HAL open science

Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées

Chaker El Kalamouni

To cite this version:

Chaker El Kalamouni. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2010. Français. NNT : 2010INPT0068 . tel-04274735

HAL Id: tel-04274735

https://theses.hal.science/tel-04274735

Submitted on 8 Nov 2023

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

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

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Institut National Polytechnique de Toulouse*
Discipline ou spécialité : *Sciences des Agroressources*

Présentée et soutenue par *Chaker EL KALAMOUNI*
Le *13 Décembre 2010*

Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées

---

JURY

Mme. Isabelle FOURASTÉ	*Professeur, Université de Toulouse III*	*Président*
M. Brahim MARZOUK	*Professeur, Centre de Biotechnologie, Tunisie*	*Rapporteur*
Mme. Chantal MENUT	*Professeur, Université Montpellier II*	*Rapporteur*
Mme. Christine RAYNAUD	*Ingénieur de recherche, INP de Toulouse*	*Membre*
M. Thierry TALOU	*Ingénieur de recherche, INP de Toulouse*	*Membre*
M. Roland VEHRÉ	*Professeur, Ghent University, Belgique*	*Membre*
M.P.Rimantas VENSKUTONIS	*Professeur, Kaunas Univ of Technology, Lituanie*	*Membre*

Ecole doctorale : *Sciences de la Matière*
Unité de Recherche : *Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle*
Directeurs de Thèse : *Thierry TALOU et Christine RAYNAUD*

A la mémoire de ma grand mère que dieu repose son âme en paix

A mes parents que dieu protège
En témoignage de ma profonde affection. Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien ; je leur suis très reconnaissant. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses

A Salma mon épouse qui m'a toujours encouragé

Madame Elisabeth BORREDON, je vous remercie pour votre accueil chaleureux au sein de votre laboratoire de recherche.

Christine, merci pour votre disponibilité tout au long de ma thèse et pour tout ce que vous m'avez appris en chimie analytique notamment sur techniques chromatographiques. Merci de m'avoir consacré du temps pour corriger ma thèse, Vous m'avez guidé pendant ces quatre années et éclairé sur les voies les plus intéressantes à prendre.
Ce travail n'aurait pas été le même sans votre encadrement.

Thierry, merci de m'avoir encouragé afin de prendre des décisions importantes dans ma vie professionnelle. Merci de m'avoir fait autant voyager durant ma thèse, Autriche, Lituanie et Grèce et de m'avoir fait participer à des congrès internationaux, cela m'a permis d'échanger sur mes travaux de recherche.
J'ai apprécié beaucoup votre amitié, votre dynamisme et votre bonne humeur tout au long de ma thèse.

Je tiens à remercier le Professeur Rimantas VENSKUTONIS, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire en Lituanie pour effectuer une bonne partie de ce travail. Je le remercie vivement pour sa collaboration et sa présence parmi les jurys.

Je remercie Professeur Isabelle FOURASTÉ pour son aide botanique, et pour les sorties que nous avons effectué ensemble pour ramasser les plantes. Je la remercie pour sa présence parmi les jurys.

Je remercie Madame Chantal MENUT Professeur à l'Université de Montpellier, qui a bien voulu examiner ce manuscrit et juger ce travail.

Je remercie Monsieur Brahim MARZOUK Professeur au centre de Biotechnologie de Borj-cédria en Tunisie, qui a bien voulu examiner ce manuscrit et pour sa présence parmi les jurys.

Je remercie Madame An ADAMS Professeur à l'Université de Gand, d'avoir accepté notre invitation pour participer à ce jury de thèse.

Merci à Géraldine GIACINTI pour sa patience et ses conseils concernant la partie analytique. J'ai beaucoup apprécié sa disponibilité et ses conseils avisés.

Merci à Laure CANDY de m'avoir aidé durant les moments difficiles…

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire pour leur convivialité, Mireille, Isabelle, Karine, Marie-Christine, Emmanuelle, Didier et Anne pour leur disponibilité.

Aux autres doctorants et collègues, bon courage pour la suite …

Merci à mes proches notamment mes parents, ma belle famille, mes deux sœurs Abir et Stéphanie, mes deux frères Nasser et Omar
Sans vous, rien n'aurait possible, merci de votre soutien moral et de votre amour…

Enfin mes remerciements sont particulièrement adressés à Salma, mon épouse, qui est la personne la plus importante à mon cœur, de m'avoir soutenu et patiemment réconforté et encouragé durant ces quatre années, qui ne pourront que rester inoubliables pour nous.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE 2

CHAPITRE I 5

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 5

Introduction 7

I . Plantes aromatiques médiévales de la région de Midi-Pyrénées 9
I.1 . Historique 9
I.2 . Les Milieux relictuels 9
I.3 . Notion de rareté 10
I.4 . Distribution botanique et mondiale des plantes aromatiques médiévales. 10
I.4.1 . Famille des Astéracées : morphologie, date d'introduction et distribution. 10
I.4.2 . Famille des Lamiacée : morphologie, date d'introduction et distribution 11
I.4.3 . Famille des Apiacées : morphologie, date d'introduction et distribution 11
I.5 . Démarche bibliographique de sélection des plantes 12

II . Etude bibliographique des cinq plantes aromatiques médiévales sélectionnées 22
II.1 . *Achillea millefolium* : informations botaniques, structurales et culturales 22
II.1.1 . Noms et origine 23
II.1.2 . Distribution nationale 23
II.1.3 . Usage tonique stomachique 23
II.1.4 . Usage hémostatique 24
II.1.5 . Usage emménagogue 24
II.1.6 . Autres usages 24
II.1.7 . Propriétés physicochimiques et biologiques 25
II.2 . *Tanacetum balsamita* : informations botaniques, structurales et culturales 26
II.2.1 . Noms et origine 27
II.2.2 . Distribution nationale 27
II.2.3 . Diverses propriétés 27
II.2.4 . Usage pharmacologique 28
II.2.5 . Usages divers 28
II.2.6 . Cultures 29
II.2.7 . Propriétés physicochimiques et biologiques 29
II.3 . *Calamintha grandiflora* : informations botaniques, structurales et culturales 32
II.3.1 . Noms et origine 33
II.3.2 . Distribution nationale 33
II.3.3 . Historique de la découverte du Thé d'Aubrac dans les Pyrénées 34
II.3.4 . Ecologie 34
II.3.5 . Propriétés physicochimiques et biologiques 35
II.4 . *Myrrhis odorata* : informations botaniques, structurales et culturales 36
II.4.1 . Noms et origine 37
II.4.2 . Distribution nationale 37
II.4.3 . Diverses propriétés 38
II.4.4 . Usages divers 38
II.4.5 . Propriétés physicochimiques et biologiques 38
II.5 . *Monarda didyma* : informations botaniques, structurales et culturales 40
II.5.1 . Noms et origine 41
II.5.2 . Distribution nationale 41
II.5.3 . Diverses propriétés 41
II.5.4 . Usages divers 41
II.5.5 . Propriétés physicochimiques et biologiques 42

III . Techniques d'extraction des fractions volatiles 43
III.1 . Techniques d'extraction des huiles essentielles 43
III.1.1 . Hydrodistillation 43
III.1.2 . Hydrodistillation-extraction simultanée 44
III.2 . Techniques d'extraction des composés organiques volatils (COV) 45
III.2.1 . Espace de tête statique (atmosphère confinée) 45
III.2.2 . Espace de tête dynamique 46
III.2.3 . Espace de tête pseudo-dynamique 46

IV . Composition chimique des plantes aromatiques 47
IV.1 . Fraction volatile des plantes aromatiques 48
IV.1.1 . Localisation et structure histologique des huiles essentielles 49
IV.1.2 . Phénomènes physico-chimiques et facteurs produisant l'altération des huiles essentielles 50

V . Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles 51
V.1 . Chromatographie en phase gazeuse monodimensionnelle 52
V.2 . Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie (CPG/O) 52
V.3 . Chromatographie en phase gazeuse à deux dimensions 53
V.3.1 . Chromatographie à deux dimensions heart-cutting CPG/SM 53
V.3.2 . Chromatographie totale CPG-2D 54

VI . Activités biologiques des plantes aromatiques 54
VI.1 . Généralités 54
VI.2 . Technique d'extraction des antioxydants 56
VI.3 . Activités antioxydantes des plantes aromatiques : huiles essentielles, extraits aromatiques 56
VI.3.1 . Oxydation et auto oxydation 56
VI.3.2 . Les antioxydants 58
VI.3.3 . Division des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action 59
VI.3.4 . Division des antioxydants suivant la nature chimique (naturel et synthétique) 60

VII . Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante 63
VII.1 . Généralités 63
VII.2 . Quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante 64

VIII . Huiles essentielles comme agents antimicrobiens 69
VIII.1 . Généralités 69
VIII.2 . Mode d'action contre les bactéries 70

IX . Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne 70
IX.1 . Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque) 70
IX.2 . Technique en milieu liquide (méthode de dilution) 71
IX.2.1 . La dilution en bouillon 71
IX.2.2 . La dilution en gélose 71

CHAPITRE II 72

CARACTERISATION DES COMPOSES ORGANIQUES VOLATILS DE CINQ PLANTES AROMATIQUES MEDIEVALES ; EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES ET DES RESIDUS D'HYDRODISTILLATION 72

Résumé 74

Introduction 75

I . Composition chimique des huiles essentielles 76
I.1 . *Achillea millefolium* : caractérisation de la fraction volatile des parties aériennes 76

Etude cinétique de l'extraction par hydrodistillation d'*Achillea millefolium* 76
I.1.1 . Composition chimique de l'huile essentielle *d'Achillea millefolium* et discussion....77
I.2 . *Calamintha grandiflora* : caractérisation des extraits des tiges et des feuilles....82
I.2.1 . Composition chimique de l'huile essentielle de *Calamintha grandiflora* et discussion....82
I.3 . *Tanacetum balsamita* : caractérisation des extraits des tiges et des feuilles 85
I.3.1 . Composition chimique de l'huile essentielle de *Tanacetum balsamita* et discussion 86
I.4 . *Myrrhis odorata :* caractérisation chimique des tiges et des feuilles 93
I.4.1 . Composition chimique de l'huile essentielle de *Myrrhis odorata* et discussion 93
I.5 . *Monarda didyma* : caractérisation chimique des tiges et des feuilles 96
I.5.1 . Composition chimique de l'huile essentielle de *Monarda didyma* et discussion 96

II . Caractérisation sensorielle des huiles essentielles des cinq plantes aromatiques : *Achillea millefolium, Tanacetum balsamita, Calamintha grandiflora, Myrrhis odorata* et *Monarda didyma*....99
II.1 . Pyramides Olfactives....99
II.1.1 . Les notes de tête....99
II.1.2 . Les notes de cœur....99
II.1.3 . Les notes de Fond 99
II.2 . Réalisation des Pyramides Olfactives....100
II.2.1 . Pyramides Olfactives des 5 huiles essentielles des plantes aromatiques selectionnées 100
II.3 . Activité odorante des composés organiques volatils évaluée par CPG-Olfactométrie 101
II.3.1 . Résultats de l'analyse sensorielle en CPG-O de l'HE d'*Achillea millefolium* 102
II.3.2 . Résultats de l'analyse sensorielle en CPG-O de l'HE de *Calamintha grandiflora* 103
II.3.3 . Résultats de l'analyse sensorielle en CPG-O de l'HE de *Tanacetum balsamita*....104
II.3.4 . Résultats de l'analyse sensorielle en CPG-O de l'HE de *Myrrhis odorata*....105
II.3.5 . Résultats de l'analyse sensorielle en CPG-O de l'HE de *Monarda didyma* 106

III . Activités biologiques des huiles essentielles et des résidus de l'hydrodistillation....107
III.1 . Introduction sur l'activité antioxydante....107
III.2 . Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles 108
III.2.1 . Evaluation de l'activité antioxydante des HE en utilisant la méthode Oxipress....108
III.2.2 . Evaluation de l'activité antioxydante des HE via des méthodes spectrophotométriques (diènes et triènes conjuguées) 115
III.3 . Evaluation de l'activité antioxydante des résidus d'hydrodistillation des 5 plantes aromatiques par la méthode de DPPH 120
III.3.1 . Principe de la méthode de DPPH....120
III.3.2 . Comparaison des activités antioxydantes des résidus d'hydrodistillation mesurées par la méthode de DPPH. 123
III.4 . Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles....126
III.4.1 . Evaluation de l'activité antibactérienne en utilisant la méthode de diffusion sur Agar....127
III.4.2 . Evaluation de l'activité antibactérienne en utilisant la méthode de plaque de micro titrage. 130

CHAPITRE III :....132

MISE EN PLACE D'UNE METHODOLOGIE INSTRUMENTALISEE DE CARACTERISATION RAPIDE DES HUILES ESSENTIELLES NATIVES ; APPLICATION PRE-INDUSTRIELLE A L'AROMATISATION DES HUILES VEGETALES PAR LES PLANTES AROMATIQUES....132

Résumé :....134

Partie I. Voie analytique....135

Introduction : 135

(A) Première approche analytique basée sur une technique d'échantillonnage classique couplée à un système de séparation/détection sophistiqué....136

I . Analyses des COVs émis par les feuilles par l'intermédiaire de la CPG bidimensionnelle. 136
I.1 . Principe de la CPG bidimensionnelle 136
I.1.1 . Séparations orthogonales.....137
I.2 . Matériels et méthodes 138
I.2.1 . Echantillons.....138
I.2.2 . Extraction des COV par SPME 138
I.2.3 . Analyses chromatographiques des COVs par CPG-2D.....138

II . Résultats de l'extraction et de l'analyse des COVs des feuilles de Tanacetum balsamita par SPME/CPG-2D.....139

(B) Deuxième approche analytique basée sur un système d'échantillonnage couplé à un système de séparation/détection classique.....142

I . Description du système.....142

II . Comparaison du profil aromatique de l'huile essentielle de *Tanacetum balsamita* et du profil CFD-DHS/GC de la plante.....143
II.1 . Matériel et Méthodes 143
II.1.1 . Concentration des COV par Headspace dynamique 143
II.1.2 . Concentration des COV d'une feuille non froissée par Headspace dynamique.....144
II.1.3 . Isolement de l'huile essentielle de *Tanacetum balsamita* 144
II.1.4 . Analyses chromatographiques des extraits 144
II.2 . Résultats de la comparaison entre une huile essentielle extraite par hydrodistillation et une huile essentielle native 144

III . Conception d'une cellule d'extraction dédiée « CFD » couplée à un système de piégeage Headspace dynamique et semi-statique.....148

IV . Application du système CFD à l'analyse de la fraction volatile de *Calamintha grandiflora* 149
IV.1 . Analyses chromatographiques.....149
IV.2 . Optimisation des conditions d'extractions par CFD-SPME ou CFD-DHS 149
IV.2.1 . Choix des fibres SPME : cinétique d'adsorption et d'absorption de la pulegone.....149
IV.2.2 . Optimisation du froissement du végétal 151
IV.2.3 . Observation microscopique au niveau du limbe des feuilles.....151
IV.2.4 . Comparaison des fractions volatiles extraites par CFD-SPME et CFD-DHS et de l'huile essentielle 152

Conclusion Partie I.....154

Partie II : Approche préindustrielle de l'aromatisation des huiles végétales par les plantes aromatiques155

Introduction.....155

I . Matériels et méthodes.....156
I.1 . Huile de tournesol 156
I.2 . Préparation des échantillons feuilles fraîches infusées dans l'huile de tournesol : HI.FF.....157
I.2.1 . Optimisation du temps d'exposition de l'huile infusée et soumise aux ultrasons 158
I.2.2 . Préparation des infusions de plantes aromatiques fraîches dans l'huile de tournesol 161
I.3 . Préparation d'infusions de plantes aromatiques séchées dans l'huile de tournesol : HI.FS 161
I.4 . Préparation des infusions de plantes aromatiques séchées et d'huile essentielle HI.HE.FS 163
I.5 . Analyses de l'espace de tête des huiles infusées.....163
I.5.1 . Fibre SPME, choix de la fibre et conditionnement 163
I.5.2 . Préparation des huiles infusées à analyser : extraction des COVs 163
I.5.3 . Analyse chromatographique des échantillons des huiles infusées ou aromatisées.....164

II . Résultats et interprétations 164
II.1 . Evolution de la concentration des COVs émis des huiles aromatisées ou infusées en fonction du temps 164

II.1.1 . Evolution de la quantité de tanacetone dans l'espace de tête de l'huile de tournesol infusée par les feuilles séchées de la Balsamite et son HE 164
II.1.2 . Evolution de la quantité du camphre (exprimée par l'aire du pic) dans d'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par les feuilles séchés d'*A. millefolium* et son HE 165
II.1.3 . Evolution, de la quantité de tanacetone dans l'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par les feuilles fraîches de Balsamite 165
II.1.4 . Evolution de la quantité de tanacétone dans l'espace de tête de l'huile de tournesol infusée par les feuilles séchées de la Balsamite 166
II.2 . Résultats de l'aromatisation par infusion de matière végétale et par ajout d'HE dans les huiles végétales 167
II.2.1 . Huile de tournesol aromatisée par l'HE d'*Achillea millefolium* 168
II.2.2 . Huile de tournesol aromatisée par l'HE de *Calamintha grandiflora* 170
II.2.3 . Huile de tournesol aromatisée par l'HE de *Tanacetum balsamita* 172
II.2.4 . Huile de tournesol aromatisée par l'HE de *Myrrhis odorata* 174
II.2.5 . Huile de tournesol aromatisée par l'HE de *Monarda didyma* 175

Conclusion Partie II 177

CONCLUSION GENERALE 179

PARTIE EXPERIMENTALE 187

I . Techniques d'extraction des huiles essentielles 189
I.1 . Différentes techniques d'extraction des huiles essentielles 189
I.1.1 . Entraînement à la vapeur 189
I.1.2 . Hydrodistillation 192
Calcul de la teneur en matière sèche et du rendement en huile essentielle 192
I.1.3 . Hydrodistillation d'*Achillea millefolium* 194
I.1.4 . Hydrodistillation de *Calamintha grandiflora* 194
I.1.5 . Hydrodistillation de *Tanacetum balsamita* 195
I.1.6 . Hydrodistillation de *Myrrhis odorata* 195
I.1.7 . Hydrodistillation de *Monarda didyma* 195
I.2 . Extraction des composés organiques volatils (COVs) 195
I.2.1 . Microextraction en phase solide (SPME) 195
I.2.2 . Choix de la fibre SPME 197

II . Analyses chimiques et sensorielles des huiles essentielles et des COVs 197
II.1 . Analyse par chromatographie phase gazeuse 197
II.1.1 . Détecteurs 198
II.2 . Les méthodes couplées 199
II.2.1 . Chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse 199
II.2.2 . Protocoles des analyses quantitatives et qualitatives des huiles essentielles 199
II.2.3 . Chromatographie en phase gazeuse / olfactométrie (CPG/O) 200
II.3 . Etablissement des pyramides olfactives 200

III . Extraction des antioxydants à partir des résidus d'hydrodistillation 201
III.1 . Principe d'extraction par soxhlet 201
III.2 . Extraction des antioxydants 202

IV . Evaluation de l'activité antioxydante des résidus d'hydrodistillation par la méthode de DPPH 202
IV.1 . Préparation des échantillons à doser 202
IV.2 . Dosage spectrophptométrique par la méthode du DPPH des solutions issues des résidus d'hydrodistillation 203
IV.2.1 . Calcul du pourcentage d'inhibition (%I) et de la concentration inhibitrice minimale (IC_{50}) 203

V . Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles 204
V.1 . Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles par la méthode Oxipress 204

V.2 . Evaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle par des méthodes spectroscopiques (diènes et triènes conjugués).....206

VI . Evaluation de l'activité antimicrobienne.....207
VI.1 . Evaluation de l'activité bactéricide par la méthode de diffusion sur Agar.....207
VI.2 . Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de micro dilution.....207

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 209

Liste des Tableaux.....225

Publications et participation à des congrès.....227

Introduction Générale

La région française de Midi-Pyrénées possède une flore riche et peu valorisée. Les environs d'une grande région comme la région Midi-Pyrénées sont soumis à de fortes pressions foncières comme le développement de l'habitat résidentiel, la progression et le renforcement des infrastructures et l'abandon de certaines pratiques agricoles. Les espaces qui abritaient traditionnellement une végétation riche et diversifiée ont tendance à régresser.
Parmi cette végétation qui se raréfie, on trouve les plantes aromatiques médiévales traditionnellement utilisées par nos ancêtres pour l'aromatisation des aliments, les arts culinaires et les vertus médicinales. Ces plantes ne sont pas valorisées d'un point de vue de leur potentiel chimique sensoriel ou biologique.

Les plantes aromatiques sont prometteuses et constituent une grande source d'antioxydants et d'antibactériens naturels pour l'industrie agroalimentaire. En effet, l'oxydation des lipides dans les produits alimentaires induit non seulement une diminution de la valeur nutritive de l'aliment, mais aussi des effets reconnus nuisibles pour le consommateur et qui peuvent être associés à des risques de cancer chez l'homme. La présence d'antioxydants dans l'alimentation est devenue essentielle pour la qualité et la sécurité de l'aliment. Les effets négatifs des antioxydants synthétiques encouragent à leur substitution par des agents naturels.

Différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la biosynthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles (HE) connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique et thérapeutique dans la médecine populaire. La composition chimique des HE est assez complexe, les composés terpéniques et aromatiques représentant les principaux constituants. On y trouve également, et en faibles concentrations des acides organiques, des cétones et des coumarines volatiles. La nature de la fonction chimique du composé majoritaire (phénol, alcool, aldéhyde, cétone…) joue un rôle prépondérant dans l'efficacité de leurs activités biologiques.

Les plantes médicinales et aromatiques sont utilisées depuis longtemps dans le processus de stress oxydatif et la lutte contre les maladies infectieuses. Mais la découverte des antioxydants synthétiques et des antibiotiques a provoqué le déclin de la médecine à base de plantes et l'a reléguée à un rang secondaire.

Ceci nous a amené à nous pencher sur l'étude des activités odorante, antioxydante et antimicrobienne d'extraits de plantes aromatiques oubliées de la région de Midi-Pyrénées. Ce sujet nous a semblé d'autant plus intéressant que la flore des Pyrénées est extrêmement riche en plantes aromatiques riches en huiles essentielles.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons recensé une centaine de plantes aromatiques régionales, à partir desquelles nous avons sélectionné, selon différents critères, cinq plantes aromatiques médiévales : *Achillea millefolium, Calamintha grandiflora, Tanacetum balsamita, Myrrhis odorata* et *Monarda didyma*.

Le deuxième chapitre est consacré à l'appliation du principe d'agro-raffinage sur les 5 plantes. Pour cela, des extractions de fractions volatiles (huile essentielle) et de fractions non volatiles (résidu d'hydrodistillation) ont été effectuées. Des études physico-chimiques, sensorielles et biologiques des extraits obtenus ont été réalisées pour caractériser les métabolites secondaires présents et juger de l'intérêt des fractions.

Dans le troisième chapitre, du fait de la rareté du végétal étudié, nous nous sommes intéressé à deux approches d'évaluation rapide du potentiel aromatique des plantes à huile essentielle ; dans un premier temps, au moyen d'un échantillonnage classique couplé à un détecteur à forte sensibilité comme la chromatographie bidimensionnelle et dans un second temps par un échantillonnage spécifique couplé à un détecteur classique pour lequel nous avons développé un appareillage novateur dénommé « Crushing Finger Device ».

Enfin, nous avons étudié la faisabilité d'une application préindustrielle agroalimentaire des cinq plantes aromatiques. Des études d'optimisation d'infusion et d'aromatisation d'huiles végétales par leurs huiles essentielles ont été développées dans cette dernière partie du chapitre.

Chapitre I

Etude bibliographique

Introduction

La réglementation REACH émet différents textes en vigueur pour les substances et préparations chimiques. Ces textes comprennent les règles qui ont prévalu pour les propositions de classement de l'EFFA (European Flavor and Fragrance Association) en collaboration avec l'EFEO (European Federation of Essential Oils). L'industrie propose donc une harmonisation des classements pour qu'il n'y ait pas de facteur de concurrence sur des éléments de sécurité. Les huiles essentielles sont classées sur la base de résultats de tests directs sur leurs propriétés physiques, chimiques, toxicologiques et écotoxicologiques. Cependant, de nombreux résultats ne sont pas disponibles ou trop anciens ou imprécis pour être valables.

En 2002, le comité du Codex alimentaire a transmis des normes de catégorie I concernant les additifs alimentaires ainsi que les aromatisants à la Commission afin qu'elles soient adoptées en tant que normes consultatives du Codex. Sur 60 normes d'additifs alimentaires, 42 normes d'anti-agglutinants (6), d'exhausteurs d'arômes (17), d'édulcorants (11) ainsi que d'épaississants (8) ont été transmises afin d'adopter de nouvelles limites concernant des métaux lourds spécifiques comme le plomb et l'arsenic.

En 2009, ce même comité a émis 342 spécifications, dont 317 pour des aromatisants et 25 pour des additifs alimentaires; 2 spécifications ont été retirées. De plus, 50 additifs alimentaires ont été révisés (anti-agglomérants, aromatisants, édulcorants, épaississants) pour leur teneur en métaux lourds.

Les conséquences de ces classements vont conduire d'après l'EFFA à la disparition forcée de 20% des formulations aromatisantes existantes, voire à la remise en cause du concept d'aromatisant Identique-Nature. Ceci va donc accroître la demande industrielle pour les aromatisants naturels, en particulier ceux labellisés WONF (With Other Natural Flavor), économiquement plus rentables.

Les agents aromatisants sont des molécules chimiquement définies pouvant être « naturelles » lorsqu'extraites de plantes ou « identiques aux naturelles » lorsqu'on synthétise chimiquement une substance déjà présente dans une source naturelle. Enfin, elles peuvent aussi être « artificielles » lorsqu'on synthétise des molécules qui ne sont pas présentes dans la nature. D'autres procédés sont mis en œuvre dans la création de nouveaux arômes tels que les arômes de Maillard et les arômes de fumée.

Préparations aromatisantes procédé physique ou biotechnologique

Substances aromatisantes isolées & chimiquement définies

Naturelles procédé physique ou biotechnologique

} Naturels

Identiques aux naturelles

Artificielles

} Synthèse chimique

Arômes de transformation Arômes de « Maillard »

Arômes de fumée Extraits de fumée (Règlement 2065/2003)

Dans le cadre de la recherche de nouveaux aromatisants naturels type WONF (Identiques aux naturelles), et afin de combler la diminution réglementaire des aromatisants naturels présents sur le marché, il existe deux différentes voies de prospection. La première voie concerne l'exploitation du potentiel aromatique des plantes exotiques rares. Par exemple, les sociétés de secteur de l'industrie aromatique ont depuis quelques années entrepris plusieurs expéditions en Amérique du Sud ainsi qu'en Afrique occidentale (Neblina, IFF, Yves Rocher et TasteTrek®, Givaudan) à la recherche de nouvelles fragrances et saveurs

La deuxième voie est la valorisation des plantes aromatiques médiévales ; ces dernières ne sont plus cultivées et poussent à l'état sauvage. Rares sont les études scientifiques ayant mis en évidence leurs potentiels aromatiques ou biologiques afin de favoriser leur culture parce qu'elles sont devenues menacées voire rares en fonction des régions.

L'objectif de cette thèse est l'application du concept d'AgroRaffinage aux plantes aromatiques médiévales du patrimoine végétal de Midi-Pyrénées. Ceci dans le but de valoriser de manière séquencée les différents constituants de la plante. Dans une première étape, une étude bibliographique a été réalisée à partir d'anciens ouvrages botaniques ainsi que de références bibliographiques afin de remonter à des plantes régionales utilisées par nos ancêtres pour leurs activités odorantes, culinaires ou médicinales. Dans une deuxième étape, des études physicochimiques, sensorielles et biologiques des fractions volatiles et non volatiles des plantes médiévales sélectionnées ont été réalisées pour juger de leurs propriétés aromatiques et biologiques et de leur intérêt dans le cadre des nouvelles réglementations européennes.

I. Plantes aromatiques médiévales de la région de Midi-Pyrénées

La région Midi-Pyrénées possède une flore riche et non valorisée, ceci concerne tout particulièrement les plantes aromatiques. Cette thèse s'inscrit dans le programme AROMATIC, qui vise la conception d'une nouvelle génération d'aromatisants naturels labellisés WONF. L'expédition MIPAROM (Midi-Pyrénées-Aromatique) a été conduite dans le cadre de cette thèse afin de collecter et d'analyser des variétés de plantes aromatiques médiévales régionales.

I.1. Historique

A la fin des années 60, G.Bosc publiait son « Guide d'herborisation et de détermination des végétaux vasculaires de la région Toulousaine ». Selon l'auteur, cet ouvrage portait sur un rayon de 20 à 30 Km autour de Toulouse (Nature Midi-Pyrénées, 2004) .

