).

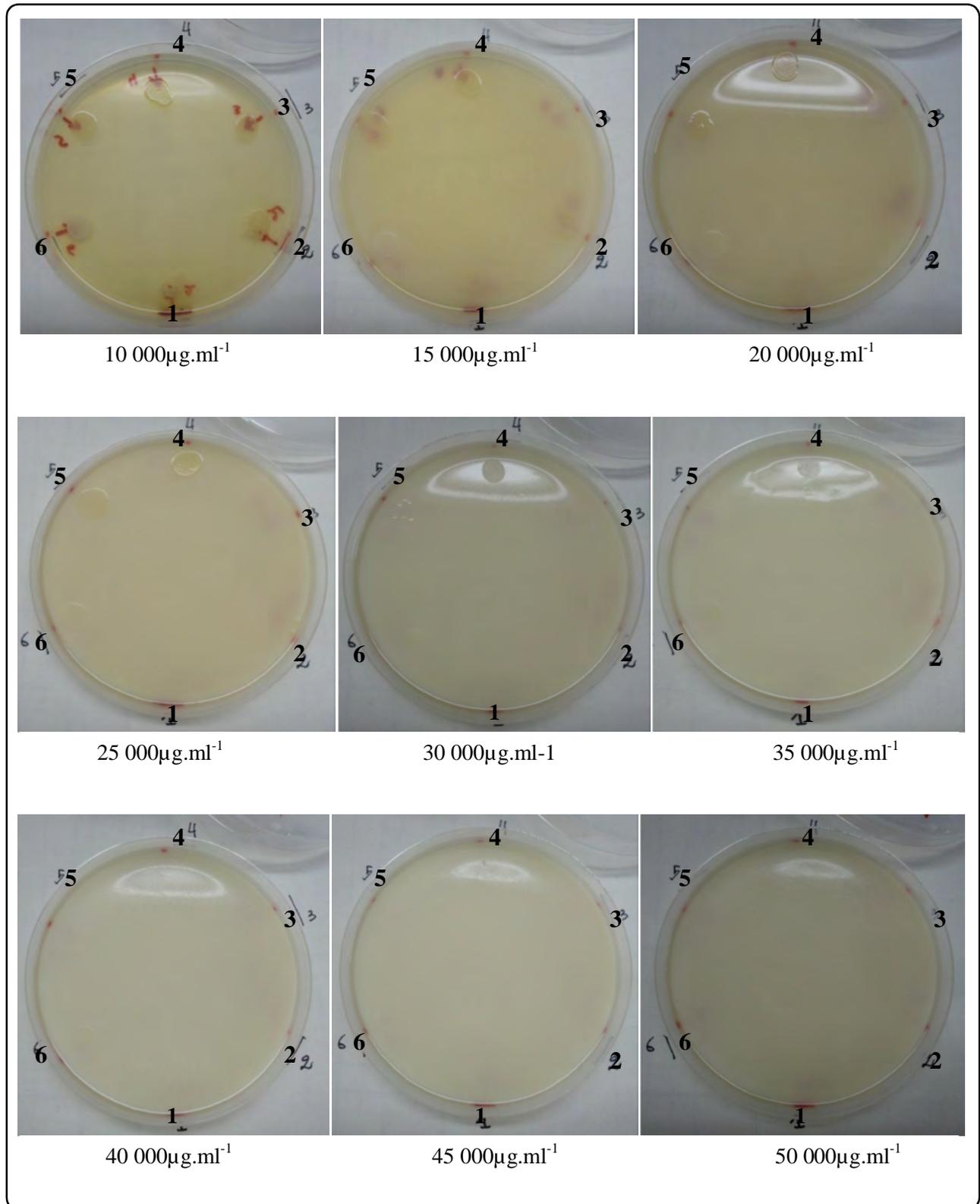
Les valeurs de CMI et CMB de l'huile essentielle extraite des graines du fenouil sont déterminées par la méthode de dilution d'agar, elles sont présentées dans le tableau 6. Il ressort que l'huile essentielle des graines du fenouil n'a pas montré une bonne susceptibilité contre les six souches bactériennes suite aux valeurs élevées de CMI et CMB obtenues. Les CMI obtenues sont comprises entre 20 000 et 45 000  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . De même, les valeurs de CMB de l'huile essentielle des graines du fenouil s'avèrent élevées.

**Tableau 6.** Concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) de l'huile essentielle des graines du fenouil

Souches bactériennes	CMI ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	CMB ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	CMB/CMI
<i>Bacillus cereus</i> CHU	25 000	45 000	1.8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	20 000	20 000	1
<i>Listeria monocytogenes</i> CHU	25 000	45 000	1.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	45 000	45 000	1
<i>Salmonella enterica</i> CHU	35 000	45 000	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	45 000	>50 000	ND

ND : non déterminé

En se référant au tableau 6 et à la figure 9, nous constatons que toutes les souches ont été inhibées totalement à 50 000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , par contre à 10 000 et 15 000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$  toutes les souches ont résisté. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 19213 sont les souches ayant une grande résistance, la CMI a été équivalente à 45 000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$  et à moindre degré *Salmonella enterica* CHU qui a une CMI de 35 000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

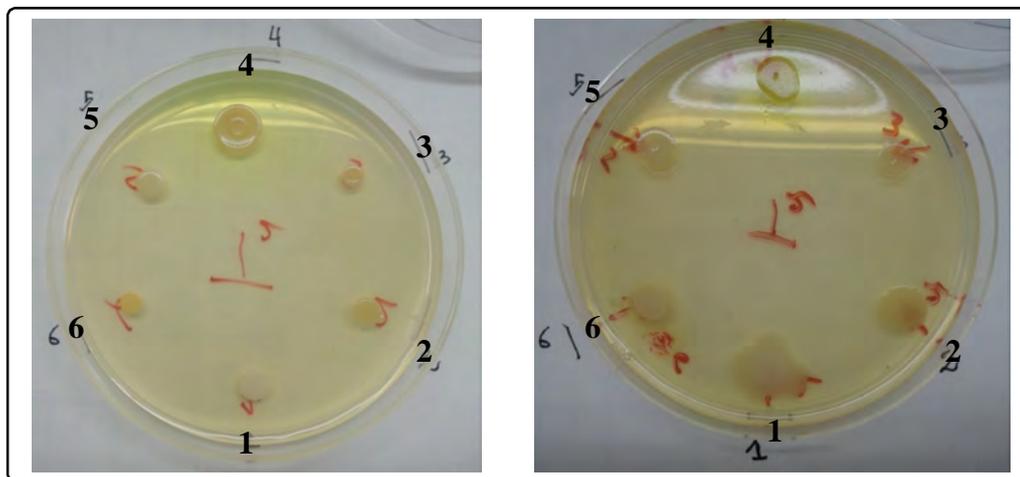


**Figure 9.** Evaluation des CMI de l'huile essentielle des graines du fenouil par la méthode de dilution après incubation pendant 24h. 1 : *Bacillus cereus* CHU; 2 : *E. coli* ATCC 25922; 3 : *Listeria monocytogenes* CHU; 4 : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; 5 : *Salmonella enterica* CHU; 6 : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

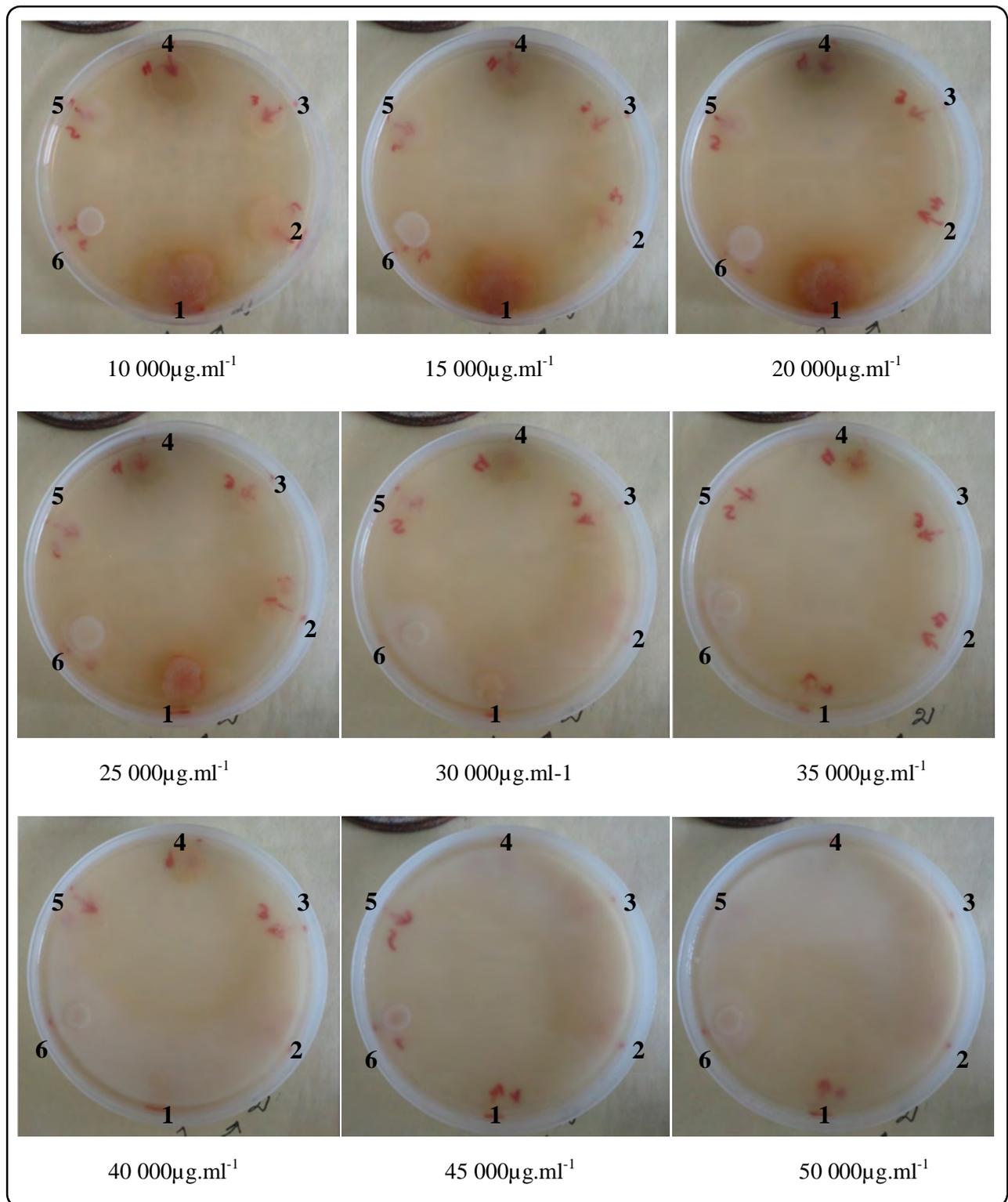
Comme contrôle négatif, le DMSO (5%) et le tween 80 (0.5%) n'ont pas affecté la croissance des souches bactériennes aux concentrations utilisées dans cette étude, comme le montre la figure 10. Ces résultats sont en similaires avec ceux obtenus par Gachkar *et al.* (2006).

Après 5 jours d'incubation, quelques souches ont repris la croissance. C'est le cas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 qui a été inhibée aux concentrations 45 000 et 50 000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  après 24 heures d'incubation, a monté une résistance à ces concentrations après 5 jours d'incubation (figure 11).

D'après nos résultats, le rapport CMB/CMI est compris entre 0.78 et 1.8 (inférieur à 4), donc, on se réfère à Canillac & Mourey (2001), l'huile essentielle des graines du fenouil semble avoir un pouvoir bactéricide vis-à-vis des souches testées.



**Figure 10.** à gauche : boîte témoin ; à droite : contrôle négatif (5% DMSO). 1 : *Bacillus cereus* CHU; 2 : *E. coli* ATCC 25922; 3 : *Listeria monocytogenes* CHU; 4 : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; 5 : *Salmonella enterica* CHU; 6 : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.



**Figure 11.** Evaluation des CMB de l'huile essentielle des graines du fenouil par la méthode de dilution après 5 jours d'incubation. 1 : *Bacillus cereus* CHU; 2 : *E. coli* ATCC 25922; 3 : *Listeria monocytogenes* CHU; 4 : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; 5 : *Salmonella enterica* CHU; 6 : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

## 1.4 Activité antifongique

### 1.4.1 Sensibilité des souches fongiques à l'huile essentielle des graines du fenouil

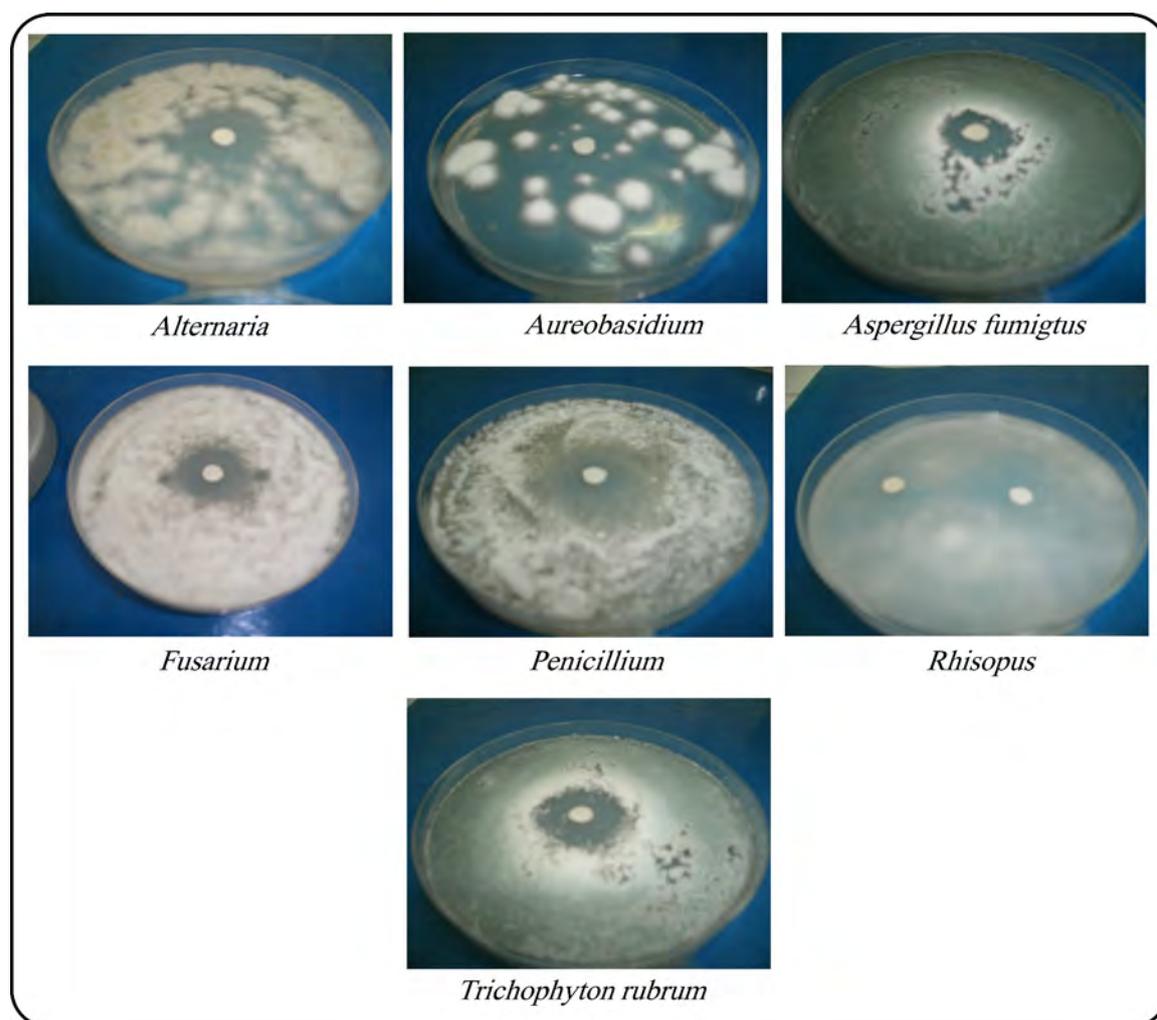
La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique de l'huile essentielle des graines du fenouil vis-à-vis des souches fongiques testées. L'activité antifongique est révélée par l'absence ou la présence de la croissance mycélienne. Elle se traduit par un halo translucide autour du disque identique à la gélose stérile (Mironescua et Georgescub, 2008).

Nos résultats indiquent que l'huile essentielle des graines du fenouil a une capacité inhibitrice de la croissance mycélienne de toutes les souches testées exceptée la souche *Aureobasidium* dont la zone d'inhibition est non déterminée. Les zones d'inhibition sont résumées dans le tableau 7. Elles varient entre 17 et 22mm (y compris le diamètre de disque de 6mm) (figure 12).

**Tableau 7.** Diamètres (mm) des zones d'inhibition des souches fongiques de l'huile essentielle des graines du fenouil.

	HE de fenouil (5µl/disque)
<i>Alternaria</i>	20,67±1,527
<i>Aspergillus fumigatus</i> CIP 1082.74	17,33±1,528
<i>Aureobasidium</i>	ND
<i>Fusarium</i>	21,67±2,082
<i>Penicillium</i>	22,67±0,577
<i>Rhisopus</i>	18,33±0,577
<i>Trichophyton rubrum</i> CIP 2043.92	17,33±2,082

ND : non déterminé.