Les environs d'une grande région comme la région Midi-Pyrénées sont soumis à de fortes pressions foncières (développement de l'habitat résidentiel, progression et renforcement des infrastructures...) ou bien à l'abandon de certaines pratiques agricoles. De nombreux espaces naturels sont détruits au profit de zones industrielles ou résidentielles à proximité d'une grande agglomération. Les espaces qui abritent traditionnellement une végétation riche et diversifiée ont tendance à régresser.

I.2. Les Milieux relictuels

Cette évolution crée des milieux alors qualifiés de « relictuels » (Nature Midi-Pyrénées, 2004) qu'il est possible de distinguer en deux types :

1. *Des milieux naturels ou écologiquement riches qui ont pu perdre de leur intérêt par réduction de leur superficie.*

   La progression de l'agglomération et de ses infrastructures laisse subsister des lambeaux boisés, quelques prairies humides isolées et de faibles surfaces, quelques pelouses sèches sur des coteaux et quelques zones humides : ce sont alors des milieux résiduels.

2. *Des milieux qui ont été artificiellement créés par les activités de l'homme*

   Des zones « refuge » se créent avec les différents aménagements tels que le talus routiers, les bords de routes et les fossés.

I.3. Notion de rareté

La notion de rareté d'une plante est définie de la manière suivante:
Ce sont des plantes qui ont un statut national de protection (Arrêté Ministériel fixant la liste des plantes protégées sur le territoire national) ou qui sont inscrites sur le livre rouge de la flore menacée de France. Ces plantes ont été éliminées lors de la première sélection. Ce sont des plantes rares ou peu fréquentes localement. Il s'agit de plantes menacées dans la zone étudiée. Elles peuvent cependant être plus fréquentes et plus répandues dans les zones voisines moins urbanisées et moins agricoles.

I.4. Distribution botanique et mondiale des plantes aromatiques médiévales.

Les plantes aromatiques médiévales sont par définition des plantes sauvages en majorité non cultivées, poussant en Europe, en Asie de l'Est et en Amérique du Nord. La recherche bibliographique sur ces plantes médiévales montre qu'elles appartiennent essentiellement aux 3 familles botaniques suivantes : Astéracées, Lamiacées et Apiacées.

I.4.1. Famille des Astéracées : morphologie, date d'introduction et distribution.

La famille des Astéracées (Composées) est la plus vaste famille de la division des spermatophytes, avec plus de 900 genres et au moins 12 000 espèces répandues sur toute la planète. Les composées sont relativement moins abondantes dans l'ancien monde que dans l'Amérique du Nord où elles forment environ un huitième de la flore vasculaire.
Elles sont probablement apparues à la fin du Cétacé ou au début de l'Eocène, et le point d'origine paraît être la région andine de l'Amérique du Sud où elles constituent aujourd'hui un quart de la flore vasculaire. Les traits saillants de la distribution géographique de cette immense famille ont une grande portée biologique. Les tribus des Astérées et des sénecionées sont toutes cosmopolites ou à peu près. Les Cichoriées, les Cynarées et les Anthémidées appartiennent surtout à l'hémisphère nord. Les Calendulées et les Arctotidées sont africaines. Les Vernoniées, les Eupatoriées, les Hélianthées, les Héléniées et les Mutisiées sont essentiellement américaines. La grande tribu des Inulées appartient surtout à l'ancien monde. Les espèces extra-tropicales communes aux deux hémisphères ne sont guère plus d'une quarantaine (Moreau, 1960). L'Afrique, l'Australie et l'Amérique occidentale paraissent posséder les représentants les plus anciens du groupe. L'Afrique offre la plus grande variété

de témoins isolés des types éteints. L'Amérique andine possède quelques espèces qui se rapprochent du type que l'on peut considérer comme le type primitif de la famille entière.
La majorité des plantes médiévales que nous avons choisies est répartie surtout en Europe, Asie et l'Amérique du Nord. Une distribution géographique sauvage importante de cette famille existe aussi en Turquie, Canada, Inde, Iran et les pays Baltes (Ivancheva *et al.*, 2003).

I.4.2. Famille des Lamiacée : morphologie, date d'introduction et distribution

La deuxième famille botanique constituant les plantes médiévales est celle des Lamiacées (Labiée). La forme de la fleur et la présence d'huiles essentielles signent cette famille (Kaufmann *et al.*, 1994). Cette famille de plantes angiospermes dicotylédones à fleurs gamopétales irrégulières qui regroupe surtout des plantes herbacées et sous-arbustives réparties dans le monde entier. Les Lamiacées herbacées, annuelles ou vivaces, sont très nombreuses et très répandues en France, exemple les Thyms, les Lavandes, les Romarins sont surtout abondants dans les régions méditerranéennes (Moreau, 1960).
Les Lamiacées comptent plus de trois mille cinq cents espèces, quelque deux cents genres, répartis en sept sous-familles.

I.4.3. Famille des Apiacées : morphologie, date d'introduction et distribution

La troisième famille constituant les plantes aromatiques médiévales est la famille des Apiacées (Apiaceae), appelée anciennement Ombellifère (Umbelliferae). Elle comprend près de 3000 espèces réparties en 420 genres qui sont surtout présentes dans les régions tempérées du monde. C'est une famille relativement homogène, caractérisée notamment par son inflorescence typique, l'ombelle.
C'est une vaste famille complexe regroupant des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces, et parfois des arbustes. Les feuilles sont alternes, souvent grandes et pennatifides (découpées en lobes profonds) mais aussi simples. Leur base est souvent engainante et élargie (Moreau, 1960). La forme des fleurs a valu à cette famille son ancien nom; ce sont des ombelles composées le plus souvent d'une ombelle primaire, avec ou sans bractées, dont chaque branche ou rayon porte une ombelle secondaire (ombellule) avec ou sans bractées secondaires (bractéoles). Les fleurs sont souvent petites, à cinq parties; les pétales toutes de même taille ou nettement irrégulières, les fleurs externes d'une ombelle pouvant avoir des pétales externes nettement plus grands que les autres. Les fruits sont souvent déterminants pour identifier genres et espèces se ressemblents. Du fait de leurs groupes de petites fleurs en

ombelles qui offrent un abondant nectar et une bonne plate-forme d'atterrissage, les ombellifères sont particulièrement appréciées par les insectes pollinisateurs.

Cette famille riche en métabolites secondaires présente des intérêts économiques et médicinaux, comportant des coumarines, flavonoïdes, composés acétyléniques et des lactones sesquiterpéniques, ainsi qu'une grande richesse en huile essentielle. Cette famille de plantes est bien connue pour avoir une quantité importante d'huile essentielle dans la quasi-totalité de ses organes anatomiques. A nos jours, 760 constituants d'huiles essentielles ont été isolés des apiacées (Moreau, 1960).

I.5. Démarche bibliographique de sélection des plantes

Une première liste (I) comprenant une centaine de plantes aromatiques oubliées de la région de Midi-Pyrénées a été établie (Tableau 1), grâce à une recherche bibliographique faite à partir d'anciens et nouveaux ouvrages botaniques et de quelques sites internet (Pailleux *et al.*, 1899; Lieutaghi, 1966; De Gubernatis, 1976; De Gubernatis, 1976; Richard, 1992; Veyrat *et al.*, 1997; Saule, 2002; Bertrand, 2003; Bertrand, 2004; Nature Midi-Pyrénées, 2004; Teuscher *et al.*, 2005).

Afin de limiter le nombre de plantes, les critères de rejets suivants ont été choisis :

- Espèce protégée
- Existence dans l'huile essentielle de molécules toxiques ayant fait l'objet de peu d'études
- Plante ayant fait l'objet de nombreuses études scientifiques
- Absence d'huile essentielle dans la plante
- Existence sous forme arborescente

19 plantes ont alors été sélectionnées (liste II) lors de cette seconde sélection. Elles sont représentées en gras dans le Tableau 1.

Tableau 1: Liste I des plantes aromatiques médiévales sélectionnées, (*) : plantes correspondent à la deuxième série de sélection

Nom Latin	Nom Français	Caractéristiques	Motif de sélection - non sélection
**** Achillea millefolium***	**Achillée millefeuille**	**Plante vivace de taille moyenne ou assez élevée (jusqu'à 1m20), à rhizome émettant des stolons, à tige dressée simple ou rameuse, plus ou moins velue. Les feuilles répandent un parfum agréable légèrement mentholé**	**Retenue**
Achyranthes Aspera	Herbe des jeunes	On conçoit aisément que cette herbe ait pu devenir après une origine pareille un Talisman puissant	Absence d'huile essentielle
**** Acinos alpinus***	**Calament des Alpes**	**Plante vivace de taille modeste (moins de 30cm) à tiges couchées ou redressées, rameuses à la base**	**Retenue**
Adiantum pedatum	Adiante	L'adiante annonce la guérison	Absence d'huile essentielle
**** Agastache foeniculum***	**Agastache**	**Cette plante dégage un fort arôme d'anis.**	**Retenue**
**** Agnus-castus***	**Poivre des moines**	**L'odeur des branches de cette arbre combattait les pensés impudiques**	**Retenue**
Agrimoinia eupatoria	Aigre moine	Elle a une variété l'agrimoine odorante qui ressemble à l'agrimoine eupatoire mais ses feuilles et ses fleurs sont odorantes	Absence d'huile essentielle
Alliaria officinalis	Alliaire	Plante vivace à odeur alliacée surtout au froissement	Toxicité de l'huile essentielle
Amaranthus retroflexus	Amaranthe réfléchie	Une saveur "carnée", inimitable	Absence d'huile essentielle
Anethum graveolens	Auelle odorante	Elle est distinguée par son odeur forte. l'auelle était un aromate chez les romains parfume agréablement les parfums	Nombreuses études scientifiques
**** Angelica archangelica***	**Angélique**	**Famille Apiacée, pays d'origine : Amérique et Europe, odeur typique aromatique, saveur : sucrée puis épicée voir musquée, amère et même piquante**	**Retenue**
**** Angelica silvestris***	**Angélique des bois**	**Une saveur fraîche et un parfum "tendre" loin des canons habituels**	**Retenue**

Nom Latin	Nom Français	Caractéristiques	Motif de sélection - non sélection
**** Anthriscus sylvestris***	**Cerfeuil sauvage**	**Plante vivace de taille moyenne ou assez élevée (jusqu'à 1,50m) à tige dressée, rameuse, à nœuds peu renflés. Feuille inférieures 3 fois divisées. Fleurs blanches, très aromatiques**	**Retenue**
Apium graveolens	Ache	Son odeur est bien connue qui la différencie des autres, saveur lui a fait ses vertus médicinales	Nombreuses études scientifiques
Arbutus unedo	Gardien des portes	Plante vivace de taille moyenne ou assez élevée (jusqu'à 1,30m)	Absence d'huile essentielle
Areca catechu	Palmier à bétel	Une espèce de noisette parfumée indienne	Absence d'huile essentielle
**** Artemisia vulgaris***	**Armoise**	**Absinthium maximum, mère de toutes les herbes indiquant sa ressemblance avec l'absinthe**	**Retenue**
Arnica montana	Arnica	Les fleurs une fois détaché, on les fait sécher le plus vite possible pour qu'ils gardent leur couleur el leur parfum	Protégée
**** Artemisia abrotanum***	**Aurone**	**Odeur aromatique, légèrement poivrée intensifiée après frottement**	**Retenue**
Asipatra vana	Armées	Une espèce de roseau	Absence d'huile essentielle
Asperula odorata	Asperule odorante	La plante fraîche est quasi inodore alors qu'après dessiccation elle acquiert une odeur très fine due à la coumarine	Absence d'huile essentielle
Attahasaka		Elle n'est autre que les cheveux hérissés, elle désigne en sanscrit *Jasminum hirsutum*	Absence d'huile essentielle
Ballota nigra	Ballote fétide	elle a une odeur repoussante et désagréable	Absence d'huile essentielle
Borago officinalis	Bourrache	Feuille et fleur qui offre des goûts d'iode, d'esprit marin. Étranges arômes pour cette plante si loin de la mer.	Nombreuses études scientifiques
Brassica nigra	Moutarde	les graines reforment une huile aromatique	Absence d'huile essentielle

Nom Latin	Nom Français	Caractéristiques	Motif de sélection - non sélection
**** Calamintha grandiflora***	**Thé d'Aubrac**	**Une saveur mentholée et florale. Une plante que tout laguiolais se doit d'avoir en provision pour aborder la saison hivernale**	**Retenue**
Capsicum frutescens	Poivre de cayenne	Odeur âcre légèrement animale	Nombreuses études scientifiques
Cardamine pentaphyllos	Dentaire digitée	Belle espèce vivace de taille, moyenne (70cm au plus) à rhizome couvert de grosses écailles triangulaires caractéristiques, à tige simple, nue à la partie inférieure, dressée, munie dans le haut de feuilles luisantes d'un beau vert	Protégée
Carlina acanthifolia	Carline artichaut	Belle plante vivace dont le gros capitule se développe à même le sol au centre d'une rosette de feuilles étalées, larges, découpées en segments garnis de fortes épines	Protégée
Carum carvi	Cumin des prés	Lors de la cueillette, les parfums des feuilles sont particulièrement prometteurs. Quant aux semences, elles explosent en saveurs anisées	Nombreuses études scientifiques
Cedrus	Cèdre	Le cèdre est un genre de conifère de la famille des pinacées, originaire du Moyen-Orient, d'Afrique du Nord et de l'Himalaya, acclimaté en Europe, comprenant des espèces d'arbres majestueux, à bois odorant, à cime conique ou étalée	Protégée
Chelidonium majus	Chelidoine	La plante entière exalte une odeur désagréable	Absence d'huile essentielle
Terminalia tomentora	Oreille de chèvre	Odeur de la chèvre	Absence d'huile essentielle
****Chrysanthemum balsamita ou Tanacetum balsamita***	**Balsamite**	**Nommée communément au Moyen Age menthe coq, cette plante à l'odeur de menthe**	**Retenue**
Cistus salviifolius	Ciste à feuilles de Sauge	Arbuste assez bas qui peut atteindre 80cm, pratiquement inodore, à rameaux velus non visqueux, munis de feuilles à court pétiole	Forme arbrescente
Convallaria majalis	Muguet	Inutile de présenter l'inflorescence, ni de vanter son parfum, Le rhizome allongé, solidement ancré au sol par plusieurs faisceaux de racines adventives, portant des fleurs odorantes en clochettes blanches	Toxicité de l'huile essentielle

Nom Latin	Nom Français	Caractéristiques	Motif de sélection - non sélection
Crataegus oxyacantha	Aubépine	Les fleurs sont séchées en un lieu bien aéré pour jaunir et conserver leur odeur délicate	Nombreuses études scientifiques
Cucurbita pepo	Courge de sweet	Petite courge aux arômes de châtaigne	Absence d'huile essentielle
Discordia	Herbe de haine	Indienne	Absence d'huile essentielle
Galium verum	Gaillet vrai	Espèce vivace de taille moyenne (1m au plus) glabre ou velue dont les tiges généralement dressées, simples ou ramifiées, sont munies de verticilles comptant 6 à 12 feuilles étroites, allongées, à bords enroulés, saveur du miel	Absence d'huile essentielle
Juniperus communis	Genevrier	Odeur un peu camphrée	Nombreuses études scientifiques
Geum urbarum	Benoîte	Les racines dégagent un fort parfum de girofle	Absence d'huile essentielle
Glechoma hederacea	Lierre terrestre	Plante vivace dont les longues tiges rampantes s'enracinent aux noeuds et donnent naissance à des tiges florifères redressées de taille modeste (30cm au plus), feuille aromatique dont la saveur épicés	Absence d'huile essentielle
Geum urbanum	La Benoîte bénédiction tonique	Plante de 50 à 60 cm de hauteur, sa racine contient une huile essentielle dont l'odeur aromatique rappelle celle du clou de girofle, parfume plusieurs boissons, sèche, elle perd ses arômes	Absence d'huile essentielle
Helichrysum stoechas	Immortelle	Plante très décorative de taille médiocre (50cm au plus) qui constitue des touffes denses avec des tiges ligneuses à la base, étalées ou redressées, très rameuses, blanches-cotonneuses, odeur de curry	Nombreuses études scientifiques
Heracleum sphondylium	Berce commune	Grande plante ombellifère vivace atteignant 50cm à 1m50 découvrirez des arômes de mandarine sur les jeunes tiges crues. L'odeur et la saveur des graines rappellent celles des feuilles de coriandre exotique d'agrume de mandarine et de noix de coco	Nombreuses études scientifiques

Nom Latin	Nom Français	Caractéristiques	Motif de sélection - non sélection
Humulus lupulus	Houblon	Longue liane (jusqu'à 8m) qui se renouvelle tous les ans à partir d'une souche ligneuse vivace. Sur des sujets distincts, se développent les fleurs mâles à 5 étamines en grappes rameuses et les fleurs femelles servent à aromatiser les bières	Nombreuses études scientifiques
Hypericum perforatum	Millpertuis	Les feuilles, les fleurs soignent les "brûlures" L'huile issue de la macération des sommités fleuries d'un rouge foncé est très aromatique	Nombreuses études scientifiques
Hyssopus officinalis	Hysope	Très aromatique	Nombreuses études scientifiques
Inula helenium	Aunée	Les racines prennent au séchage une odeur d'Iris	Nombreuses études scientifiques
Laurus nobilis	Laurier	Parfum balsamique et épicé	Nombreuses études scientifiques
Levisticum officinale	Liveche ou Ache	Une puissance aromatique, elle est recommandée pour restaurer l'appétit	Nombreuses études scientifiques
Lilium sp	Lis orangé, safrané	Connue par le nom : la fleur des fleurs	Absence d'huile essentielle
Matricaria recutita	Camomille sauvage	Plante annuelle glabre, à odeur prononcée de camomille, de taille médiocre (60cm au plus)	Nombreuses études scientifiques
Melissa officinalis	Mélisse	sèche perd rapidement son huile essentielle	Nombreuses études scientifiques
**** Meum athamanticum***	**Cistre**	**Un goût anisé si mystérieux. Pour nous, qui l'avons choisie pour illustrer notre image, elle est source de souvenirs, d'histoire et de sagesse**	**Retenue**
**** Monarda didyma***	**Monarde**	**Ses corolles déclinent des parfums citronnés, des goûts épicés**	**Retenue**
**** Myrrhis odorata***	**Cerfeuil musqué**	**Tiges sucrées et anisées**	**Retenue**

Nom Latin	Nom Français	Caractéristiques	Motif de sélection - non sélection
Myrtus communis	Myrte	Prince des végétaux odorants, mentholé	Forme arborescente
Narcissus pseudonarcissus	Narcisse jaune	Dès la fin de l'hiver jusqu'au début de juin en altitude, la floraison des Narcisses relaie celle du Galanthe des neiges. Issu d'un bulbe assez gros, accompagné par 2 à 4 feuilles d'un vert un peu glauque, parfume des vallées entières	Absence d'huile essentielle
Ocimum basilicum	Basilic	La multitude de variétés proposée aujourd'hui est phénoménale. Des parfums de citron, de réglisse, en passant par le camphre, l'anis, et leur usage offre une palette de saveurs inestimable	Nombreuses études scientifiques
Origanum majorana	Marjolaine	agréable odeur parfumée, voir épicée	Nombreuses études scientifiques
Origanum vulgare	Marjolaine sauvage	Plante vivace dont les tiges rameuses dressées, munies de feuilles pétiolées ovales, peuvent atteindre 60cm. Les fleurs roses accompagnées de bractées lancéolées d'un rouge violacé Odeur très aromatique	Nombreuses études scientifiques
Pastinaca sativa	Panais	Exemple types de légumes oubliés, ses feuilles parfument les potages et ses petits fruits aplatis	Toxicité de l'huile essentielle
Phragmites australis	Roseau	Espèce vivace dont la taille peut atteindre 6m. A partir d'un rhizome ramifié et très allongé, s'élèvent les tiges épaisses, mais peu résistantes, car non ligneuses	Forme arbrescente
Robinia pseudacacia	Acacia	un arbre plein de vie, le bourdonnement des abeilles et il embaume l'atmosphère. Un parfum, un goût tout en finesse utilisé pour les sucreries.	Forme arbrescente
Rosmarinus officinalis	Romarin	Parfum agréable légèrement camphré	Nombreuses études scientifiques
Rosa canina	Eglantier	Parfum brodé d'insecte	Nombreuses études scientifiques
Ruta graveolens	Rue	Odeur particulière aromatique voir épicée	Nombreuses études scientifiques

Nom Latin	Nom Français	Caractéristiques	Motif de sélection - non sélection
Salvia officinalis	Sauge	Feuilles aromatiques voir camphré	Nombreuses études scientifiques
Salvia pratensis	Sauge commune	Plante vivace de taille moyenne (80cm au plus) à tige simple ou peu ramifiée. Les feuilles ne sont pas odorantes mais la hampe florale est recouverte d'une substance collante qui dégage un parfum plaisant légèrement citronné à la fois fraisé.	Nombreuses études scientifiques
**** Sambucus nigra***	**Sureau noir**	**Parfum de musc, ses fleurs donnent leur arôme de muscat, vins parfumés**	**Retenue**
Sanguisorba minor	Pimprenelle	Exalte des arômes de noisettes.	Absence d'huile essentielle
Satureia hortensis	Sariette	odeur fortement épicée et camphrée avec de réminiscences de thym et d'origan	Nombreuses études scientifiques
Spiraea ulmaria	Reine des prés	Plante herbacée vivace au port élégant d'où son nom de "Reine", à rhizome rampant noueux et aux racines fibreuses, dont la taille va de 1 à 1,50 m.	Nombreuses études scientifiques
**** Stachys sylvatica***	**Epiaire des bois**	**A force de se terrer au fond des bois, on jurerait qu'elle en a pris l'odeur, lorsqu'on froisse entre les doigts ses feuilles velues sent fortement l'humus avec cependant une nuance mentholée**	**Retenue**
Syzygium aromaticum	Girofle	Odeur caractéristique chaude épicée, sucrée, fortement aromatique	Nombreuses études scientifiques
Tagetes tenuifolia	Tagette	Petites fleurs de couleur jaune au parfum de citron et d'orange	Nombreuses études scientifiques
**** Tanacetum vulgare***	**Tanaisie commune**	**Belle espèce vivace, glabre, de taille assez élevée (jusqu'à 1m50) à tiges droites, dressées, anguleuses, ramifiées au niveau de l'inflorescence, munies de feuilles profondément découpées, feuillage très aromatique**	**Retenue**
Teucrium scorodania	Germandrée	Aromatique discrète, odeur très légèrement alliacées, couleur blanc jaunâtre	Toxicité de l'huile essentielle

Nom Latin	Nom Français	Caractéristiques	Motif de sélection - non sélection
Thlapsi arvense	Tabouret	Plante annuelle glabre, de 60cm au plus, qui émet une odeur d'ail au froissement. La tige simple ou rameuse, dressée, est munie à la base de feuilles pétiolées, saveur piquante, odeur forte	Absence d'huile essentielle
**** Thymus serpyllum***	**Thym à pilosité variable, serpolet**	**Plante vivace basse (15cm au plus) longs stolons rampants sans faisceaux de feuilles ; rameaux florifères velus sur 2 faces opposées seulement (hors entre-nœud supérieur), à feuilles plus grandes près de l'inflorescence, très aromatique.**	**Retenue**
Urtica dioica	Grande ortie	C'est une des espèces les plus banales et les mieux connues à cause de ses feuilles et tiges hérissées de poils rigides qui provoquent des irritations douloureuses, goût d'haricot vert	Absence d'huile essentielle
Valeriana officinalis	Valériane des collines	Espèce vivace à souche courte très odorante qui produit des stolons terminés par des rosettes de feuilles. Les stolons sont souterrains avec des feuilles à nombreux segments étroits, très odorants	Nombreuses études scientifiques
**** Tussilago farfara***	**Tussilage**	**Particularité de fleurir avant de produire ses feuilles, saveur aromatique proche de celle de la marguerite**	**Retenue**
Viola sp	Violette	Un parfum de sucrerie	Absence d'huile essentielle
Zingiber officinale	Gingembre	Plante herbacée vivace besoin de beaucoup de soleil renferme plusieurs poils piquants	Nombreuses études scientifiques

Une étude bibliographique générale a été effectuée sur les 19 plantes aromatiques sélectionnées dans la liste II, suite à la volonté de travailler sur le plus grand nombre possible de plantes pendant la thèse, nous avons pu choisir 5 plantes aromatiques (Tableau 2) en suivant les critères de sélection suivants : (I) les plantes peu étudiées jusqu'à présent et (II) la diversité des notes odorantes.

Tableau 2: Liste des 5 plantes aromatiques selectionnées

Nom Latin	Caractéristiques organoleptiques	Nombre de publications scientifiques	Image
Achillea millefolium	Feuilles : parfum légèrement mentholé	21	
Tanacetum balsamita	Feuilles : odeur de menthe forte	17	
Calamintha grandiflora	Feuilles : saveur légèrement mentholée à dominante florale	3	
Myrrhis odorata	Tiges : sucrée et anisée	5	
Monarda didyma	Corolles : parfum citronné, goût épicé	6	

II. Etude bibliographique des cinq plantes aromatiques médiévales sélectionnées

II.1. *Achillea millefolium* : informations botaniques, structurales et culturales

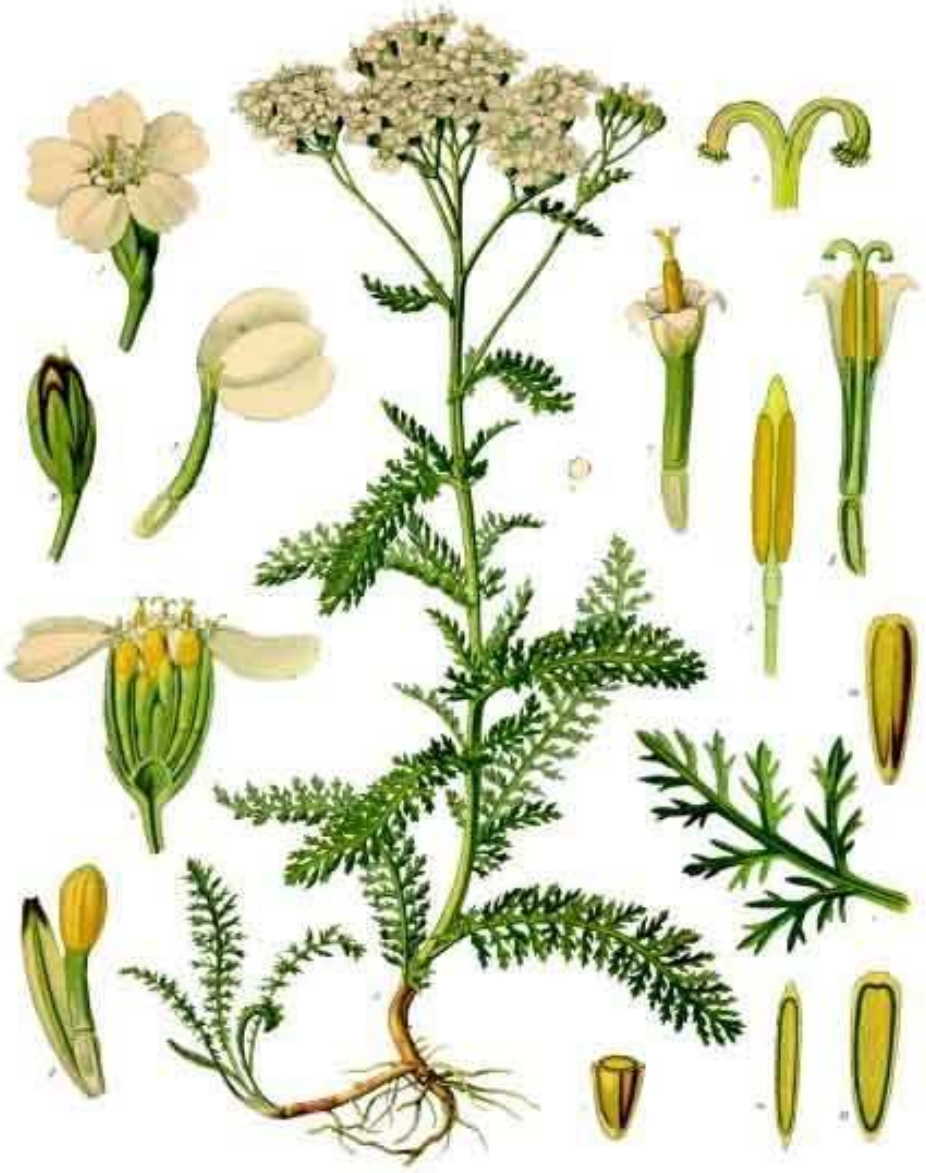


Figure 1: Planche botanique d'*Achillea millefolium* L. (Wilhelm, 1885)

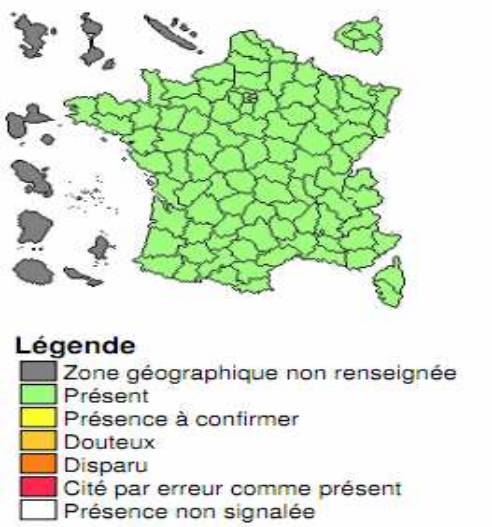
Famille : *Asteraceae*
Genre: *Achillea*
Espèce: *Achillea millefolium* L.
Sous-espèce: *Achillea millefolium* subsp. *millefolium*
Variété : *Achillea millefolium* var. *millefolium*

II.1.1. Noms et origine

Achillea millefolium L. (Asteracée), qui est connue comme l'achillée millefeuille est distribuée de façon sauvage en Amérique du nord et en Europe. Elle comprend plusieurs types tétraploïde, hexaploïde et plusieurs hybrides. Le genre Achillea est représenté par 85 espèces majoritairement répandues en Europe, Asie et Amérique du Nord. L'Achillée millefeuille a été utilisée comme herbe médicinale (Orav *et al.*, 2006), Le nom d'Achillée désigne le héros grec Achille, qui a utilisé dit on, cette plante sur le champ de bataille pour étancher le saignement des blessures de ses hommes.

Elle épanouit de mai à la fin de l'automne ses fausses ombelles blanches, parfois roses, au long des chemins, des voies ferrées, dans les terrains vagues, les cultures, les friches. Cette Astéracée se distingue des Apiacées, avec lesquelles les non botanistes pourraient la confondre, par l'examen de ses petites « fleurs » qui sont en réalité des capitules et par le fait que leurs pédoncules communs ne partent pas d'un même point sur la tige principale. Ces caractères, joints à ceux des feuilles, étroites, à bords presque parallèles, à folioles disposées sur deux rangs, et très finement découpées, la rendent aisément reconnaissable.

II.1.2. Distribution nationale



(Le réseau de la botanique francophone)

II.1.3. Usage tonique stomachique

Herbe Militaire, Herbe à Coupures, Herbe aux charpentiers, ces noms disent assez que l'Achillée millefeuille fut autrefois tenue en estime par ceux que leur profession exposait au coup de sabre ou au coup d'herminette. L'usage interne de l'Achillée Millefeuille a fait l'objet

d'un grand nombre de travaux qui ont montré son utilité comme tonique amer, hémostatique, emménagogue (AFSSAPS, 2009). On emploie les sommités fleuries dont la récolte est possible tout l'été. L'infusion à 5% est utile dans les maux d'estomac aigus et chroniques. L'infusion et la macération ont aussi une heureuse influence sur la circulation sanguine.

II.1.4. Usage hémostatique

Employée à l'extérieur en topique sur les hémorroïdes (Lieutaghi, 1966), les fissures anales, l'achillée se montre fort efficace et particulièrement sur les hémorroïdes en agissant non seulement par astringence mais aussi « d'une manière spéciale et directe sur les vaisseaux et les nerfs du rectum et cette action est tout à la fois astringente, tonique et sédative.

II.1.5. Usage emménagogue

Dans les règles douloureuses (Lieutaghi, 1966), insuffisantes ou supprimées par une cause accidentelle passagère (froid, émotion, etc..) ou même plus profonde (chlorose, affaiblissement etc..), l'usage de l'infusion concentrée de l'Achillée millefeuille est d'une efficacité reconnue et le flux menstruel peut se produire parfois une demi-heure seulement après l'absorption.

II.1.6. Autres usages

L'Achillée millefeuille est une bonne plante de gazons que l'on mêle avantageusement aux Graminées. Des tontes fréquentes doivent cependant l'empêcher de monter en fleur. Sa présence est très souhaitable dans les prairies temporaires qu'elle contribue à enrichir, la présence de plantes aromatiques et médicinales dans les herbages ayant le meilleur effet sur la santé du bétail (Lieutaghi, 1966).

Aujourd'hui, l'Achillée est utilisée principalement dans le domaine médicinal, parfois dans l'aromatisation de certaines bières.

II.1.7. Propriétés physicochimiques et biologiques

Dans les 200 années passées, l'huile essentielle d'Achillée millefeuille a été un sujet intéressant pour plusieurs investigateurs. Les premières productions de l'huile essentielle furent en 1719 par Hoffman (Hoffman, 1935). Cependant Bley (Bley, 1928) est officiellement considéré comme étant le premier qui a produit cette huile. Plusieurs recherches ont été ciblées vers l'étude de l'azulène dans l'huile essentielle depuis la découverte de sa responsabilité dans la coloration bleue de l'huile essentielle (Weber *et al.*, 2007). Oswiecimska (Oswiecimska, 1974) a démontré que la présence de l'azulène ou des précurseurs d'azulène dans les différentes variétés de l'Achillée est reliée au nombre de chromosomes. Les tétraploïdes produisent de l'azulène ; par contre, les octaploïdes et les hexaploïdes n'en produisent pas. Les auteurs ont concentré leurs travaux sur *Achillea millefolium* L. qui est une variété hexaploïde donc ne produisant pas d'azulène. La composition chimique de l'huile essentielle de l'Achillée millefeuille dépend du nombre de chromosomes de l'espèce, l'huile distillée d'une espèce tétraploïde, octaploide et hexaploïde est caractérisée par la présence de chamazulène. Les di et tétraploïdes contiennent des pro-azulènes, qui se transforment à leur tour en azulène coloré. L'huile distillée de l'Estonie et de Grèce est riche en chamazulène (jusqu'au 25%) (Orav *et al.*, 2006).

L'effet du temps d'hydrodistillation sur la formation de chamazulène et sur la variation de % des monoterpènes, monoterpènes oxygénés, et les autres familles de terpènes a été étudié par Orav *et al.* (Orav *et al.*, 2001).

En effet, les auteurs ont remarqué que le pourcentage de monoterpènes diminue avec l'augmentation de temps de l'hydrodistillation (0,5, 1, 2 et 3 heures), par contre le pourcentage des monoterpènes oxygénés reste stable. Le pourcentage de chamazulène augmente 3 fois plus en passant de 0,5 à 3heures d'hydrodistillation (Orav *et al.*, 2001).

Orav *et al.* ont analysé l'huile essentielle de l'Achillée millefeuille provenant de France (partie traitée non précisée) leur résultats montrent une quantité élevée des monoterpènes oxygénés (53,9-76,1%), principalement le camphre (jusqu'au 24,5%), ainsi les α et β-thujone (jusqu'au 26.8%), 1,8-cinéole (jusqu'au 20,3%) et artemisia cétone (jusqu'au 10,1%).

II.2. *Tanacetum balsamita* : informations botaniques, structurales et culturales

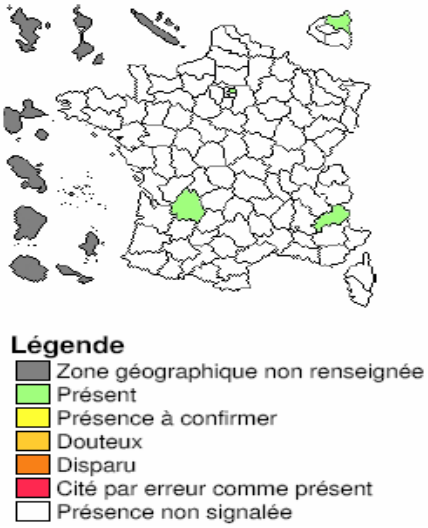
Figure 2 : Planche botanique de *Tanacetum balsamita* (Le réseau de la botanique francophone)

Famille : *Asteraceae*
Genre : *Tanacetum*
Espèce : *Tanacetum balsamita* L.

II.2.1. Noms et origine

D'origine d'Asie occidentale. C'est une plante de climat tempéré, largement naturalisée en Europe, en Afrique du Nord et en Amérique du Nord. Le chrysanthème balsamique, figure 2 est originaire des régions sud de l'Europe mais est maintenant cultivé un peu partout jusqu'en Amérique du Nord. Cette plante connue sous différents noms : herbe Sainte-Marie, *Balsamita mas*, maudin, *Balsamita foemina*, menthe-coq, et menthe de Notre-Dame.

II.2.2. Distribution nationale



(Le réseau de la botanique francophone)

II.2.3. Diverses propriétés

Cette grande composée vivace, parfois cultivée dans les jardins, forme des peuplements souvent denses dans les terrains vagues, sur les décombres, au long des voies ferrées, des berges des chemins, dans une grande partie de la France (elle est rare dans l'Ouest, le Sud-ouest et le Midi (Lieutaghi, 1966). La balsamite fleurit tout l'été ; on récolte ses sommités au début de la floraison, les semences à la maturité des capitules.

D'étroits liens de parenté unissent, dans la famille des astéracées, la balsamite et la tanaisie. L'une originaire du Midi est cultivée dans les jardins comme plante d'ornement, l'autre abondante dans l'île de France où on la rencontre sur les berges des rivières, le long des routes, dans les lieux pierreux (Leclerc, 1949). On pourrait même les confondre à n'observer que leurs nombreux capitules disposés en corymbes terminaux qui charment le regard par la teinte d'un beau jaune d'or de leurs fleurons, particulièrement éclatants chez la Tanaisie. Mais il suffit de comparer les feuilles des deux espèces pour que devienne impossible toute erreur de confusion : presque glabre et d'un vert foncé, pennatipartites. C'est-

à-dire profondément divisées en segments réguliers disposés comme les barbes d'une plume et dentés sur leur bords. Chez la Tanaisie, elles sont, chez la Balsamite, d'un vert cendré, pulvérulentes, de forme elliptique, les radicales portées par un long pétiole, celles qui garnissent la tige, sessiles. Au niveau de l'olfaction, la fragrance si agréable de menthe ne permet pas de confondre avec celle de Tanaisie.

II.2.4. Usage pharmacologique

Aux dires du capitaine Bontemps « quelle drôle d'idée, on bon toubib, d'avoir assaisonné cette salade d'eau de dentifrice et de chicotin ! », en effet, à son odeur de menthe s'ajoute une saveur d'une agressive amertume (Leclerc, 1949). C'est ce que la plante renferme, surtout à l'époque de la floraison, un principe amer qui s'y trouve associé à une huile essentielle obtenue par distillation.

Quelques 200 ans plus tard, Murray *et al.* s'exprimaient en ces termes sur le compte d'une plante si merveilleuse : « elle est inusitée, bien que son odeur semble promettre quelque activité : je lis qu'elle fortifie l'estomac, calme les coliques, favorise la menstruation, toutes choses qui n'ont rien de contraire à la raison : on peut la prescrire dans les affections hystériques »(Murray, 1792). Cette esquisse pharmacologique nous montre dans la balsamite un médicament utile à l'estomac, au foie en le rendant plus apte à remplir le rôle capital qui lui est dévolu dans les actes fondamentaux du métabolisme (Leclerc, 1949).

Tanacetum balsamita L. est bien connue comme une herbe médicinale. Elle a été utilisée depuis des siècles par les égyptiens, les romains, et les grecs. Le nom de la balsamite est dû au « balsam herb » c'est-à-dire la légèreté et le plaisir de l'odeur aromatique balsamique de l'huile, qui est présent dans des poils sécréteurs de la surface inférieure de la feuille (Leclerc, 1949).

II.2.5. Usages divers

Les semences de la Balsamite sont condimentaires ; on peut les rajouter à faibles doses sur les viandes, les gibiers, dans les pâtés, dans les gâteaux. Par macération dans l'alcool, elles donnent une liqueur assez voisine de la chartreuse mais peu recommandable en raison des propriétés convulsivantes de la plante (Leclerc, 1949). C'est une plante qui a déjà été utilisée dans le procédé de brassage de la bière pour la conservation et pour y transmettre un goût d'amertume. Les feuilles ont une senteur de menthe citronnée qui se conserve très longtemps même une fois séchées.

II.2.6. Cultures

La balsamite, rustique et vivace, vit très facilement en terres fraîches et fertiles, assez légères. On la multiplie par éclats de pieds ou par semis de graines en place au printemps. C'est une plante vivace, assez grande, jusqu'à 1,2 m, exhalant un parfum agréable rappelant celui des menthes. Les feuilles sont simples, ovales, d'une consistance ferme et à bords crénelés. Les feuilles inférieures sont longuement pétiolées, alors que les feuilles supérieures sessiles embrassent la tige. Les fleurs sont groupées en petits capitules, de 5 à 6 mm de diamètre, eux-mêmes groupés en corymbes sur une tige dressée. La plante est vivace par sa tige souterraine rampante qui émet des bourgeons.

II.2.7. Propriétés physicochimiques et biologiques

Jaimand *et al.* ont travaillé sur l'huile essentielle de la balsamite provenant de l'Iran (Jaimand *et al.*, 2005) en séparant les différents organes (feuille, fleur et tige), les composés majoritaires qui constituent la composition des trois différentes huiles obtenues sont : acétate de bornyle, pinocarvone, camphre et terpinolène, avec des variations quantitatives non significatives en fonction de l'organe étudié.

En 1968, Gockeritz a défini 2 chémotypes de *Tanacetum balsamita* en fonction de la dominance du terpène (type camphre: *Balsamita major* (L.) Desf. Asch) et type carvone: *Tanacetum balsamita* (L.) Desf. var. tanacetoïdes (Boiss) Fiori (Goeckeritz, 1968). Dans la littérature de Bestman *et al.* en 1984, on a proposé un 3ème chémotype avec la dominance des deux composés carvone et camphre dans l'huile essentielle (Bestmann *et al.*, 1984). En 1968, Gockeritz *et al.* ont analysé l'HE des feuilles de la Balsamite de type camphre (91%) (Goeckeritz, 1968). En 1938, Voight *et al.* ont analysé la composition chimique de l'HE de la balsamite type carvone (Voigt *et al.*, 1938). En 1973, Juknevicien *et al.* ont étudié la variation de la composition chimique de l'HE en fonction de phase de croissance de la plante ainsi que l'organe anatomique traité. Trois ans après, Paris *et al*. en 1976, ont identifié 1,3% de l'HE dans les fleurs et 0,7% dans la partie aérienne.

Zielincka-Sowicka *et al.* ont identifié dans les feuilles 13 composés constituant 91% de la composition totale (camphre, bornéol, isobornéol, camphène, carvone, limonène et alpha-pinène) (Zielinska-Sowicka *et al.*, 1970).

Mounfared *et al.* ont analysé l'huile essentielle de la partie aérienne séchée de la Balsamite provenant d'Iran (*Tanacetum balsamita*, L. ssp. balsamitoïdes (schultz Bip) Grierson [syn.

Chrysantemum balsamita (L.) Wild], 31 composés ont été identifiés parmi lesquels la carvone (68%) constitue le composé majoritaire (Monfared *et al.*, 2002).

Baser *et al.* ont identifié la composition de l'huile essentielle ainsi que la distribution énantiomèrique de plusieurs espèces de Tanacetum parmi lesquelles *Tanacetum balsamita*(Baser *et al.*, 2001)

En 2000 Bylaite *et al.* ont étudié la variation de la composition de l'huile essentielle de B*alsamita major* (L.). Desf en fonction des différentes phases de croissance et de la partie hydrodistillée (feuilles et fleurs) où le rendement en huile essentielle élevé a été détecté durant la phase de floraison (Bylaite *et al.*, 2000). On a remarqué qu'il n'y a pas de variation considérable de la composition selon la phase de croissance à l'exception du début de la phase (mai) où le % de carvone est plus faible que celui de la béta thujone.

En 2001, Gallori *et al.* ont analysé la composition chimique de l'HE et de l'eau aromatique des feuilles de la Balsamite d'origine Italienne (Gallori *et al.*, 2001), et la carvone a été détectée comme le composé majoritaire dans les deux parties.

Il existe également des travaux concernant l'activité insecticid de la Balsamite. Une vingtaine de composés actifs ont été identifiés dans l'HE pour leur forte activité insecticide contre les aphides (Bestmann *et al.*, 1984). Todorova *et al.* en 1989, ont focalisé leurs travaux sur la recherche des flavonoïdes dans la fraction O-dihydroxyphénolique de *Balsamita major* où on a identifié 5 composés comprenant les acides caféique, chlorogénique et férulique (Todorova *et al.*, 1989).

7 espèces de Tanacetum de différentes origines géographiques parmi lesquelles *Tanacetum balsamita,* ont été analysées pour leur potentiel élevé en flavonoïdes lipophiliques et polaires. La partie traitée de la balsamite était les feuilles où on a identifié 5 flavonoïdes (Williams *et al.*, 1999).

D'un autre côté, en 1996, Kubo *et al.* ont isolé à partir des fleurs séchées de *Tanacetum balsamita* (*Catinga-de-mulata*) d'origine brésilienne un composé actif antimicrobien qui s'appelle la Tanabaline (Kubo, 1995).

En 2003, Nickavar *et al.* ont isolé à partir de la partie aérienne de la balsamite d'origine Iranienne un flavonol (Nickavar *et al.*, 2003) dont la structure est présentée dans la figure 7.

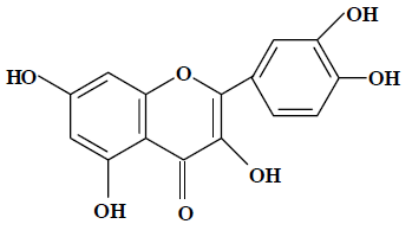


Figure 3: structure chimique de 3',4',5,7-Tetrahydroxy flavonol

En se basant sur la nature du terpène dominant on peut identifier 4 chémotypes : type camphre, type carvone, type camphre-thujone et type carvone-thujone.

II.3. *Calamintha grandiflora* : informations botaniques, structurales et culturales

Figure 4: Planche botanique de *Calamintha grandiflora* (Le réseau de la botanique francophone)

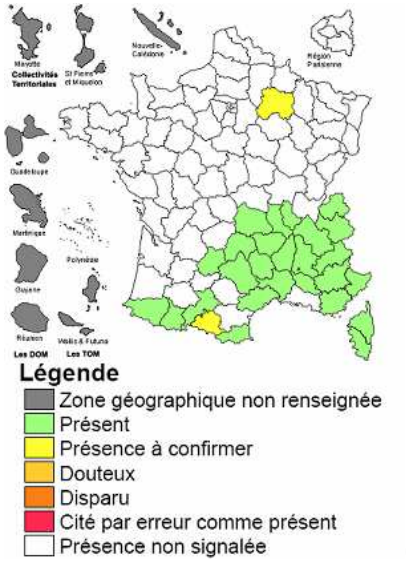
Famille : *Lamiaceae*
Genre : *Calamintha*
Espèce : *Calamintha grandiflora* (L.) Moench

II.3.1. Noms et origine

Utilisé en infusion comme une tisane, le Thé d'Aubrac est la plante la plus rare parmi les plantes sélectionnées, *Calamintha grandiflora* (L.) Moench (Syn.*Satureja grandiflora* (L.) Scheele) voir les synonymes *Melissa grandiflora* L., *Thymus grandiflorus* Scop., *Satureja grandiflora* (L.) Scheele, *Calamintha mariae,* le Thé d'Aubrac est une plante connue dans la région d'Aubrac au Massif Central en France. Elle appartient à la famille des Labiées, de taille (20-60 cm) et d'une odeur forte et pénétrante particulièrement en juillet. Plante vivace de 20-50 cm., verte, à poils épais, à odeur agréable, à souche stolonifère ; tige simple ; feuilles grandes, ovales, à long pétiole, à limbe plus long que large, fortement denté en scie à dents profondes, triangulaires, étalées ; fleurs rouge pourpre, très grandes, peu nombreuses en verticilles écartés, à pédoncules communs plus courts que les feuilles ; calice long de 12-16 mm., vert, glabrescent, à tube droit, à poils de la gorge inclus, à dents inégales, ciliées ; corolle dépassant de 18 mm. La gorge du calice, à tube arqué-ascendant ; carpelles ovoïdes, noirs. Avant les années 1990 il n'existait pas d'études chimiques dans la littérature concernant la composition chimique de son huile essentielle (Souleles *et al.*, 1990).

II.3.2. Distribution nationale

La distribution géographique de cette labiée couvre l'Europe centrale et méridionale. D'après Grualbo, il s'agit d'une espèce fréquente dans le sud-est de la France (Grualbo *et al.*, 1993), depuis le Massif Central jusqu'aux Alpes occidentales, étant aussi présente dans les Pyrénées orientales et la Corse. Récemment, Galland *et al.* ont aussi mentionné une sous espèce comme étant présente en Afrique du Nord (Rif et Atlas moyen) sous le nom de *Calamintha grandiflora* (L.) Moench subsp. Baborensis (Bali) Galland; les plantes nord-africaines présenteraient la même allure que celles d'Europe, mais seraient plus réduites, c'est à dire, avec des feuilles, calice et corolle un peu plus courts.



(Le réseau de la botanique francophone)

II.3.3. Historique de la découverte du Thé d'Aubrac dans les Pyrénées

Calamintha grandiflora est une espèce rare aux Pyrénées, notamment sur le versant méridional. Sa découverte prolonge son aire de répartition d'environ 200 km vers l'Ouest. Peut-être d'autres citations péninsulaires telles Torrecilla de Alcafiiz (Teruel), Moncayo (Zaragoza), montagnes de Santander, etc. doivent se rapporter à des confusions avec les espèces du même genre (*Calamintha sylvatica*) ou de la même famille (*Melissa officinalis*)(Grualbo *et al.*, 1993).

II.3.4. Ecologie

A peu près tous les ouvrages consultés indiquent la préférence écologique de l'espèce pour les forêts ombragées et fraîches des étages montagnard et subalpin, surtout hêtraies; cependant, la plante semble avoir été trouvée dans les sapinières et même les forêts de pin à crochets. *Calamintha grandiflora* est une espèce rare aux Pyrénées (Grualbo *et al.*, 1993) notamment sur le versant méridional. La découverte de cette labiée dans les Pyrénées aragonaises autorise l'espoir de sa présence possible dans des différentes enclaves de la vallée de Boucharo. Si, au contraire, elle n'existait que dans cette population isolée, elle courrait un risque de disparition au cas d'un élargissement de la route forestière.

II.3.5. Propriétés physicochimiques et biologiques

Dans la Littérature, il existe peu d'études concernant la composition chimique de l'huile essentielle de *Calamintha* grandiflora. Deux espèce et sous-espèces de *Calamintha* ont été étudiées dans la littérature ; les résultats montrent une différence remarquable dans la composition chimique des deux huiles essentielles. La première s'appelle *Calamintha nepeta* (L.) Savi et a comme composés majoritaires : la pulégone, la menthone et l'isomenthone. L'autre espèce s'appelle *Calamintha nepeta* (L.) Savi. Ssp. Glandulosa (Souleles *et al.*, 1990) ; cette dernière contient dans son huile l'oxyde de pipéritone, l'oxyde de pipériténone et le limonène comme composés majoritaires.

Baser *et al.* ont travaillé sur les feuilles de la *Calamintha grandiflora* (L) Monech [syn. *Satureja grandiflora* (L.) Scheele, *Melissa grandiflora* L., *Clinopodium grandiflora* (L.) Kuntze], le composé majoritaire de l'huile essentielle était l'isopinocamphone (52,59%) (Baser *et al.*, 1993).

II.4. *Myrrhis odorata* : informations botaniques, structurales et culturales

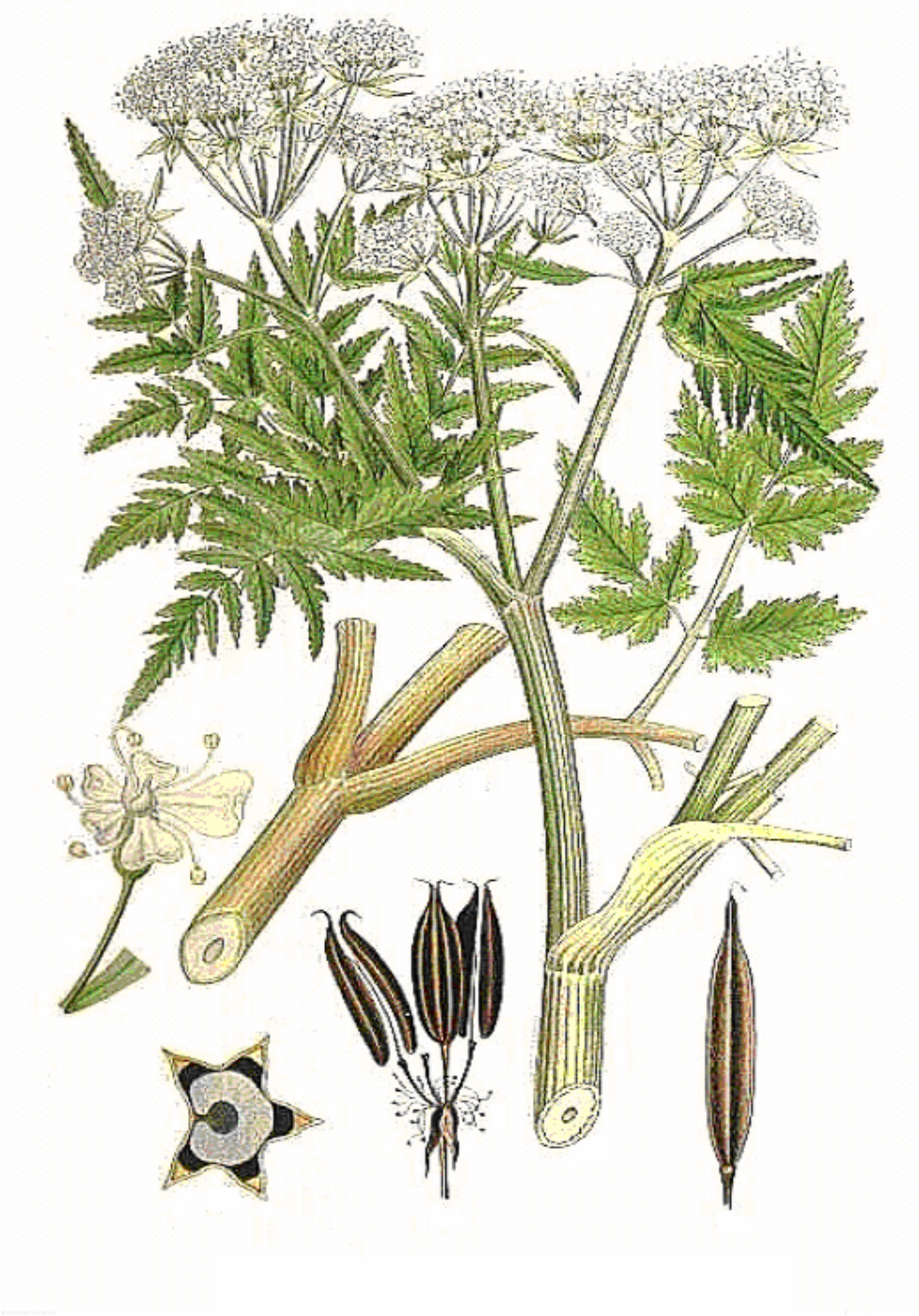


Figure 5: Planche botanique de *Myrrhis odorata* (Le réseau de la botanique francophone)

Famille : *Apiaceae*
Genre : *Myrrhis*
Espèce : *Myrrhis odorata* (L.) Scop.

II.4.1. Noms et origine

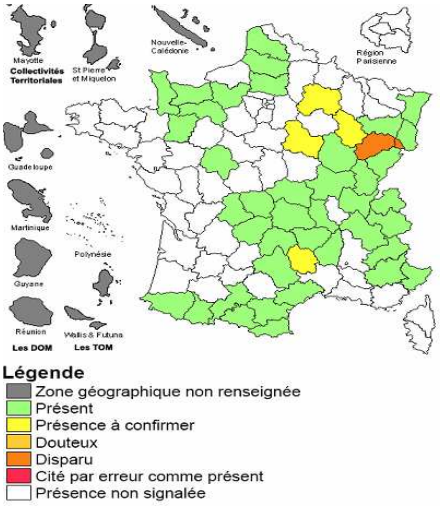
Plusieurs noms communs ont été attribués à cette plante : cerfeuil perpétuel, cerfeuil d'Espagne, fougère musquée et cerfeuil musqué.

Plante vivace de 50 cm à 1 mètre, velue, à odeur d'anis ; tige robuste, creuse, cannelée ; feuilles grandes, molles, bi-tripennatiséquées, à segments lancéolés, incisés-pennatifides ; fleurs blanches, en ombelles à 6-15 rayons pubescents, dressés à la maturité ; involucre nul ; involucelle à 5-8 folioles lancéolées, membraneuses, ciliées, réfléchies ; pétales obovales, émarginés, à pointe courbée ; styles courts, réfléchis ; fruit grand, oblong, long de 20 à 30 mm., comprimé par le côté, acuminé d'un noir luisant à la maturité ; méricarpes à 5 côtes égales, fortement carénées, tranchantes, creuses en dedans, séparées par dés vallécules profondes, sans bandelettes.