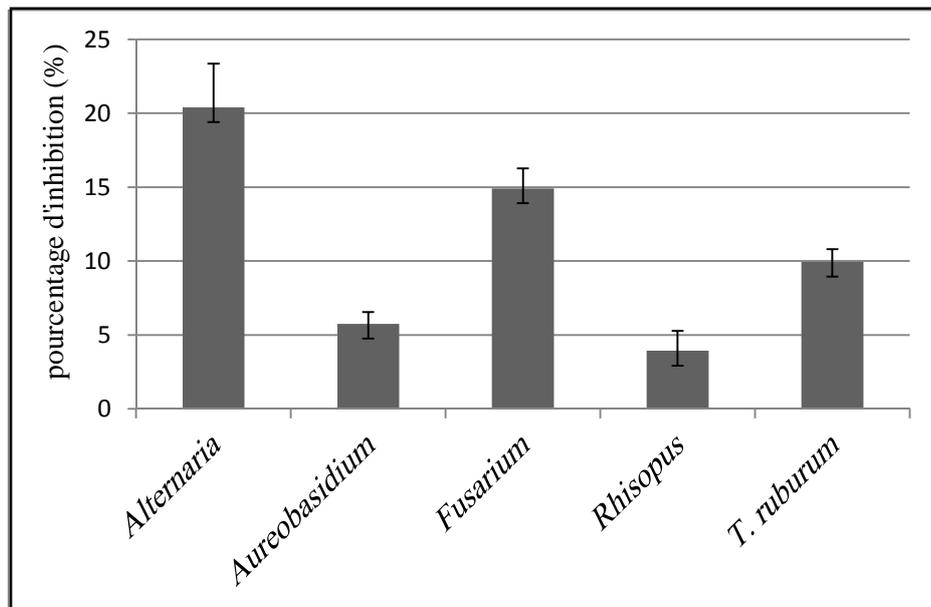


**Figure 12.** Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil (5µl/disque) sur les souches fongiques testées.

#### 1.4.2 Sensibilité des souches fongiques aux composés volatiles de l'huile essentielle des graines du fenouil

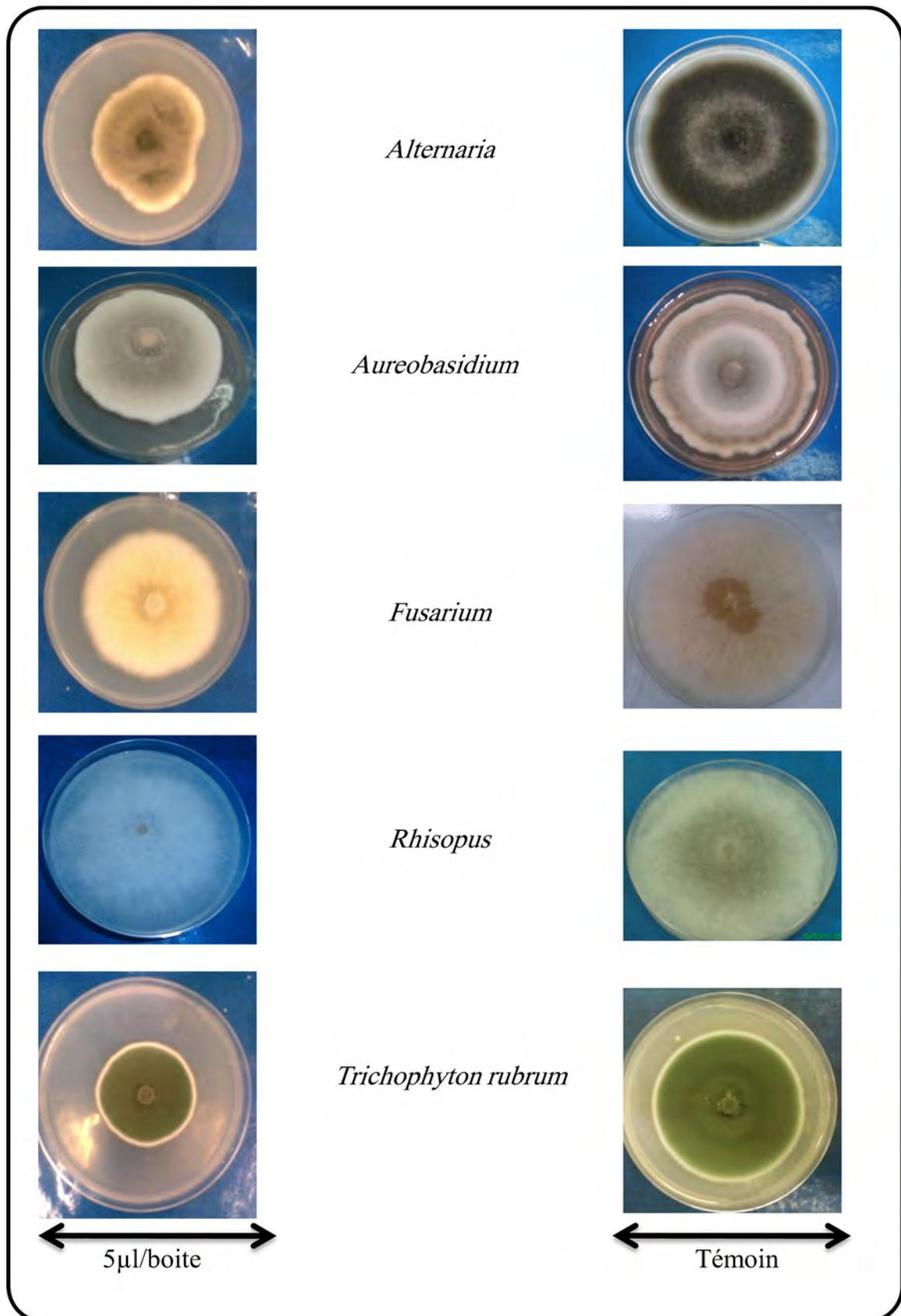
L'activité antifongique des composés volatiles de l'huile essentielle des graines du fenouil a été déterminée par la méthode de boîte Pétri inversée. La vapeur de l'huile essentielle des graines du fenouil a montré une activité inhibitrice qui n'est pas négligeable à une dose de 5µl.

Toutes les souches fongiques ont été inhibées par la vapeur de l'huile essentielle des graines du fenouil à 5µl/boîte, mais à un taux d'inhibition différent selon la souche. *Rhisopus* et *Aureobasidium* sont les souches les plus sensibles à l'huile essentielle des graines du fenouil avec des taux d'inhibition de  $18,33 \pm 0,577$  et  $17,33 \pm 1,528$ , respectivement (figure 13).



**Figure 13.** Effet inhibiteur de la vapeur de l'huile essentielle des graines du fenouil (5 $\mu$ l/boite) sur la croissance mycélienne.

D'après la figure 14, nous remarquons clairement un changement de la couleur d'*Alternaria* et d'*Aureobasidium*, et aussi une diminution de taux de sporulation de *Rhizopus*.



**Figure 14.** Effet de la vapeur de l'huile essentielle des graines du fenouil (5µl) sur les souches fongiques testées.

### 1.4.3 Détermination des $CMF_S$ et $CMF_C$

Semblablement à l'activité antibactérienne, avant d'appliquer une huile comme conservateur alimentaire, les concentrations minimales fongistatique ( $CMF_S$ ) doivent être calculées. Ces concentrations sont mesurées dans le but de définir les frontières de l'acceptabilité sensorielle et l'efficacité antifongique des huiles essentielles (Tiwari *et al.*, 2009).

Les valeurs de  $CMF_S$  et  $CMF_C$  de l'huile essentielle extraite des graines du fenouil sont présentées dans le tableau 8. Il ressort une bonne susceptibilité de l'huile essentielle contre les souches fongiques. Les  $CMF_S$  obtenues sont comprises entre 625 et 1250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . En revanche, la valeur de  $CMF_C$  de l'huile essentielle des graines du fenouil est 1250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

**Tableau 8.** Concentrations minimales fongistatique ( $CMF_S$ ) et fongicide ( $CMF_C$ ) de l'huile essentielle des graines du fenouil

Souches fongiques	$CMF_S$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	$CMF_C$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	$CMF_C / CMF_S$
<i>Alternaria</i>	625	1250	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> CIP 1082.74	1250	1250	1
<i>Aureobasidium</i>	625	1250	2
<i>Fusarium</i>	1250	1250	1
<i>Penicillium</i>	1250	1250	1
<i>Rhizopus</i>	1250	1250	1
<i>Trichophyton rubrum</i> CIP 2043.92	1250	1250	1

L'huile essentielle des graines du fenouil a montré une activité antifongique intéressante contre tous les souches fongique examinées. Selon les valeurs du tableau 8, elle présente une  $CMF_C$  de 1250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

D'après nos résultats, le rapport  $CMF_C/CMF_S$  est compris entre 1 et 2 (inférieur à 4), en se référant à Derwich *et al.* (2010), l'HE des graines de fenouil a un pouvoir fongicide vis-à-vis les souches fongiques testées.

Comme contrôle négatif, le DMSO [5%(v/v)] et le Tween 80 [0.5%(v/v)] n'ont pas affecté la croissance des souches fongiques.

### 1.4.4 Détermination des index antifongiques ( $IA_{50}$ )

Pour obtenir des concentrations plus précises que les  $CMF_S$  et  $CMF_C$ , un autre paramètre a été déterminé : l' $IA_{50}$ , qui est la concentration qui inhibe 50% la croissance mycélienne. Toutes

les concentrations de l'huile essentielle des graines du fenouil appliquées ont empêché, partiellement ou complètement, la croissance des souches fongiques testées.

Les  $IA_{50}$  ont été déterminés graphiquement (annexe 5) et sont récapitulés dans le tableau 9.

**Tableau 9.** Récapitulation des index antifongiques ( $IA_{50}$ ) de l'huile essentielle des graines du fenouil.

Souches fongiques	$IA_{50}$ ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )
<i>Alternaria</i>	26,22±0,693
<i>Aspergillus fumigatus</i> CIP 1082.74	ND
<i>Aureobasidium</i>	29,17±2,021
<i>Fusarium</i>	1767±39,589
<i>Penicillium</i>	ND
<i>Rhisopus</i>	304,84±13,012
<i>Trichophyton rubrum</i> CIP 2043.92	170,16±4,458

ND : non déterminée

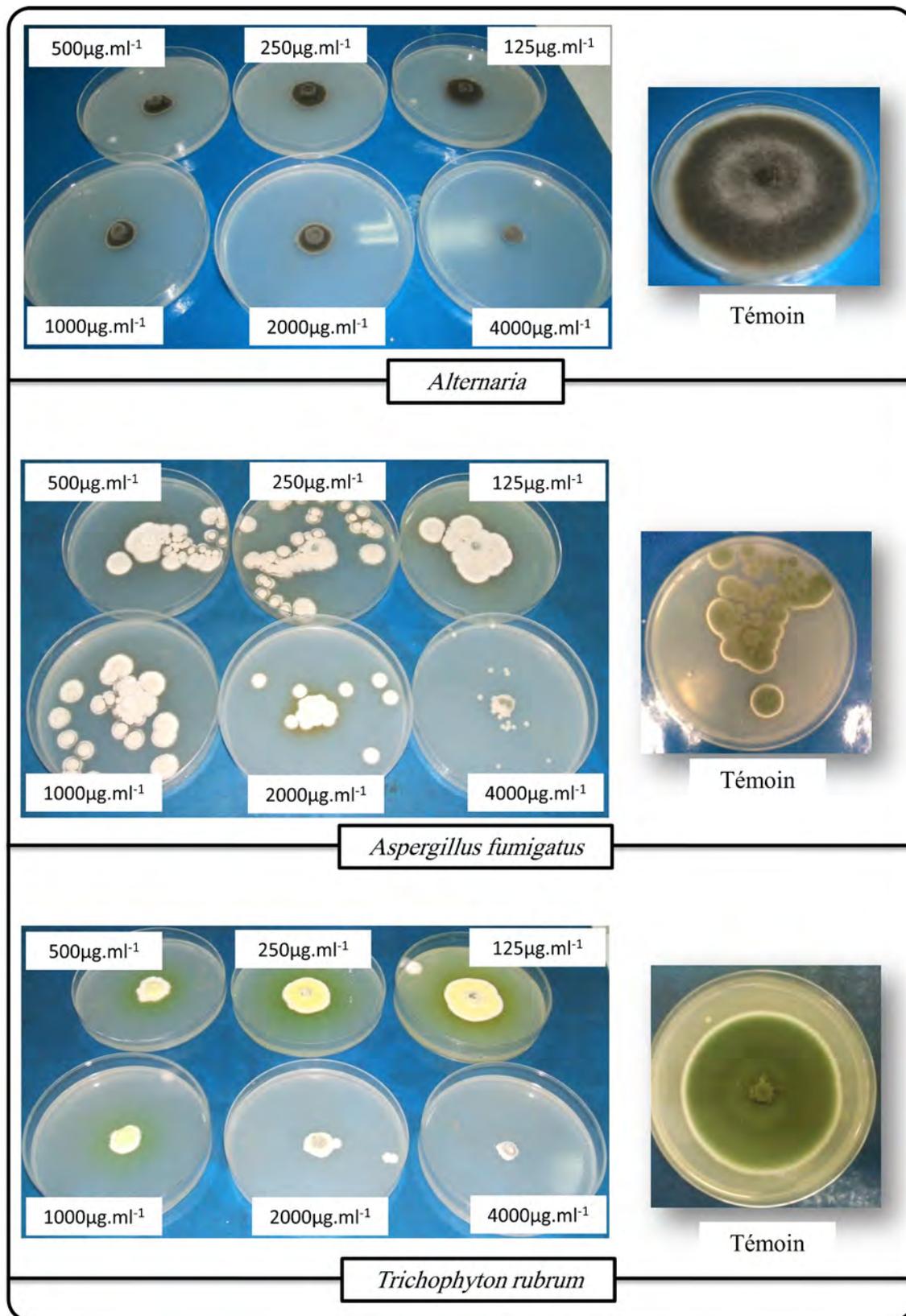
D'après les résultats obtenus, il est clair que les souches testées n'ont pas le même  $IA_{50}$ , les souches appartenant aux genres *Alternaria* et *Aureobasidium* sont les plus sensibles. L'huile essentielle des graines du fenouil a inhibé la croissance totale (100%) d'*Aureobasidium* à 2000 $\mu\text{g/ml}$  et à 4000 $\mu\text{g/ml}$  pour la souche *Alternaria*. Par contre les souches appartenant aux genres *Fusarium* et *Rhisopus* sont les souches les plus résistantes.

Les  $IA_{50}$  d'*Aspergillus fumigatus* CIP 1082.74 et de *Penicillium* n'ont pas été déterminées à cause de la dispersion des spores, par conséquent, nous n'avons pas pu mesurer leurs diamètres.

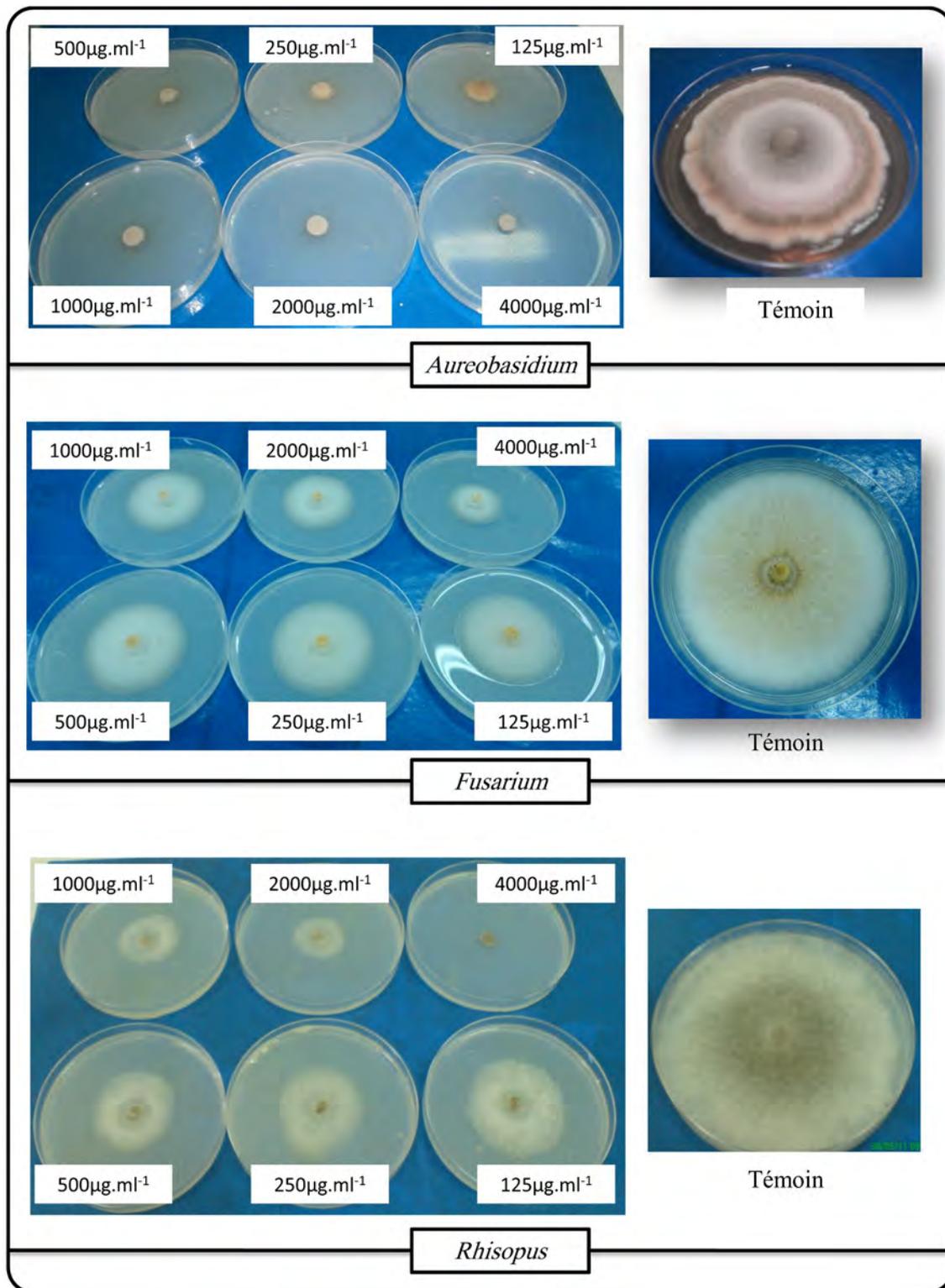
Nous constatons aussi que la couleur d'*Aspergillus fumigatus* est transformée en blanche, de même celle de *Trichophyton rubrum* est virée vers le jaune. Nous remarquons aussi une diminution du taux de sporulation de *Rhisopus*.

Des exemples de la croissance mycélienne sous l'effet de l'huile essentielle des graines du fenouil sont présentés dans les figures 15 et 16.

Comme contrôle négatif, le DMSO n'a pas affecté la croissance des souches fongiques à la concentration utilisée dans cette étude (0.5ml de DMSO par 20ml de PDA).



**Figure 15.** Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil sur *Alternaria*, *Aspergillus fumigatus* et *Trichophyton rubrum* à différentes concentrations.



**Figure 16.** Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil sur *Aureobasidium*, *Fusarium* et *Rhizopus* à différentes concentrations.

## 2. Discussion

### 2.1 Rendement en huile essentielle

Nous rappelons que le rendement a été voisin de  $0.79 \pm 0.02\%$ . Ce rendement est très faible par rapport à la bibliographie. Cette différence du rendement de l'huile essentielle est toute à fait normale, puisqu'il dépend de plusieurs facteurs à savoir l'espèce, la géographie, la période de récolte, les pratiques culturales, la technique d'extraction, etc. (Silano & Delbò, 2008; Marzoukia *et al.*, 2009; Aprotosoiaie *et al.*, 2010; Olle et Bender, 2010)

Nous tenons à signaler, pour notre huile essentielle, exceptée la zone de culture (Ain Oualmene) plusieurs facteurs sont ignorés notamment les conditions de culture et de récolte et en particulier les conditions et la durée de stockage des graines. A titre d'exemple, les graines peuvent perdre leurs composés volatiles si elles sont stockées longtemps.

La séparation de l'huile essentielle après sa distillation est déterminée dans une large mesure par son degré de solubilité dans l'eau. C'est ce que nous l'avons remarqué durant l'étape de récupération de l'huile essentielle à partir de l'hydrolysate, ce dernier contient toujours des gouttelettes que nous n'avons pas pu les récupérer ce qui fausserait le rendement. D'après Lagunez Rivera (2006), les gouttelettes d'huile essentielle qui restent dans l'hydrolysate peuvent avoir plusieurs origines, une fraction de l'huile distillée est dissoute dans l'eau et une autre est émulsionnée dans l'eau. La séparation de l'huile essentielle après condensation est en fait l'étape déterminante pour recueillir le maximum d'huile essentielle.

Il est intéressant de trouver d'autres méthodes pour extraire le maximum d'huile essentielle ou de suivre l'hydrodistillation par une extraction liquide-liquide à l'aide des solvants organiques de l'hydrolysate.

### 2.2 Activité antioxydante

Nous avons utilisé deux méthodes différentes pour étudier l'activité antioxydante, puisque, les résultats d'une seule méthode ne peuvent donner qu'une suggestion réduite de l'activité antioxydante. En plus, la complexité chimique des huiles essentielles, souvent un mélange d'une douzaine de composés avec des groupes fonctionnels différents ; la polarité et le comportement de produits chimiques peuvent mener aux résultats dispersés, selon la méthode utilisée.

L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle des graines du fenouil a été évaluée suivant la méthode de DPPH<sup>•</sup>. Cette méthode peut être employée pour évaluer de l'activité antiradicalaire dans une durée relativement brève. Presque 90% des études sur l'activité antioxydante utilisent la méthode du DPPH<sup>•</sup> (Kulisic *et al.*, 2004 ; Moon & Shibamoto, 2009). Cette méthode est simple mais fortement sensible (Moon & Shibamoto, 2009). Dans ce test, on

s'intéresse à mesurer l'activité de balayage d'un radical libre (DPPH<sup>•</sup>) par les fractions antioxydantes (huile essentielle) (Ho *et al.*, 2010).

Dans la présente étude, l'huile essentielle des graines du fenouil a montré une activité antiradicalaire inférieure à celle de la vitamine C. L'effet antiradicalaire de l'huile essentielle sur le DPPH<sup>•</sup> est dû à leur capacité donatrice d'un atome d'hydrogène (Conforti *et al.*, 2006).

D'après Kulisic *et al.* (2004), la méthode de DPPH<sup>•</sup> est indépendante de la polarité du substrat. De même, d'autres auteurs ont rapporté que la polarité du substrat n'affecte pas l'activité de balayage du DPPH<sup>•</sup> (Pekkarinen *et al.*, 1999; Koleva *et al.*, 2002).

La dégradation oxydante des lipides (peroxydation de lipide) a été étudiée dans l'oxydation des aliments. Un des mécanismes les plus bien connus est celui des acides gras insaturés, notamment l'acide linoléique (Moon & Shibamoto, 2009). Dans ce contexte, Pour étudier l'activité antioxydante de l'huile essentielle des graines du fenouil, la méthode de blanchiment du  $\beta$ -carotène a été utilisée. Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, suite à l'abstraction des atomes d'hydrogènes à partir de groupements méthylènes diallyliques de l'acide linoléique. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le  $\beta$ -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du  $\beta$ -carotène (Kulisic *et al.*, 2004; Conforti *et al.*, 2006; Meziti, 2009). C'est cette propriété de décoloration que nous avons employée pour l'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle des graines du fenouil.

D'après les résultats de l'étude de la cinétique de blanchiment du  $\beta$ -carotène en absence et en présence de l'huile essentielle de graines du fenouil et de la vitamine C, l'huile essentielle des graines du fenouil semble inhiber d'une manière efficace ( $81,74 \pm 3,92\%$ ) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène par rapport au contrôle négatif et à la vitamine C. Ces résultats sont probablement dus à la haute spécificité de l'essai du blanchissement du  $\beta$ -carotène pour les composés lipophiles (Gachkar *et al.*, 2007). De ce fait, pour l'acide ascorbique, qui est un antioxydant bien connu et un composé polaire, l'essai de blanchiment du  $\beta$ -carotène n'a pas montré ses propriétés antioxydantes. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le paradoxe des phénomènes polaires comme il est décrit par Frankel *et al.* (1994) et Koleva *et al.* (2002). Etant donné que le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau, Frankel et Meyer (2000) ont supposé que les antioxydants apolaires (huile essentielle des graines du fenouil dans la présente étude) exercent des propriétés antioxydantes plus importantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du  $\beta$ -carotène. Alors que les

antioxydants polaires (vitamine C) restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides.

Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du  $\beta$ -carotène peut être décrit comme un antioxydant primaire (Liyana-Pathirana et Shahidi, 2006) ; c'est le cas de l'huile essentielle testée. Un antioxydant primaire est défini comme étant un composé chimique qui retarde ou empêche l'étape d'initiation et interrompt l'étape de propagation de la réaction d'oxydation des lipides (Miliauskas *et al.*, 2004; Multon, 2002).

D'après les résultats obtenus, la méthode de blanchissement du  $\beta$ -carotène serait particulièrement utile pour des investigations des antioxydants lipophiles et serait appropriée pour étudier l'activité antioxydante des huiles essentielles. En revanche, si des composés polaires (acide ascorbique, etc.) sont examinés seulement par cette méthode, ils seraient considérés en tant qu'antioxydants faibles.

D'après notre recherche bibliographique, il n'y a pas beaucoup des publications scientifiques qui ont étudié les activités antioxydantes de l'huile essentielle des graines du fenouil, mais le peu de références consultées prouve l'existence d'une activité antioxydante très intéressante, même meilleure que celle des antioxydants de synthèse. Singh *et al.* (2006) ont étudié l'activité antioxydante de l'huile essentielle du fenouil et son extrait acétonique par trois méthodes différentes. Leurs travaux montrent que l'huile essentielle du fenouil et les extraits cétoniques ont donné des bons résultats comparativement avec le BHA et le BHT (conservateurs alimentaires les plus utilisées).

En se référant à la bibliographie, certains auteurs ont mentionné que ce sont les extraits des graines entières qui ont un pouvoir antioxydant. Dans une étude effectuée par Oktay *et al.* (2003), l'activité antioxydante des extraits aqueux et celle des extraits éthanoliques des graines du fenouil a été évaluée par plusieurs méthodes (balayage du DPPH<sup>\*</sup>, balayage du superoxyde, balayage du peroxyde d'hydrogène et la puissance de réduction), ces extraits ont été comparés aux BHA, BHT et à l' $\alpha$ -tocophérol. Les extraits aqueux et éthanoliques des graines du fenouil ont montré des activités antioxydantes fortes. 100 $\mu$ g de chaque extrait ont montré une inhibition de 99.1% et 77.5% de la peroxydation de l'acide linoléique, respectivement ; ces valeurs d'inhibition sont plus grandes que celle de l' $\alpha$ -tocophérol (36.1%) à la même dose.

Il est difficile d'attribuer cette activité antioxydante à un composé ou aux composés totaux de l'huile essentielle des graines du fenouil. L'activité antioxydante de cette huile peut être due à l'effet combinatoire de plus de deux composés, qui sont présents dans les huiles essentielles. Selon Muckenstrum *et al.* (1997) cette activité pourrait être aussi due aux composés majeurs tel que l'anéthole, un monoterpène oxygéné connu pour son activité antioxydante, ces observations ont été confirmés par Freire *et al.* (2005). Lu et Foo (1995) ont déjà rapporté que les composés

antioxydants fonctionnent synergiquement les uns avec les autres pour produire une large gamme d'activités antioxydantes qui crée un système de défense efficace contre l'attaque du radical libre.

L'effet antiradicalaire de l'huile essentielle des graines du fenouil pourrait être dû à la présence d'une grande proportion des composés phénoliques (Velioglu *et al.*, 1998). Il est rapporté que les composés phénoliques peuvent donner un atome d'hydrogène aux radicaux libres arrêtant de ce fait la réaction en chaîne de propagation pendant le processus d'oxydation des lipides (Sanchez-Mareno *et al.*, 1998). Les composés phénoliques réagissent selon un mécanisme proposé par Sherwin (1976), l'antioxydant cède un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de protons, pour donner un intermédiaire radical stabilisé de par ses structures mésomères conjuguées.

### 2.3 Activité antibactérienne

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle des graines du fenouil vis-à-vis des bactéries testées. Selon la classification de Ponce *et al.* (2003), toutes les souches sont sensibles à l'huile essentielle des graines du fenouil.

L'huile essentielle des graines du fenouil n'a pas montré une activité antibactérienne intéressante. Cette faible efficacité est due probablement aux pertes des composés volatils de l'huile essentielle durant le stockage et/ou l'extraction. Donc, il serait rentable d'utiliser des graines récemment récoltées et d'essayer un autre procédé d'extraction pour obtenir des huiles essentielles efficaces du point de vue activité antibactérienne. Cette faible efficacité pourrait être aussi due au fait qu'au cours de la période d'incubation quelques composants volatils de l'huile peuvent s'évaporer des milieux de culture, ce qui diminuerait sa concentration, et par la suite son activité antibactérienne.

Dans la présente étude, nous n'avons testé que de l'huile essentielle pure, parce que, d'après Manou *et al.* (1998) et Bagamboula *et al.* (2004), il n'y a aucun rapport entre la concentration d'huile essentielle ou du composé actif et la zone d'inhibition ; cette dernière semble dépendre de la capacité des huiles essentielles à diffuser uniformément sur l'agar. Généralement, les huiles essentielles sont médiocrement solubles dans l'eau, ce qui pose beaucoup de problèmes pour étudier leur activité antibactérienne, ceci a été déjà rapporté par Southwell *et al.* (1993) et Griffin (2000).

La méthode de l'aromatogramme est généralement employée comme une analyse préliminaire pour étudier l'activité antibactérienne ensuite viennent des méthodes plus détaillées. Dans cette méthode, les paramètres tels que le volume de l'huile essentielle placé sur

les disques de papier, l'épaisseur de la couche d'agar et si un dissolvant est employé varient considérablement entre les études (Manou *et al.*, 1998; Burt, 2004). Ceci signifie que cette méthode est utile pour le choix des huiles essentielles actives et pour la mise en évidence de leur activité antibactérienne, mais la comparaison des données éditées n'est pas faisable.

Nous constatons que *Bacillus cereus* CHU et *Listeria monocytogenes* CHU sont les bactéries les plus sensibles, avec une CMI égale à  $25\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Ceci pourrait être expliqué par le fait que les bactéries à G+ possèdent des dispositifs structuraux qui sont plus susceptibles aux huiles essentielles (Abdul Rahman *et al.*, 2010). En revanche, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 est moins sensible. D'après Bassole *et al.* (2002), les staphylocoques sont déjà connus par leur antibio-résistance.

Dans la présente étude, les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Salmonella enterica* s CHU) se sont avérées les plus résistantes, elles montrent des valeurs de CMI trop élevées équivalentes respectivement à 45000 et  $35000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Plusieurs travaux notamment ceux de Ouattara *et al.* (1997); Hammer *et al.* (1999); De Billerbeck *et al.*, (2002); Souza *et al.* (2006a); Ahmad *et al.* (2006b); Ağaoğlu *et al.* (2007); Derwich *et al.* (2010) et Bari *et al.* (2010) ont confirmé la grande résistance des bactéries G- par rapport aux G+. Ce constat peut être dû à l'action de certains composés volatiles de l'huile essentielle étudiée d'une part et à la présence d'une couche de lipopolysaccharide (LPS) chez les bactéries G- qui pourrait fonctionner comme barrière efficace contre n'importe quelle biomolécule entrant d'autre part (Inouye *et al.*, 2001; Bagamboula *et al.*, 2004 ; Upadhyay *et al.*, 2010).

Concernant le *Pseudomonas aeruginosa*, cette bactérie est connue pour sa résistance à n'importe quel genre d'agents antimicrobiens. En réalité, ce comportement n'est pas étonnant parce que le *Pseudomonas aeruginosa* a une capacité de former un biofilm (une organisation complexe composée de différentes strates dans lesquelles les bactéries se retrouvent en conditions physiologiques spécifiques à leur situation) (Abi-Ayad *et al.*, 2011).

*E. coli* ATCC 25922 s'est avérée la plus sensible par la méthode de dilution, malgré qu'elle est Gram négatif. Il est postulé que les différents composants des huiles essentielles montrent différents degrés d'activité contre des bactéries G- et G+ (Dorman et Deans, 2000) et que la composition chimique des huiles essentielles peut varier selon plusieurs facteurs intrinsèque et extrinsèque (Lahlou, 2004). Il est connu aussi que les espèces bactériennes n'ont pas également la même sensibilité vis-à-vis d'un agent antibactérien. De même dans une population bactérienne, il peut exister des différences individuelles de sensibilité. Ainsi, l'action antibactérienne est parfois partielle et après une diminution du nombre de bactéries, il y'a une reprise de la croissance bactérienne.

La matière organique du milieu de culture est susceptible de réduire l'efficacité d'un agent antibactérien en se combinant avec lui pour former des composés inactifs, en l'adsorbant et en diminuant sa concentration, ou en le précipitant et en l'éliminant purement. Ainsi, l'activité antibactérienne peut dépendre de la composition du milieu de culture.

La plus petite CMI de l'huile essentielle des graines du fenouil est celle constatée chez *E. coli* ATCC 25922 (20 000 µg.ml<sup>-1</sup>) malgré sa résistance dans la méthode de diffusion des disques, ce qui confirme que la méthode employée peut être considéré comme un facteur influant sur les résultats de l'activité antibactérienne. L'absence de relation entre les deux méthodes d'étude pourrait s'expliquer par l'environnement où se trouve l'huile essentielle ainsi que le type de contact. Dans la méthode de diffusion, les constituants actifs ont trouvé une difficulté pour diffuser sur la gélose; alors qu'avec la méthode de dilution, les constituants actifs sont en émulsion avec les ingrédients du milieu de culture et sont donc en contact direct avec les constituants du milieu de culture.

Les différentes valeurs de CMI obtenues nous permettent de constater que l'activité antibactérienne est en fonction de la bactérie, ce qui confirme que le type de microorganismes est un paramètre important déterminant l'activité antibactérienne.

Nos résultats concordent avec ceux de plusieurs auteurs notamment Friedman *et al.* (2002), Lo Cantore *et al.* (2004) et Ağaoğlu *et al.* (2007) qui ont trouvé une faible activité. En revanche, ils s'opposent aux résultats de Singh *et al.* (2002); Ozkan *et al.* (2003); Dadalioglu et Evrendilek (2004) qui ont démontré une activité considérable contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Dans une étude réalisée par Abed (2007a), les huiles essentielles extraites à partir des racines, des tiges et des feuilles du fenouil n'ont montré aucune inhibition de la croissance des *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*; ce qui prouve que la partie de la plante dont l'huile essentielle extraite a aussi une influence sur l'activité biologique.

Dadalioglu et Evrendilek (2004) ont démontré que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des graines du fenouil est due à l'anéthol qui est le composant majeur. Ces observations ont été confirmées par Ağaoğlu *et al.* (2007); Gulfraz *et al.* (2008) et Abdul Rahman *et al.* (2010). En revanche, plusieurs études signalent que l'effet des composés mineurs n'est pas négligeable (Tantaoui-Elaraki, 1993; Hammer *et al.*, 2003; Burt, 2004; Rasooli *et al.*, 2008; Hussain *et al.*, 2010).

Selon Cosentino *et al.* (1999) et Gulfraz *et al.* (2008), l'activité antimicrobienne de toutes huiles essentielles est assignée aux terpénoïdes et aux composés phénoliques. Récemment, Tiwari *et al.* (2009) ont interprété l'activité antibactérienne des composants phénoliques en termes de substitution alkylique dans le noyau de phénol. La formation des radicaux de

phénoxy, qui agissent les uns sur les autres avec les substituants alkyliques, ne se produit pas avec l'anéthole qui est une molécule stable, ce qui expliquerait la faible activité antimicrobienne des graines du fenouil.

Les interactions entre les agents émulsifiants et dissolvants (Tween 80 et DMSO), et les constituants des huiles essentielles représentent un facteur important pour la mesure de leur activité antimicrobienne car elles peuvent diminuer l'activité antimicrobienne.