Prairies et bois des montagnes ; Vosges ; Jura ; Alpes ; Forez, Auvergne et Plateau central ; Corbières et Pyrénées. Europe centrale et méridionale.

Le cerfeuil musqué est une plante indigène en Europe; son utilisation a connu du succès au XVème siècle puis elle a disparu des jardins, pour revenir à la mode de nos jours, malgré sa difficulté de multiplication. Les anciens attribuaient déjà à cette plante des propriétés médicales extraordinaires ; d'après Apulée, elle était un remède infaillible contre les blessures, la sciatique, l'hypochondrie et autres maladies. Mais le cerfeuil musqué était surtout une plante sacrée dans les croyances populaires.

II.4.2. Distribution nationale



(Le réseau de la botanique francophone)

II.4.3. Diverses propriétés

Le cerfeuil musqué est une plante herbacée vivace de la famille des Apiacées cultivée pour ses feuilles et ses graines au goût sucré et anisé, utilisées comme condiments alimentaires (Hussain *et al.*, 1990). Toutes les parties de la plante possèdent le parfum et le goût sucré de l'anis. *Myrrhis odorata* possède des propriétés expectorante, diurétique et tonique. Elle contient une huile essentielle riche en anéthole(Kudrzycka-Bieloszabska *et al.*, 1970).
Le cerfeuil musqué est une herbe vivace qui croît jusqu'à 1 m de hauteur. Tiges dressées, creuses, très ramifiées. Les grandes feuilles, jusqu'à 30 cm, molles, sont très découpées, bi- ou tripennées, et ressemblent à celle des fougères. Petites fleurs blanches groupées en ombelles larges et étalées avec des rayons de 10 à 12 cm. Graines assez grandes, 25 mm. La plante se ressème facilement.

II.4.4. Usages divers

Le cerfeuil musqué est souvent confondu avec le cerfeuil d'âne (*Anthriscus silvestris*) qui est toxique. Le simple froissement des feuilles de *Myrrhis odorata* dégage une forte odeur anisée rappelant la réglisse. *Myrrhis odorata* permet de diminuer la quantité de sucre utilisé dans les plats sucrés (diabétiques) (Sawicka *et al.*, 1999). Elle a une action digestive. Les feuilles fraîches, crues, à odeur anisée caractéristique, peuvent servir à aromatiser les salades et crudités, omelettes et potages. Les graines sont utilisées pour parfumer les desserts.

II.4.5. Propriétés physicochimiques et biologiques

En 1982, Kubeczka *et al.* ont analysé l'huile essentielle de la partie aérienne de *Myrrhis odorata* et ont détecté 76,8 % d'anéthole en composé majoritaire (Kubeczka *et al.*, 1982). En 1990, Hussain *et al.* ont fait des tests organoleptiques afin de découvrir des agents sucrés issus des plantes. Parmi les plantes sélectionnées se trouvait *Myrrhis odorata* où l'on a identifié 85,48% de trans-anéthole et 9,08% de méthyl eugénol (Hussain *et al.*, 1990).
En 1993, l'HE des feuilles de *Myrrhis odorata* d'origine russe a été analysée par Tkachenko *et al.* où l'anéthole constitue le composé majoritaire (82-85%) (Tkachenko *et al.*, 1993).
En 1999, l'HE des feuilles de cerfeuil musqué récoltées en août en Finlande a été analysée par Usitalo *et al.* ; La composition chimique est marquée par la présence de méthyl chavicol (2,64%), l'absence de limonène, de caryophyllène et de germacrène. La présence de monoterpènes oxygénés était remarquable (Uusitalo *et al.*, 1999).

En 2005, Rancic *et al.* ont analysé l'HE de *Myrrhis odorata* en période de floraison ; le *para*-cymène était le composé majoritaire (62,0%) (Rancic *et al.*, 2005).

En général, la composition de l'huile essentielle de *Myrrhis odorata* est relativement semblable qualitativement à l'exception de l'espèce provenant de Finlande. Néanmoins, des différences quantitatives sont présentes en fonction de l'origine géographique et de l'organe traité.

II.5. *Monarda didyma* : informations botaniques, structurales et culturales

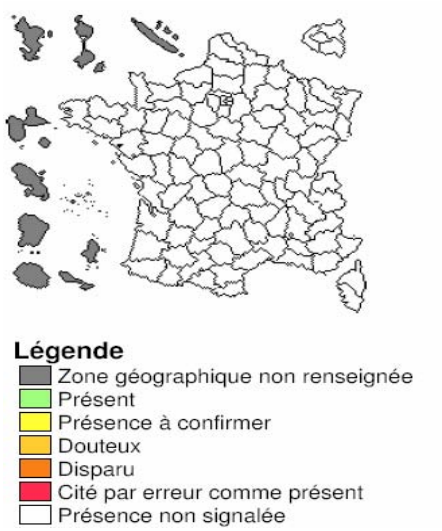
Figure 6: Planche botanique de *Monarda didyma* (Le réseau de la botanique francophone)

Famille : *Lamiaceae*
Genre : *Monarda*
Espèce : *Monarda didyma* L.

II.5.1. Noms et origine

La Monarde ou *Monarda* (bergamote en anglais) est une plante vivace originaire d'Amérique du Nord ; elle constitue l'équivalent de notre menthe ; elle appartient à la famille des Lamiacées, douce au toucher, elle dégage une forte odeur aromatique rappelant celle de la menthe et du citron.

II.5.2 . Distribution nationale



(Le réseau de la botanique francophone)

II.5.3. Diverses propriétés

Elle produit des tiges quadrangulaires, raides et dressées, vert rougeâtre. Les feuilles opposées sont d'un vert assez sombre ; elles ont une forme allongée, voire lancéolée et leur bordure présente de petites dents. De mi-juin à septembre, la floraison vient illuminer cette plante. Il existe une douzaine d'espèces de monade ; les plus cultivées sont *Monarda didyma* qui demande un sol humide et dont il existe de nombreuses variétés à fleurs blanches, roses, rouges ou violacées et *Monarda fistulosa*, plus grande (1,5 m) plus résistante à la sécheresse et aux fleurs dans les tons pourpres, rouges ou violacés.

II.5.4. Usages divers

La Monarde est utilisée pour aromatiser les plats et en infusion. On lui attribue des vertus médicinales : diurétique, antifébrile, sudorifique, carminative et antiseptique grâce au thymol qu'elle contient.

II.5.5. Propriétés physicochimiques et biologiques

Monarda didyma d'origine française analysée en 1991 par Carnat *et al.* avait le linalol (64,5-74,2%) comme composé majoritaire. Ils ont analysé l'HE des feuilles et des fleurs séparément (Carnat *et al.*, 1991). Un an plus tard Mazza *et al.* ont analysé l'huile essentielle de plusieurs hybrides de l'espèce Monarda provenant de l'hybridation entre deux espèces *M. fistulosa* et *M. didyma* (Mazza *et al.*, 1992). Une distribution de terpènes cycliques dans la majorité de ces hybrides a été rapportée.

Récemment Fraternale *et al*. ont analysé l'huile essentielle de *Monarda didyma* d'origine italienne ; l'huile essentielle a été obtenue à partir des tiges et feuilles ainsi que des fleurs. La composition de l'HE provenant de la partie aérienne (tiges et feuilles) est quasi semblable quantitativement et qualitativement à celle obtenue à partir des fleurs (Fraternale *et al.*, 2006).

En général, la composition chimique de l'espèce *Monarda didyma,* diffère selon l'origine géographique de la plante ; par contre, l'organe traité n'a pas d'influence sur cette composition.

III. Techniques d'extraction des fractions volatiles

De manière générale, la distillation est un procédé de séparation basé sur la différence de composition entre un liquide et la vapeur engendrée (Garnero, 1996). La technique implique la condensation de la vapeur et la récupération des fractions liquides résultantes. On parle de distillation simple ou fractionnée lorsqu'il s'agit de liquides miscibles. On peut également procéder à la distillation de liquides non miscibles. C'est le cas de l'hydrodistillation des huiles essentielles.

III.1. Techniques d'extraction des huiles essentielles

III.1.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage communément appelé cohobage.

Lors de la distillation des huiles essentielles, plusieurs phénomènes sont à la base d'échanges de matière entre les phases solide, liquide et vapeur, d'où l'influence d'un grand nombre de paramètres sur la qualité et le rendement de la production (Hajji *et al.*, 1985). Les expérimentations conduites jusqu'à épuisement du substrat en essence montrent que la durée de la distillation est plus longue pour les organes de plantes ligneuses que pour les herbacées.

Cette différence est fortement liée à la localisation des structures d'élaboration ou de stockage des huiles essentielles pouvant être superficielles ou internes. De ce fait, elles ont une influence sur le déroulement de l'hydrodistillation, c'est-à-dire sur les mécanismes successifs mis en jeu, et par conséquent sur la durée.

Dans le cas où ces structures sont superficielles, la membrane externe ou la cuticule qui constituent les seules barrières à la libération de l'huile essentielle, est vite rompue à ébullition, les composés volatils sont aussitôt évaporés. Lorsque les HE sont sous-cutanées, elles doivent d'abord diffuser à travers l'épaisseur du tissu végétal avant d'entrer en contact avec l'eau ou sa vapeur. Elles sont alors évaporées comme dans le cas des secrétions superficielles.

Ainsi durant la distillation, l'eau bouillante pénètre dans les cellules végétales et solubilise une partie de l'HE de l'appareil sécréteur interne. La solution aqueuse chargée de composés terpéniques, diffuserait ensuite à travers une épaisseur de tissu, plus ou moins dense, selon

l'organe, vers la surface extérieure où l'huile essentielle serait vaporisée et entraînée sous forme d'azéotrope.

Cependant, on attribue le terme d'hydrodiffusion à ce type de transport contrôlé par la polarité des constituants. Elle serait responsable de la vitesse relative de la distillation des différents composés aromatiques, dépendant davantage de leurs solubilités dans l'eau que de leurs points d'ébullition. Si l'hydrodiffusion constituait l'étape limitante de l'hydrodistillation, alors l'ordre de sortie des composés serait dicté par leur polarité et non par leur volatilité (Acquaronne *et al.*, 1998). Dans le cas de composés de volatilité et de polarité intermédiaires tels que les esters mono terpéniques, ni la vitesse d'hydrodiffusion ni la vitesse de vaporisation ne seront négligeables. L'hydrodiffusion et la vaporisation ne constituent pas les seuls mécanismes mis en jeu lors de l'hydrodistillation ; il faut leur associer la décantation qui fait intervenir une vitesse de transfert de matière entre deux phases liquides. L'isolement de composés volatils après leur distillation est déterminé dans une large mesure par leur degré de solubilité dans l'eau.

Par conséquent, l'eau résiduelle peut être plus ou moins saturée en constituants polaires selon la difficulté de séparation des phases. Celle-ci peut avoir trois origines éventuellement combinées :

une partie de l'huile essentielle est dissoute dans l'eau, soit 1% environ de la fraction décantée, rarement plus de 2% et exceptionnellement supérieure à 5% dans le cas de certains composés polaires phénoliques ;

Une autre fraction est émulsionnée le plus souvent dans 10% d'eau ;

Enfin, une quantité est fortement mélangée avec de l'eau et des molécules organiques tierces. A l'interface huile/eau, elle peut être supérieure à 10%.

Dans ces conditions, les pertes dues à une mauvaise décantation peuvent atteindre 25% et plus, de l'essence recueillie.

III.1.2. Hydrodistillation-extraction simultanée

La distillation à la vapeur (Likens-Nickerson) combine les avantages de l'hydrodistillation et de l'extraction au solvant. L'hydrodistillation permet d'éviter l'extraction des composés non volatils, et l'utilisation en faible quantité d'un solvant non miscible à l'eau facilite l'extraction des composés organiques (Pollien *et al.*, 1998).

Ce procédé très efficace, repose sur le chauffage en parallèle de la matrice (dans l'eau) et du solvant. Les vapeurs sont dirigées vers un extracteur central et se condensent sur un doigt

froid. Les liquides sont collectés et décantés dans la partie basse de l'appareil, puis retournent dans leurs ballons respectifs.

L'avantage principal de cette méthode réside dans ce recyclage, qui assure une faible consommation de solvant et la préconcentration de l'extrait. Bien que tout solvant organique non miscible dans l'eau puisse être utilisé (en ajustant l'appareil en fonction de sa densité), l'inconvénient majeur de cette méthode, tout comme pour l'entraînement à la vapeur, réside dans la formation possible d'artefacts dus au chauffage de la matrice en milieu aqueux (Chaintreau, 2001). Néanmoins, cette limite a conduit à développer des extractions sous pressions réduites à des températures proches de la température ambiante (Pillonel *et al.*, 2002).

III.2. Techniques d'extraction des composés organiques volatils (COV)

Facilement automatisables, simples, les techniques de l'espace de tête ou Headspace ne requièrent pas de grandes quantités d'échantillon (Kolb, 1999). La possibilité d'avoir des artéfacts et de contaminations est très faible si on manipule avec soin. La méthode consiste à extraire les composés organiques volatils émis par un échantillon liquide ou solide (Pillonel *et al.*, 2002; Pawliszyn, 2003). Pour cela, une petite quantité de l'échantillon est placée dans un flacon hermétiquement clos par un septum en PTFE/silicone. Un équilibre entre l'échantillon et la phase gazeuse est nécessaire, une partie de cette dernière est prélevée pour être analysée, le plus souvent par Chromatographie en phase gazeuse (CPG). Pour les matrices peu odorantes, un chauffage léger peut être appliqué pour atteindre plus rapidement l'équilibre. Ces techniques sont complémentaires des méthodes d'extraction aux solvants organiques. Cependant, la concentration relative des composés dans l'espace de tête ne reflète pas leur concentration réelle dans l'échantillon (Matich *et al.*, 1999).

III.2.1. Espace de tête statique (atmosphère confinée)

Dans la technique de l'espace de tête statique ou Static HeadSpace (SHS), la phase gazeuse en équilibre avec l'échantillon est prélevée à l'aide d'une seringue à gaz ou d'une boucle d'injection et injectée directement dans un chromatographe. Cette technique est parfaitement automatisée, reproductible et très utile pour un criblage rapide de nombreux échantillons (Kolb, 1999). L'inconvénient majeur de cette méthode est la discrimination des composés selon leur volatilité, les composés les plus volatils saturant très rapidement l'espace de tête.

L'espace de tête statique est généralement utilisé pour extraire et quantifier des composés très volatils de matrices alimentaires (Fleming Jones *et al.*, 2003).

III.2.2. Espace de tête dynamique

La méthode de l'espace de tête dynamique ou Dynamic Headspace (DHS) (Da Costa *et al.*, 2005) consiste à entraîner les composés volatils d'un échantillon à l'aide d'un gaz vecteur inerte (azote ou hélium) et de les piéger dans un tube en verre désactivé ou en acier inoxydable rempli de carbone ou d'un polymère organique poreux. Les polymères utilisés (Porapak™, Carboxen™, Tenax™, Chromosorb™) ont une grande surface spécifique et possèdent tous la propriété de retenir faiblement les composés polaires de masse molaire peu élevée. Le Tenax™ est le polymère le plus employé ; très stable thermiquement et hydrophobe, il est peu sélectif ce qui en fait un piège de choix pour extraire les COVs, puis les analyser par CPG (Pillonel *et al.*, 2002). Pour faciliter la saturation de l'espace de tête, les échantillons sont fréquemment chauffés et/ou agités pendant l'extraction. Les composés organiques retenus par le piège sont ainsi concentrés. Cependant, il est possible de dépasser la capacité du piège, ce qui peut conduire à la perte de nombreux composés lors de l'extraction.

III.2.3. Espace de tête pseudo-dynamique

Les techniques d'adsorption ou désorption sont très utilisées pour l'analyse des Composés Organiques Volatils (COV). Elles permettent l'extraction et la concentration des composés volatils sans solvant. Elles sont basées sur la partition des composés organiques entre une phase aqueuse ou gazeuse et un film polymérique de faible épaisseur. Dans ce groupe, on peut distinguer trois grandes techniques : la microextraction en phase solide (SPME), l'extraction par adsorption en espace de tête (Headspace Sorptive Extraction, HSSE) et l'extraction dynamique en phase solide (Solid Phase Dynamic Extraction, SPDE).

Microextraction en phase solide (SPME)

Cette méthode d'extraction présente l'avantage de regrouper toutes les étapes de la préparation d'un échantillon (extraction, concentration, dérivation et transfert au chromatographe) en un seul procédé. En particulier, elle peut se révéler une meilleure méthode pour les analyses qui requièrent des extractions longues et coûteuses et nécessitent une grande consommation de solvants. Elle utilise une fibre de silice (1 à 2 cm de long) recouverte d'un film polymérique pour extraire les composés organiques d'un échantillon (Burgot *et al.*, 2003). La SPME est une technique d'extraction sans solvant très simple et

rapide qui est maintenant parfaitement automatisée. Les fibres peuvent être réutilisées une cinquantaine de fois, ce qui en fait une technique peu onéreuse. Cependant, l'optimisation des conditions d'extraction peut se révéler assez longue.

En effet, il est nécessaire de déterminer la fibre la plus efficace, les temps et les températures d'incubation et d'échantillonnage, pour chaque échantillon. De plus, une fois ces conditions obtenues, il peut s'avérer difficile d'obtenir des résultats répéttitifs et reproductifs ce qui pourrait être dû à un manque d'homogénéité entre certains lots de fibres. De par sa simplicité et son coût modéré, la SPME est une bonne technique pour l'identification et la comparaison rapide et efficace d'arômes (Schmitt *et al.*, 2005); elle est utilisée pour l'analyse de nombreuses matrices alimentaires comme les produits laitiers (Lubbers *et al.*, 2004), les fruits et légumes (Wang *et al.*, 2000).

En effet, la quantité du composé cible adsorbée dépend fortement des conditions d'extraction : température, temps d'incubation et d'extraction, agitation, volumes de l'échantillon et de la phase gazeuse. Elle dépend également de la nature, de l'usure de la phase d'extraction (perte de sa capacité d'adsorption ou de sorption au cours du temps) et de la nature des autres constituants caractérisant le mélange.

IV. Composition chimique des plantes aromatiques

La composition chimique des plantes aromatiques est complexe et est constituée de deux fractions. La première fraction dite volatile (COV) est présente dans différents organes de la plante selon la famille ; cette fraction est composée de métabolites secondaires qui constituent l'huile essentielle.

Les plantes aromatiques ont la particularité de renfermer au sein de leurs organes sécréteurs, des cellules génératrices de métabolites secondaires où il apparaît clairement comment les molécules très volatiles sont synthétisées à partir d'unités méthyl-2-buta-1,3-diène (isoprène) et où les réactions d'addition de ces unités conduisent aux terpènes, sesquiterpènes, diterpènes et leurs produits d'oxydation tels que les alcools, aldéhydes, cétones, éthers et esters terpéniques. L'ensemble de ces produits sont accumulés dans des cellules sécrétrices offrant à la plante une odeur caractéristique (Heinrich *et al.*, 1983).

La deuxième fraction dite non volatile de la plante, composés organiques non volatils (CONV), est composée essentiellement de coumarines, flavonoïdes (Cisowski, 1985), composés acétyléniques ainsi de lactones sesquiterpéniques phénols ou polyphénols jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante (Kubeczka *et al.*, 1982)

IV.1. Fraction volatile des plantes aromatiques

Les huiles essentielles sont des substances odorantes concentrées, obtenues à partir de plantes par entraînement à la vapeur d'eau, hydrodistillation ou expression (pression à froid). Le terme "huile essentielle" a été inventé au 16ième siècle par le médecin suisse Parascelsus von Hohenheim afin de désigner le composé actif d'un remède naturel. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles essentielles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums (Essawi *et al.*, 2000).

La norme AFNOR NF T 75-006 définit l'huile essentielle comme: « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ». La majorité des huiles essentielles sont des liquides très peu colorés, volatils à température ambiante. Les huiles essentielles dégagent une odeur caractéristique et sont, en général plus légères que l'eau tout en possédant des caractéristiques hydrophobes.

Ce sont des molécules légères qui sont entraînées par la vapeur d'eau lors de la distillation, l'huile se sépare de l'eau du distillat mais une petite partie persiste dans l'eau et lui communique une odeur, on parle alors d'eau aromatique, à rapprocher de l'hydrolat, eau distillée aromatisée (parfois artificiellement) à laquelle on ajoute parfois de l'alcool, des stabilisants chimiques ou des conservateurs. L'utilisation par les humains des plantes aromatiques et donc des huiles essentielles est très ancienne et assez universelle ; on s'en sert traditionnellement pour conjurer le mauvais sort, se soigner, se détendre, aromatiser la nourriture, conserver les aliments.

Les huiles essentielles contenues dans les herbes aromatiques sont responsables des différentes senteurs que dégagent les plantes. Elles sont très utilisées dans l'industrie des cosmétiques, de la parfumerie et aussi de l'aromathérapie. Cette dernière se veut une technique thérapeutique par le massage, les inhalations ou les bains en utilisant les huiles essentielles des plantes. Les huiles essentielles vont servir de signaux chimiques permettant à la plante de contrôler ou réguler son environnement (rôle écologique): attraction des insectes pollinisateurs, action répulsive sur les prédateurs, inhibition de la germination des graines, voire communication entre les végétaux (émission de signaux chimiques signalant la présence d'animaux herbivores par exemple). Ces huiles sont stockées dans des structures cellulaires spécialisées (cellules à huile essentielle, poils sécréteurs (comme dans la menthe), canaux sécréteurs) et ont vraisemblablement un rôle défensif : protection du bois contre les insectes et

les champignons, action répulsive contre les animaux herbivores (Heinrich *et al.*, 1983). La concentration dans les plantes est en général faible, aux alentours de 0,1 à 2%, mais il y a des exceptions comme le clou de girofle avec 15% d'huile essentielle ou la noix de muscade, 5-15%. Parmi les familles végétales les plus productrices d'huiles essentielles, on distingue les Lamiacées (famille du Thym, de la lavande, de la menthe, du basilic etc..), les Astéracées (camomille, absinthe…), les Myrtacées (Cannelle, Laurier…), les Apiacées (coriandre…).

IV.1.1. Localisation et structure histologique des huiles essentielles

Toutes les parties des plantes aromatiques peuvent contenir de l'huile essentielle.

- les fleurs bien sur, exemples : oranger, rose, lavande ; le bouton floral (girofle) ou les bractées (ylang-ylang)
- les feuilles le plus souvent, exemples : eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge, aiguilles de pin et sapin
- les organes souterrains, exemples : racines (vétiver), rhizomes (gingembre, acore)
- les fruits, exemples : fenouil, anis, épicarpes des Citrus
- les graines : noix de muscade, coriandre.
- le bois et les écorces, exemples : cannelle, santal, bois de rose.

Les huiles essentielles sont produites par diverses structures spécialement différenciées dont le nombre et les caractéristiques sont très variables.

- les poils sécréteurs épidermiques rencontrés souvent chez les Lamiacées, Géraniacées et Verbénacées. Ils produisent les essences dites superficielles.
- les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant des cellules et des poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les *Myrtacée*, *Rutacées*, ainsi que des canaux sécréteurs chez les Apiacées.

La composition chimique d'une huile essentielle peut varier considérablement :

- dans une même plante selon les organes (feuille, fleur, fruit, bois)
- dans l'année selon la saison pour une même plante,
- selon les conditions de culture pour une même espèce végétale (ensoleillement, humidité, longueur du jour, fertilité du sol),
- selon les races chimiques (ou chemotypes) pour une même espèce (l'exemple classique est le thym avec 7 races chimiques).

IV.1.2. Phénomènes physico-chimiques et facteurs produisant l'altération des huiles essentielles

Au cours de l'hydrodistillation, le milieu aqueux possédant un pH compris entre 4 et 7 (résultant de l'immersion du matériel végétal), atteint occasionnellement des valeurs inférieures à 4 pour certains fruits. Les constituants de l'essence native sont soumis aux effets combinés de l'acidité et de la chaleur, et peuvent subir des conversions chimiques (Morin *et al.*, 1985). L'huile essentielle récupérée est un produit qui diffère sensiblement de l'essence originelle, d'autant plus que l'ébullition est longue et le pH faible.

La matière chimique présente dans le végétal fait l'objet de réactions chimiques diverses : hydrolyses, déprotonations, hydratations et cyclisations pouvant être catalysées par des métaux présents à l'état de traces dans la plante, provoquant des transformations chimiques des constituants (Koedam, 1982).

L'hydrolyse d'esters est souvent la première réaction qui se produit durant le chauffage du végétal. Elle conduit à la formation d'acides organiques qui à leur tour catalysent les réactions de cyclisation et de déshydratation. La dégradation du sabinène donne un exemple des transformations chimiques de l'huile essentielle lors de l'hydrodistillation.

Les fréquentes modifications chimiques du sabinène ont été étudiées par Koedam *et al*. (Koedam *et al.*, 1980). Ils constatèrent qu'en milieu acide dilué ce composé se transforme en terpinèn-4-ol, réaction déjà signalée par Wallach *et al*. (Wallach, 1907).

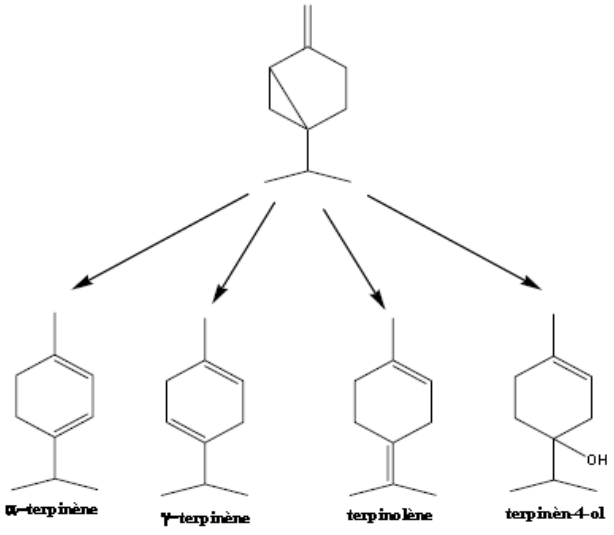


Figure 7: Principales conversions chimiques du sabinène lors de l'hydrodistillation

Divers auteurs ont confirmé ce résultat et montré que le réarrangement du sabinène produit en plus du terpinèn-4-ol, de l'α-terpinène, du γ-terpinène, et du terpinolène représentés dans la figure 7.

Pour limiter les artéfacts, Richard *et al.* préconisent de maintenir le pH proche de la neutralité et de minimiser la durée d'hydrodistillation, quand bien même, il est bien connu que la dégradation de la matière végétale induit la formation d'un milieu acide fortement tamponné.

En résumé, parmi les constituants sujets aux artefacts, les auteurs signalent particulièrement :

les monoterpènes (mono et bicycliques),

les alcools monoterpéniques,

les amino-acides soufrés et les oxydes sesquiterpéniques.

Les étapes successives conduisant à l'isolement d'une essence et les diverses transformations susceptibles de l'accompagner se traduisent par la modification de la teneur en certains constituants ou par la formation de nouveaux composés, d'où une grande variabilité de sa composition. De profondes modifications de l'huile essentielle peuvent intervenir lors de l'exploitation des végétaux depuis leur collecte jusqu'à leur transformation industrielle.

La période de récolte, les conditions de transport, de séchage et de stockage peuvent engendrer des dégradations enzymatiques. Les changements les plus importants interviennent lors de l'hydrodistillation sous l'influence des conditions opératoires, notamment du milieu (pH, température) et de la durée d'extraction.

D'autres facteurs tels que les traitements survenus avant ou pendant l'hydrodistillation (broyage, dilacération, dégradation chimique, pression, agitation) contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'huile essentielle.

Les variations de la composition des huiles essentielles provenant d'un même phénotype se développant dans le même environnement sont l'expression de différences génotypiques. Elles peuvent être attribuées à des hybridations, à un polymorphisme génétique ou à des mutations.

V. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles

Une fois l'extrait le plus représentatif obtenu, l'analyse permet d'identifier et de quantifier les produits qui le composent. Les progrès des méthodes analytiques permettent d'identifier rapidement un très grand nombre de constituants.

V.1. Chromatographie en phase gazeuse monodimensionnelle

La séparation et l'identification des constituants volatils d'un extrait présente bien moins d'alternatives que sa préparation. En effet, la CPG est la méthode de référence dans l'analyse des huiles essentielles et des COVs (Lehotay *et al.*, 2002) ; elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées (Arpino *et al.*, 1995).