D'après nos résultats, le rapport CMB/CMI est compris entre 0.78 et 1.8 (inférieur à 4) ce qui confère à l'huile essentielle des graines du fenouil un pouvoir bactéricide vis-à-vis les souches testées (Canillac & Mourey, 2001).

### **3.4 Activité antifongique**

Les agents antifongiques synthétiques sont appliqués à grande échelle pour empêcher la croissance mycélienne. Ces produits chimiques sont également connus pour posséder des propriétés cancérogènes, tératogéniques, oncogènes et génotoxiques (Nagendra *et al.*, 2010). La difficulté de développer une molécule antifongique est liée, d'une part à l'ultrastructure de la cellule fongique qui présente trois barrières : la paroi cellulaire chitineuse, les ergostérols membranaires et le noyau eucaryote (Chami, 2005) et d'autre part, les molécules antifongiques elles-mêmes qui peuvent engendrer des résistances (Nagendra *et al.*, 2010; Prasad et Kapoor, 2004). Les huiles essentielles peuvent être utiles en tant qu'agents antifongiques parce qu'elles affectent plusieurs cibles simultanément et il n'y a aucun rapport de résistance ou d'adaptation des microorganismes à cause de la diversité des composés chimiques (Bakkali *et al.*, 2008). Beaucoup de chercheurs ont confirmé la présence de l'activité antifongique de l'huile essentielle des graines du fenouil. De même, nos résultats prouvent l'existence de cette activité et indiquent que les huiles essentielles des graines du fenouil ont une activité antifongique intéressante.

Plusieurs méthodes d'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles sont disponibles, mais puisqu'elles ne se basent pas sur le même principe, les résultats peuvent être profondément influencés par la méthode (Mesa-Arango *et al.*, 2009). Parmi les méthodes proposées, trois différentes méthodes ont été utilisées.

La méthode de diffusion des disques est intensivement employée pour étudier l'activité antifongique des substances naturelles et des extraits des plantes. Cette technique est basée sur l'utilisation des disques comme réservoirs contenant la solution des substances à examiner (Mohammedi, 2006). Elle nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique de l'huile essentielle des graines du fenouil vis-à-vis des souches fongiques. Nos résultats indiquent que l'huile essentielle des graines du fenouil a une capacité inhibitrice de la croissance mycélienne de toutes les souches testées.

Le test des disques est limité seulement au criblage de l'activité antifongique, parce que, la capacité des disques est limitée et les zones d'inhibition, dans la présente étude, ne nous permettent pas de faire une comparaison entre les souches testées et elles ne sont pas représentatives et par conséquent le calcul des diamètres d'inhibition n'est pas exacte, c'est le cas d'*Aureobasidium* (figure 12), où les diamètres d'inhibition ne sont pas calculables. Sharma et Tripathi (2008) ont prouvé que l'activité antifongique des huiles essentielles peut être évaluée par la méthode de dilution mieux que par la méthode de diffusion, puisque dans cette dernière, la taille de la zone d'inhibition dépend de la diffusion des composés insolubles dans le milieu de culture. Les mêmes résultats ont été rapportés par Hammer *et al.* (2003). En conséquence, l'évaluation de l'activité antifongique avec cette méthode est insuffisante, il fallait donc utiliser d'autres techniques telle que l'incorporation de l'huile essentielle directement dans le milieu de culture. Dans la méthode de dilution, le seul inconvénient est qu'elle exige une grande quantité de l'HE (Mesa-Arango *et al.*, 2009).

Malgré l'existence de nombreux rapports sur l'activité antifongique des huiles essentielles par la méthode de contact direct, nous avons constaté que les informations sur l'activité antifongique de la phase volatile d'huile essentielle sont rares. Les composés volatiles de l'huile essentielle des graines du fenouil se sont avérés doués d'activité antifongique. Dans la présente étude, la vapeur de l'huile essentielle des graines du fenouil a montré une activité inhibitrice qui n'est pas négligeable à une dose de 5µl/boîte.

Certains chercheurs ont trouvé que l'huile essentielle des graines du fenouil est efficace par la méthode des boîtes inversées que par la méthode de contact direct. Ils ont supposé que la nature lipophile des huiles essentielles les rendent plus absorbables par les mycéliums fongiques que par l'agar de nature hydrophile (Soylu *et al.*, 2005). La même méthode est utilisée par Singh *et al.* (2006), ils ont trouvé que l'huile essentielle des graines du fenouil montre un taux d'inhibition de 100% contre *A. niger* et *A. flavus* à une dose de 6µl/disque, elle s'est avérée fortement efficace même à 4µl pour *A. niger*.

En se basant sur les résultats des microaromatogrammes, l'activité antifongique de l'huile essentielle des graines du fenouil pourrait être due à l'effet combinatoire de la vapeur de l'huile essentielle et du contact direct.

AliGiannis *et al.* (2001) ont proposé une classification des extraits naturels, basée sur les résultats des valeurs de CMF<sub>S</sub>, comme suit : activité forte : CMF<sub>S</sub> est inférieure ou égale à 500µg.ml<sup>-1</sup>; activité modérée : CMF<sub>S</sub> entre 600 et 1500µg/ml<sup>-1</sup> et activité faible : CMF<sub>S</sub> supérieure à 1600µg/ml<sup>-1</sup>. En basant sur cette classification, l'huile essentielle des graines du fenouil semble avoir une activité modérée.

Récemment, plusieurs chercheurs ont rapporté que les terpénoïdes et leurs dérivés oxygénés sont les composants principaux des huiles essentielles ; ces composés ont un potentiel inhibiteur fort sur des souches microbiennes pathogènes (Gudzic *et al.*, 2002; Cakir *et al.*, 2004; Shunying *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2006; Fontenelle *et al.*, 2007; Hossain *et al.*, 2008). Des composés épurés dérivés de l'huile essentielle du fenouil, comme l'anéthole, ont été déjà étudiés pour tester leurs activités antimicrobiennes (Curtis *et al.*, 1996; Nychas, 1998; De *et al.*, 2002).

Les constituants mineurs des huiles essentielles particulièrement ont pu également être impliqués dans l'activité antifongique (Jantan *et al.*, 2008; Sidhu *et al.*, 2009 ; Bajpai *et al.*, 2010). Pattnaik *et al.* (1997) ont signalé que la nature et la proportion des différents constituants de l'huile essentielle et de leurs effets synergiques ont une influence forte sur l'activité antifongique des huiles essentielles. L'activité inhibitrice peut être due aux différents modes d'action de tous les composants de l'huile essentielle sur les moisissures.

Le mécanisme d'action des huiles essentielles contre des mycètes, jusqu'à maintenant, n'est pas totalement compris, mais quelques auteurs ont donné plusieurs suppositions selon leurs observations.

La plupart des études sur le mécanisme d'action des huiles essentielles se sont accentuées sur leurs effets sur les membranes cellulaires. En fait, les composés actifs attaquent la paroi et la membrane cellulaire, affectant de ce fait la perméabilité et le dégagement des constituants intracellulaires, en interférant également avec la fonction de la membrane (Rasooli et Owlia, 2005; Pinto *et al.*, 2006; Carmo *et al.*, 2008; Koul *et al.*, 2008; Bajpai *et al.*, 2008; Yen & Chang, 2008; Bajpai & Kang, 2010).

D'après les résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle des graines du fenouil étudiée par la méthode de dilution d'agar, il est clair que les souches étudiées n'ont pas les mêmes valeurs de l'IA<sub>50</sub>. Ceci serait dû à la nature de la paroi des souches fongiques qui se compose d'un réseau complexe des protéines et des polycarbohydres et qui varie en composition selon les espèces fongiques. La perturbation de cette matrice peut avoir comme conséquence une paroi défectueuse, qui devient sensible à la lyse osmotique et sensitive aux agents antifongiques (Yen & Chang, 2008).

D'après les observations de Soyly *et al.* (2005), l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* Mill. a entraîné des détériorations de la morphologie des thalles ; ils ont observé également des grandes vésicules à l'intérieur de la paroi cellulaire. Dans beaucoup des cas, les cellules du mycélium n'ont plus un cytoplasme ou un cytoplasme épuisé des organelles. Des observations similaires avec d'autres huiles essentielles ont été rapportées par Zambonelli *et al.* (1996) et Fiori *et al.* (2000).

En outre, l'activité antifongique des huiles essentielles pourrait également être liée à l'interférence des composants de l'huile essentielle dans des réactions enzymatiques de la synthèse de la paroi cellulaire, qui affecte la croissance fongique (Carmo *et al.*, 2008). Ces suggestions ont été déjà rapportées par Bang *et al.* (2000). Ils ont étudié l'inhibition des enzymes synthétisant la paroi des cellules fongiques en examinant les effets inhibiteurs de l'huile essentielle sur le  $\beta$ -(1.3) glucane sur la chitine synthéase. Chalchat *et al.* (1997) signalent que les huiles essentielles endommagent une série de systèmes enzymatiques des moisissures, de ce fait affectant la synthèse et la production énergétique composantes structurales.

D'après Wiley (2005), la couleur caractéristique de beaucoup des moisissures est due à la pigmentation des conidiums. En conséquence, le changement de la couleur d'*Aspergillus fumigatus*, du *Trichophyton rubrum*, d'*Alternaria* et d'*Aureobasidium* pourrait être dû à l'effet de l'huile essentielle des graines du fenouil sur les conidiums.

Le mécanisme d'action des composés phénoliques des huiles essentielles sur les champignons est fondé principalement sur l'inhibition des enzymes fongiques contenant le groupement SH dans leur site actif (Celimene *et al.*, 1999).

Plusieurs auteurs, notamment de Billerberk *et al.* (2001); Mares *et al.* (2004); Rasooli and Abyaneh (2004) et Sharma &Tripath (2007), ont constaté que les huiles essentielles peuvent causer des changements morphologiques comprenant l'insuffisance de sporulation, la perte de pigmentation, le développement anormal des conidiophores et la déformation des hyphes.

La toxicité du solvant peut être critiquée car le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous pendant que le solvant réagit avec certains composés pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation, ou l'isomérisation de ces composés (Mohammedi, 2006).

D'autres recherches sont penchées sur l'évaluation de l'interférence de l'huile essentielle dans la synthèse de mycotoxines par quelques espèces toxicogènes (Carmo *et al.*, 2008), mais, Il n'y pas beaucoup de données disponibles concernant l'effet des huiles essentielles sur la production des mycotoxines par les mycètes (Tatsadjieu *et al.*, 2008).

D'après nos résultats, nous pouvons proposer l'huile essentielle des graines du fenouil comme une alternative aux agents antioxydants et antifongiques synthétiques pour les agro-industries. Par conséquent, il serait également intéressant de tester l'huile essentielle des graines du fenouil dans les aliments pour développer de nouveaux agents antioxydants et antifongiques pour empêcher ou retarder la détérioration des denrées alimentaires.

Bien qu'il y ait beaucoup d'études focalisées sur les propriétés biologiques des plantes aromatiques et leurs huiles essentielles, les applications sur les aliments sont très peu (Raza *et al.*, 2009; Foda *et al.*, 2010; Ghasemi *et al.*, 2010). Ceci est dû en fait à la complexité de la création de nouveaux conservateurs, efficaces et sûrs.

Beaucoup de questions technologiques devraient être soulevées avant que de nouveaux conservateurs naturels puissent être considérés comme additifs. Le mécanisme d'action, la solubilité et la stabilité dans les aliments, les impacts sur la saveur ou la couleur du produit et la concentration appropriée requise sont importants pour les industries alimentaires. Dans beaucoup de cas des antioxydants et antimicrobiens d'origine naturelle ont échoué à répondre à certaines de ces questions (la solubilité, l'odeur et la couleur sont les limitations les plus communes).

Une autre question importante : Est-ce que c'est vrai que : « naturel = sûr ? ». Il est bien connu que ceci pas toujours le cas (Burt, 2004); donc faire des études toxicologiques est une nécessité, quoique ce type de recherche soit coûteux. Les composés complexes peuvent donner un éventail d'interactions avec le produit, et ceci devrait être pris en compte.

Indépendamment des questions ou préoccupations mentionnées tout en recherchant de nouvelles sources de conservateurs naturels, la culture des plantes ou les conditions climatiques devrait être prises en considération. Ces facteurs influencent la composition des plantes et donc ses propriétés. Néanmoins la recherche devrait continuer pour trouver des sources prometteuses des antioxydants et antimicrobiens ou effectuer des investigations détaillées, sur l'optimisation des techniques d'isolement, sur des études biochimiques vers la sûreté des sources nouvellement découvertes, et la disponibilité biologique des composés actifs.

# *Conclusion*

---

Un grand nombre de plantes aromatiques contiennent des composés chimiques ayant des propriétés antioxydante et antimicrobienne. Plusieurs travaux de recherche ont été focalisés sur les huiles essentielles extraites de ces plantes aromatiques. Les différents résultats publiés indiquent qu'elles sont douées de plusieurs propriétés biologiques. Cependant, les travaux de recherche sur les propriétés antioxydante, antibactérienne et antifongique de certaines plantes sont rares. Par conséquent, l'évaluation de telles propriétés demeure une tâche intéressante et utile, en particulier pour trouver de nouvelles sources d'agents antioxydant et antimicrobiens naturels. Dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer *in vitro* des activités antioxydante, antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill.

L'extraction de l'huile essentielle des graines du fenouil a été réalisée par hydrodistillation. Le rendement a été voisin de  $0.79 \pm 0.02\%$ .

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* de l'huile essentielle extraite des graines du fenouil a été évaluée par deux méthodes différentes. La méthode de réduction du DPPH<sup>\*</sup> et la méthode de blanchiment du  $\beta$ -carotène nous ont permis respectivement d'étudier l'activité antiradicalaire et antioxydante de l'huile essentielle des graines du fenouil, cette dernière a réduit le radical DPPH<sup>\*</sup> avec une CE<sub>50</sub> de  $752,65 \pm 32,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . La méthode de blanchiment du  $\beta$ -carotène nous a permis d'évaluer l'activité antioxydante, celle-ci s'est avérée très intéressante ( $81,74 \pm 3,92\%$ ).

Pour l'activité antibactérienne, la méthode de l'aromatogramme nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle des graines du fenouil vis-à-vis de six bactéries. Ce pouvoir est relativement faible, avec des zones d'inhibition variant entre 8 et 13mm. La méthode de dilution a confirmé les résultats de la méthode de l'aromatogramme. Les CMI obtenues sont comprises entre 20 000 et 45 000  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . De même, les valeurs de la CMB de l'huile essentielle des graines de fenouil s'avèrent élevées.

La méthode de diffusion des disques nous a permis aussi de mettre en évidence le pouvoir antifongique de l'huile essentielle des graines du fenouil vis-à-vis des souches fongiques. Nos résultats indiquent que l'huile essentielle des graines du fenouil a une capacité inhibitrice de la croissance mycélienne de toutes les souches testées. Les zones d'inhibition varient entre 17 et 22mm. La vapeur de l'huile essentielle des graines du fenouil a montré également une activité inhibitrice qui n'est pas négligeable à une dose de 5 $\mu\text{l}$ /boite.

La méthode de dilution en bouillon a montré une activité antifongique intéressante contre les souches fongiques examinées. Les valeurs de la  $CMF_S$  obtenues sont comprises entre 625 et  $1250\mu\text{g.ml}^{-1}$  et celle de la  $CMF_C$  était de  $1250\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

Pour obtenir des concentrations plus précises que la  $CMF_S$  et la  $CMF_C$ , un autre paramètre a été déterminé qui est l' $IA_{50}$ . Toutes les concentrations de l'huile essentielle des graines du fenouil appliquées ont empêché, partiellement ou complètement, la croissance des moisissures testées. Les résultats obtenus indiquent que l'*Alternaria* et l'*Aureobasidium* sont les souches fongiques les plus sensibles. Par contre, *Fusarium* et *Rhizopus* sont les plus résistantes.

En fin, nos résultats indiquent que l'huile essentielle des graines du fenouil n'a pas une activité antibactérienne intéressante. En revanche, elle a montré des bonnes activités antioxydante et antifongique. Subséquemment, nous pouvons conclure que l'huile essentielle des graines du fenouil peut être considérée comme un agent conservateur très prometteur pour l'industrie alimentaire capable d'empêcher l'oxydation des aliments et de réduire la croissance mycélienne responsable d'altération des aliments.

A l'essor de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie sur l'huile essentielle des graines du fenouil afin d'isoler, de purifier et d'identifier les composés ayant une activité antioxydante et antifongique.

Malgré la complexité de l'application des huiles essentielles dans l'industrie alimentaire, il serait utile de cibler un des produits alimentaires pour lequel on utilise cette huile comme alternative au conservateur synthétique déjà employé et voir son comportement sur plusieurs plans.

*Références*  
*Bibliographiques*

---

- Abdesselam Z., 2006. Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News.*, pp. 6-16.
- Abdul Rahman M.S., Thangaraj S., Salique S.M., Khan K.F. and Natheer S.E., 2010. Antimicrobial and biochemical analysis of some spices extract against food spoilage pathogens. *Internet Journal of Food Safety*, Vol.12, pp. 71-75.
- Abed K.F., 2007. Antibacterial and anticandidal activity of essential oils of some medicinal plants in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 14 (2), pp. 245-250.
- Abi-Ayad M., Abi-Ayad F.Z., Lazzouni H.A. and Rebiahi S.A., 2011. Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria (Tlemcen). *J. Nat. Prod. Plant Resour.*, 1 (1): pp. 33-36.
- Abramson C.I., Wanderley P.A., Wanderley M.J.A., Silva J.C.R. and Michaluk L.M., 2007. The Effect of essential oils of sweet fennel and pignut on mortality and learning in africanized Honeybees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) *Neotropical Entomology* 36 (6), pp. 828-835.
- AFNOR, 1986. Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57 p.
- AFNOR, 1996. Huiles essentielles. Volume 1 : échantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p.
- AFNOR, 2000. Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. 6<sup>ème</sup> édition. AFNOR, Paris.
- Ağaoğlu S., Dostbil N. and Alemdar S., 2007. Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. *Bull Vet Inst Pulawy* 51, pp.53-57.
- Ahmad I., Aqil F. and Owais M., 2006a. Modern phytochemistry : Turning medicinal plants into drugs. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.
- Ahmad A.M., Khokhar I., Ahmad I., Kashmiri M.A., Adnan A. and Ahmad M., 2006b. Study of antimicrobial activity and composition by GC/MS spectroscopic analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum*. *Internet Journal of Food Safety*, Vol. 5, pp.56-60.
- Ahmed S.M. and Abdelgaleil S.A.M., 2005. Antifungal activity of extracts and sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. (Magnoliaceae). *Int. J. Agri. Biol.*, Vol. 7, №4, pp.638-642.
- Aiyegoro O.A. and Okoh A., 2010. Preliminary phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10 : 21; pp. 1-8.
- Alais C., Linden G. et Miclo L., 2003. Biochimie alimentaire, DUNOD. 5<sup>ème</sup> édition de l'abrégé. 59p.