V.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie (CPG/O)

Les huiles essentielles obtenues renferment très souvent des centaines de composés volatils. Le couplage CPG/O combine la séparation des composés volatils par CPG avec l'évaluation olfactive. En sortie de colonne, une partie des composés élués est envoyée vers un cône de détection nasale qui permet l'évaluation olfactive en même temps que l'enregistrement du chromatogramme.

Tous les types de détecteurs peuvent être utilisés en parallèle au port d'olfaction, mais ce sont les détecteurs FID ou de masse qui sont les plus fréquemment utilisés.

Afin d'éviter l'inconfort dû aux effluents chauds et la déshydratation de la muqueuse nasale qui conduit à une perte de sensibilité, de l'air humide est ajouté en sortie de cône (Hanaoka *et al.*, 2000). L'opérateur enregistre ses données olfactives grâce à divers dispositifs de saisie (bouton pressoir, curseur, enregistrement vocal) reliés à un ordinateur. La CPG/O trouve de nombreuses applications tant en Recherche et Développement qu'en Contrôle Qualité.

En effet, un certain nombre de composés à odeurs négatives (off flavour) ne sont pas détectés par les instruments classiques. Dans ce cas, la CPG/O est un moyen très efficace pour les mettre en évidence grâce au faible seuil de perception du nez humain.

Deux types de données peuvent être obtenus lors d'une analyse CPG/O. Tout d'abord la sensation perçue par l'évaluateur qui est décrite à l'aide d'un descripteur et l'intensité de la perception.

V.3. Chromatographie en phase gazeuse à deux dimensions

La chromatographie bidimensionnelle consiste à coupler deux colonnes de polarités différentes pour avoir une séparation parfaite. Cette méthode est appliquée aux mélanges complexes présentant de nombreuses co-élutions. Parmi les méthodes de chromatographie à deux dimensions, on distingue la méthode dite par piégeage « heart-cutting », notée CPG-CPG (Dunn *et al.*, 2004), de la chromatographie totale, notée GC×GC (Dugo *et al.*, 2005).

V.3.1. Chromatographie à deux dimensions heart-cutting CPG/SM

La CPG-CPG était la première méthode de chromatographie bidimensionnelle (Dunn *et al.*, 2004). Cette méthode consiste à sélectionner une fraction du chromatogramme qui est mal résolu sur la première colonne pour la séparer sur la seconde colonne (Schomburg, 1995)

Cette méthode consiste à utiliser deux colonnes, deux détecteurs et un système de piégeage (figure 8). Le plus souvent, la première colonne est une colonne apolaire (PDMS) de dimensions classiques. La seconde colonne est alors polaire (PEG), mais bien plus courte et de plus faible diamètre pour permettre une élution rapide. Il est également fréquent d'utiliser une colonne chirale comme seconde colonne (Marriott *et al.*, 2003). Les deux colonnes peuvent être placées dans le même four ou non. Le piégeage d'une fraction à la sortie de la première colonne se fait le plus souvent à l'aide d'une trappe cryogénique. Elle permet de stocker les composés élués de la fraction jusqu'à ce que la seconde colonne soit disponible pour l'analyse.

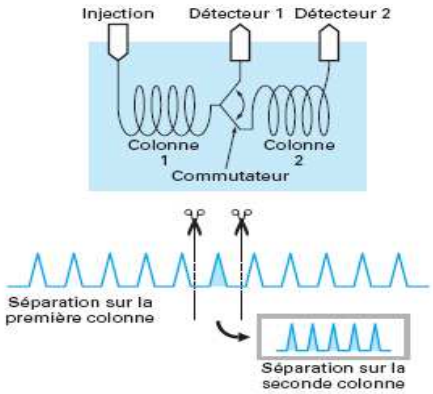


Figure 8: Séparation par une Chromatographie en phase gazeuse à deux dimensions CPG-CPG

V.3.2. Chromatographie totale CPG-2D

La chromatographie totale, ou *Chromatographie compréhensive* GC×GC, permet d'étudier tous les composés élués de la première colonne sur la seconde, non pas comme la CPG-CPG où une fraction subit une séparation sur la deuxième colonne.

Elle a pour principe l'injection continue de petites fractions éluées de la première colonne dans la seconde (Beens *et al.*, 2005). Tout comme dans la CPG-CPG, on utilise deux colonnes de polarités différentes, la seconde ayant une dimension beaucoup plus faible (0,5 à 1,5 m, diamètre interne compris entre 0,1 et 0,25 mm, épaisseur de film de 0,1 µm) (Dalluge *et al.*, 2003). Ainsi, les différentes fractions sont analysées et conduisent chacune à de petits chromatogrammes. L'ensemble des chromatogrammes enregistrés au cours de l'analyse est représenté dans un diagramme à deux dimensions, communément nommé *contour plot*, sur lequel l'abondance des composés détectés est traduite par des couleurs variables.

À l'heure actuelle, le seul détecteur de masse parfaitement adapté au couplage à la CPG-2D est le détecteur de masse à temps de vol (GC×GC/TOF-MS). Ce spectromètre possède la vitesse d'acquisition des spectres (> 500 Hz), autorisant l'enregistrement de 10 à 20 spectres par pic, nécessaire au couplage à la CPG-2D.

VI. Activités biologiques des plantes aromatiques

VI.1. Généralités

Les aliments lipidiques ne peuvent être stockés que pendant des périodes courtes à cause de la résistance insuffisante à l'oxydation par l'oxygène. Dans les aliments séchés, l'oxygène peut pénétrer très facilement dans la phase lipidique et la stabilité de ces aliments devient donc plus faible en présence d'eau. Ainsi, la stabilité des aliments séchés doit être testée, et si nécessaire, la fraction lipidique doit être préservée en rajoutant des antioxydants dans la formulation du produit alimentaire.

L'oxydation des lipides est une cause majeure de la détérioration de la qualité des aliments contenant des matières grasses, d'où l'utilisation devenue de plus en plus fréquente des antioxydants. Les antioxydants synthétiques les plus utilisés sont le hydroxyanisol butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT), ces deux composés sont assez volatils et se décomposent rapidement à des températures élevées (Branen, 1975). Il existe de sérieux problèmes concernant l'utilisation et la toxicité de ces deux produits synthétiques, tant au niveau de leur métabolisme que de leur accumulation dans les tissus de l'organisme humain

(Linderschmidt *et al.*, 1986) ; ainsi les préparations d'antioxydants naturels sont vivement recherchées.

Depuis l'antiquité, les plantes aromatiques furent utilisées le plus souvent par les parfumeries. Cependant, durant ces dernières décennies, elles sont devenues sources d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens (Bandoniene *et al.*, 2000).

Les huiles essentielles quant à elles, ainsi que les extraits aromatiques ont été utilisées pour leurs propriétés antiseptiques. Dans l'Egypte ancienne, les techniques de l'embaumement utilisant les résines aromatiques, ainsi que l'HE, produisaient une inhibition puis une destruction de tous les microorganismes présents, en assurant une conservation pratiquement infinie du corps. Dans les vieux ouvrages de médecine, les résines aromatiques ou l'HE étaient les principes actifs qu'on peut retrouver dans les différentes drogues végétales ayant des propriétés antiseptiques significatives. Dans les ouvrages les plus récents, l'utilisation des huiles essentielles dans l'aromathérapie laisse entrevoir une perspective d'alternative aux médicaments de synthèse.

Les plantes aromatiques possèdent plusieurs activités biologiques, parmi lesquelles on peut citer les activités suivantes :

* Fongistatique * Insecticide
* Nématicide * Herbicide
* Bactériostatique * Antioxydante

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne. Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens.

Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques antibactériens et antifongiques. Le thymol est très irritant, astringent et caustique.

Dans les domaines phytosanitaires et agro-alimentaires, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires.

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des Lamiacées : thym, origan,

lavande, menthe, romarin, sauge, etc…L'HE de thym d'Espagne (*Thymus capitatus*) est souvent rapportée comme étant parmi les huiles les plus actives.

Dans notre étude, nous n'allons nous intéresser qu'à deux activités biologiques : les activités antioxydantes et antibactériennes

VI.2. Technique d'extraction des antioxydants

Un extracteur de Soxhlet est une pièce de verrerie utilisée en chimie analytique et en chimie organique permettant de faire l'extraction continue par solvant d'une espèce chimique contenue dans une poudre ou dans une matrice végétale.

VI.3. Activités antioxydantes des plantes aromatiques : huiles essentielles, extraits aromatiques.

VI.3.1. Oxydation et auto oxydation

L'oxygène est le premier élément essentiel pour la vie, responsable du fonctionnement normal de tout le système aérobie (Namiki, 1990). Par contre l'O_2 est responsable d'un nombre de processus d'oxydation suivi de mauvaises conséquences comme le stress oxydatif (Dalton, 1995; Garcia-Plazaola *et al.*, 1999), la détérioration de la qualité des aliments (Finely *et al.*, 1993; Hiramatsu *et al.*, 1994; Frankel, 1996) ainsi que le désordre de la santé humaine qui est relié à l'oxydation des molécules biologiques (Bermond, 1990; Ramarathnam *et al.*, 1995).

Les substances d'oxydation peuvent avoir différentes structures chimiques que sont les protéines, ADN, acides gras non saturés, cholestérol, phospholipide, etc.…Après l'eau et l'air, la nutrition est le troisième élément essentiel de la vie. Les lipides constituent les composés majeurs de notre nutrition, leur étude est donc un sujet très important pour la protection contre l'oxydation puisqu'ils sont des éléments constitutifs des membranes cellulaires.

En raison de leur insaturation, les lipides naturels sont très sensibles à l'oxydation. Le mécanisme d'oxydation le plus connu des lipides dans les aliments est l'auto-oxydation. Ce mécanisme comprend trois phases, initiation, propagation et terminaison. La plupart des aliments contiennent des traces de métaux résultant de l'emballage ou de stockage ou même de la composition alimentaire. Des traces de métal dans l'aliment avec des concentrations inférieures à 0,5ppm sont suffisantes pour catalyser l'oxydation des lipides (Labuza, 1971; Larson, 1997). Le métal le plus actif est celui qui est capable de subir une réaction de transfert d'électron (Redox).

$$RH + M \rightarrow R^{\cdot} + MH$$

La conséquence des mécanismes d'initiation est la formation de radicaux lipidiques et ce stade du processus s'appelle Initiation de l'oxydation figure 9. La réaction est lente et la concentration du radical au début est faible. Le mécanisme détaillé dans lequel le radical libre est formé à partir d'un lipide est pour l'instant en étude.

La phase de propagation commence après que l'initiation soit finie. Le radical libre généré réagit très facilement avec l'oxygène bi radicalaire pour produire le radical peroxydé ($ROO^{\cdot}$), cette réaction est rapide et la concentration en radicaux peroxydés augmente très rapidement. Le radical peroxydé attaque d'autres molécules lipidiques afin de produire des lipides hydro peroxydés (ROOH) et la prolifération des radicaux libres dans le système. Le radical peroxydé ($ROO^{\cdot}$) est considéré comme la molécule clé dans la réaction d'oxydation des lipides. Selon le degré de saturation du lipide, le radical peroxydé peut être dissocier en des hydroxyles radicalaire ($HO^{\cdot}$) et alkoxyl ($RO^{\cdot}$) ; cette phase s'appelle liaison (Branching) le radical hydroxylé est extrêmement réactif (demie Vie 10^{-9}s) (Pietta, 2000). Il attaque toute espèce dans son entourage, ce qui va produire des milliers de radicaux libres et accélérer le processus d'oxydation.

La décomposition des hydroperoxydes donne lieu à la formation de produits volatils à faible poids moléculaire, comme les aldéhydes, les cétones, les hydrocarbures et les acides. Ces produits d'oxydation secondaire sont très importants dans le domaine alimentaire, à cause de l'odeur qu'ils produisent. Une très faible quantité de l'ordre du ppb est capable de donner une odeur inacceptable pour l'aliment (Labuza, 1971). Les produits d'oxydation secondaires participent à plusieurs réactions, comme l'oxydation, décomposition, polymérisation, etc. Les produits obtenus à partir de ces réactions affectent négativement la couleur, la texture, et la qualité de l'aliment (Bermond, 1990). Ils peuvent réagir avec des protéines et produire une désactivation des enzymes (Decker, 1998).

La présence de ces radicaux instables dans notre organisme est en grande partie responsable du vieillissement prématuré de nos cellules et de la pathogenèse de nombreuses maladies telles que les tâches sur la peau, le cancer, les maladies dégénératrices (sclérose en plaques et la maladie d'Alzheimer).

Réaction d'initiation : Formation des radicaux peroxy ($ROO^{\bullet}$), alkoxy ($RO^{\bullet}$) ou alkyl ($R^{\bullet}$).

$$RH + O_2 \rightarrow R^{\bullet} + HOO^{\bullet}$$

Réaction de propagation

$$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet} \quad (\textit{Rapide})$$

$$ROO^{\bullet} + RH \rightarrow ROOH + R^{\bullet} \text{ (Lente)}$$

$$RO^{\bullet} + RH \rightarrow ROH + R^{\bullet}$$

Réaction de Liaison

$$ROOH \rightarrow RO^{\bullet} + OH^{\bullet}$$

$$2ROOH \rightarrow ROO^{\bullet} + RO^{\bullet} + H_2O$$

Réaction de Terminaison

$$R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow \text{produits stables non radicalaire}$$

$$R^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow \text{produits stables non radicalaire}$$

$$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow \text{produits stables non radicalaire}$$

Figure 9 : Présentation schématique du processus d'auto oxydation

VI.3.2. Les antioxydants

L'oxydation des lipides est un processus qui fait intervenir plusieurs types de réactions, une variété d'intermédiaires chimiques et une multitude de facteurs. Cependant, plusieurs approches permettant de contrôler l'oxydation sont possibles.

En termes de protection et de préservation des aliments, différentes mesures pour contrôler et minimiser l'oxydation de lipides sont recherchées par les industries. Ceci implique le remplacement des acides gras polyinsaturés avec plus de lipides monoinsaturés et stables ; une hydrogénation partielle des lipides polyinsaturés, le contrôle du paramètre de stockage comme la limite d'aération, la minimisation des traces de métaux, ainsi que des conditions de stockage appropriés (Decker, 1998; Frankel, 1998). Néanmoins il est quasi impossible de maitriser pratiquement tous les facteurs qui provoquent l'oxydation. Cependant l'ajout des antioxydants peut prévenir ou ralentir le processus d'oxydation.

Un antioxydant est un réducteur, mais un réducteur n'est pas nécessairement un antioxydant (Prior *et al.*, 1999). Le terme « antioxydant » a été formulé comme « une substance qui en faibles concentrations, en présence du substrat oxydable, ralentit ou empêche significativement l'oxydation des substrats matériels » (Halliwell, 1995). « Food

antioxydant » est spécialement formulé comme « une substance qui, en faible quantité, est responsable du ralentissement de l'oxydation des composés facilement oxydables comme les acides gras. » (Frankel *et al.*, 2000). Cependant, derrière cette simple description se cache un phénomène très complexe qui est celui de l'oxydation-antioxydation.

Les antioxydants exercent leur protection à différents stades de l'oxydation lipidique et par l'intermédiaire de mécanismes différents. Une distinction doit être prévue entre une courte et une longue protection de l'antioxydant par rapport à la cinétique de réaction (Antolovich *et al.*, 2002). La classification de tous les antioxydants connus est difficile, ils sont classés généralement par leur mécanisme d'action ou par leur nature chimique.

VI.3.3. Division des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action

(i) Groupe I. Plusieurs noms ont été attribués à ce groupe par exemple, antioxydants primaires, chain-breaking, piégeur des radicaux libres. Ce genre d'antioxydants peut inhiber la réaction d'initiation et la propagation de l'oxydation en participant au processus d'oxydation et en convertissant les radicaux libres vers leurs formes inactives.

Les antioxydants primaires sont généralement des composés phénoliques (AH) capables de donner un atome d'hydrogène au radical libre et le convertir en un composé stable non radicalaire.

Les antioxydants de ce groupe réagissent de façon prédominante avec les radicaux peroxylés, pour deux raisons : la concentration élevée de ces radicaux et la faible énergie du groupement ($ROO^{\bullet}$), en comparaison avec les autres radicaux comme le ($RO^{\bullet}$) et la faible concentration du piégeur du radical libre dans l'aliment. Un piégeur du radical libre, même à des concentrations faibles, entre en compétition avec les lipides pour rendre le radical libre inactif par l'intermédiaire d'une réaction de libération d'un électron, suivie d'une déprotonation (Frankel *et al.*, 2000).

(ii) Groupe II. Les composés de ce groupe sont catalogués comme préventifs ou antioxydants secondaires. Ils englobent une large gamme de différentes substances chimiques qui inhibent l'oxydation des lipides par différents mécanismes et ne transfèrent pas le radical libre sous sa forme non-radicalaire. Avec quelques exceptions, les antioxydants secondaires sont généralement reliés à l'inhibition de facteurs initiant l'oxydation. Le groupe II inclut : des chélateurs de métaux pro-oxydatifs, des désactivateurs de l'oxygène singulet, des piégeurs de la molécule d'oxygène, inhibiteurs des enzymes pro-oxydative, enzymes antioxydantes et destructeurs des hydroperoxides.

Parfois, quelques antioxydants peuvent exercer plusieurs fonctions anti-oxydatives, par exemple, l'acide ascorbique peut être un piégeur du radical libre, désactivateur des oxygènes singulets dans une solution aqueuse et effectivement régénérer du tocophérol. Plusieurs flavonoïdes sont des piégeurs de radicaux libres et chélateurs de métaux (Miller *et al.*, 1996).

VI.3.4. Division des antioxydants suivant la nature chimique (naturel et synthétique)

Dans l'alimentation, les antioxydants les plus utilisés sont des composés phénoliques (chain-breaking). Plusieurs antioxydants synthétiques [BHT, BHA], hydroquinone de butyle tertiaire (TBHQ) et gallate de propyle (PG) (figure 10-1, 2, 3, 4) et quelques composés naturels [tocophérol, acide ascorbique, Béta-carotène] (figure 11-5, 6, 7) sont officiellement autorisés pour l'utilisation dans l'alimentation.

Cependant, des études toxicologiques ont jugé certains antioxydants synthétiques comme sources de danger (Barlow, 1990; Evans *et al.*, 1992). La recherche de nouveaux antioxydants naturels est l'objectif de nombreux industriels et scientifiques. Dans la littérature, des milliers de publications ayant pour sujet les antioxydants naturels ainsi que leur effet sur l'organisme humain peuvent être consultées (Namiki, 1990; Wanasundara *et al.*, 1994; Larson, 1997; Pietta, 2000; Moure *et al.*, 2001).

Quelques produits naturels sont déjà exploités dans le marché (Schuller, 1990). Par exemple l'acide ascorbique, le tocophérol, l'huile de sésame, l'huile d'olive (Pratt, 1980; Taga *et al.*, 1984; Altarejos *et al.*, 2005; Perez-Bonilla *et al.*, 2006).

Des recherches intensives sur plusieurs plantes on été entreprises, plusieurs composés actifs ont été isolés et évalués comme étant des antioxydants. Dans la majorité des cas le composé actif est un composé phénolique (Cuvelier *et al.*, 1992; Marinova *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1997), des isoflavones, ou phenylpropanoides, de l'acide phénolique (figure 11-8, 12) (Cuvelier *et al.*, 1992; Marinova *et al.*, 1992; Rice-Even *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1997), flavonoïdes (figure 11-14, 15) (Rice-Even *et al.*, 1994; Heilman *et al.*, 1995; Pietta, 2000), isoflavones (figure 11-16), catechine (figure 11-17) (Kanner *et al.*, 1994), phenylpropanoide (figure 11-19), anthocyanidine (Wang *et al.*, 1998), et chalcones.

La propriété antioxydante des composés phénoliques est déterminée par sa richesse en électrons libres, ce qui implique une libération facile de cet électron suivie de la déprotonation de son groupe hydroxyle (Frankel *et al.*, 2000).

Chez les plantes, les substances naturelles se trouvent sous forme de mélange complexe, qui assure la protection de la plante contre le stress oxydatif dû aux effets

synergiques ou additifs (Pratt, 1980; Moure *et al.*, 2001). L'utilisation des extraits de plantes ou de fractions enrichies est devenue aujourd'hui une façon très attractive pour préserver les aliments. De plus, il a été démontré que plusieurs produits naturels (antioxydants) avaient des propriétés médicinales, par exemple : anti cancérigène, anti-inflammatoire (Madhavi *et al.*, 1995). Cependant il faut contrôler le fait que le produit « naturel » soit inoffensif. Par exemple, on a démontré *in vitro* que quelques flavonoïdes peuvent être mutagènes (Sahu *et al.*, 1993).

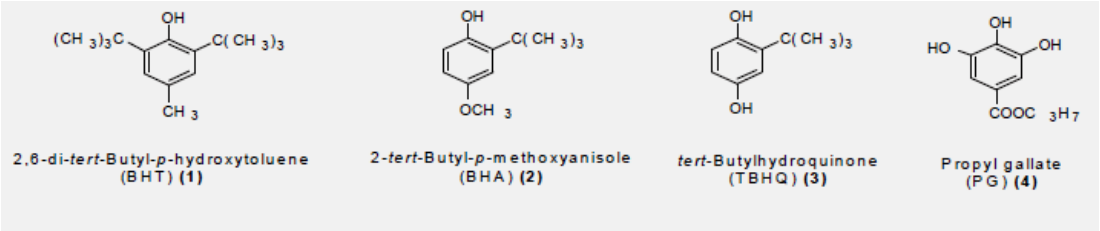


Figure 10: Structures chimiques de quatre antioxydants synthétiques

D'un point de vue général, un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques en rompant la chaîne des réactions radicalaires. Et d'un point de vue chimique, un antioxydant n'est qu'un composé réducteur ; il va donc pouvoir réagir avec un oxydant pour le neutraliser. Les antioxydants vont alors réduire les radicaux libres en annihilant ainsi leur action. Les antioxydants sont capables de stopper les réactions en chaîne décrites précédemment et empêchent donc la formation de molécules très réactives ou provoquent l'élimination de ces espèces avant l'endommagement des constituants de la cellule.

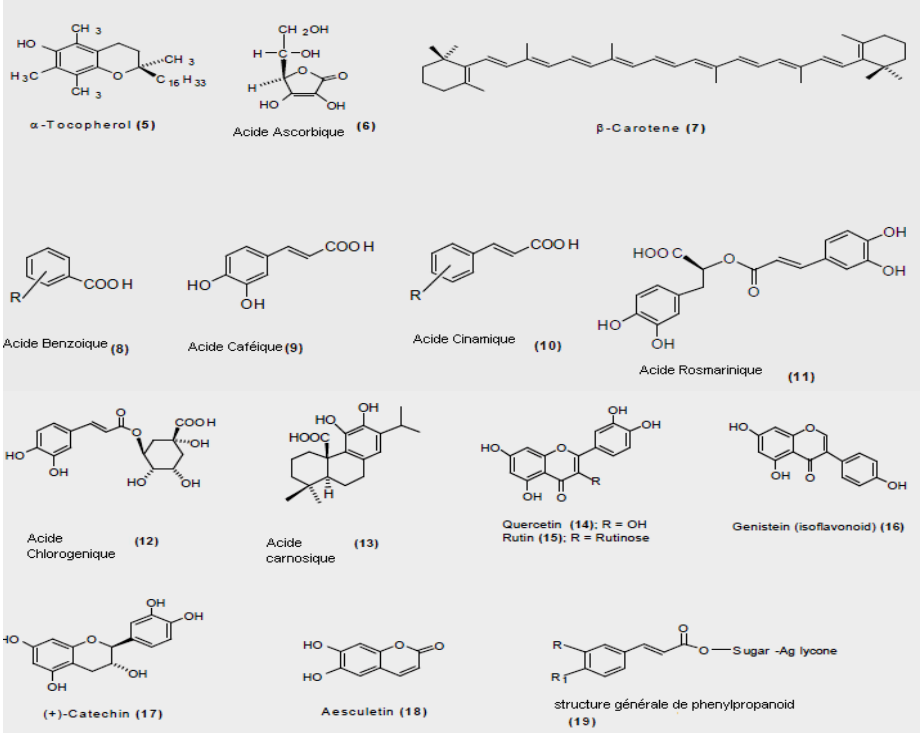


Figure 11: structures chimiques des antioxydants naturels

Tout organisme vivant possède un système d'antioxydants et d'enzymes qui agissent ensemble pour empêcher l'endommagement des composants des cellules comme l'ADN, les lipides et les protéines. Par exemple, notre organisme est capable de produire, à partir de l'acide aminé cystéine, un antioxydant puissant, l'acide alpha-lipoique, conduisant aux sels encore appelés lipoates. De nombreux extraits de plantes, en particulier ceux qui sont riches en composés polyphénoliques, montrent certains effets antioxydants. Les plantes produisent de nombreux antioxydants pour se protéger, tels le glutathion, la vitamine C, la vitamine E, ou des enzymes telles que la catalase, la superoxyde dismutase et certaines peroxydases. Les fruits et les légumes sont bien connus pour être riches en antioxydants. Les fruits notamment ceux dits rouges, tels les airelles, du fait de la présence conjuguée de vitamine C et de polyphénols, et pour les légumes ayant la plus forte concentration en antioxydants ; on trouve la tomate, le cresson, l'ail, le chou vert, l'épinard, la betterave…Il faut savoir que lors de la cuisson de ces aliments, certains antioxydants tels que la vitamine C sont inactivés, alors que d'autres se transforment pour devenir plus actifs ou plus facilement absorbables par le système digestif.

VII. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

VII.1. Généralités

Dans la littérature, plusieurs méthodes et techniques ont été trouvées pour suivre l'état d'oxydation des lipides et ainsi évaluer l'activité antioxydante (Shervin, 1968; Ragnarsson *et al.*, 1977; Namiki, 1990; Frankel, 1996). En principe, si un composé montre une faible activité antioxydante *in vitro*, il est très rare qu'il présente une activité meilleure *in vivo* (Hanasaki *et al.*, 1994). Les mécanismes d'oxydation et de prévention *in vivo* sont différents à cause de la perméabilité cellulaire et le processus de transport (Antolovich *et al.*, 2002) et ne sont pas discutés dans cette thèse.

La majorité de ces méthodes contient des phénomènes chimiques, des processus physiques et des instrumentations incluant : Chromatographie GC, HPLC, ainsi que plusieurs techniques ; spectroscopies UV/Visible, IR, Fluorimétrie, SM, RMN. La plupart des procédés analytiques exigent un prétraitement avant la mesure proprement dite. Ces méthodes couvrent les antioxydants primaires et secondaires.

La plupart des méthodes mesure un paramètre particulier en fonction du temps, d'autres méthodes enregistrent la vitesse d'oxydation (bombe à oxygène, gain de poids, mesure des radicaux libres par EPR). Pour diminuer le temps d'analyse, des températures élevées sont appliquées. Le stockage à température ambiante est toujours utilisé ; ainsi il est plus représentatif des circonstances de la vie réelle de l'aliment. Pour simplifier le protocole expérimental et pour faciliter les études théoriques, des systèmes modèles ont été élaborés comme le β-carotène bleaching test (Bocco *et al.*, 1998).

Quelques analyses permet de mesurer la quantité du produit intermédiaire ou final généré par une oxydation (diènes conjugués, TBARS). A cause de la propriété essentielle de l'antioxydant (piégeur des radicaux libres), plusieurs méthodes ont été mises en place pour évaluer l'efficacité de l'antioxydant à piéger les radicaux libres (ABTS, DPPH).

Afin de choisir la bonne méthode, il faut savoir ce que l'on va mesurer et évaluer. Par exemple, la quantité des hydroperoxydes accumulée doit être mesurée avant qu'ils ne commencent à diminuer ; après la décomposition des hydroperoxydes, le degré d'oxydation de l'échantillon doit être mesuré en se basant sur la formation des produits d'oxydation secondaire.

VII.2. Quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Les avantages et les limites des méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante ainsi que les références sont présentées dans le tableau 3. Il est clair qu'il serait difficile de développer une méthode qui prenne en compte tous les paramètres et qui soit applicable sur tous les substrats et les antioxydants.

Tableau 3: Les avantages et les limites de quelques méthodes d'estimation de la stabilité des lipides et d'évaluation de l'activité antioxydante

Méthodes	avantages	limites	référence
Test de stabilité huile/graisses			
Gain de poids	+ simple performance + équipement commun + reproductibilité satisfaite	– faible sensibilité – formations des composés volatils qui affectent les résultats	(Wanasundara *et al.*, 1994; Pokorny *et al.*, 1997; Frankel, 1998)
Bombe à oxygène	+ reproductibilité excellente + mesure la vitesse d'oxydation + faible quantité d'échantillon	– T°C très élevées – Contamination provenant du tissu en papier couvrant l'échantillon	(Huang *et al.*, 2005)
Méthodes d'évaluation des antioxydants			
HPLC Analyse de changement de la composition en acide gras	+ très sensible + reproductible + information quantitative et qualitative sur les acides gras impliqués dans l'oxydation	– besoin de connaissance sur la nature et la rétention des composés analysés – instruments coûteux	(Gebicki *et al.*, 1989; Frankel, 1998)

Valeur du peroxidation	+	Information sur les hydroperoxydes formés	–	Non adaptable avec l'étude avancée de l'oxydation→hydro peroxyde commence à se décomposer	(Gebicki *et al.*, 1989; Takao *et al.*, 1994; Frankel, 1996; Zhang *et al.*, 1996)
	+	Adaptable dans le milieu huileux			
Titration iodometrique	+	Protocole analytique commun	–	non adaptable avec le matériel biologique	(Gebicki *et al.*, 1989; Takao *et al.*, 1994; Yen *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996)
	+	Précise	–	possibilité d'oxydation d'iode	
	+	sensible			
Diènes conjugués	+	sensible	–	Présence d'autre chromophore qui absorbe	(Kanner *et al.*, 1994; Frankel, 1998; Madsen *et al.*, 1998; Prior *et al.*, 1999; Antolovich *et al.*, 2002)
	+	reproductible	–	exige une oxydation douce pour éviter la formation d'hydroperoxide	
	+	résultats ne dépend pas de la réactivité chimique	–	Non adaptable avec les huiles hydrogénées qui contiennent des diènes	
	+	rapide	–	Absence d'information sur la structure des composés	
	+	mesure une courte période d'oxydation			
	+	faible quantité d'échantillon			
	+	utilisation de méthode spectroscopique simple			
	+	adaptable avec les émulsions et l'huile.			

TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)	+	Simple	–	pas trop sensible pour les lipides mono et di insaturés	(Moller *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1991; Jacobson, 1993; Miura *et al.*, 1998)
	+	Sensible, surtout pour les lipides poly insaturés	–	les conditions de la réaction affectent le développement	
	+	Précise	–	grande influence des paramètres de la réaction (lumière, température, temps de chauffage, présence des ions métalliques ou des amines)	
	+	utilisation de méthodes spectroscopiques simples	–	protocole expérimental provoque parfois des artéfacts	
	+	bonne corrélation avec l'analyse sensorielle des huiles végétales			
B-carotène bleaching test	+	simple	–	non spécifique	(Marco, 1968; Miller *et al.*, 1993; Dapkevicius, 1998; Fukumoto *et al.*, 2000)
	+	rapide	–	influence des conditions expérimentales	
	+	sensible	–	les données obtenues ne sont pas reliées directement à l'état d'oxydation actuel	
	+	utilisation des méthodes spectroscopiques simple	–	mécanisme d'oxydation pas clair	
Autres méthodes d'évaluation des antioxydants					
ORAC (capacité d'absorbance du radicale oxygéné)	+	spécifique	–	nécessite un détecteur fluorimétrique	(Pieri *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1998)
	+	adaptable à plusieurs antioxydants	–	non linéaire en fonction du temps	
			–	longue	

RPE (Résonnance Paramagnétique Electronique)	+	la seule technique analytique qui détecte les radicaux libres dans l'auto oxydation	–	nécessite des instruments sophistiqués	(Yang *et al.*, 1991)
	+	sélective	–	l'application directe sur l'oxydation des lipides est limitée à cause de la courte durée de vie des radicaux libres	
	+	détecte et évalue même les radicaux de courtes durées de vie			
IR (infrarouge)	+	enregistre la formation et la disparition des produits d'oxydation	–	non spécifique	(Frankel, 1998)
	+	très faible quantité d'échantillon	–	non sensible	
	+	simple			
	+	rapide			
H-RMN	+	non destructive	–	le changement de profils des acides gras a un effet sur l'oxydation primaire et secondaire	(Wanasundara *et al.*, 1994)
	+	très faible quantité d'échantillon	–	non spécifique	
	+	rapide	–	non sensible	

VIII. Huiles essentielles comme agents antimicrobiens

VIII.1. Généralités

Depuis l'Antiquité, les extraits aromatiques des plantes ont été utilisés dans différentes formulations, comme pour les médicaments et la parfumerie (Heath, 1981). Les huiles essentielles ont été considérées comme les agents antimicrobiens les plus efficaces présents dans ces plantes.

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ième siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues à la fraction des huiles essentielles contenue dans les plantes. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums. Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle, a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances (Essawi *et al.*, 2000). Depuis deux décennies, des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des huiles essentielles dans le domaine alimentaire.

Les effets antimicrobiens de différentes espèces d'herbes et d'épices sont connus depuis longtemps et mis à profit pour augmenter la durée de vie des aliments. Ainsi, les huiles essentielles, actuellement employés comme arômes alimentaires sont également connus pour posséder des activités antimicrobiennes et pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires, et ce d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés "généralement reconnus comme sains" (Generally Recognized As Safe GRAS), ou approuvés comme additifs alimentaires par la Food and Drug Administration. Ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments ; cependant, des études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité antimicrobienne.

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (Sipailiene *et al.*, 2006). Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudomycéliums alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

VIII.2. Mode d'action contre les bactéries

L'activité antimicrobienne des HE a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale. Cependant, la majorité des travaux cités dans ces publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de ces HE. Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude pouvant nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des HE. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

* attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
* acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
* destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

IX. Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antimicrobien des HE a une grande influence sur les résultats. Des difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des HE dans l'eau, de leur volatilité et de la nécessité de les tester à faibles concentrations. A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide.

IX.1. Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque)

La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de culture ensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Le diamètre de cette zone d'inhibition autour du disque de l'antimicrobien est corrélée avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière bactérie/antimicrobien, la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai. Généralement, plus la zone d'inhibition est importante, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne des organismes est faible.

La mesure manuelle des zones d'inhibition peut prendre du temps. Les dispositifs automatisés avec zone de lecture sont disponibles et peuvent être intégrés avec le rapport de laboratoire et les systèmes de manipulation de données. Les disques devraient être distribués également de sorte que les zones d'inhibition autour des disques antimicrobiens dans l'essai de diffusion en disque ne se chevauchent pas et qu'ainsi la zone d'inhibition puisse être déterminée. Généralement cela peut être effectué si les disques sont distants d'au moins 24 mm de centre à centre, bien que cela dépende de la concentration du disque et de la capacité de l'antimicrobien à diffuser dans la gélose.

IX.2. Technique en milieu liquide (méthode de dilution)

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

IX.2.1. La dilution en bouillon

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

IX.2.2. La dilution en gélose

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

Chapitre II

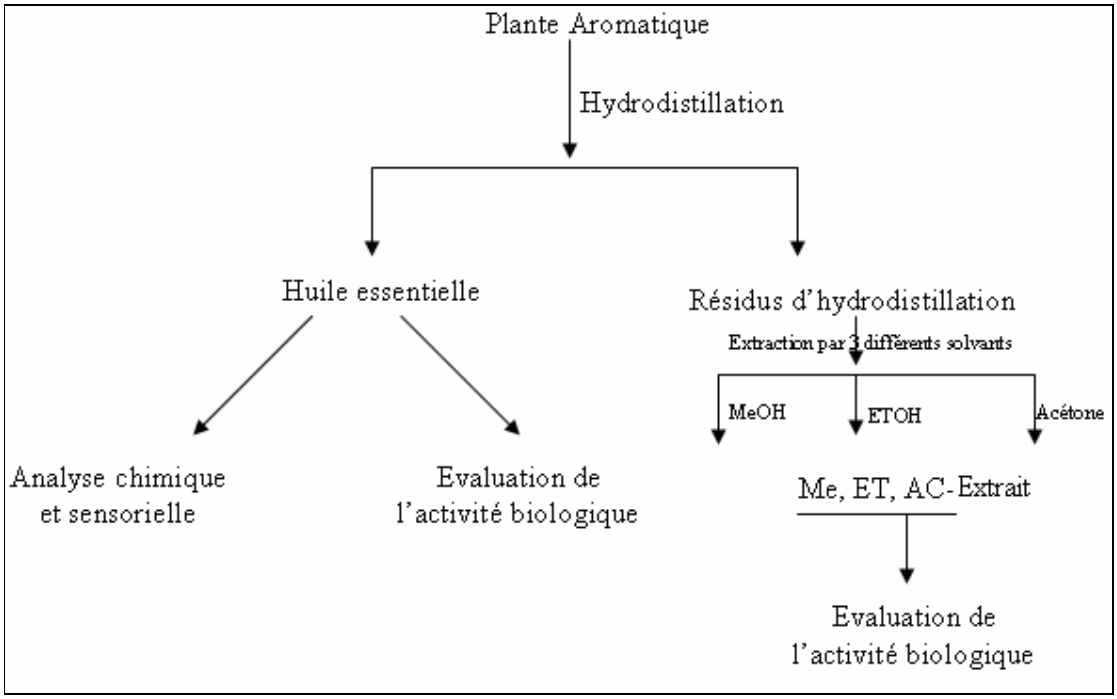
Caractérisation des composés organiques volatils de cinq plantes aromatiques médiévales ; Evaluation de l'activité biologique des huiles essentielles et des résidus d'hydrodistillation

Résumé

Les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des plantes aromatiques selectionnées ont été caractérisées par analyse chimique puis sensorielle. Une pyramide olfactive a été établie en définissant les notes de tête, de cœur et de fond. Des analyses sensorielles par CPG-SM-O ont permis de décrire le profil aromatique des extraits.

L'activité antioxydante des huiles essentielles mais également des résidus d'hydrodistillation a été évaluée par trois méthodes différentes : Oxipress, méthode spectroscopique et DPPH.

Enfin l'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée par deux méthodes différentes : diffusion sur Agar et plaque de microtitration. Les résultats de ces travaux montrent une activité antioxydante et une activitée antibactérienne significative pour l'ensemble des cinq plantes.



Introduction

Chacune des cinq plantes aromatiques sélectionnées va être fractionnée par hydrodistillation. Les différentes fractions obtenues seront ensuite caractérisées par des analyses chimiques, biologiques et sensorielles (voir schéma ci-dessous).

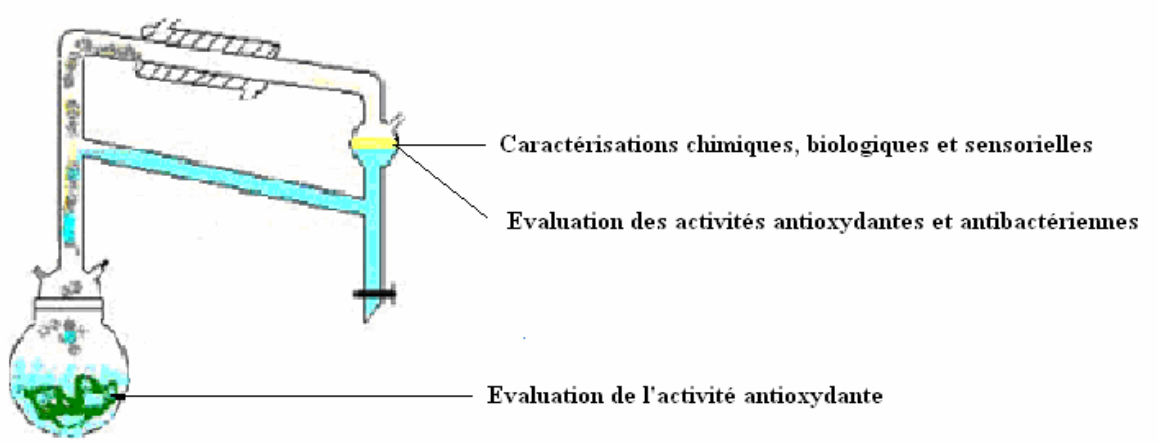


Schéma réprésentatif des différentes études effectuées dans le chapitre II.

I. Composition chimique des huiles essentielles

I.1. *Achillea millefolium* : caractérisation de la fraction volatile des parties aériennes

L'Achillée millefeuille utilisée dans cette étude est de nature sauvage. Elle a été récoltée par cueillette dans la banlieue sud-est de Toulouse durant le mois de mai 2008. L'identification botanique a été effectuée par le Pr. Isabelle FOURASTÉ. Un échantillon d'herbier a été déposé à l'herbier du Laboratoire de pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Toulouse (Université Toulouse III) sous le numéro « Ast 251 (2008) (I.F) ». La partie aérienne fraîche comprenant les sommités blanches fleuries a été hydrodistillée pendant 3 heures afin d'obtenir une huile essentielle de couleur jaune à tendance verte. Le rendement d'hydrodistillation est de $0{,}07 \pm 0{,}01\%$ par rapport à la matière sèche. La méthodologie ainsi que les différentes quantités utilisées sont décrites dans la partie expérimentale (cf. I.1.3). L'extraction de l'huile essentielle a été répétée six fois.

Etude cinétique de l'extraction par hydrodistillation d'*Achillea millefolium*

Dans le but d'optimiser la durée d'extraction, nous avons étudié la cinétique du rendement en huile essentielle par rapport à la matière sèche (figure 12).

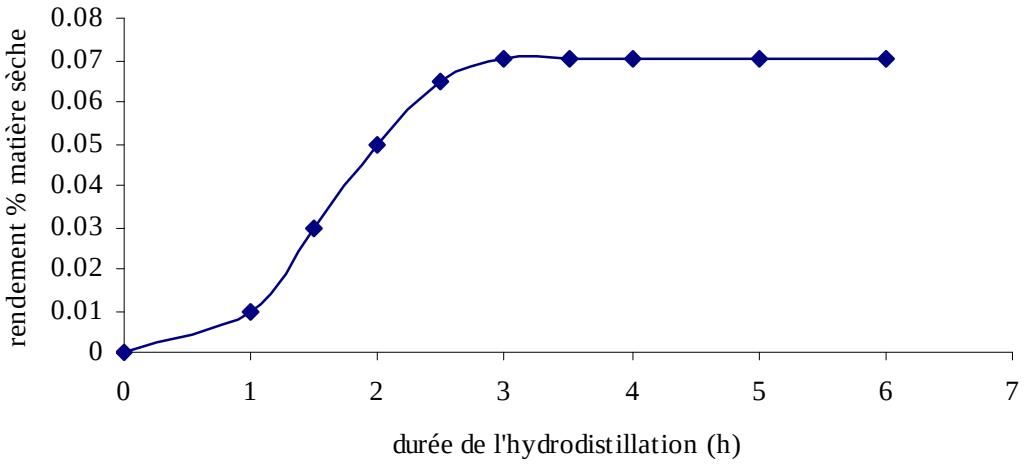


Figure 12: Cinétique d'hydrodistillation de l'Achillée millefeuille en fonction du temps

La vitesse d'extraction augmente progressivement jusqu'à 3h pour atteindre un plateau. Le temps optimum de cette hydrodistillation est d'environ 3h. En accord avec la bibliographie nous proposons de fixer la durée d'hydrodistillation des plantes à 3 heures.

I.1.1. Composition chimique de l'huile essentielle *d'Achillea millefolium* et discussion

Après extraction par hydrodistillation des parties aériennes, la composition de l'huile essentielle est analysée par chromatographie en phase gazeuse à ionisation de flamme couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM-DIF) (Clarus MS 500, Perkin Elmer). Le mode opératoire est détaillé dans la partie expérimentale (cf. II.2.2). Les résultats analytiques sont regroupés dans le tableau 6.

L'identification est réalisée à l'aide des indices de rétention calculés sur la base des n-alcanes C_5-C_{18}, des spectres de masse obtenus en ionisation par impact électronique (EI, 70eV) comparées aux bases de données NIST 2005, Wiley 275 et des données de la littérature (Mclafferty, 2005).

A partir de l'Achillée millefeuille poussant sous forme sauvage à Toulouse, nous avons pu obtenir une huile essentielle par hydrodistillation de la partie aérienne fraîche. Cette huile essentielle possède une odeur caractéristique et forte de choux mentholé. Le rendement de l'hydrodistillation varie de manière significative selon l'origine de la plante et apparait relativement faible par rapport à ceux obtenus par d'autres auteurs (Kalinkina *et al.*, 2000; Orav *et al.*, 2001; Todorova *et al.*, 2001). Il se révèle être néanmoins similaire à celui obtenu avec des espèces indiennes (Shawl *et al.*, 2002). L'intensité de la couleur dépend de la quantité de chamazulène présent dans l'extrait, ce dernier provient de la dégradation de la matricine durant l'hydrodistillation (Orav *et al.*, 2001).

L'huile essentielle est un complexe mixte de 50 composés, parmi eux 45 composés ont été identifiés constituant 96% de la quantité totale de l'HE (Tableau : 4). La fraction de monoterpènes oxygénés comme le camphre (12,6%), le sabinène (6,7%), le trans-acétate de chrysantényle (6,6%), le 4-terpinéol (5%), l'isocyclocitral (4,5%), l'eucalyptol (4%) et le béta-pinène (3,3%) constituent la majorité de la composition de l'huile essentielle, puis viennent les sesquiterpènes et les sesquiterpènes oxygénés qui sont présents à 19%, comme le

germacrène-D (11,73%) et le (E)-nérolidol (7,2%). La structure chimique des composés majoritaires est représentée dans la figure 13.

Tableau 4: Résultats des analyses par CPG-DIF-SM de l'huile essentielle *d'Achillea millefolium* issues de l'hydrodistillation des parties aériennes

Pics	IR[a] (TIC)	IR[a] (FID)	IRth[b]	Identification[c]	%[d]	CV[e]
1	801	800	790	Hexane-2,3-dione	0,05	8,05
2	848	849	854	3-hexène-1-ol	0,22	16,67
3	923	926	927	hexanoate de méthyle	0,18	13,84
4	931	935	939	alpha-pinène	1,70	8,05
5	947	952	954	camphène	1,60	8,09
6	970	974	975	**sabinène**	6,72	10,46
7	976	981	979	béta-pinène	3,28	8,69
8	1015	1018	1017	alpha-terpinène	0,70	8,29
9	1022	1025	1026	*para*-cymène	0,82	10,09
10	1030	1034	1031	1,8-cinéole	4,03	9,28
11	1055	1058	1060	gamma-terpinène	1,71	10,55
12	1083	1086	1089	terpinolène	0,35	6,82
13	1099	1099	1097	linalol	1,78	12,09
14	1103	1103	1101	nonanal	0,61	11,49
15	1115	1119	_	isocyclocitral	4,48	10,36
16	1122	1126	_	béta-terpinène	0,39	4,26
17	1134	1138		ni	0,28	22,57
18	1138	1144	1139	trans-pinocarvéol	0,55	22,18
19	1146	1151	1146	camphre	12,64	11,38
20	1160	1163	_	2,4,6-triméthyl-3-cyclohexène-1-carboxaldéhyde,	1,76	11,37
21	1170	1175	1169	bornéol	2,25	10,20
22	1179	1183	1189	4-terpinéol	4,70	3,90
23	1193	1198	1196	cis-*para* menthane-2-one	1,46	7,66
24	1228	1228	1236	trans-acétate de chrysanthényle	6,55	13,32

25	1280	1285	1289	acétate de bornyle	1,17	15,28
26	1317	1321	_	1,3,8 p-menthatriène	0,31	3,19
27	1355	1355	_	acétate de linalol	0,31	1,37
28	1370	1377	1377	copaène	0,52	6,75
29	1382	1385	_	isolédène	0,12	15,64
30	1422	1415	1419	béta-caryophyllène	1,42	7,45
31	1447	1462	_	cis-alpha-bisabolène	0,54	1,31
32	1474	1483	1485	**germacrène-D**	11,73	13,09
33	1487	1496	1492	méthyl-isogénol	0,98	9,24
34	1505	1513	1514	gamma-cadinène	0,35	1,10
35	1509	1517	1523	delta-cadinène	1,22	21,02
36	1532	1542	1546	alpha-calacorène	0,35	38,73
37	1547	1553	1550	élemol	1,57	13,48
38	1555	1559	1563	**(E)-nérolidol**	7,23	15,84
39	1567	1574		ni	0,84	17,21
40	1572	1584	1572	alcool caryophyllénique	1,97	28,78
41	1584	1596	1583	oxyde de caryophyllène	1,88	11,18
42	1594	1603		ni	1,21	13,17
43	1598	1610	1596	viridiflorol	1,41	14,41
44	1616	1625	1623	céderène-epoxide	0,46	4,42
45	1626	1638		ni	1,14	12,58
46	1631	1641		ni	0,54	35,58
47	1644	1654	1651	béta-eudesmol	1,09	37,66
48	1653	1659	1652	cedr-8(15)-en-10-ol	0,19	28,94
49	1661	1669	1658	alcool patchoulique	0,79	26,38
50	1674	1683	1686	alpha-bisabolol	1,49	33,77

[a]indice de rétention calculé à partir des n-alcanes C_5-C_{18}.

[c]identification réalisée à partir des [b]indices de rétention théoriques (IRth) des librairies Adams, NIST, Agilent France, Wiley, Hewlett Packard France et de la littérature

[d]pourcentage moyen sur 6 réplicats

[e]coefficient de variation (%)

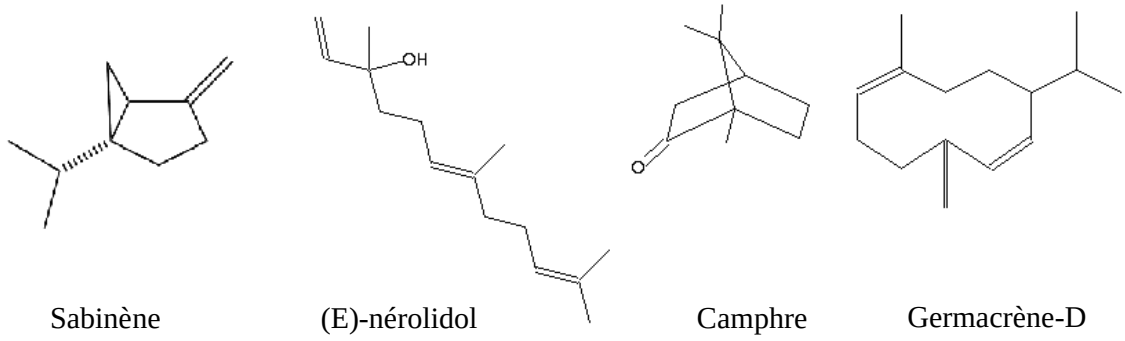


Figure 13 : Structures chimiques de quelques composés majoritaires de l'huile essentielle de l'Achillée millefeuille

En comparant la composition de l'huile essentielle d'Achillée millefeuille provenant de la région toulousaine avec d'autres huiles issues de différentes origines géographiques (Tableau : 5), nous avons observé que la plupart des composés majoritaires de l'huile essentielle ont été identifiés par Orav et Shawl (Orav *et al.*, 2001; Shawl *et al.*, 2002). L'espèce d'Achillée provenant du Canada possède la béta-thujone comme composé majoritaire (Hachey *et al.*, 1990). La plupart des constituants de l'huile essentielle d'Achillée d'origine Iranienne sont des alcools sesquiterpéniques comme le spathulénol, (Z) nérolidol, alpha-bisabolol et (E, E) farnésol. L'alpha-bisabolol est en faible pourcentage (1,49%) dans notre extrait. (Tableau 4, 5). Les pourcentages élevées en germacrène-D, sabinène et acétate de trans-chrysantényle montrent une huile essentielle différente de celles étudiées jusqu'à présent et provenant de régions géographiques différentes.

Orav *et al.* (Orav *et al.*, 2006) ont analysé l'huile essentielle de l'Achillée millefeuille provenant de France (partie traitée non précisée) qui contenait un pourcentage élevé en monoterpènes oxygénés (53,9-76,1%), principalement de camphre (jusqu'à 24,5%), ainsi que d'α et de la β-thujone (jusqu'à 26,8%), d'artemisia cétone (jusqu'à 10,1%) et de 1,8-cinéole (jusqu'à 20,3%) alors que seulement 4,0% de ce dernier a été détecté et identifié dans notre extrait.

Tableau 5: Variation des pourcentages des composés majoritaires des huiles essentielles de l'Achillée millefeuille provenant de différentes régions du monde

Composés	France	USA	Canada	Grèce	Cuba	Iran	Lituanie				Estonie
							I	II	III	IV	
alpha-pinène	1,7	**8,2**	1,31-1,9	0,4	0,4	-	2,3-4,7	2,7-5,3	1,9-6,9	2,1-5,1	0,7-4,1
camphène	1,6	**6,0**	1,7-2,5	-	-	-	1,1-2,5	0,8-1,43	tr-2,8	0,4-1,6	0,1-2,2
sabinène	**6,7**	**-**	-	0,4	**5,4**	-	1,5-4,3	3,2-5,2	0,9-8,6	2-8,5	tr-11,7
béta-pinène	**3,3**	**5,5**	4,9-8,8	0,3	-	-	4-12,6	**9,7-26,5**	**7,3-30,2**	**5,5-12**	0-20,3
alpha-terpinène	0,7	**-**	0,94-0,99	**7,0**	-	-	tr-0,7	0,2-0,7	tr-1,5	0,2-1,4	0-1,5
para-cymène	-	**7,3**	-	**7,4**	0,6	-	0,7-1,5	tr-1,9	tr-4	0,7-1,3	0,2-5,6
limonène	-	**10,7**	1,3-1,9	**-**	-	-	-	-	-	-	0-1,0
para-cymène	0,8	**-**	-	**-**	-	-	-	-	-	-	-
1,8 cinéole	**4,0**	**9,7**	9,4-19,5	**10,5**	**5,7**	-	5,3-12,5	5,3-10,6	**3,1-16,8**	4,4-8,8	0,8-20,3
gamma-terpinène	1,7	**-**	2,1-3,01	-	-	-	0,2-2,1	0,2-1,7	0,3-3,4	0,8-3,8	0-2,2
terpinolène	0,4	**-**	-	-	-	-	0,2-0,4	tr-0,3	tr-0,6	0,1-0,9	-
linalol	1,8	**-**	-	0,5	1,0	-	-	-	-	-	tr-9,5
alpha-thujone	-	**-**	-	-	-	-	-	-	-	-	0-26,6
béta-thujone	-	**-**	-	-	-	-	-	-	-	-	0-11,0
isocyclocitral	**4,5**	**-**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
camphre	**12,6**	**20,6**	9,7-24,7	**8,1**	**1,2**		**4,1-13,1**	0,3-1,6	tr-5,9	0,6-4,4	0,1-24,5
bornéol	**2,3**	0,4	3,2-5,4	-	**9,8**	-	**11,5-13,2**	0,4-3,8	tr-7,6	0,4-6,6	0-9,2
cis-carvéol	-	-	-	-	**-**	**5,0**	-	-	-	-	-
alcool furfurilique	-	**11,4**		-	**-**	-	-	-	-	-	-
4-terpinéol	**4,7**	**4,3**	5,8-6,8	1,1	**2,8**	-	1,9-4,5	1,2-2,3	0,9-7,6	0,9-5,5	0,2-4,0
ascaridole		-	-	**47,2**	**-**	-	-	-	-	-	-
Trans acétate de chrysanthényle	**6,6**	-	-	-	**-**	-	-	-	-	-	0-0,8
béta-caryophyllène	1,4	-	1,8-2,1	1,9	**5,2**	0,9	0,7-3,5	4,5-8	3-8,7	3,2-7,5	0-12,5
cis-alpha-bisabolène	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
germacrène-D	**11,7**	-	-	-	0,8	-	0,3-1,8	2,1-4,9	0,5-4,2	2,1-6,3	0-6,0
(E)-nérolidol	**7,2**	-	-	tr	-	**5,7**	2,6-4,8	tr-0,4	tr-9,5	**5,5-13,5**	-
spathulénol		-	-	-	-	**12,4**	tr-1,3	0,6-1,5	0,3-5,7	0,5-2,7	-
alcool caryophyllénique	**2,0**	-	-	-	-	**-**	-	-	-	-	-
oxyde de caryophyllène	**1,9**		1,2-1,5	1,4	**20,0**	**-**	1,9-4,7	1,1-2,5	0,3-3,3	2,8-6,3	0,2-5,2
alpha-bisabolol	**1,5**	-	-	-	-	**22,9**	-	-	-	-	0-5,1
(E,E) Farnésol	-	-	-	-	-	**4,0**	tr-0,8	0,4-0,5	tr-1,7	0,2-2,8	-
chamazulène	tr	-	**1,63-2,19**	1,6	-	-	0,7-1,3	**9,8-20,1**	tr-12,6	0,1-4,8	**0-42,0**

tr : Traces

I.2. *Calamintha grandiflora* : caractérisation des extraits des tiges et des feuilles

Calamintha grandiflora [syn. *Satureja grandiflora* (L.) Scheele, *Melina grandiflora* L., *clinopodium grandiflora* (L.) Kuntze] ou encore thé d'Aubrac est une plante de la famille des Lamiacées qui possède une odeur pénétrante très forte, particulièrement en juillet.