- Alais C., Linden G. et Miclo L., 2008. Biochimie alimentaire, DUNOD. 6<sup>ème</sup> édition, paris. pp. 67-71.
- Alavi S.H.R., Yassa N. and Fazeli M.R., 2005. Chemical constituents and antibacterial activity of essential oil of *Peucedanum ruthenicum* M. Bieb. Fruits. *SHR IJPS* 1 (4): pp. 217-222.
- Aligiannis N., Kalpotzakis E., Mitaku S. and Chinou I.B., 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, 40 : pp. 4168-4170.
- Amimar Z., Lamarti A., Badoc A., Reduron J.P., Ouahabi S. and Muckensturm B., 2001. Clonage du fenouil doux par culture d'apex. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 140, pp.43-58.
- Amin I. and Tan S.H., 2002. Antioxidant activity of selected seaweeds. *Malaysian Journal of Nutrition*, 8, pp.167-177.
- Anton R. and Lobstein A., 2005. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. *Tec. & Doc.*, Paris, 522p.
- Aprotosoiaie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V. and Stanescu U., 2010. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, Vol. 58 (1); pp. 46-54.
- Archana B., Dasgupta N. and De B., 2005. *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chem.* 90, pp. 727-733.
- Armando C.C. and Rahma H.Y., 2009. Evaluation of the yield and the antimicrobial activity of the essential oils From: *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus* and *Rosmarinus officinalis* (Uganda). *Rev. Colombiana cienc. Anim.* 1 (2), pp. 240-250.
- Badoc A., Amimar Z., Lamarti A. and Deffieux G., 1998. Action de la colchicine lors de la micropropagation du fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.) sur l'huile essentielle des fruits. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 137, pp. 25-36.
- Bagamboula C.F., Uyttendaele M. and Debevere J., 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology* 21: pp. 33-42.
- Bajpai V.K. and Kang S.C., 2010. Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 87: pp. 327-336.
- Bajpai V.K., Shukla S. and Kang S.C., 2008. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. *Bioresource Technology* 99: pp.8903-8908.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M., 2008. Biological effects of essential oils - a review. *Food Chem Toxicol* 46 : pp. 446-475.

- Bang K.H., Lee D.W., Park H.M. and Rhee Y.H., 2000. Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, pp. 1061-1063.
- Banias C., Oreopoulou V. & Thomopoulos C. D., 1992. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 69, 520-524. *In* Kulevanova S. and Panovska T.K., 2001. Antioxidant activity of essential oils of different Wild *thymus* L. Species. *Bull. Chem. Technol. Macedonia*, 20, 1, pp. 61-66.
- Bari M.A., Islam W., Khan A.R. and Mandal A., 2010. Antibacterial and antifungal activity of *Solanum torvum* (Solanaceae). *Int. J. Agric. Biol.*, 12: pp. 386-390.
- Barry N., 2001. Art d'extraire les huiles essentielles. De parfum à faire soi même, pp. 125-128. *In* Belaagoune S. et Himed L. (2007). Etude de l'activité antioxydant d'une huile essentielle de *Schinus molle*. *Mémoire d'Ingéniorat*. INATAA, Université Constantine. 57p.
- Baser K.H.C. and Buchbauer G., 2010. Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. *Taylor and Francis Group, LLC*. United States of America. 994p.
- Bassole H.N., Kabore Z. and Traore A.S., 2002. Étude des profils bactériostatiques et bactéricides d'extraits végétaux vis-à-vis de germes pathogènes impliqués dans la contamination des denrées alimentaires d'origine animale. *Pharm. Med.trad.afr*, Vol.11, pp. 113-122.
- Baydar H., Sagdic O., Ozkan G., and Karadogan T., 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control* 15: pp.169-172.
- Beirão A.R.B. and Bernardo-Gil M.G., 2006. Antioxidants from *Lavandula luisieri*. 2<sup>nd</sup> *Mercosur Congress on Chemical Engineering*. Portugal ; 8p.
- Belleau F., 1990. Analyses des huiles essentielles du *Ledum groenlandicum*. *Thèse de doctorat*, Université du Québec. pp. 13-16.
- Belyagoubi L., 2006. Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. *Mémoire de magister*. Université Abou Bekr Belkaid, 110p.
- Benayad N., 2008. Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed V – Agdal. Rabat, 63p.
- Benini C., 2007. Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux Comores. *Mémoire d'ingéniorat*. Université Gembloux, 109p.
- Benkeblia N., 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 37 pp. 263-268.

- Benzeggouta N., 2005. Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments. *Mémoire de magister*, Université de Constantine, Algérie, 110p.
- Beraoud L., 1990. Effet de certains épices et plantes aromatiques et leurs extraits sur la croissance et la toxinogénèse d'*Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *Thèse 3<sup>e</sup> cycle*. Faculté des sciences de Rabat. Maroc.
- Bernadet M., 2000. Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles. Ed. Dangles. *In* Benzeggouta N., 2005. Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments. *Mémoire de magister*, Université de Constantine, 110p.
- Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat*. Université de La Rochelle, 289p.
- Beylier-Maurel M.F., 1976. Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana. E.P.P.O.S.*, 58: pp. 283-286.
- Bilgrami K.S., Sinha K.K. & Sinha A.K., 1992. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol, onion, and garlic extracts. *Indian. J. Med. Res.* 96, pp. 171-175.
- Blois M.S., 1958. Antioxidant determination by the use of a stable radical. *Nature*, 4617, pp. 1199-1200.
- Bondet V., Brand-Williams W. and Berset C., 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH<sup>•</sup> free radical method. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, vol. 30 №6, pp.609-615.
- Bouguerra A. & Zeghou K., 2009. Etude des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle extraite des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*. *Mémoire d'ingénieur*. INATAA, Université Mentouri Constantine, 46p.
- Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Shali N. S., & Abrini J., 2006. *Thymus* essential oils: chemical composition and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities. *International congress of biochemistry*, pp. 324-328.
- Bourkhis B., Ouhssine M., Hnach M., Bourkhiss M., Satrani B. & Farah A., 2007. Composition chimique et bio activité de l'huile essentielle des rameaux de *Tetraclinis articulata*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146, pp. 75-84.
- Bowles E.J., 2003. The chemistry of aromatherapeutic oils. 3<sup>rd</sup> Ed. *Allen & Unwin*, Australia. 257p.

- Boz I., Burzo I., Zamfirache M.M., Toma C. and Padurariu C., 2009. Glandular trichomes and essential oil composition of *Thymus pannonicus* All. (*Lamiaceae*). *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*, pp.36-39.
- Braca A., Sortino C., Politi M., Morelli I. and Mendez J., 2002. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology*. 79: pp.379-381.
- Braga F.G., Bouzada M.L.M., Fabri R.L., Matos M.O., Moreira F.O., Scio E. and Coimbra E.S., 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 111 : pp. 396-402.
- Bruneton J., 1993. Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. *Tec. & Doc.* Lavoisier, 2<sup>ème</sup> édition, Paris. 915p.
- Bruneton J., 1999. Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. *Tec. & Doc.* Lavoisier 3<sup>ème</sup> édition, Paris.
- Buchbauer G., 2000. The detailed analysis of essential oils leads to the understanding of their properties. *Perfumer & Flavorist* 25: pp.64–67.
- Burits M., and Bucar F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother. Res.* 14 (5): pp. 323-328.
- Burits M., Asres K. and Bucar F., 2001. The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*. *Phytotherapy Res.* 15: pp. 103-108.
- Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, pp.223-253.
- Caillet S. et Lacroix M., 2007. Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (*RESALA*). pp. 1-8.
- Cakir A., Kordali S., Zengin H., Izumi S. and Hirata T., 2004. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour Frag. J.* 19 (1), pp.62-68.
- Caldefie-Chezet F., Guerry M., Chalcat J.C., Fusillier C., Vasson M.P. & Guilloteffet J., 2003. Anti-inflammatoire et bactéricide de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* sur les polynucléaires neutrophiles humains : étude *in vitro*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 142, pp. 113-142.
- Calvin A., 2001. Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinospora crispa* (Ménispermacée), *Merremia emarginata* (Convolvulacée) et *Oropea enneandra* (Annonacée), *Thèse de Doctorat*, Lausanne. 241p.

- Canillac N. and Mourey A., 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiol.* 18: pp. 261-268.
- Caplin J.L., Allan I. & Hanlon G.W., 2009. Enhancing the in vitro activity of *Thymus* essential oils against *Staphylococcus aureus* by blending oils from specific cultivars. *International Journal of Essential Oil Therapeutics* 3, pp. 35-39.
- Carette A.S., 2000. La lavande et son huile essentielle. *In* Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat*. Université de La Rochelle, 289p.
- Carmo E.S., Lima E.D.O. and De Souza E.L., 2008. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: pp.362-367.
- CE, 2001. Commission Européenne : proposition de la commission en matière de lutte contre la résistance microbienne. Bruxelles. *In* Kechkar M., 2008. Extraction de Silymarine et étude de son activité antimicrobienne. *Mémoire de magister*. Université Mentouri Constantine. Algérie, 99p.
- Celimene C.C., Micales J.A., Ferge L. and Young R.A., 1999. Efficacy of pinosylvins against white rot and brown rots fungi. *Holz.forschung*: 53, pp.491-497.
- Ceylan E., Fung D.Y.C. and Sabah J.R., 2004. Antimicrobial activity and synergistic effect of cinnamon with sodium benzoate or potassium sorbate in controlling *Esherichia coli* O157:H7 in apple juice. *J. Food Sci.* 69: pp.102-106.
- Chahardehi A.M., Ibrahim D., and Sulaiman S.F., 2010. Antioxidant, antimicrobial activity and toxicity test of pileamicrophylla. *International Journal of Microbiology*, Article ID 826830, 6p.
- Chairgulprasert V., Prasertsongskun S., Junpra-ob S. and Sangjun M., 2008. Chemical constituents of the essential oil, antioxidant and antibacterial activities from *Elettariopsis curtisii* Baker. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 30 (5): pp. 591-596.
- Chalchat J.C., Garry P.R., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. & Chopineau J., 1997, Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African Essential Oils. *Journal of essential oil research*, 9, pp. 67-75.
- Chami F., 2005. Evaluation *in vitro* de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires *in vivo* application dans la prophylaxie et le traitement de la *Candidose Vaginale* sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. *Thèse de doctorat*, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 266p.
- Chang C.W., Chang W.L., Chang S.T. & Cheng S.S., 2008a. Antibacterial activities of plant essential oils against *Legionella pneumophila*. *Water Research* 42 : pp.78-286.

- Chang H-T., Cheng Y-H., Wu C-L., Chang S-T., Chang T-T. and Su Y-C., 2008b. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresource Technology* 99: pp.6266-6270.
- Chang S.T., Wang S.Y., Wu C.L., Su Y.C. and Kuo Y.H., 1999. Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of Taiwania (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. *Holzforchung* 53: pp.487-490.
- Cheng S.S., Liu J-Y., Hsui Y-R. and Chang S-T., 2006. Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresource Technology* 97: pp. 306–312.
- Chiasson H., Bélanger A. and Bostanian N., 2001. Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. *J. Econ. Entomol.* 94: pp.167-171.
- Chowdhury J.U., Mobarok H. Bhuiyan N.I. and Nandi N.C., 2009. Constituents of essential oils from leaves and seeds of *Foeniculum vulgare* Mill. Cultivated in bangladesh. *Bangladesh J. Bot.* 38(2): pp.181-183.
- Chua M.T., Tung Y.T. and Chang S.T., 2008. Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. *Bioresource Technology* 99: pp. 1918-1925.
- Clarke S., 2008. Chemistry of essential oil. 1<sup>st</sup> edition *ELSEVIER*. British, 302p.
- Clevenger J.F., 1928. Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 17: pp.345-349.
- Conforti F., STATTI G., Uzunov D. and Menichini F., 2006. Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurus nobilis* L. leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) Coutinho Seeds. *Biol. Pharm. Bull.* 29 (10) pp. 2056-2064.
- Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. and Palmas F., 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29, pp.130-135.
- Cox S.D., Mann C.M. & Markham J.L., 2001. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology* 91: pp. 492-497.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R. & Wyllie S.G., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88: pp. 170-175.
- Cuendet M., Hostettmann K. and Potterat O., 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv. Chim. Acta.* 80: pp.1144-1152.

- Curtis O.F., Shetty K., Cassagnol G. & Peleg M., 1996. Comparison of synthetic and lethal effects of synthetic versions of plant metabolites (anethole, eugenol, carvacrol, thymol) on food spoilage yeast (*Debaromycesd hanenei*). *Food Biotechnology*, 10, pp.55-73.
- Dadalioglu I. and Evrendilek G.A., 2004. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.) and fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) on common foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.*, 52: pp.8255-8260.
- De Billerbeck V.G., Roques C., Vanière P. & Marquier P., 2002. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Revue hygiène*. Vol. X - N°3, pp. 248-254.
- De Billerberk V.G., Roques C.G., Bessiere J.M., Fonvieille J.L. and Dargent R., 2001. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.*, 47, pp. 9-17.
- De M., De A.K., Sen P. & Banerjee A. B., 2002. Antimicrobial properties of star anise (*Illicium verum* Hook f). *Phytotherapy Research*, 16, pp. 94-95.
- Degryse A.C., Delpla I. & Voinier M.A., 2008. Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement -IGS- EHESP*, 87p.
- Del-Vechio-Vieira G., Sousa O.V., Yamamoto C.H. and Maria Kaplan A.C., 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). *Rec. Nat. Prod.* 3:1 pp. 52-57.
- Derwich E., Benziane Z. & Boukir A., 2009. Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.*, 3 (4): pp.3818-3824.
- Derwich E., Benziane Z. & Boukir A., 2010. GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.*, 6 (3):pp. 191-198.
- Desmares C., Laurent A. & Delerme C., 2008. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. *AFSSAPS*. Anatole, France, 18p.
- Diallo A., 2005a. Étude de la phytochimie et des activités biologiques de *syzygium guineense* willd. (Myrtaceae). *Thèse de doctorat*, Université de Bamako, Mali, pp. 11, 55.
- Diallo A. M., 2005b. Étude des plantes médicinales de niafunke (région tombouctou), phytochimie et pharmacologie de *Maerua crassifolia* Forsk. (Capparidacée). *Thèse de doctorat*, Université de Bamako, Mali, pp. 22-32.

- Diallo D., 2000. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada africana* (Mimosaceae), *Trichilia emetica* (Meliaceae). *Thesis of doctorate*, Lausanne, 221p.
- Dongmo P.M.J., Tchoumboungang F., Ndongson B., Agwanande W., Sandjon B., Zollo P.H.A. & Menut C., 2010. Chemical characterization, antiradical, antioxidant and anti-inflammatory potential of the essential oils of *Canarium schweinfurthii* and *Aucoumea klaineana* (Burseraceae) growing in Cameroon. *Agric. Biol. J. N. Am.*, 1 (4): pp. 606-611.
- Dorman H.J.D. and Deans S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, pp. 308-316.
- Dramane S., Witabouna K.M. & Kagoyire K., 2010. Evaluation des activités Antimicrobiennes et anti-radicaux libres de quelques taxons bioactifs de Côte D'ivoire. *European Journal of Scientific Research*. Vol. 40 N° 2, pp. 307-317.
- Dung N.T., Kim J.M. and Kang S.C., 2008. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology* 46: pp.3632-3639.
- Džamić A.M., Soković M.D., Ristić M.S., Novaković M., Grujić-Jovanović S., Tešević V. and Marin P.D., 2010. Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia* (L.) Hudson (Lamiaceae) essential oil. *Botanica serbica vol.* 34 (1): pp. 57-61.
- Ebeed N.M., Abdou H.S., Booles H.F., Salah S.H., Ahmed E.S. and Fahmy K., 2010. Antimutagenic and chemoprevention potentialities of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) hot water crude extract. *Journal of American Science* 6 (9): pp.831-822.
- EFSA, 2009. EFSA Scientific cooperation (ESCO) working group on botanicals and botanical preparations; Advice on the EFSA guidance document for the safety assessment of botanicals and botanical preparations intended for use as food supplements, based on real case studies on request of EFSA. *EFSA Journal*, 7 (9) : 280 ; 104p.
- Ettayebi K., Yamani J.E. & Rossi-Hassani B.D., 2000. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 183 (1), pp.191-195.
- Eyob S., Martinsen B.K., Tsegaye A., Appelgren M. and Skrede G., 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of extract and essential oil of korarima (*Aframomum corrorima* (Braun) P.C.M. Jansen). *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (15), pp.2585-2592.

- Faria T.D.J., Ferreira R.S., Yassumoto L., De Souza J.R.P., Ishikawa N.K. and Barbosa A.D.M., 2006. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology* Vol.49, N° 6: pp. 867-871.
- Fayed S.A., 2009. Antioxidant and anticancer activities of *Citrus reticulata* (Petitgrain Mandarin) and *Pelargonium graveolens* (Geranium) essential Oils. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.*, 5 (5): pp.740-747.
- Fenaroli G., 1995. Fenaroli's Handbook of flavor ingredient, 3<sup>rd</sup> ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. 87p.
- Fiori A.C.G., Schwan-Estrada K.R.F., Stangarlin J.R., Vida J.B., Scapim C.A., Cruz M.E.S. and Pascholati S.F., 2000. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *J. Phytopathol.*, 148: pp.483-487.
- Foda M.I., El-Sayed M.A., Hassan A.A., Rasmy N.M. and El-Moghazy M.M., 2010. Effect of spearmint essential oil on chemical composition and sensory properties of white cheese. *Journal of American Science* ; 6 (5) : pp. 272-280.
- Fokialakis N., Cantrell C.L., Duke S.O., Skaltsounis A.L. and Wedge D.E., 2006. Antifungal activity of thiophenes from *Echinops ritro*. *J. Agric. Food Chem.*, 54, pp.1651-1655.
- Fontenelle R.O.S., Morais S.M., Brito E.H.S., Kerntopf M.R., Brilhante R.S.N., Cordeiro R.A., Tome A.R., Queiroz M.G.R., Nascimento N.R.F., Sidrim J.J.C. and Rocha M.F.G., 2007. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59, pp.934-940.
- Frankel E.N. & Meyer A.S., 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: pp.1925-1940.
- Frankel E.N., Huang S.W., Kanner J. & German J.B., 1994. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils versus emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42, pp.1054–1059.
- Freire R.S., Morais S.M., Catunda-Junior F.E.A., Pinheiro D.C.S.N., *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 4353-4358 (2005) *In* Conforti F., STATTI G., Uzunov D. and Menichini F., 2006. Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurus nobilis* L. Leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) Coutinho Seeds. *Biol. Pharm. Bull.* 29 (10) pp. 2056-2064.

- Friedman M., Henika P.R. and Mandrell R.E., 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, Vol. 65, No. 10, pp.1545-1560.
- Fu Y., Zu Y., Chen L., Efferth T., Liang H., Liu Z. and Liu W., 2007. Investigation of antibacterial activity of rosemary essential oil against *Propionibacterium acnes* with atomic force microscopy. *Planta medica* pp.1-20.
- Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I., 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*, 102: pp.898-904.
- Garnéro J., 1991. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. *Encyclopédie des médecines naturelles*, Paris, France, pp. 2-20.
- Garnéro J., 1996. Huiles essentielles. *Techniques de l'Ingénieur*, traité Constantes physico-chimiques ; K 345-1, 39p.
- Ghasemi P.A., Rahimi E. & Moosavi S.A., 2010. Antimicrobial activity of essential oils of three herbs against *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Acta agriculturae Slovenica*, 95-3, pp.219-223.
- Gill A.O., Delaquis P., Russo P. and Holley R.A., 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *Int. J. Food Microbiol.* 73, pp. 83-92.
- Goupy P., Dufour C., Loonis M. and Dangles O., 2003. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, pp. 615-622.
- Gramza A., Pawlak-Lemańska K., Korczak J., Sowicz E.W. and Rudzińska M., 2005. Tea extracts as free radical scavengers. *Polish Journal of Environmental Studies* Vol. 14, N° 6 pp. 861-867.
- Griffin S., 2000. Aspects of antimicrobial activity of terpenoids and the relationship to their molecular structure. *Doctorante thesis*, University of Western Sydney, Sydney, Australia.
- Gudzic B., Djokovic D., Vajs V., Palic R. and Stojanovic G., 2002. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum maculatum* Crantz. *Flavour Frag. J.* 17 (5), pp.392-394.
- Guiraut J. P., 2003. Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD, Paris. pp. 110-112.
- Gulfranz M., Mehmood S., Minhas N., Jabeen N., Kausar R., Jabeen K. and Arshad G., 2008. Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (24), pp.4364-4368.
- Hachette, 2004. Dictionnaire HACHETTE. Editions Françaises. ISBN.

- Hadizadeh I., Peivastegan B. and Hamzehzarghani H., 2009. Antifungal activity of essential oils from some medicinal plants of Iran against *Alternaria alternate*. *American Journal of Applied Sciences* 6 (5): pp. 857-861.
- Hammer K. A., Carson C. F., & Riley T. V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* Vol. 86, Issue 6: pp.985-990.
- Hammer K.A., Carson C.F. and Riley T.V., 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology* 95 : pp.853–860.
- Hazzit M., 2002. Arômes alimentaires. *Thèse magister, USTHB*, Alger. 96p.
- Hendawy S.F. and Ezz El-Din A.A., 2010. Growth and yield of *Foeniculum vulgare* var. *azoricum* as influenced by some vitamins and amino acids. *Ozean Journal of Applied Sciences* 3(1), pp.113-122.
- Hettiarachichi D.S., 2008. Volatile oil content determination in the Australian sandalwood industry: Towards a standardised method. *Sandalwood Research Newsletter*, Issue 23; pp.1-4.
- Himed, 2011. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Citrus limon* : application à la margarine. *Mémoire de Magister*. Université Mentouri Constantine, Algérie. 91p.
- Ho C.L., Wang E.I.C., and Su Y.C., 2009. Essential oil compositions and bioactivities of the various parts of *Cinnamomum camphora* Sieb. var. *linaloolifera* Fujuta. *林業研究季刊* 31 (2) : pp. 77-96.
- Ho C.L., Wang E.I.C., Wei X.T., Lu S.Y. and Su Y.C., 2008. Composition and bioactivities of the leaf essential oils of *Cinnamomum subavenium* Miq. from Taiwan. *J. Essent. Oil Res.* 20: pp. 328-34.
- Ho C.L., Wang E.I.C., Yu H.T., Yu H.M. and Su Y.C., 2010. Compositions and antioxidant activities of essential oils of different tissues from *Cryptomeria japonica* D. Don. *林業研究季刊* 32 (1) : pp.63-76.
- Hossain M.A., Ismail Z., Rahman A. and Kang S.C., 2008. Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oils and crude extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Industrial Crops And Products* 2, 7 : pp. 328–334.
- Huang *et al.*, 1987. Perfumer and flavorist, Vol. 13, N° 2, 67p. *In* Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat*. Université de La Rochelle, 41p.

- Hubert J., 2006. Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja – Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines. *Thèse de doctorat*. № 2435. Institut National Polytechnique de Toulouse, 64p.
- Hussain A.I., 2009. Characterization and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae. *Doctorale thesis*, Pakistan ; 257p.
- Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S. and Nigam P.S., 2010. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: pp.1070-1078.
- Hussain A.I., Anwar F., T.H.S. Sherazi and Przybylski R., 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*. 108: pp.986-995.
- Imelouane B., Tahri M., Ankit M., khdid K., Amhamdi H. Dubois J. & Elbachiri A., 2010. The essential oil of eastern moroccan *Rosmarinus Officinalis*: chemical composition, *in vitro* antimicrobial and antioxydant activities. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* Vol 4, N°2, pp. 120-141.
- Imelouane B., Amhamdi H., Wathelet J.P., Ankit M., Khedid K. and El Bachiri A., 2009. Chemical composition of the essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *Int. J. Agric. Biol.*, 11: pp. 205-208.
- Inouye S., Tsuruoka T., Watanabe M., Takeo K., Akao M., Nishiyama Y. and Yamaguchi H., 2000. *Mycoses*, 43, pp.17–26. *In* Ahmad I., Aqil F. and Owais M. Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.
- Inouye, S., Tsuruoka, T., Uchida, K., Yamaguchi, H., 2001. *Microbiol. Immunol.*, 43, pp.201–208. *In* Ahmad I., Aqil F. and Owais M. Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.
- Iqbal S., Bhangar M.I. and Anwar F., 2005. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry*. 93: pp. 265-272.
- Ismail A., Marjan Z.M. and Foong C.W., 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*. 87 ; pp.581–586.
- ISO, 1997. Norme ISO 9235 : Matières premières d'origine naturelle - Vocabulaire, 2p.
- Jacob M., Pellecuer J. & Tomei R., 1979. Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* 11: pp. 26-30.
- Jantan I.B., Moharam B.A.K., Santhanam J. and Jamal J.A., 2008. Correlation between chemical composition and antifungal activity of the essential oils of eight *Cinnamomum* species. *Pharmaceutical Biology* ; Vol. 46, №6, pp.406–412.

- Jeantet R., Croguennec T., Schuck P. et Brule G., 2006. Science des aliments, stabilisation biologique et physico-chimique, volume 1. Ed. *Tec. & Doc.*, Lavoisier, pp. 95–151.
- Kamatou G.P.P., Viljoen A.M. and Steenkamp P., 2009. Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chemistry*, pp. 1-5.
- Karatzas A.K., Kets E.P.W., Smid E.J. and Bennik M.H.J., 2001. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology* 90, pp. 463–469.
- Kaufmann B. and Christen P., 2002. Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem. Anal.* 13, pp.105-113.
- Kaur G.J. and Arora D.S., 2010. Bioactive potential of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi* belonging to the family Umbelliferae - Current status. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(2), pp. 087-094.
- Kechkar M., 2008. Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne. *Mémoire de magister*. Université Mentouri Constantine, Algérie. 99p.
- Kirby A.J. and Schmidt R.J., 1997. The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs. *J. Ethnopharmacol.* 56: pp.103-108.
- Klaric M.S., Kosalec I., Mastelic J., Pieckova E. & Pepeljnak S., 2006. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology*, 44 (1): pp. 36-42.
- Koleva I.I., Van Beek T.A., Linssen J.P.H., De Groot A. and Evstatieva L.N., 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, 13, pp. 8-17.
- Kothe H.W., 2008. 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre editions. Toulouse, 328p.
- Koul O., Walia S. and Dhaliwal G.S. 2008. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopestic. Int.* 4(1): pp.63–84.
- Koutsoumanis K., Lambropoulou K. and Nychas G.J.E., 1999. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. *Int. J. Food Microbiol.* 49, pp. 63-74.
- Kulevanova S. and Panovska T.K., 2001. Antioxidant activity of essential oils of different wild *Thymus* . Species. *Bull. Chem. Technol. Macedonia*, 20, 1, pp.61-66.
- Kulisic T., Radonic A., katalinic V. and Milos M., 2004. Use of different methods for the testing activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. 85: pp.633-640.

- Lagunez Rivera L., 2006. Étude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. *Thèse de doctorat*. N° 2360. Institut National Polytechnique de Toulouse, 64p.
- Lahlou M., 2004. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18 : pp. 435-448.
- Lamarti A., Badoc A. & Carde J.P., 1993. Etude chromatographique de l'huile essentielle de la plantule de fenouil amer (*Foeniculum vulgare* Mill.) ; caractéristiques spectrales (UV, IR, SM) de ses constituants. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 132, pp. 73-89.
- Lazouni H.A., Benmansour A., Taleb-Bendiab S.A. & Chabane Sari D., 2007. Composition des constituants des huiles essentielles et valeurs nutritives du *Foeniculum vulgare* Mill. *Sciences & Technologie C – N°25*, pp.7-12.
- Lesley B., 1996. Plantes médicinales et aromatiques, Ed. Lavoisier. Paris. pp. 58-61.
- Liyana-Pathirana C.M. and Shahidi F., 2006. Antioxydant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: pp. 477-485.
- Lo Cantore P., Iacobellis N.S., De Marco A., Capasso F. and Senatore F., 2004. Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller var. *vulgare* (Miller) essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 52: pp.7862-7866.
- Loganathan J.K., Gunasundari D., Hemalatha M., Shenbhagaraman R. and Kaviyarasan V., 2010. Antioxidant and phytochemical potential of wild edible mushroom *Termitomyces reticulatus*: individual cap and stipe collected from south eastern part of india. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* Vol. 1, Issue 7; pp. 62-73.
- Lu F. & Foo L. Y., 1995. Phenolic antioxidant component of evening primrose. *In* Ong A.S.H., Niki E. & Packer L. (Eds.), Nutrition, lipids, health and disease. Champaign: *American Oil Chemists Society Press*.
- Lucchesi M. E., 2005. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. *Thèse de doctorat*. Université de La Réunion, 72p.
- Lucchesi M.E., Chemat F. and Smadja J., 2004. Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs. Comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A* 1043, pp. 323-327.
- Maffei & Sacco, 1987. Perfumer and flavorist. Vol. 13, N° 5, 61p. *In* Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat*. Université de La Rochelle, 289p.

- Malecky M., 2007. Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. *Thèse de doctorat*, INRA, UMR 791 Physiologie de la Nutrition et Alimentation, F-75231 Paris, pp. 30-35.
- Manohar V., Ingram C., Gray J., Talpur N.A., Echard B.W., Bagchi D. and Preuss H.G., 2001. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 228: pp.111–117.
- Manou I., Bouillard L., Devleeschouwer M.J. and Barel A.O., 1998. Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *J. Appl. Microbiol.* 84, pp. 368-376.
- Mares D., Tosi B., Poli F., Andreotti E. and Romagnoli C., 2004. Antifungal activity of *Tagetes patula* on some phytopathogenic fungi ultrastructural evidence on *Phytophthora ultimum*. *Microbiol. Res.*, 859, pp. 295-304.
- Marriott P.J., Shellie R. and Cornwell C., 2001. Review : Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 936; pp. 1-22.
- Marzoukia H., Elaissib A., Khaldic A., Bouzidd S., Falconerie D., Marongiu B., Pirasa A. and Porcedda S., 2009. Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia. *The Open Natural Products Journal*, Vol. 2; pp. 86-91.
- Mayachiew P. & Devahastin S., 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology* 41; pp. 1153-1159.
- Meazza G., Dayan F.E. and Wedge D.E., 2003. Activity of quinines against *Colletotrichum* species. *J. Agric. Food Chem.*, 51, pp.3824-3828.
- Mejlholm O. & Dalgaard P., 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology* 34: pp. 27-31.
- Mesa-Arango A.C., Montiel-Ramos J., Zapata B., Durán C., Betancur-Galvis L. and Stashenko E., 2009. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104 (6): pp.878-884.
- Meziti A., 2009. Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L. Étude *in vitro* et *in vivo*. *Mémoire de magister*. Université El-Haj Lakhdar Batna, Algérie, 105p.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R. and van Beek T.A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 85: pp. 231-237.
- Mimica-Dukic N., Kujundzic S., Sokovic M. and Couladis M., 2003. Essential oil composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. *Phytother. Res.* 17 (4), pp. 368-371.

- Mironescu M. and Georgescu C., 2008. Preliminary researches on the effect of essential oils on moulds isolated from surfaces. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 14 ; pp. 30-33.
- Mohamed M.AH. & Abdu M. 2004. Growth and oil production of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.): effect of irrigation and organic fertilization. *Biol. A. & Hort.*, 22, pp. 31-39.
- Mohamed N.A.B., 2005. Study on important parameters affecting the Hydro-distillation for ginger oil production. *Master Thesis*, Universiti Teknologi Malaysia, 172p.
- Mohammad S., Abu-Darwish and Abu-Dieyeh Z.H.M., 2009. Essential oil content and heavy metals composition of *Thymus vulgaris* cultivated in various climatic regions of Jordan. *Int. J. Agric. Biol.*, Vol. 11, N° 1, pp.59-63.
- Mohammedi Z. & Fouzia A. 2007. Pouvoir fongistatique de l'huile essentielle d'une plante aromatique sur la croissance des champignons. Université Abou Bakr Belkaïd –Tlemcen, Algérie. 3p.
- Mohammedi Z., Bachik S. & Belkaroube N., 2010. Potentiel antifongique et antiaflatoxinogène des huiles essentielles d'une plante endémique *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. *Les Technologies De Laboratoire*.Vol. 5, N°19, pp.10-15.
- Mohammedi Z., 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. *Thèse magistère*, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 155p.
- Moll M., 1998. Additifs alimentaires et auxiliaires technologique. Ed. DUNOD. Paris. pp. 89-99.
- Molyneux P., 2004. Use of DPPH to estimate antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* Vol. 26 N° 2. 212p.
- Montes-Belmont R. and Convajal M., 1998. Control of *Aspergillus flavus* in Maize with plant essential oils and their components. *J. Food Prot.* 61 (5), pp. 616-619.
- Moon J-K. and Shibamoto T., 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J. Agric. Food Chem.*, 57 (5), pp.1655-1666.
- Moreira M. R., Ponce A. G., Del Valle C. E. & Roura S. I., 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT.* 38: pp. 565-570.
- Moura L.S., Carvalho Junior R.N., Quispe-Condori S., Rosa P.T.V., Ming L.C. and Meireles M.A.A., 2003. Determination of the global yields for the system fennel (*Foeniculum vulgare*) + CO<sub>2</sub>. University of the State of São Paulo, *Botucatu, São Paulo, Brazil*, 6p.
- Muckenstrum B., Foechterlen D., Reduron J.P., Danton P. and Hildenbrand M., 1997. Phytochemical and chemotaxonomic studies of *Foeniculum vulgare*, *Biochem. Syst. Ecol.* 25: pp. 353-358.

- Murdock D.H., 2002. The Encyclopedia of Foods: A Guide to Healthy Nutrition. *Elsevier's Science & Technology*. Oxford, UK ; 529p.
- Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C. and Tenover F.C., 1995. Manual of clinical microbiology. Vol . 6, ASM, Washington.
- Nagendra P.M.N., Shankara B.S. and Sreenivasa M.Y., 2010. Antifungal activity of essential oils against *Phomopsis azadirachtae*- the causative agent of die-back disease of neem. *Journal of Agricultural Technology*, Vol.6 (1): pp.127-133
- Nakahara K., Alzoreky N.S., Yoshihashi T., Nguyen H.T.T. and Trakoontivakorn G., 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). *JARQ* 37 (4), pp. 249-252.
- Nakamura C.V., Ueda-Nakamura T., Bando E., Melo A.F.N., Cortez D.A.G. and Filho B.P.D., 1999. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 94(5): pp.675-678.
- Nessrien M.N.Y. and Mohamed A.T., 2007. Antioxidant and antimicrobial effects of marjoram and thyme in coated refrigerated semi fried mullet fish fillets. *World J. Dairy & Food Sci.*, 2 (1): pp. 01-09.
- Niculae M., Huerta B., Köbölkuti L., Bolfa P. and Spinu M., 2007. Screening of herbal essential oils' and alcoholic Extractions' activities on Oedema disease Associated *E. Coli* strains. *Lucrări stiințifice medicină veterinară vol. XL*, pp.165-170.
- Nielsen P.V. & Rios R., 2000. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Int. J. Food. Microbiol.* 60: pp. 219-229.
- Nikhat F., Satynarayana D. and Subhramanyam E.V.S., 2009. Isolation, characterization and screening of antioxidant activity of the roots of *Syzygiumcumini* (L) Skeel. *Asian J. Research Chem.* 2(2): pp. 218-221.
- Nychas G.J. E., 1998. Natural antimicrobials from plants. *New York: Chapman & Hall*. *In* Singh G., Maurya S., de Lampasona M.P. and Catalan C., 2006. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control*, Vol. 17, pp.745–752.
- Oktay M., Gulcin I. and Kufrevioglu O.I., 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 36 pp. 263–271.
- Olivero-Verbel J., González-Cervera T., Güette-Fernandez J. Jaramillo-Colorado B. and Stashenko E., 2010. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20(4): pp.568-574.