Calamintha grandiflora a été cultivée sous serre pendant l'année 2007-2008 et récoltée en juillet 2008. La partie aérienne fraîche comprenant les tiges et les feuilles a été hydrodistillée pendant 3 heures afin d'obtenir une huile essentielle de couleur jaune claire. Le rendement de l'hydrodistillation est de $0.35 \pm 0{,}02$ % par rapport à la matière sèche. Le mode opératoire est détaillé dans la partie expérimentale (cf. I.1.4). L'extraction de l'huile essentielle a été répétée trois fois.

I.2.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Calamintha grandiflora* et discussion

L'huile essentielle a été diluée dans le pentane (10%v/v) et analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et à l'ionisation de flamme (CPG-DIF-SM) (Clarus MS 500, Perkin Elmer). Le mode opératoire est détaillé dans la partie expérimentale (cf. II.2.2). L'identification ainsi que la quantification de l'huile essentielle a été réalisée de la même manière que celle décrite pour l'Achillée millefeuille.

29 composés organiques volatils ont été identifiés dans les extraits du thé d'Aubrac. Ils constituent 93 % de la composition chimique totale de l'huile essentielle (Tableau : 6).

Tableau 6: Composition chimique de l'huile essentielle de *Calamintha grandiflora*

Pics	IR[a] (TIC)	IR[a] (FID)	IRth[b]	Identification[c]	%[d]	CV[e]
1	931	934	939	alpha-pinène	0,03	6,39
2	970	973	975	sabinène	0,19	7,15
3	976	980	979	béta-pinène	0,21	5,68
4	987	986	991	béta-myrcène	0,09	6,93
5	995	993	991	3-octanol	0,25	8,35
6	1027	1029	1029	limonène	0,71	7,31
7	1032	1033	1037	béta-trans-ocimène	0,08	9,66
8	1068	1070	1089	terpinolène	0,03	6,43
9	1100	1099	1091	linalol	0,04	8,20
10	1148	1150	1150	*para*-Menth-8-en-3-ol	0,24	8,89
11	1155	1158	1153	**menthone**	4,40	7,93
12	1168	1169	1162	**isomenthone**	34,07	1,73
13	1181	1181	1183	**isomenthol**	7,65	8,24
14	1191	1193	1187	**néo-isomenthol**	19,83	7,72
15	1240	1243	1237	**pulégone**	19,54	16,60
16	1251	1255	1253	**pipéritone**	1,28	8,99
17	1284	1290		ni	0,03	18,38
18	1301	1304	1305	acétate d'isomenthyle	0,03	10,03
19	1335	1331		ni	0,14	14,12
20	1370	1362	1377	copaène	0,04	9,85
21	1378	1369	1388	béta-bourbonène	0,13	9,95
22	1413	1397	1409	caryophyllène	1,99	9,53
23	1448	1443	1447	santalène	0,37	9,62
24	1474	1477	1485	**germacrène-D**	3,55	10,14
25	1487	1495	1500	bicyclogermacrène	1,78	10,10
26	1499	1501	1506	alpha-farnesène	0,11	13,07
27	1510	1518	1514	gamma-cadinène	0,12	10,34
28	1568	1578	1568	acétate d'isogénol	0,93	11,11
29	1572	1584	1583	oxyde de caryophyllène	0,43	12,19
30	1599	1611		ni	0,06	11,13
31	1605	1615		ni	0,28	13,62

32	1646	1655	1654	alpha-cadinol	0,20	11,31
33	1781	1786		ni	0,15	19,02
34	1786	1790		ni	0,07	11,00
35	1790	1795		ni	0,08	11,56
36	1802	1803		ni	0,16	8,20
37	1806	1806		ni	0,05	19,76
38	1810	1812		ni	0,18	10,06
39	1830	1835		ni	0,04	12,69
40	1850	1855		ni	0,14	14,77
41	1860	1862		ni	0,17	13,96

[a]indice de rétention calculé à partir des n-alcanes C_5-C_{18},

[c]identification réalisée à partir des [b]indices de rétention théoriques (IRth) des librairies Adams, NIST, Agilent France, Wiley, Hewlett Packard, France et de la littérature

[d]pourcentage moyen sur 3 réplicats

[e]coefficient de variation (%)

Les principaux composés chimiques qui constituent la fraction majoritaire de l'huile essentielle du thé d'Aubrac, obtenue à partir de l'hydrodistillation des tiges et de feuilles (Tableau 8), sont l'isomenthone (34,07%), le néoisomenthol (19,83%), la pulégone (19,54%), l'isomenthol (7,65%), la menthone (4,40%) et le germacrène-D (3,55%). La structure chimique de quelques composés majoritaires de l'HE est représentée dans la figure 14.

Peu d'études, à ce jour, concernent la composition chimique de l'huile essentielle de *Calamintha grandiflora*. La composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce d'origine grecque (*Calamintha grandiflora* (L). Moench) étudiée par Souleles *et al.* est la plus similaire à la nôtre (Tableau 7). En effet cette espèce (Souleles *et al.*, 1990) présente un extrait composé en majorité de pulégone (35,2%), de menthone (20,2%) et d'iso-menthone (15,2%), Nos extraits se distinguent également de ceux étudiés à partir de l'espèce d'origine turque (Baser *et al.*, 1993) (*Calamintha grandiflora* (L.) Monech) par Baser *et al.* majoritairement riches en isopinocamphone (52,59%) et acétate de terpinyle (8,4%)

Tableau 7: Comparaison des composés majoritaires des extraits des feuilles de *C. grandiflora* France *vs* Turquie, Grèce et *C. Nepeta*

COV / Origine		isomenthone	neo-isomenthol	pulégone	menthone	Iso-pinocamphone	Oxyde de pipéritone
France	*C. grandiflora*	34,07	19,83	19,54	4,4	-	-
Grèce	*C. grandiflora*	15,2	-	35,2	20,2	-	tr
Turquie	*C. grandiflora*	-	-	-	-	52,59	1,45
Serbie	*C. nepeta*	-	-	75,5	5,3	-	6,0

Une autre espèce cependant de Calamintha a été trouvée dans la littérature, il s'agit de la *C. nepeta* (L.) Savi. ssp. nepeta var. suhisodonda (Borb) Hayek. Kitic *et al.* montrent que cette espèce d'origine Serbe (Kitic *et al.*, 2005) contient majoritairement de la pulégone (75,5%), de l'oxyde de pipéritone (6,0%), de la menthone (5,3%) et du menthol (4,3%). Cette composition est très différente de celle de notre extrait (Tableau : 6, 7)

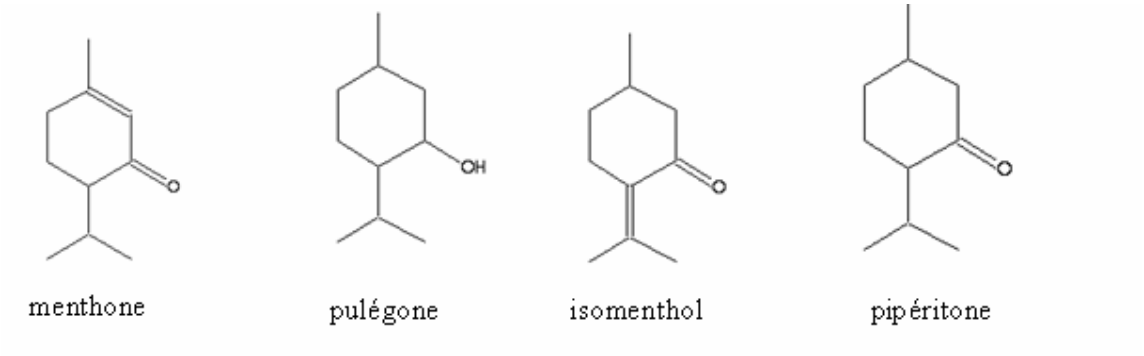


Figure 14 : Structures chimiques de quelques composés majoritaires de l'huile essentielle du thé d'Aubrac

I.3. *Tanacetum balsamita* : caractérisation des extraits des tiges et des feuilles

Tanacetum balsamita [syn, *Chrysanthemum balsamita* L, *Balsamita major* (L,) Desf,] est une plante de la famille des Astéracées, d'odeur mentholée.

Pour cette étude, nous avons utilisé deux origines différentes de matière végétale. La première est une espèce sauvage récoltée à Toulouse pendant le mois de Juin 2007. La deuxième origine de *Tanacetum balsamita* a été cultivée sous serre d'octobre 2007 à juillet 2008. La partie aérienne fraîche comprenant les tiges et les feuilles a été hydrodistillée pendant 3 heures afin d'obtenir une huile essentielle de couleur jaune. Les rendements d'extraction pour l'espèce sauvage et pour l'espèce cultivée sous serre sont respectivement 0,65 $\pm$0,02 % et

$0{,}53 \pm 0{,}02$ % par rapport à la matière sèche. Le mode opératoire est décrit dans la partie expérimentale. L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée trois fois.

I.3.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Tanacetum balsamita* et discussion

34 COVs ont été détectés dont 27 ont été identifiés dans l'huile essentielle de l'espèce sauvage, correspondant à 96% de la composition totale de l'extrait. Les composés majoritaires de l'extrait sauvage sont la carvone (56,72%), la tanacétone (9,08%), le germacrène-D (2,43%), le limonène (2,51%), et le béta-bisabolène (2,46%) (Tableau 8).

45 composés organiques volatils ont été détectés dont 38 sont identifiés dans l'huile essentielle de l'espèce cultivée sous serre correspondant à 96% de la composition totale de l'extrait. Les composés majoritaires sont la tanacétone ou béta-thujone (83,57%), le 1,8 cinéole (3,97%) et l'alpha-thujone (3,3%) voir (Tableau 9). La structure chimique de quelques composés majoritaires de l'HE est représentée dans la figure 15.

Plusieurs chimiotypes ont été identifiés dans la littérature. En 1968, Gockeritz a défini deux chémotypes de la *Balsamita major* en fonction de la nature du terpène prédominant : type camphre: *Balsamita major* (L.) Desf Asch et type carvone: *Balsamita Major* (L.) Desf. var. tanacetoïdes (Boiss) Fiori (Goeckeritz, 1968).

Bestmann *et al.* en 1984, ont mis à jour un troisième chimiotype possédant la double prédominance en carvone et camphre (Bestmann *et al.*, 1984). Quelques auteurs (Voigt *et al.*, 1938) ont analysé la composition chimique de l'huile essentielle de Balsamite type carvone. En 1976, Paris *et al.* ont évalué à 1,3% l'huile essentielle des fleurs et à 0,7% celle de la partie aérienne, rendements proches de ceux de nos extraits. La carvone est le composé majoritaire et constitue 65 à 80% de la composition totale de l'huile essentielle.

Un autre chimiotype camphre d'origine polonaise a été identifié par Zielincka-Sowicka *et al.* 13 composés ont été identifiés dont le camphre à hauteur de 91%. Le bornéol, l'isobornéol, le camphène, la carvone, le limonène et l'apha-pinène ont également été identifiés (Zielinska-Sowicka *et al.*, 1970).

Ces chimiotypes ont été également identifiés dans trois espèces iraniennes :

Jaimand *et al.* ont travaillé sur l'huile essentielle de Balsamite provenant d'Iran (*Tanacetum balsamita* L. ssp. *Balsamitoïdes* (schultz_Bip.) Grierson) en séparant les différents organes

(feuilles, fleurs et tiges). Les composés majoritaires des trois différentes huiles obtenues sont l'acétate de bornyle (47,7% dans les feuilles), la pinocarvone (27,1% dans les feuilles), le camphre (9,3% dans les feuilles) et le terpinolène, (5,4% dans les feuilles) avec des variations quantitatives non significatives en fonction de l'organe anatomique étudié (Jaimand *et al.*, 2005). Parmi ces 4 composés majoritaires seul le terpinolène est présent dans nos extraits en très faible proportion (0,09%) (Tableau 10).

Mounfared *et al.* ont analysé l'huile essentielle de la partie aérienne séchée de la Balsamite provenant également d'Iran (*Tanacetum balsamita* L. ssp. Balsamitoïdes (schultz Bip) Grierson [syn, *Chrysantemum Balsamita*, pyre balsamita (L.) Wild], 31 composés ont été identifiés (Monfared *et al.*, 2002), où la carvone représente 68% (Tableau : 12)

Enfin une troisième étude a été réalisée en 2009, par Yousefzadi *et al.* sur une espèce iranienne *Tanacetum balsamita* subsp. balsamita collectée durant la phase de floraison riche en carvone (51,0%), béta-thujone (20,8%) et alpha-thujone (3,2%) (Yousefzadi *et al.*, 2009).

En 2001, Gallori *et al.* ont étudié la composition chimique de l'huile essentielle et de l'eau aromatique des feuilles de Balsamite (*Balsamita suaveolens* Pers. [syn. *Chrysanthemum balsamita* L. ; *Tanacetum balsamita* L.] d'origine italienne, où le carvone apparait comme le composé majoritaire des deux extraits (Gallori *et al.*, 2001).

La variation de la composition chimique de l'huile essentielle de *Tanacetum balsamita* (L.). Desf., d'origine lituanienne a été étudiée en fonction des différentes phases de croissance de la plante et de la partie anatomique hydrodistillée (feuilles et fleurs) par Bylaite *et al.* Le rendement optimal en huile essentielle a été obtenu pendant la phase de floraison (Bylaite *et al.*, 2000).

Tableau 8: Composition chimique de l'HE de *Tanacetum balsamita* sauvage récoltée à Toulouse pendant la période de floraison

Pics	IR[a] (FID)	IRth[b]	Identification[c]	%[d]	CV[e]
1	917	939	alpha-pinène	0,18	3,6
2	932	954	camphène	0,12	3,95
3	954	975	sabinène	0,52	4,34
4	959	979	béta-pinène	0,14	4,62
5	1009	1025	*para*-cymène	0,11	6,11
6	1013	1029	limonène	2,51	22,31
7	1016	1031	1,8-cinéole	1,99	5,07
8	1086		ni	0,20	6,362
9	1092	1102	cis-thujone	0,88	2,33
10	1103	1114	trans-thujone	9,08	9,54
11	1108		ni	2,10	3,68
12	1121		cis-p-mentha-2,8-dien-1-ol	1,12	2,86
13	1128	1145	trans-verbénol	1,76	1,39
14	1140	1165	pinocarvone	1,43	3,67
15	1146	985	trans-isolimonène	1,37	9,46
16	1152	1169	bornéol	1,31	3,56
17	1161	1189	4-terpinéol	1,18	6,74
18	1169		ni	1,33	6,98
19	1174	1196	myrthénal	1,21	2,37
20	1179		cis-dihydrocarvone	0,41	5,86
21	1180	1229	cis-carvéol	0,64	8,33
22	1203	1217	trans carvéol	0,72	9,32
23	1227	1243	carvone	56,72	9,36
24	1159		cis-acétate de carvyle	1,52	6,54
25	1165		ni	1,10	6,88
26	1483	1485	germacrène-D	2,43	5,36
27	1488	1561	bicyclogermacrène	0,22	6,33
28	1489		ni	0,57	21,36
29	1495	1531	béta-bisabolène	2,46	8,36

30	1496	1514	delta-cadinène	2,19	12,35
31	1502	1515	trans-gamma-bisabolène	0,58	32,21
32	1516		ni	0,14	14,32
33	1593		ni	0,30	25,32
34	1613	1654	cadinol	1,04	26,34

[a]indice de rétention calculé à partir des n-alcanes C_5-C_{18},

[c]identification réalisée à partir des [b]indices de rétention théoriques (IRth) des librairies Adams, NIST, Agilent France, Wiley, Hewlett Packard, France et de la littérature

[d]pourcentage moyen sur 3 réplicats

[e]coefficient de variation (%)

Tableau 9: Composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Tanacetum balsamita* cultivée sous serre

Pics	IR[a] (TIC)	IR[a] (FID)	IRth[b]	Identification[c]	%[d]	CV[e]
1	933	934	939	alpha-pinène	0,05	4,12
2	973	973	975	sabinène	0,19	3,97
3	979	981	979	béta-pinène	0,04	3,72
4	987	985	984	mentha-2,8-diène	0,05	3,31
5	991	991	991	myrcène	0,09	4,17
6	1010	1006	_	butyrate d'isoamyle	0,06	3,60
7	1017	1017	1017	alpha-terpinène	0,14	3,95
8	1025	1025	1026	*para*-cymène	0,26	3,36
9	1033	1034	1031	1,8-cinéole	3,97	4,00
10	1058	1058	1060	gamma-terpinène	0,53	3,80
11	1072	1072	1072	béta-terpinène	1,55	4,34
12	1086	1086	1089	alpha-terpinolène	0,09	4,31
13	1099	1095	1100	2-méthyl-butyrate d'isoamyle	0,07	4,62
14	1109	1110	1102	cis-thujone	3,33	2,51
15	1128	1122	1114	trans-thujone	83,57	0,82
16	1140	1138	1138	3-isothujanol	0,23	6,11
17	1144	1147	1150	*para*-menth-3-en-8-ol	0,39	22,31
18	1148	1152	_	ni	0,05	8,12
19	1151	1158	_	ni	0,05	5,07

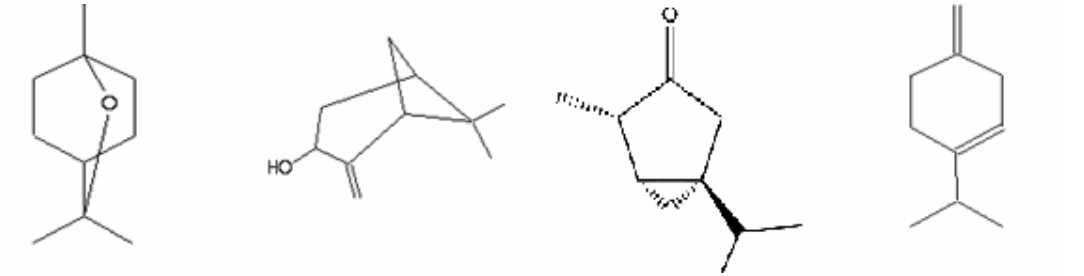
20	1157	1161	_	bicyclo[4,1,0] heptan-3-one,7,7 diméthyl-4 méthylène	0,03	6,70
21	1165	1167	1165	pinocarvone	0,28	4,58
22	1172	1173	1175	acétate de santolinyle	0,16	45,27
23	1183	1184	1184	pinocarvéol	1,48	4,62
24	1198	1197	1186	ocimène	0,16	0,89
25	1251	1252	_	carvotanacetone	0,15	7,81
26	1260	1259	_	4-carène	0,14	4,94
27	1288	1287	_	bicyclo[3,1,0] hex-2-ène,4-méthylène-1-(1-méthyléthyl)	0,11	5,30
28	1296	1296	_	3-carène,10-acétylméthyl	0,04	4,85
29	1303	1302	1307	acétate de dihydrocarvéol	0,18	4,83
30	1323	1324	_	ni	0,03	4,10
31	1329	1329	_	ni	0,14	4,56
32	1336	1337	_	ni	0,02	1,76
33	1352	1351	_	ni	0,02	5,60
34	1385	1369	1388	alpha-bourbonène	0,02	6,27
35	1395	1393	1394	isobutanoate de phenyléthyle	0,02	24,34
36	1421	1427	1419	caryophyllène	0,02	6,37
37	1474	1478	1477	gamma-gurjunène	0,07	4,92
38	1482	1488	1485	germacrène-D	1,50	5,65
39	1496	1502	1500	bicyclogermacrène	0,19	4,44
40	1518	1521	1523	delta-cadinène	0,02	5,24
41	1560	1563	_	ni	0,05	5,98
42	1578	1583	_	ni	0,03	31,46
43	1656	1663	1663	dihydro eudesmol	0,38	8,19
44	1733	1715	_	pirétrinal	0,03	41,86
45	1788	1790	_	ni	0,03	4,24

[a]indice de rétention calculé à partir des n-alcanes C_5-C_{18},

[c]identification réalisée à partir des [b]indices de rétention théoriques (IRth) des librairies Adams, NIST, Agilent France, Wiley, Hewlett Packard, France et de la littérature

[d]pourcentage moyen sur 3 réplicats

[e]coefficient de variation (%)



1,8-cinéole pinocarvéol Béta-thujone Béta-terpinène

Figure 15: Structures chimiques des principaux composés majoritaires de l'huile essentielle de *Tanacetum balsamita*

Tableau 10: Comparaison entre les principaux composés majoritaires de l'huile essentielle de *Tanacetum balsamita* de différentes origines : France *vs* Iran, Italie, Lituanie et Turquie

Origine / COV	France		Iran Jaimand *et al.*	Iran Mounfared *et al.*	Iran Yousefzadi *et al.*	Italie	Lituanie	Turquie
	Espèce sauvage	Espèce cultivée						
Terpinolène	-	0,09	5,4	-	-	tr	-	-
Alpha-thujone	0,88	3,33	-	-	3,2	15,61	289,8-1261,6	11,7
Béta-thujone	9,08	83,57	-	-	20,8	2,10	15,7-225,4	1,2
Camphre	-	-	9,3	1,1	-	-	-	-
Pinocarvone	1,43	0,28	27,1	-	0,7	1,00	tr-16,1	0,5
Carvone	56,72	-	-	68,0	51,0	43,54	932,9-7637,2	52,4
Acétate de bornyle		-	47,7	-	-	-	tr	tr

En complément des études réalisées sur la composition chimique de l'huile essentielle, il existe quelques travaux concernant l'activité insecticide de la balsamite pour laquelle on a identifié et quantifié dans l'huile essentielle une vingtaine de composés actifs qui présentent une forte activité insecticide contre les aphides (Bestmann *et al.*, 1988).

Ainsi 7 espèces de Tanacetum de différentes origines géographiques dont *Tanacetum balsamita* ont été analysées pour leur potentiel élevé en flavonoïdes lipophiles. (Williams *et al.* 1999). Cinq flavonoïdes ont été identifiés dans les feuilles de *T. balsamita* L. : apigénine, 6-méthyle éther scutellareine, 6-méthyl éther-hydroxy-lutéoline, 6,3'-diméthyle éther-6-hydroxy-lutéoline et le 6,7,4'-triméthyle éther-6-hydroxy-lutéoline (Williams *et al.*, 1999).

D'autre part, en 1996, Kubo *et al.* ont isolé et déterminé la structure d'un composé actif antimicrobien, le Tanabaline à partir des fleurs séchées de *Tanacetum balsamita* (*Catinga-de-mulata*) d'origine brésilienne (Kubo, 1995).

En se basant sur la nature des terpènes dominants on peut identifier quatre chimiotypes : type camphre, type carvone, type camphre-thujone et type carvone-thujone.

La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature, permet de conclure que l'espèce sauvage française et spécifiquement celle récoltée dans la région de Midi-Pyrénées se rapproche de l'espèce turque (voir tableau 10). Par contre, la prédominance de la tanacétone et l'absence de carvone dans les huiles essentielles des parties aériennes suggèrent qu'il pourrait s'agir d'un cinquième chimiotype : le type tanacétone. Ce chimiotype pourrait être induit par les conditions de culture sous serre.

I.4. *Myrrhis odorata :* caractérisation chimique des tiges et des feuilles

Les plantes appartenant à la famille des apiacées sont riches en métabolites secondaires.

La plante, *Myrrhis odorata*, ou encore cerfeuil musqué a été cultivée sous serre d'octobre 2007 à Mai 2008 et récoltée en juin 2008. La partie aérienne fraîche comprenant les tiges et les feuilles a été hydrodistillée pendant 3 heures afin d'obtenir une huile essentielle de couleur jaune clair. Le rendement d'extraction est de $0,48 \pm 0,02$ % par rapport à la matière sèche. Le mode opératoire est décrit dans la partie expérimentale (cf. I.1.6). L'extraction de l'huile essentielle a été répétée trois fois.

I.4.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Myrrhis odorata* et discussion

20 composés organiques volatils ont été identifiés à partir de l'huile essentielle de la partie aérienne du cerfeuil musquée. Ils constituent 96% de la composition totale de l'extrait. Les composés majoritaires sont l'anéthole (75,12%), le germacrène-D (6,19%) le limonène (4,42%), le bicyclogermacrène (3,18%), l'estragole (3,04%) et le caryophyllène (2,71%) (Tableau : 11). La structure chimique de quelques composés majoritaire de l'HE est représentée dans la figure 16.

Ces résultats d'analyse sont proches de ceux trouvés dans la littérature par Kubeczka *et al.* en 1982 sur le taux d'anéthole évalué à 76,8 % bien que l'origine de l'espèce analysée ne soit pas précisée (Kubeczka *et al.*, 1982). Nos extraits sont légèrement plus riches en estragole, 3,04% contre 1,2% et dépourvu de bicyclogermacrène. En 1990, Hussain *et al.* quantifient 85,48% d'anéthole et 9,08% d'eugénol méthylique dans des extraits de *Myrrhis odorata* Scop. (sweet cicely) cultivée à Chicago aux USA(Hussain *et al.*, 1990) (Tableau : 12).

Tableau 11: Composition chimique de l'huile essentielle obtenue à partir de la partie aérienne de *Myrrhis odorata*

Pics	IR[a] (TIC)	IR[a] (FID)	IRth[b]	Identification[c]	%[d]	CV[e]
1	934	936	939	alpha-pinène	0,03	25,53
2	973	974	975	sabinène	0,02	21,05
3	979	982	979	béta-pinène	0,02	8,25
4	987	986	991	béta-myrcène	0,63	3,12
5	1030	1031	1029	limonène	4,42	3,90
6	1047	1045	1050	cis-ocimène	0,32	1,03

7	1059	1060	1060	gamma-terpinène	0,24	6,03
8	1088	1088	1089	terpinolène	0,04	8,46
9	1199	1200	1196	estragole	3,04	1,01
10	1229	1228	-	cis-3 hexenyl isovalerate	0,01	18,30
11	1253	1255		ni	0,06	10,77
12	1290	1292	1285	trans-anéthole	75,12	0,03
13	1376	1382	-	ni	0,05	10,15
14	1388	1393	-	ni	0,10	1,40
15	1404	1403	-	ni	0,17	6,21
16	1420	1428	1419	béta-caryophyllène	2,71	1,36
19	1457	1464	1457	béta-farnesène	0,22	1,96
22	1482	1490	1485	germacrène-D	6,19	0,19
23	1489	1498	-	ni	0,01	29,95
24	1496	1503	1500	bicyclogermacrène	3,18	3,11
25	1504	1510	1506	alpha-farnesène	0,48	13,54
26	1518	1523	-	ni	0,10	8,52
27	1562	1561	-	ni	2,74	2,95

[a]indice de rétention calculé à partir des n-alcanes C_5-C_{18},

[c]identification réalisée à partir des [b]indices de rétention théoriques (IRth) des librairies Adams, NIST, Agilent France, Wiley, Hewlett Packard, France et de la littérature

[d]pourcentage moyen sur 3 réplicats

[e]coefficient de variation (%)

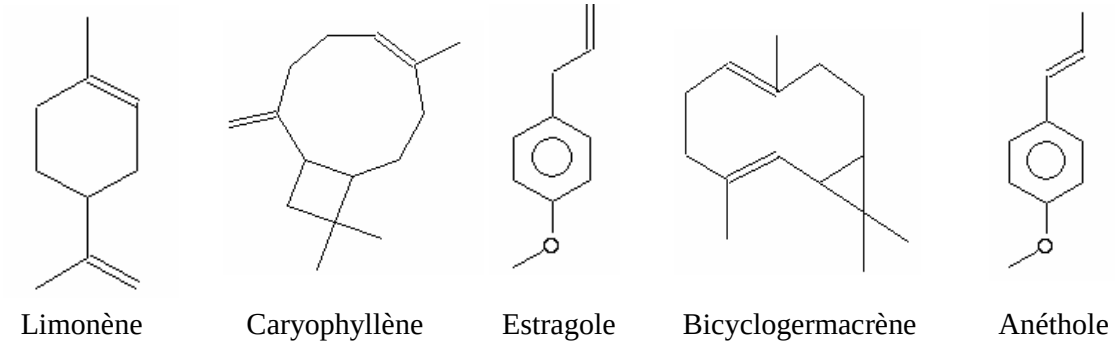


Figure 16: structures chimiques des composés majoritaires de l'huile essentielle de *Myrrhis odorata*

En 1993, l'huile essentielle des feuilles de *Myrrhis odorata* (L.) Scop. d'origine russe a été analysée par Tkachenko *et al.* Dans ces extraits l'anéthole constitue le composé majoritaire

(82-85%) avec le germacrène-D (2-2,9%) ; les quantités rencontrées de ces molécules varient selon que la plante est en période de floraison ou non (Tkachenko *et al.*, 1993).

Notre espèce se rapproche le plus de l'espèce finlandaise identifiée par Usitalo *et al.* Elle se distingue néanmoins par la présence du germacrène et sa richesse en sesquiterpènes (Uusitalo *et al.*, 1999) (Tableau 12).