- Olle M. and Bender I., 2010. The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research* 8 (3), pp.687-696.
- Ouamba J.M., 1991. Valorisation chimique des plantes aromatiques du Congo. Extraction et analyse des huiles essentielles Oximation des aldéhydes naturels. *Mémoire de magister*. Université Montpellier II, 342p.
- Ouattara B., Simard R.E., Holley R.A., Piette G.J.P. and Begin A., 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol*, 37, pp.155-162.
- Oussou K.R., Yolou S., Boti J.B., Guessennnd K.N., Kanko C., Ahibo C. & Casanovad J., 2008. Etude chimique et activite antidiarrheique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopee ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*. Vol.24, №1, pp. 94-103.
- Ownagh A., Hasani A., Mardani K. and Ebrahimzadeh S., 2010. Antifungal effects of thyme, agastache and satureja essential oils on *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani*. *Veterinary Research Forum*. 2; pp. 99-105.
- Oyaizu M., 1986. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 35: pp.771-775.
- Özcan M. and Akgül A., 2001. Chemical composition of the essential oil of bitter fennel (*Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum*). *J. Spices Arom. Crops* 10: pp. 49-50.
- Özcan M., Chalchat J.C., Arslan D., Ates A. and Ünver A., 2006. Comparative essential oil composition and antifungal effect of bitter fennel (*Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum*) fruit oils obtained during different vegetation. *J. Med. Food* 9 (4): pp.552-561.
- Özcan M.M. & Chalchat J.-C., 2004. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in turkey. *Bulg. J. Plant Physiol.*, 30 (3-4), pp.68-73
- Özek T., Tabanca N., Demirci F., Wedge D.E. and Baser K.H.C., 2010. Enantiomeric distribution of some linalool containing essential oils and their biological activities. *Rec. Nat. Prod.* 4:4; pp.180-192.
- Ozkan G., Sagdic O. and Ozcan M., 2003. Inhibition of pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations. *Food Sci. Techn. Int.*, 9 : pp.85–58.
- Pamphile M., Randrianasolonjanahary H. & Razafindrajaona J.M., 2009. Etude des substances Actives de *Cinnamosma fragrans*. *Actes du symposium biomad*. Universite de mahajang. 22p.
- Pandit, V.A. and L.A. Shelef. 1994. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Microbiol.* 11: pp.57-63.

- Paramapojn S. and Gritsanapan W., 2009. Free radical scavenging activity determination and quantitative analysis of curcuminoids in *Curcuma zedoaria* rhizome extracts by HPLC method. *Current science*, vol. 97, N° 7, 10 : pp. 1069-1073.
- Pascal G., 1979. Les antioxygènes alimentaires. *Cahier de Nutrition et de Diététique*, N°14, pp.271-290.
- Patrone V., Campana R., Vittoria E. and Baffone W., 2010. *In Vitro* synergistic activities of essential oils and surfactants in combination with cosmetic preservatives against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* 60: pp. 237-241.
- Pattnaik S., Subramanyan V.R., Bapaji M. and Kole C.R., 1997. Antibacterial and antifungal activities of aromatic constituents of essential oils. *Microbios* 89: pp.39-46.
- Pavel M., Ristić M. and Stević T., 2009. Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity. *J. Serb. Chem. Soc.* 75 (1) pp. 27-34.
- Pekkarinen S.S., Stockmann H., Schwarz K., Heinonen M. and Hopia A.I., 1999. Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, pp. 3036–3043.
- Perfumer & Flavorist, 2009. A preliminary report on the world production of some selected essential oils and countries, Vol. 34. *In* Baser K.H.C. and Buchbauer G., 2010. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Ed. *Taylor and Francis Group, LLC*. United States of America. 994p.
- Periago P.M., Palop A. & Fernandez P.S., 2001. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. *Food Science Technology International*, Vol. 7 (6), pp. 487-492.
- Petkov V., Roussinov K., Todorov S., Lazarova M., Yonkov D. and Draganova S., 1984. Pharmacological investigations on *Rhaponticum carthamoides*. *Planta Med.*, 50: pp. 205-209.
- Phattayakorn K. and Wanchaitanawong P., 2009. Antimicrobial activity of thai herb extracts against coconut milk spoilage microorganisms. *Kasetsart J. Nat. Sci.* 43 : pp.752-759.
- Pibiri M.C., 2006. Assainissement de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. *Thèse de doctorat*. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, pp. 28-52.
- Pingot A., 1998. Les huiles essentielles. Ed. *Tec. & Doc.* Paris, pp. 230-236.
- Pinto E., Pina-Vaz C., Salgueiro L., Gonçalves M.J., Costa-de-Oliveira S., Cavaleiro C., Palmeira A., Rodrigues A. and Martinez-de-Oliveira J., 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 55, pp. 1367–1373.

- Piochon M., 2008. Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore aurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. *Thèse de doctorat*. Université du Québec, pp. 5-9.
- Pitasawat B., Champakaew D., Choochote W., Jitpakdi A., Chaithong U., Kanjanapothi D., attanachanpichai E., Tippawangkosol P., Riyong D., Tuetun B. & Chaiyasit D., 2007. Aromatic plant-derived essential oil: an alternative larvicide for mosquito control. *Fitoterapia*. 78(3), pp.205-210.
- Piyo A., Udomsilp J., Khang-Khun P. and Thobunluepop P., 2009. Antifungal activity of essential oils from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and sweet fennel (*Ocimum gratissimum* Linn.): Alternative strategies to control pathogenic fungi in organic rice. *As. J. Food Ag-Ind. Special Issue*, S2-S9.
- 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. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*36, pp.679-684.
- Portes E., 2008. Synthèse et Etudes de tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés photochimiques et antioxydantes, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. *Thèse de doctorat*. № 3695. Université Bordeaux I, 244p.
- Pradhan M., Sribhuwaneswari S., Karthikeyan D., Minz S., Sure P., Chandu A.N., Mishra U., Kamalakannan K., Saravanankumar A. and Sivakumar T., 2008. *In-vitro* Cytoprotection activity of *Foeniculum vulgare* and *Helicteres isora* in cultured human blood Lymphocytes and antitumour activity against B16F10 melanoma cell line. *Research J. Pharm. and Tech.* 1(4): pp.450-454.
- Prakash A., 2001. Antioxidant activity. *Medallion Laboratories analytical progress*. Vol. 19, № 2. 2p.
- Prasad R. and Kapoor K., 2004. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int. Rev. Cytol.* 242: pp.215-248.
- Pratt D.E., 1980. Natural antioxidants of soybean and other oil-seeds. *In* M. G. Simic, & M. Karel (Eds.), *Autoxidation in food and biological systems*. *Plenum Press*. New York: pp.283–292.
- Qian H. and Nihorimbere V., 2004. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *J. Zhejiang Univ. SCI* 5(6): pp.676-683.
- Rashid ch A., Qureshi M.Z., Raza S.A., William J. and Arshad M., 2010. Quantitative determination of antioxidant potential of *Artemisia persica*. *Analele Universităţii din Bucureşti – Chimie (serie nouă)*, vol. 19 №1, pp. 23-30.
- Rasooli I. and Abyaneh M.R., 2004. Inhibitory effect of Thyme oils on growth and afltoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 15, pp. 479-483.

- Rasooli I. and Owlia P., 2005. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*, 66: pp.2851-2856.
- Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D., Gachkar L., Allameh A. and Rezaei M.B., 2008. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *Food Chemistry* ; pp.135-140.
- Raza S. A., Rehman A., Adnan A. & Qureshi F., 2009. Comparison of antioxidant activity of essential oil of *Centella asiatica* and Butylated hydroxyanisole in sunflower oil at ambient conditions. *Biharean Biol.* 3, Vol. 3, N°1, pp.71-75.
- Razakarivony A.A., Andriamihaja B. & Razanamahefa B., 2009. Etude chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Callistemon rigidium*. *Actes du symposium biomad*. Université d'Antananarivo. 28p.
- Remmal A., Tantaoui-Elaraki A., Bouchikhi T. & Ettayebi M., 1993a. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar Medium. *J. Essent. Oil. Res.* 5: pp.1179-1184.
- Renata P.S., Edson P.N., Ronaldo F.N., Gilvandete M.P.S., Gustavo H.M.A., Edilberto S.R. & Otilia D.L., 2006. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 17, № 5, pp. 1027-1030.
- Rhayour K., 2002. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. *Thèse de doctorat*. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 170p.
- Roche, M., Dufour C., Mora, N. and Dangles O., 2005. Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Organic Biomolecular Chemistry*, 3, pp. 423-430.
- Rolland Y., 2004. Actualités des lipides en cosmétique : Antioxydants naturels végétaux. OCL. Vol. 11, n°6, 419-424. *In* Traoré M. C., 2006. Étude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. Thèse de doctorat. Université de Bamako, Mali, pp. 175p.
- Rozier J., Carlier V. et Bolnot F., 1986. Bases microbiologiques de l'hygiène des aliments. Éd. SAPALC. Paris. pp. 130-143.
- Rožman T. and Jeršek B., 2009. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, Vol. 93 ; N° 1, pp.51-58.

- Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M. and Bruni R., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91: pp. 621-632.
- Salazar-Aranda R., Perez-Lopez L.A., Lopez-Arroyo J., Alanis-Garza B.A. and De Torres N.W., 2009. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. *ECAM* ; pp.1-6.
- Sánchez-Moreno C., Larrauri J.A. and Saura-Calixto F., 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*; 76: pp.270-276.
- Sani M.P., 2006. Les polyphénols en agro-alimentaire. Paris : Lavoisier. pp. 347-289.
- Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Fougrach H., Bourkhiss B., Bousta D. & Talbi M., 2007. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146, pp. 85-96.
- Schlesier K., Harwat M., Böhm V. & Bitsch R. A., 2002. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radical Research*, 36, pp. 177-187.
- Seguin E., 2001. Le préparateur en pharmacie « Botanique - Pharmacognosie - Phytothérapie - Homéopathie ». Ed. O.P.U, Alger. 208 p.
- Sharma N. and Tripath A, 2007. Effects of *Citrus* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiol. Res. In press*.
- Sherwin E.R., 1976. Antioxidants for vegetable oils. *Journal of American Oil Chemical Society*, 53, pp.430-436.
- Shin J.M. and Baek S.H., 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Pterostoechas lavandula* and *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Cosmetics and Public Health* 3(1): pp. 1-4.
- Shunying Z., Yang Y., Huaidong Y., Yue Y. and Guolin Z., 2005. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *J. Ethnopharmacol.* 96, pp.151–158.
- Sidhu O.P., Chandra H. and Behl H.M., 2009. Occurrence of aflatoxins in mahua (*Madhuca indica* Gmel.) seeds: synergistic effect of plant extracts on inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Food Chem Toxicol* 47: pp.774–777.
- Silano V. and Delbò M., 2008. Assessment report on *Foeniculum vulgare* Miller. *EMEA*, European Medicines Agency. London ; 23p.
- Silou T., 2003. Variations individuelle et saisonnière de la teneur et de la composition des huiles essentielles d'*E. citriodora* acclimaté à Pointe-Noire (Congo-Brazzaville). Université Marien Ngouabi. Faculté des sciences, pp. 1-6.

- Simionatto E., Bonani V.F.L., Morel A.F., Poppi N.R., Júnior J.L.R., Stuker C.Z., Peruzzo G.M., Peres M.T. and Hess S.C., 2007. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) Stem Bark. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 18, №5, pp. 879-885.
- Singh G., Kapoor I.P., Pandey S.K., Singh U.K. and Singh R.K. 2002. Antibacterial activity of volatile oils of some spices. *Phytother. Res.* 16 (7); pp.680-682.
- Singh G., Maurya S., de Lampasona M.P. and Catalan C., 2006. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control*, Vol. 17, pp.745–752.
- Siripornvisal S., Rungprom W. and Sawatdikarn S., 2009. Antifungal activity of essential oils derived from some medicinal plants against grey mould (botrytis cinerea). *As. J. Food Ag-Ind.*, pp.229-233.
- Smith-Palmer A., Stewart J. and Fyfe L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: pp.118-122.
- Southwell I.A., Hayes A.J., Markham J. and Leach D.N. 1993. *Acta Horticult.*, 344, 256–265. *In* Ahmad I., Aqil F. and Owais M., 2006. Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.
- Souza E.L., Barros C.J., Conceição M.L., Neto N.J.G. and Costa A.C.V., 2009. Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. *Brazilian Journal of Microbiology* ; 40: pp.387-393.
- Souza E.L., Stamford T.L.M. and Lima E.O., 2006a. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: pp.527-532.
- Souza E.L., Guerr N.B., Stamford T.L.M. and Lima E.O., 2006b. Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. *Rev. Bras. Farm.*, 87 (1), pp. 22-25.
- Soylu E.M., Yigitba H., Tok F.M., Soyly S., Kurt S., Baysal Ö. and Kaya A.D., 2005. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Artemisia annua* L. against foliar and soil-borne fungal pathogens. *Journal of Plant Diseases and Protection* 112 (3), pp.229–239.
- Stefanini M.B., Ming L.C., Marques M.O.M., Facanali R., Meireles M.A.A., Moura L.S., Marchese J.A. and Sousa L.A., 2006b. Essential oil constituents of different organs of fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*). *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, Vol.8, pp.193-198.

- Stefanini M.B., Ming L.C., Marques M.O.M., Meireles M.A.A., Moura L.S. and Marchese, J. A., 2006a. Seed productivity, yield and composition of the essential oil of fennel *Foeniculum vulgare* var. *dulcis* in the season of the year. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, Vol.8, pp.86-90.
- Su Y.C., Ho C.L., Wang I.C. & Chang S.T., 2006. Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of four eucalypts. *Taiwan J. For Sci.* 21 (1): pp.49-61.
- Su Y.C., Lu S.Y., Ho C.L., Wang E.I-C. and Wei X.T., 2008. Composition and bioactivities of the leaf essential oils of *Cinnamomum subavenium* Miq. from Taiwan. *Journal of Essential Oil Research* Vol. 20; pp. 328-335.
- Svoboda K.P. and Hampson J.B., 1999. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department, Scotland, U.K.*, 17p.
- Tabanca N., Bernier U.R., Tsikolia M., Becnel J.J., Sampson B., Werle C., Demirci B., Başer K.H.C., Blythe E.K., Pounders C. and Wedge D.E., 2010. *Eupatorium capillifolium* essential oil: chemical composition, antifungal activity, and insecticidal activity. *Natural Product Communications*. Vol. 5 №9; pp.1409-1415.
- Tabanca N., Demirci B., Crockett S.L., Baser K.H.C., and Wedge D.E., 2007. Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 55, pp. 8430-8435.
- Tabanca N., Wedge D.E., Wang X., Demirci B., Baser K.H.C., Zhou L. and Cutler S.J., 2008. Chemical composition and antifungal activity of *Angelica sinensis* essential oil against three *Colletotrichum* species. *Natural Product Communications*, 3, pp. 1073-1078.
- Tabanca N.; Bedir E., Ferraira D., Slade D., Wedge D. E., Jacob M. R., Khan S. I., Kirimer N., Baser K.H.C. and Khan I.A., 2005. Bioactive constituents from Turkish *Pimpinella* species. *Chem. Biodiv.*, 2, pp.221–232.
- Tanira M.M., Shah A.H., Mohsin A., Ageel A.M. and Qureshi S., 1996. Pharmacological and toxicological investigations on *Foeniculum vulgare* dried fruit extract in experimental animals. *Phytotherapy Research*, Vol. 10, pp.33-36.
- Tantaoui-Elaraki A., Ferhout H & Errifi A., 1993. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus Broussonettii*, *T. zygis* and *T. satureioides*. *J. Essent. Oil. Res.*, 5 : pp. 45-53.
- Tassou C., Drosinos E.H. and Nychas G.J.E., 1996. Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish fillets in olive oil, oregano and lemon juice under modified atmosphere or air. *J. Food Prot.* 59: pp.31-34.

- Tatsadjieu N.L., Etoa F.X., Mbofung C.M.F. & Ngassoum M.B., 2008. Effect of *Plectranthus glandulosus* and *Ocimum gratissimum* Essential Oils on Growth of *Aspergillus flavus* and Aflatoxin B1 Production. *TROPICULTURA*, 26, 2, pp.78-83.
- Tepsorn R., 2009. Antimicrobial activity of thai traditional medicinal plants extract incorporated alginate-tapioca starch based edible films against food related bacteria including foodborne pathogens. *Doctorate Theses*. Thailand, 370p.
- Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O'Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P. and Cullen P. J., 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food Chem.* 57, pp.5987–6000.
- Traoré M. C., 2006. Étude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. *Thèse de doctorat*. Université de Bamako, Mali, pp. 175p.
- Udomsilp J., Piyo A., Khang-Khun P. and Thobunluepop P., 2009. Antifungal properties of essential oils from Thai medical plants against rice pathogenic fungi. *As. J. Food Ag-Ind. Special Issue*, pp. 24-30.
- Ultee A., Gorris L.G.M. and Smid E.J., 1998. Bactericidal activity of carvacrol towards the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* 85, pp. 2111–2218.
- Upadhyay R.K., Dwivedi P. and Ahmad S., 2010. Screening of antibacterial activity of six plant essential oils against pathogenic bacterial strains. *Asian Journal of Medical Sciences* 2 (3) : pp.152-158.
- Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L. & Oomah B.D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46: pp. 4113-4117.
- Vienna C.F., Bauer R., Carle R., Tedesco D., Tubaro A. and Zitterl-Eglseer K., 2005. Assessment of plants/herbs, plant/herb extracts and their naturally or synthetically produced components as “additives” for use in animal production. *FEEDAP* ; 297p.
- Vrinda Menon K. and Garg S.R., 2001. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *Food Microbiol.* 18: pp.647-650.
- Wan J., Wilcock A. and Coventry M.J., 1998. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.* 84: pp. 152-158.
- Wanchaitanawong P., Chaungwanit P., Poovarodom N. and Nitisinprasert S., 2005. *In vitro* Antifungal activity of thai herb and spice extracts against food spoilage fungi. *Kasetsart J. Nat. Sci.* 39: pp. 400-405.

- Wang H.F., Yih K.H. and Huang K.F., 2010. Comparative study of the antioxidant activity of forty-five commonly used essential oils and their potential active components. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 18, №1, pp. 24-33.
- Wangcharoen W. and Morasuk W., 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of holy basil. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 29 (5): pp.1407-1415
- Weinreich & Nitz, 1996. Perfumer and flavorist. Vol. 25 №4, 55p. *In* Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle, 289p.
- Wendakoon C. N. & Sakaguchi M., 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection* 58: pp. 280-283.
- Wiley J., 2005. Essential microbiology. *Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England*, 481p.
- Wilkinson J.M., 2006. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapter VIII. pp.157-165. *In* Ahmad I., Aqil F. and Owais M. Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.
- Yang E.-J., Kim S.-S., Oh T.-H., Baik J.S., Lee N.H. and Hyun C.-G., 2009. Essential oil of citrus fruit waste attenuates LPS-induced nitric oxide production and inhibits the growth of skin pathogens *Int. J. Agric. Biol.*, 11: pp. 791–794.
- Yassa N., Masoomi F., Rohani Rankouhi S.E. and Hadjiakhoondi A., 2009. Chemical composition and antioxidant activity of the extract and essential oil of *Rosa damascena* from Iran, population of Guilan. *DARU* Vol. 17, N° 3 pp. 175-181.
- Yen T-B., and Chang S-T., 2008. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource Technology* 99: pp. 232-236.
- Zahid N.Y., Abbasi N.A., Hafiz I.A. and Ahmad Z., 2009. Genetic diversity of indigenous fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) Germplasm in pakistan assessed by RAPD markers. *Pak. J. Bot.*, 41(4): pp.1759-1767.
- Zambonelli A., Zechini A., Binchi A. and Albasin A., 1996. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. *J. Phytopathol.*, 144: pp.491-494.
- Zarrin M., Amirrajab N. and Nejad B.S., 2010. *In vitro* antifungal activity of satureja khuzestanica jamzad against *Cryptococcus neoformans*. *Pak. J. Med. Sci.*; 26 (4): pp.880-882.

# *Annexes*

---

**Annexe 1.** Glossaire (Hachette, 2004)

**Analgésique :** démunie ou supprime la douleur.

**Antipyrétique :** Médicament utilisé dans le traitement symptomatique de la fièvre.

**Antispasmodique :** qui combat les spasmes, les spasmes les plus fréquents sont ceux qui siègent dans les organes creux et les sphincters : tube digestif, voies urinaires et appareil respiratoire.

**Aromathérapie :** Thérapeutique par ingestion, massage du corps ou inhalation d'huiles essentielles végétales ou d'essences aromatiques.

**Carminatif :** Se dit de substances qui stimulent les sécrétions salivaires et gastriques et la motilité de l'intestin.

**Diurétique :** Se dit d'une substance qui augmente la diurèse et qui peut éventuellement être utilisée contre l'hypertension artérielle ou contre les œdèmes et l'insuffisance cardiaque.

**Enfleurage :** Extraction des parfums des fleurs par contact avec un corps gras

**Racémisations :** Réaction chimique transformant un énantiomère en mélange racémique correspondant.

**Réarrangements :** Réaction au cours de laquelle un ou plusieurs atomes d'un substrat se retrouvent disposés différemment dans le produit, provoquant une isomérisation du substrat ou une transformation anormale.

**Sédatif :** Se dit d'une substance qui agit contre la douleur, l'anxiété, l'insomnie ou qui modère l'activité d'un organe.

**Stomachique :** Se dit d'un médicament qui favorise le fonctionnement normal de l'estomac.

**Tératogéniques :** Anomalies congénitales dues aux médicaments et aux drogues.

---

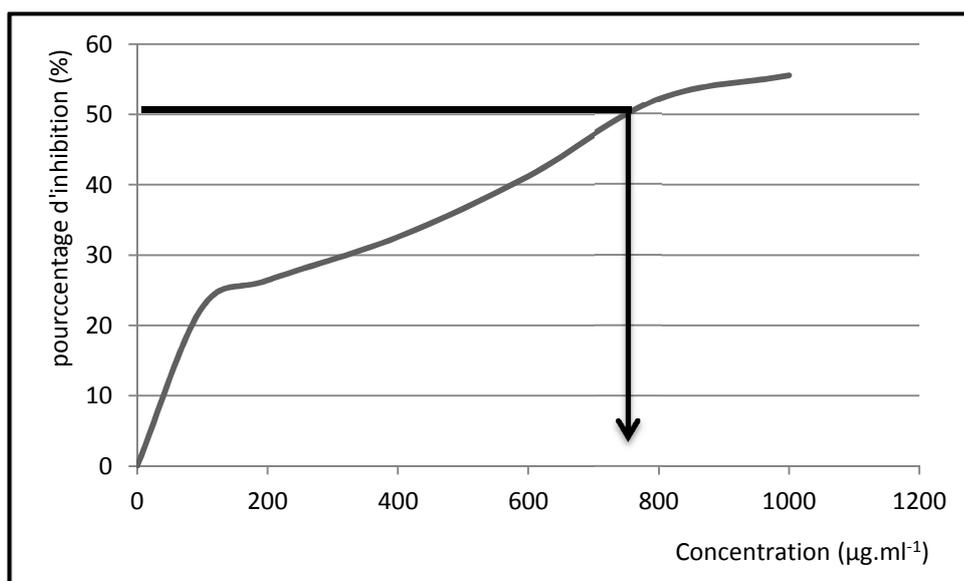
**Annexe 2. Lexique (HACHETTE, 2004)**

- Anis** : nom commun à la badiane (anis étoilé) et à plusieurs ombellifères (pimprenelle, cumin, fenouil) cultivées pour leurs fruits utilisés dans la préparation de tisanes et pour parfumer diverses boissons alcoolisées.
- Aneth** : (latin *anethum*, du grec *anêthon*, fenouil) Ombellifère aromatique très voisine du fenouil et dont la graine fournit une essence d'usage pharmaceutique.
- Boldo** : (espagnol *boldo*, de l'araucan) Plante du Chili, dont les feuilles sont utilisées en pharmacie pour le traitement des maladies du foie.
- Bergamotier** : arbre fruitier de la famille de l'oranger (*Citrus bergamia*), qui produit la bergamote.
- Camomille** : (latin médiéval *camomilla*, du latin classique *chamaemelon*, du grec *khamaimêlon*, pomme du sol) Nom usuel de plusieurs espèces d'herbes aromatiques de la famille des Composées.
- Citronnelle** : plante des régions tropicales cultivées pour son huile essentielle à odeur citronnée, telle que l'armoise citronnelle, la mélisse et la verveine odorante.
- Estragon** : plante potagère aromatique voisine de l'armoise, utilisée comme condiment (genre *Artemisia* ; famille des Composées).
- Eugéno**l : Constituant essentiel de l'essence de girofle (*Eugenia caryophyllata*), antiseptique et analgésique, utilisé en chirurgie dentaire.
- Hysope** : arbrisseau aromatique, originaire d'Europe et d'Asie méridionales, à fleurs bleues utilisées en infusion pour leurs propriétés médicinales (famille des Labiées).
- Marjolaine** : Labiée aromatique de la région méditerranéenne, utilisée en parfumerie et en pharmacie
- Moutarde** : Petite Crucifère annuelle largement dispersée en Europe et en Asie, portant des grappes de fleurs d'un beau jaune, et dont le fruit en silique sert à la préparation du condiment de même nom.
- Patchouli** : Labiée voisine de la menthe, produisant une huile essentielle odoriférante, dont on sépare une matière solide (camphre de patchouli) et une essence employée en parfumerie.
- Sarriette** : (ancien français *sarree*, du latin *satureia*) Labiée buissonnante cultivée pour ses feuilles, très aromatiques, utilisées comme condiment.
- Sauge** : plante des terrains vagues, a un effet tonique, la sauge officinale, avec fleurs bleues violettes, est utilisé en cuisine et en pharmacie (genre *Salvia* ; famille des Labiées).
- Vétiver** : plante Indienne (*andropogon muricatus*, fam. Graminées) cultivées pour le parfum de ses racines.

**Annexe 3.** Graines sèches de *Foeniculum vulgare* Mill.



**Annexe 4.** Evaluation graphiquement de la CE<sub>50</sub> de l'huile essentielle des graines du fenouil.



$$\begin{array}{l}
 800 - 600 \longrightarrow 17\text{mm} \\
 Y_1 - 600 \longrightarrow 13\text{mm}
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{l} 800 - 600 \\ Y_1 - 600 \end{array}} \right\} Y_1 = 752,94 \mu\text{g.ml}^{-1} \dots\dots\dots Y = (Y_1 + Y_1 + Y_1)/3$$

**Annexe 5.** Estimation graphiquement de l'IA<sub>50</sub> de l'huile essentielle des graines du fenouil.

**Tableau I.** Pourcentages d'inhibition de l'*Alternaria* de l'huile essentielle des graines du fenouil à différentes concentrations.

Concentrations	D1	%	D2	%2	D3	%3
125	25	66,6666667	24	68	23	69,3333333
62,5	30	60	29	61,3333333	29	61,3333333
31,25	36	52	37	50,6666667	36	52
15,625	43	42,6666667	44	41,3333333	46	38,6666667
7,312	57	24	59	21,3333333	60	20
3,656	74	1,33333333	75	0	73	2,66666667
contrôle négatif	75	0	75	0	75	0

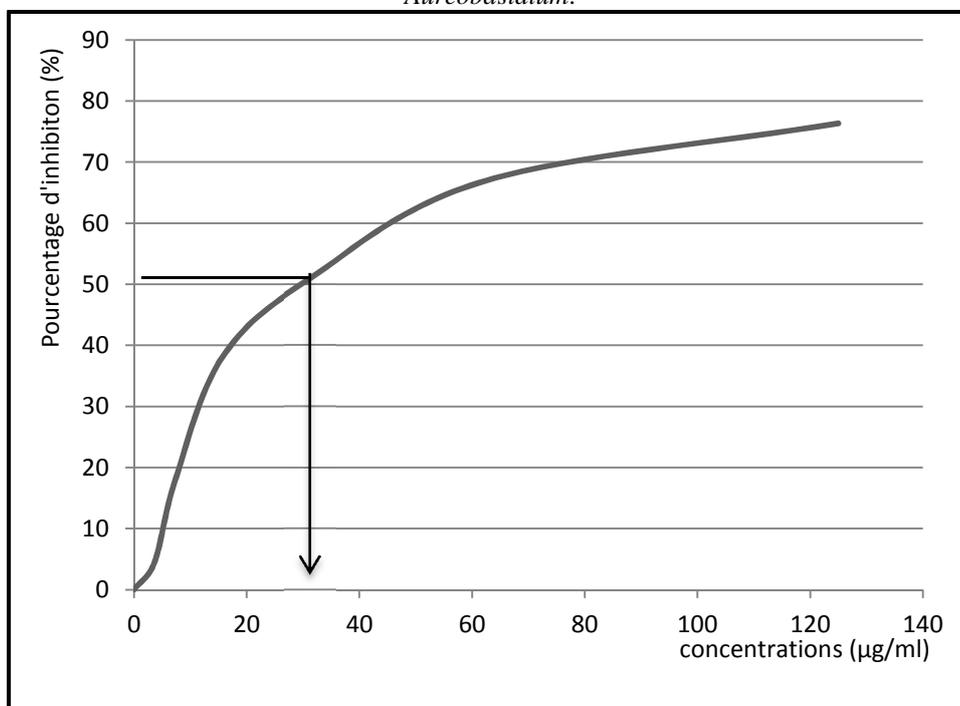
D : diamètre ; % : pourcentage d'inhibition

**Tableau II.** Pourcentages d'inhibition de l'*Aureobasidium* de l'huile essentielle des graines du fenouil à différentes concentrations.

Concentrations	D1	%	D2	%2	D3	%3
125	18	75,6756757	17	77,3333333	18	76
62,5	24	67,5675676	26	65,3333333	24	68
31,25	35	52,7027027	38	49,3333333	37	50,6666667
15,625	44	40,5405405	47	37,3333333	48	36
7,312	59	20,2702703	63	16	62	17,3333333
3,656	70	5,40540541	72	4	72	4
contrôle négatif	74	0	75	0	75	0

D : diamètre ; % : pourcentage d'inhibition

**Figure II.** Exemple de l'estimation graphiquement de l'IA<sub>50</sub> de l'huile essentielle des graines du fenouil pour *Aureobasidium*.



40 – 20 → 16mm }  
 X<sub>1</sub> – 20 → 8mm } X<sub>1</sub> = 30µg.ml<sup>-1</sup> ..... X = (X<sub>1</sub> + X<sub>1</sub> + X<sub>1</sub>)/3

**Tableau III.** Pourcentages d'inhibition de la *Fusarium* de l'huile essentielle des graines du fenouil à différentes concentrations.

Concentrations	D1	%	D2	%2	D3	%3
4000	30	64,7058824	31	63,5294118	28	67,0588235
2000	41	51,7647059	41	51,7647059	40	52,9411765
1000	46	45,8823529	47	44,7058824	46	45,8823529
500	48	43,5294118	47	44,7058824	48	43,5294118
250	49	42,3529412	48	43,5294118	49	42,3529412
125	49	42,3529412	50	41,1764706	50	41,1764706
contrôle négatif	85	0	85	0	85	0

*D* : diamètre ; % : pourcentage d'inhibition

**Tableau IV.** Pourcentages d'inhibition de la *Rhisopus* de l'huile essentielle des graines du fenouil à différentes concentrations.

Concentrations	D1	%	D2	%2	D3	%3
4000	9	89,4117647	9	89,4117647	8	90,5882353
2000	24	71,7647059	26	69,4117647	25	70,5882353
1000	32	62,3529412	29	65,8823529	30	64,7058824
500	38	55,2941176	35	58,8235294	34	60
250	44	48,2352941	43	49,4117647	44	48,2352941
125	47	44,7058824	46	45,8823529	45	47,0588235
contrôle négatif	85	0	85	0	85	0

*D* : diamètre ; % : pourcentage d'inhibition

**Tableau V.** Pourcentages d'inhibition de la *T. rubrum* CIP 2043.92 de l'huile essentielle des graines du fenouil à différentes concentrations.

Concentrations	D1	%	D2	%2	D3	%3
1000	14	78,125	15	76,1904762	15	76,5625
500	22	65,625	23	63,4920635	15	76,5625
250	30	53,125	28	55,5555556	26	59,375
125	33	48,4375	34	46,031746	33	48,4375
62,5	37	42,1875	40	36,5079365	37	42,1875
31,25	42	34,375	43	31,7460317	45	29,6875
contrôle négatif	64	0	63	0	64	0

*D* : diamètre ; % : pourcentage d'inhibition

## Annexe 6. Milieux de culture

### Gélose chocolat (en gramme par litre d'eau purifiée filtrée)

Peptone de caséine.....	7,5 ;
Peptone de viande.....	7,5 ;
Amidon.....	1,0 ;
Phosphate de potassium dibasique.....	4,0 ;
Phosphate de potassium, mono-basique.....	1,0 ;
Chlorure de Sodium.....	5,0 ;
Gélose.....	10,0 ;
Hémoglobine .....	10,0 ;
Suppléments de Bio-X .....	10 ml.

pH 7,2 +/- 0,2 à 25° C

### Gélose Hektoen (en grammes par litre d'eau purifiée filtrée)

Peptone de viande .....	12,0 ;
Extrait de levure .....	3,0 ;
Lactose.....	12,0 ;
Sucrose .....	12,0 ;
Salicine.....	2,0 ;
Sels biliaires .....	9,0 ;
Chlorure de sodium .....	5,0 ;
Citrate ferrique d'ammonium .....	1,5 ;
Thiosulfate de sodium .....	5,0 ;
Fuchsine acide .....	0,1 ;
Bleu de bromothymol .....	0,065 ;
Gélose .....	14,0.

pH 7.6 +/- 0,2 à 25° C

**Gélose Nutritive**

Extrait de viande de bœuf.....	1g ;
Extrait de levure.....	2g ;
Peptone.....	5g ;
Chlorure de sodium.....	5g ;
Agar.....	15g.

pH= 7,2 à 7,4

**Agar Mueller Hinton**

Eau distillée.....	1000ml ;
Infusion de viande de bœuf.....	02.0g ;
Hydrolysate de Caseine.....	17.5g ;
Amidon.....	1,5g ;
Agar.....	10g.

pH= 7.4

**Potatoes Dextrose Agar (PDA)**

Eau distillée.....	1000ml ;
Filtrat de pomme de terre.....	200g ;
Glucose.....	20g;
Agar.....	15g.

pH= 4.5

**Milieu sabouraud**

Eau distillée.....	1000ml;
Peptone.....	10g;
Glucose.....	20g;
Agar-agar.....	15g .

pH=6.3