Finalement, Rancic *et al.* ont analysé l'huile essentielle de *Myrrhis odorata* d'origine Serbe récoltée en période de floraison. La composition est totalement différente de celle de nos extraits ainsi que de celles des autres huiles essentielles étudiées dans différentes régions géographiques où le p-cymène (62,0%) a remplacé l'anéthole comme composé majoritaire (Rancic *et al.*, 2005).

Tableau 12: Comparaison entre les principaux composés majoritaires de l'HE de *Myrrhis odorata* de différentes origines : France vs Serbie, Finlande, Russie et Amérique du Nord

Origine / COV	France	Amérique du Nord	Russie	Finlande	Serbie
para-cymène	-	-	-	-	62,0
Limonène	4,42	0,26	-	0,08	2,10
Estragole	3,04	1,71	-	2,64	-
Anéthole	75,12	85,48	82,0	83,10	-
Béta-caryophyllène	2,71	-	1,70	1,01	0,70
Eugénol méthylique	-	9,08	-	-	-
Germacrène-D	6,19	-	2,9	-	-
Bicyclogermacrène	3,18	-	-	-	-
Alpha-farnesène	0,48	-	-	-	-

I.5. *Monarda didyma* : caractérisation chimique des tiges et des feuilles

La plante *Monarda didyma* appartient à la famille des Lamiacées.

Dans le cadre de notre étude, elle a été cultivée sous serre d'octobre 2007 jusqu'à juin 2008 et récoltée en juillet 2008. La partie aérienne fraîche comprenant les tiges et les feuilles a été hydrodistillée pendant 3 heures afin d'obtenir une huile essentielle de couleur jaune clair. Le rendement de distillation est de $0,70 \pm 0,02$ % par rapport à la matière sèche. Les conditions expérimentales sont décrites dans la partie expérimentale (cf. I.1.7). L'extraction de l'huile essentielle a été répétée trois fois.

I.5.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Monarda didyma* et discussion

26 composés organiques volatils ont été identifiés dans l'huile essentielle obtenue à partir de la partie aérienne de la plante comprenant les tiges et les feuilles. Les principaux composés majoritaires sont le thymol (47,06%), l'eucalyptol (9,68%), le germacrène (4,04%), le limonène (3,46%), le p-cymène (2,78%) et le gamma-terpinène (2,68%) comme indiqué dans le Tableau 13. La structure chimique de quelques composés majoritaire de l'HE est représentée dans la figure 17.

Tableau 13: Composition chimique (%) de l'huile essentielle de *Monarda didyma*

Pics	IR[a] (TIC)	IR[a] (FID)	IRth[b]	Identification[c]	%[d]	CV[e]
1	925	929	930	alpha-thujène	0,35	2,2
2	933	939	939	alpha-pinène	0,88	3,0
3	951	957	954	camphène	1,39	2,8
4	973	978	975	sabinène	5,53	1,2
5	979	985	979	béta-pinène	1,05	2,0
6	987	989	991	béta-myrcène	1,10	0,9
7	1008	1012	1003	alpha-phellandrène	0,10	1,6
8	1017	1022	1017	alpha-terpinène	1,04	2,0
9	1025	1029	1026	*para*-cymène	2,78	0,8
10	1030	1034	1029	limonène	3,46	0,9
11	1033	1039	1031	eucalyptol	9,68	1,3
12	1058	1062	1060	gamma-terpinène	2,68	1,2
13	1072	1076	1073	hydrate de sabinène	0,55	1,2

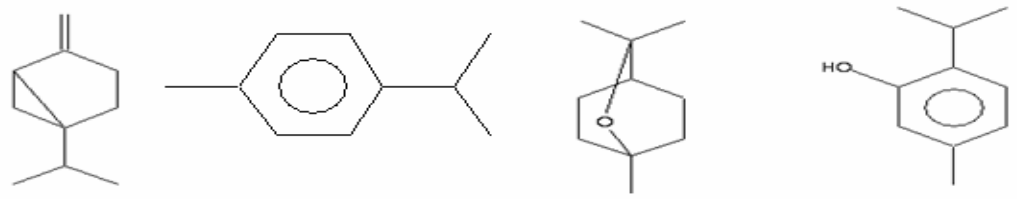
14	1086	1091	1089	alpha-terpinène	1,02	0,8
15	1100	1101	1102	linalol	1,83	1,1
16	1120	1124	1128	chrysanténone	0,44	0,4
17	1174	1181	1180	bornéol	1,13	0,3
18	1182	1188	1189	alpha-terpinéol	0,47	0,4
19	1197	1201	1199	gamma-terpinéol	8,52	1,3
20	1238	1241	1235	thymol-méthyl ether	3,20	0,9
21	1290	1291	1290	thymol	47,06	1,0
22	1376	1385	1388	béta-cubebène	0,09	2,7
23	1389	1396	_	ni	0,14	5,0
24	1421	1431	1419	caryophyllène	0,89	1,7
25	1482	1492	1485	germacrène-D	4,04	0,7
26	1507	1507	1506	alpha-farnesène	0,54	23,3
27	1518	1525	1523	delta-cadinène	0,04	0,5

[a]indice de rétention calculé à partir des n-alcanes C_5-C_{18},

[c]identification réalisée à partir des [b]indices de rétention théoriques (IRth) des librairies Adams, NIST, Agilent France, Wiley, Hewlett Packard, France et de la littérature

[d]pourcentage moyen sur 3 réplicats

[e]coefficient de variation (%)



Sabinène *Para*-cymène 1,8-cinéole Thymol

Figure 17 : structures chimiques des principaux composés majoritaires de l'HE de la *M. didyma*

La composition chimique de nos extraits, comparée à celle de *Monarda didyma* d'origine française analysée, en 1991, par Carnat *et al.* est totalement différente car la teneur en linalol de cette dernière est prédominante avec 64,5 à 74,2%. Ces auteurs ont montré qu'il n'y avait pas de différence qualitative entre l'huile essentielle des feuilles et celle des fleurs (Carnat *et al.*, 1991). Néanmoins, une légère différence quantitative apparait sur les teneurs en

eucalyptol et limonène relativement faibles, 0,6% et 0,3% respectivement. Un an plus tard, Mazza *et al.* ont analysé l'huile essentielle de plusieurs hybrides *Monarda* provenant du croisement entre deux espèces *M. fistulosa* et *M. didyma* d'origine Canadienne dont la composition chimique a été identifiée. Une distribution de terpènes cycliques dans la majorité des hybrides a été identifiée (linalol, géraniol, thymol et carvacrol). Parmi les hybrides analysés, l'hybride 75-1B riche en thymol (31,11%) (Mazza *et al.*, 1992) possède la composition chimique la plus proche de nos extraits où la présence en eucalyptol est aussi bien marquée (14,11%) (Tableau 14).

Notre extrait se rapproche de l'extrait obtenu à partir de l'espèce italienne analysée par Fraternale *et al.* Nos extraits se distinguent par une teneur en thymol légèrement différente (47,06% contre 57,3%), la présence d'eucalyptol (9,68%) et une faible concentration en *para*-cymène (2,8% contre 10,5% dans l'extrait de Fraternale *et al.*) (Fraternale *et al.*, 2006) (Tableau 14).

Les résultats de notre étude comparés aux différentes données de la littérature confirment que la composition chimique de *Monarda didyma* varie selon l'origine géographique de la plante.

Tableau 14 : Comparaison entre les principaux composés majoritaires de l'HE de *M. didyma* provenant de différents pays

Origine / COV	France Midi-Pyrénées	France Clermont Ferrand	Canada (hybride 75-1B)	Italie
Sabinène	5,53	5,0	1,41	-
Para-cymène	2,78	**11,0**	3,01	**10,5**
Limonène	3,46	0,3	-	1,3
Eucalyptol	**9,68**	0,6	**14,11**	-
Gamma-terpinène	2,68	5,3	-	9,3
Linalol	1,83	**64,5**	1,46	0,6
Thymol	**47,06**	-	**31,11**	**57,3**
Germacrène-D	4,04	3,2	0,49	1,1

II. Caractérisation sensorielle des huiles essentielles des cinq plantes aromatiques : *Achillea millefolium, Tanacetum balsamita, Calamintha grandiflora, Myrrhis odorata* et *Monarda didyma*

II.1. Pyramides Olfactives

L'analyse sensorielle des huiles essentielles peut se faire par diverses méthodes. Avant d'analyser les huiles essentielles par l'intermédiaire d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur olfactométrique, des tests sensoriels sont nécessaires afin d'établir les pyramides olfactives relatives à chaque extrait.

L'établissement d'une pyramide olfactive consiste à répérer les différentes notes dominantes dans l'huile essentielle comme on le ferait pour un parfum. On suit l'évolution au cours du temps de l'odeur des extraits aromatiques déposées sur une mouillette afin de déterminer les notes de tête, de cœur et de fond. La procédure est détaillée dans la partie expérimentale (cf. II.3).

II.1.1. Les notes de tête

Elles sont constituées des notes olfactives les plus légères, les plus volatiles, qui vont ressortir dés le départ de l'application, et disparaître rapidement entre quelques minutes et 2 heures.

Exemple : les notes agrumes, les notes menthées.

II.1.2. Les notes de cœur

Les molécules à volatilité moyenne sont les notes de cœur, elles ont une durée de vie de 2 à 10h et ont un rôle tampon : prolonger la fraîcheur des notes de tête et annoncer la chaleur des notes de fond.

Exemple : les notes florales, épicées et aldéhydées.

II.1.3. Les notes de Fond

Les notes de fond correspondent auxs molécules les plus lourdes, elles ont une durée de vie beaucoup plus longue de 8h à plusieurs jours.

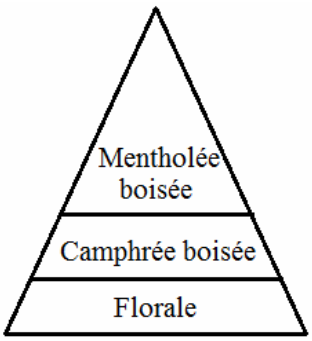
Exemple : notes vanillées, boisées, musquées et ambrées.

Les notes odorantes perçues pourraient être associées à certaines molécules odorantes identifiées dans les huiles essentielles.

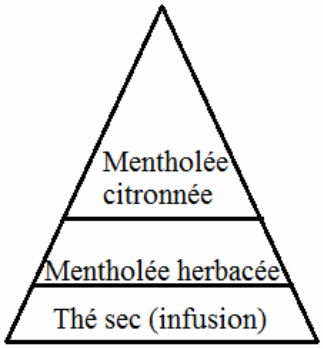
II.2. Réalisation des Pyramides Olfactives

Les pyramides olfactives ont été effectuées par deux expérimentateurs. Une mouillette est trempée dans chaque huile essentielle diluée au 1/10 (v/v) dans de l'éthanol anhydre, puis flairée pour évaluer les différentes notes de tête, de fond et de cœur à des temps déterminés : au temps 0, c'est-à-dire immédiatement après trempage, après 2 heures, 4 heures puis 24 heures.

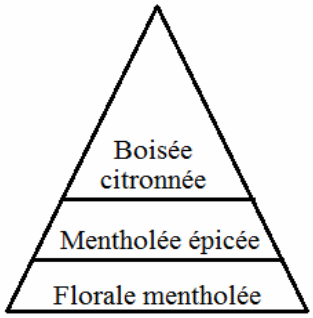
II.2.1. Pyramides Olfactives des 5 huiles essentielles des plantes aromatiques selectionnées



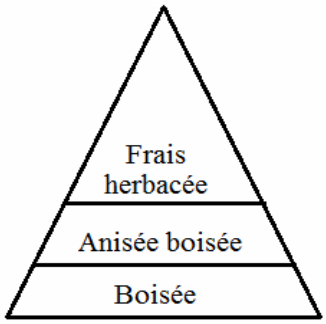
Achillea millefolium



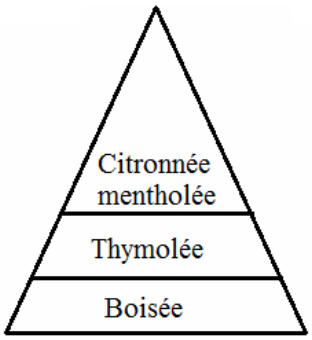
Tanacetum balsamita



Calamintha grandiflora



Myrrhis odorata



Monarda didyma

II.3. Activité odorante des composés organiques volatils évaluée par CPG-Olfactométrie

Les huiles essentielles ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de masse et un détecteur olfactométrique (CPG-SM-O). La méthodologie, la programmation du four ainsi que les différents facteurs de dilution sont décrits en détail dans la partie expérimentale (cf. II.2.3).

Le couplage CPG-Olfactométrie combine la séparation des composés volatils par CPG avec l'évaluation olfactive. En sortie de colonne, une partie des composés élués est envoyée vers un cône de détection nasale qui permet l'évaluation olfactive en même temps que l'enregistrement du chromatogramme. Afin d'éviter la déshydratation de la muqueuse nasale qui conduit à une perte de sensibilité de l'expérimentateur, de l'air humide est injecté en entrée du cône. Les données olfactives sont enregistrées grâce à un bouton pressoir type potentiomètre qui envoie un signal à un logiciel d'acquisition (système Gerstel).

Afin de limiter toute subjectivité, il est nécessaire d'utiliser un vocabulaire normalisé pour décrire les odeurs mais très souvent les laboratoires utilisent un vocabulaire interne. Le « Champs des odeurs ®» introduit par J.N. Jaubert (Jaubert *et al.*, 1987; Jaubert *et al.*, 1987) trouve son intérêt dans la formation des opérateurs et est bien adapté aux études CPG/O.

L'analyse en CPG-O a été effectuée pour chaque huile essentielle en 3 répétitions au moyen de 2 juges avec 20 minutes environ d'analyse sensorielle à chaque fois. Les huiles essentielles ont été diluées au 1/10 dans le pentane, et 0,1µL de cette dilution a été injectée. La programmation de la CPG est décrite dans la partie expérimentale (cf. II.2.3).

II.3.1. Résultats de l'analyse sensorielle en CPG-O de l'HE d'*Achillea millefolium*

TR (min)	Notes	Fréquence de détection [%], n=3	Composés	
6,94	Boisé pin	100	alpha-pinène	Mentholée, Boisée
7,46	Boisé piquant	100	camphène	
8,17	Boisé citronné	33	sabinène	
8,36	Boisé fort	67	béta-pinène	
10,28	Eucalyptus	100	eucalyptol	
11,23	Floral anisé	100	gamma-terpinène	
13,15	Bergamote	100	linalol	
13,75	Citron léger	100	cyclocitral, isomère1	
14,87	Citron léger	67	cyclocitral, isomère 2	
15,21	Camphre	100	camphre	Camphrée, Boisée
15,87	Citron	100	cyclocitral, isomère 3	
16,24	Poussière	100	bornéol	
16,56	Agrume floral	100	4-terpinéol	Florale
26,59	Boisé épicé	100	béta-caryophyllène	
29,22	Floral Anisé	100	germacrène-D	
32,66	Floral jasmin	100	(E)-nérolidol	
33,76	Boisé épicé	100	viridiflorol	

On remarque aussi que le nez ne détecte pas l'ensemble des notes de l'huile essentielle. En effet, certaines odeurs peuvent être masquées par d'autres odeurs intenses qui seraient éluées avant, ou bien, le composé n'a pas d'odeur détectable, ou encore, il est à une concentration en dessous du seuil de perception du nez humain.

II.3.2. Résultats de l'analyse sensorielle en CPG-O de l'HE de *Calamintha grandiflora*

TR (min)	Notes	Fréquence de détection [%], n=3	Composés	
6,05	Boisé pin	100	alpha-pinène	
7,05	Boisé citronnée	100	sabinène	Boisée, Citronnée
7,20	Boisé piquant	100	béta-myrcène	
7,44	Champignon	100	3-octanol	
8,27	Agrumes	100	limonène	
11,77	Floral bergamote	100	béta-linalol	
12,01	Mentholé léger	67	**menthone**	Mentholée, Epicée
12,23	Mentholé léger	100	**isomenthone**	
12,53	Menthe poussière	100	**isomenthol**	
12,84	Menthol camphré	100	**néo-isomenthol**	
14,14	Boisé épicé	100	**pulégone**	
14,49	Menthe poivrée	100	**pipéritone**	
17,76	Vert épicé	67	béta-bourbonène	
18,72	Boisé	100	caryophyllène	
19,60	Vert	100	santalène	Florale
20,28	Floral anis	100	**germacrène-D**	
20,62	Boisé	100	gamma-cadinène	

La majorité des composés identifiés dans les extraits du Thé d'Aubrac ont été perçus par olfactométrie. Ces résultats d'analyse sensorielle couplés à ceux de l'analyse chimique permettent de mieux caractériser la pyramide olfactive des extraits de *Calamintha grandiflora*.

II.3.3. Résultats de l'analyse sensorielle en CPG-O de l'HE de *Tanacetum balsamita*

TR (min)	Notes	Fréquence de détection [%], n=3	Composés	
6,03	Boisé pin	75	alpha-pinène	Mentholée, citronnée
6,96	Bois citronné	100	sabinène	
8,49	Eucalyptus	100	1,8-cinéole	
9,25	Floral citron	100	gamma-terpinène	
10,52	Thé boisé	100	alpha-thujone	
11,24	Thé fort	100	**tanacétone**	Mentholée, herbacée
12,56	Vert camphré	75	pinocarvone	
14 ,15	Fruité citron	100	4-carène	
14,98	Floral	75	ni	
16,42	Citron boisé	50	alpha-bourbonène	
20,2	Boisé	25	caryophyllène	
20,33	Floral	100	**germacrène-D**	Thé sec (doux, infusion)
22,19	Boisé soufré	75	delta-cadinène	
24,36	Sucré	100	dihydro eudesmol	

Le pic majoritaire est la tanacétone, composé à odeur caractéristique de thé et d'épice. Pour cette huile essentielle, on observe aussi un retard de détection de 30 secondes et un composé non identifié détecté à environ 15 min.

II.3.4. Résultats de l'analyse sensorielle en CPG-O de l'HE de *Myrrhis odorata*

TR (min)	Notes	Fréquence de détection [%], n=3	Composé	
4,50	Boisé	100	alpha-pinène	
5,30	Boisé citron	67	sabinène	Frais, herbacée
7,42	Vert piquant	67	béta-myrcène	
8,42	Agrumes	100	limonène	
12,80	Anisé vert	100	estragole	Anisée, boisée
15,67	Anis fort	100	trans-anéthole	
18,56	Boisé	100	béta-caryophylène	
20	Floral	100	germacrène-D	
20,29	Anisé	100	alpha-farnesène	
20,69	Boisé	100	ni	Boisée
22,09	Boisé	67	ni	

Le composé majoritaire de cette HE est l'Anéthole. Son odeur est tellement forte qu'elle persiste tout le long de l'analyse (après son élution). Elle cache ainsi certains composés qui le suivent. C'est pour cela que peu de composés odorants sont détectés chez *Myrrhis odorata*. L'écart de temps de rétention entre le pic chromatographique et la detection olfactive de la molécule est également de 30 secondes.

II.3.5. Résultats de l'analyse sensorielle en CPG-O de l'HE de *Monarda didyma*

TR (min)	Notes	Fréquence de détection [%], n=3	Composés	
6,10	Boisé	100	alpha-pinène	
7,15	Boisé vert	67	béta-pinène	
7,30	Boisé piquant	100	béta-myrcène	
8,05	Citronnée	67	alpha-terpinène	Citronnée, mentholée
8,58	Eucalyptus	100	eucalyptol	
9,83	Floral citronné	67	gamma-terpinène	
10,25	Bergamote	100	linalol	
12,53	Floral	67	alpha-terpinéol	
13,03	Citron vert	100	gamma-terpinéol	
14,03	Epice (thym léger)	100	thymol-méthyl ether	Thym
15,90	Thym	100	thymol	
18,84	Boisé	33	caryophyllène	Boisée
20,40	Floral	100	germacrène-D	
21,10	Boisé soufré	100	delta-cadinène	

Ces résultats d'analyse sensorielle couplés à ceux de l'analyse chimique permettent de mieux caractériser les pyramides olfactives des 5 huiles essentielles étudiées.

III. Activités biologiques des huiles essentielles et des résidus de l'hydrodistillation

III.1. Introduction sur l'activité antioxydante

L'utilisation des antioxydants synthétiques est un sujet très étudié du fait de leur impact négatif sur la santé humaine (Branen, 1975; Barlow, 1990). Plusieurs limites et restrictions ont été mises en place concernant leur utilisation, et leur substitution par des antioxydants naturels est devenue un enjeu scientifique. Les antioxydants bien connus et traditionnels sont ceux provenant du thé, du vin, des fruits, des épices et d'autres végétaux (Kanner *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1998; Madsen *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). Plusieurs espèces de plantes ont été impliquées dans la recherche des nouveaux antioxydants (Economou *et al.*, 1991). Quelques antioxydants naturels issus du romarin et de la sauge par exemple sont déjà exploités et commercialisés en tant qu'additifs nutritionnels antioxydants (Schuller, 1990).

L'oxydation des lipides est un processus complexe en chaîne produisant plusieurs types de radicaux libres. L'oxydation est influencée par la température, la lumière, l'air, les propriétés physiques et chimiques du substrat, ainsi que par la présence de catalyseurs d'oxydation ou d'initiateurs tels que les métaux dont une trace inférieure à 0,5ppm est suffisante pour catalyser la réaction d'oxydation (Chapitre I, paragraphe VI.3.1)

Les antioxydants peuvent exercer leurs propriétés de protection lors des différents stades du processus d'oxydation et par différents mécanismes. Il existe deux grandes types d'antioxydants : les primaires et les secondaires ou préventifs (voir Chapitre 1, paragraphe VI.3.2).

Plusieurs systèmes modèles d'oxydations accélérées sont utilisés et différentes méthodes ont été développées afin d'évaluer l'activité antioxydante (Ragnarson, 1977 ; Frankel, 1993 ; Moure, 2001) (voir Chapitre 1, partie VII).

L'oxydation des lipides dans les produits alimentaires induit non seulement une diminution de la valeur nutritive de l'aliment, mais aussi des effets reconnus nuisibles pour le consommateur qui peuvent être associés à des risques de maladies cancérigènes chez l'homme (Papas, 1999). La présence d'antioxydants dans l'alimentation est devenue de plus en plus essentielle pour la qualité et la sécurité de l'aliment. L'importance des antioxydants naturels comme additifs alimentaires est déjà établie. Les effets négatifs des antioxydants synthétiques donnent lieu à l'interdiction de leur utilisation par les consommateurs et poussent les intérêts scientifiques vers leur substitution par des agents naturels. Cependant, les produits naturels y compris les

antioxydants peuvent être toxiques sous certaines conditions. Parfois certains d'entre eux possèdent des propriétés fonctionnelles additionnelles : antibactérienne, antimutagène, etc…
Les plantes aromatiques sont prometteuses et constituent une grande source d'antioxydants naturels pour l'industrie agroalimentaire (Yen *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2001)

III.2. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles

L'objectif de la présente étude est de comparer l'activité antioxydante des huiles essentielles des plantes aromatiques oubliées ainsi que de leurs résidus d'hydrodistillation en utilisant les méthodes suivantes : la méthode Oxipress, la méthode d'évaluation des diènes et triènes conjugués et la méthode de détermination de l'oxydation du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl dite DPPH. La sensibilité, la rapidité, l'applicabilité ainsi que la mise en relation des résultats sont discutés.

III.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante des HE en utilisant la méthode Oxipress

Les parties aériennes d'*Achillea millefolium,* de *Tanacetum balsamita* L., de *Calamintha grandiflora* (L.) Moench, de *Myrrhis odorata* (L.) Scop, et de *Monarda didyma* ont été utilisées dans cette étude. Ces plantes ont été cultivées sous serre pendant l'année 2008 et collectées en juillet 2008 durant leurs stades de floraison. Les huiles essentielles ont été isolées par hydrodistillation et la composition chimique de chaque huile essentielle a été analysée (cf. chapitre 2, paragraphe II).
L'activité antioxydante des huiles essentielles a été déterminée dans l'huile de tournesol au moyen de l'appareil Oxipress (Mikrolab Aarhus, Denmark). Cette méthode consiste à évaluer la consommation d'oxygène en mesurant la variation de pression dans une enceinte hermétiquement fermée et renfermant l'échantillon à doser ainsi que de l'oxygène. La technique expérimentale ainsi que les différentes valeurs expérimentales sont bien détaillées dans la partie expérimentale (cf.V.1)
La période d'induction (PI) de l'oxydation a été évaluée au moment où la pression commence à chuter (voir partie expérimentale cf. V.1). Le facteur de protection (FP) ainsi que l'activité anti-oxydante (AA) sont calculés à partir des formules suivantes :

$$FP = PI_X / PI_K \qquad AA = (PI_X - PI_K) / PI_{BHT} - PI_K$$

Où : PI_X est la période d'induction de l'échantillon avec additif ;

PI_K est la période d'induction de l'échantillon sans additif ;

PI_{BHT} est la période d'induction de l'échantillon contenant la référence BHT (hydroxy toluène buthylé) ;

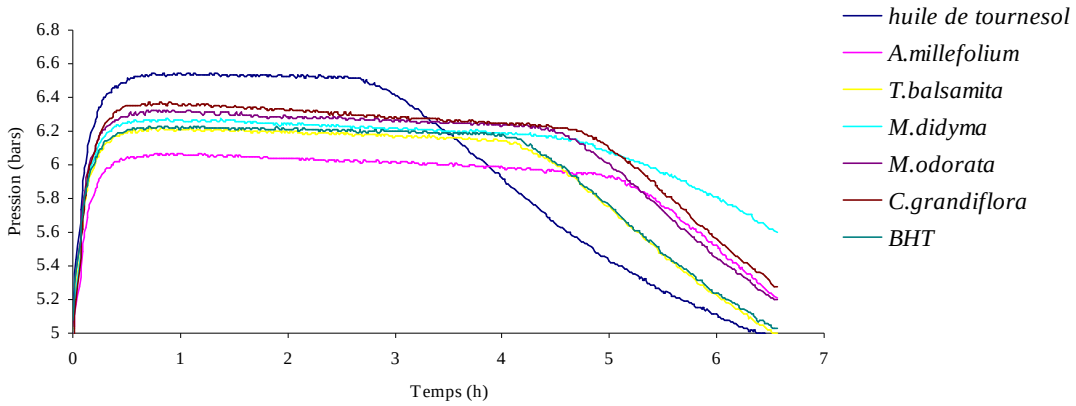


Figure 18: Oxydation de l'huile de tournesol à 110°C, 5 bars, en présence de différentes huiles essentielles

La méthode Oxipress est une procédure avantageuse et performante pour laquelle aucun composé chimique n'a été utilisé. Les courbes d'oxydation typiques obtenues sont présentées dans la figure (18). La variation de la pression ainsi que la période d'induction ont été mesurées avec précision.

Dans le cas de l'ajout de l'huile essentielle dans l'huile de tournesol (huile vecteur), la chute de pression a été retardée d'un temps T, indiquant l'effet antioxydant de la substance ajoutée dans l'huile vecteur.

Les effets des huiles essentielles évalués pour différentes concentrations de celles-ci (0,05% ; 0,1% et 0,2%) sont présentés dans le tableau (15). L'huile essentielle de *M. didyma* montre une activité antioxydante plus efficace, en comparaison des autres huiles essentielles. Les huiles essentielles de *M. didyma* et d'*A. millefolium* ont été les plus efficaces pour la stabilisation de l'huile de tournesol. L'efficacité des huiles essentielles diminue en fonction de l'ordre suivant : *M. didyma* > *A. millefolium* > *C. grandiflora* >*M. odorata* >*T. balsamita* pour des concentrations de 0,05%, 0,1% et 0,2%.

Tableau 15: Activité antioxydante (AA) des huiles essentielles comparée à l'efficacité du BHT

Espèces	[ ] %	Facteur de protection (FP)	Activité antioxydante (AA)	période d'induction (PI)	CV (%)
Sans additif	0,00	1,00	-	-	
BHT	0,02	1,47	1,00	4,26	0,04
M. didyma	0,2	**1,73**	1,55	5,02	0,01
M. didyma	0,1	1,37	0,79	3,97	0,01
M. didyma	0,05	1,29	0,62	3,74	0,01
A. millefolium	0,2	1,71	1,51	4,96	0,05
A. millefolium	0,1	1,29	0,62	3,74	0,05
A. millefolium	0,05	1,17	0,36	3,39	0,05
C. grandiflora	0,2	**1,63**	1,34	4,73	0,02
C. grandiflora	0,1	1,22	0,47	3,54	0,02
C. grandiflora	0,05	1,18	0,38	3,42	0,02
M. odorata	0,2	**1,61**	1,30	4,67	0,12
M. odorata	0,1	1,2	0,43	3,48	0,12
M. odorata	0,05	1,17	0,36	3,39	0,12
T. balsamita	0,2	1,41	0,87	4,09	0,04
T. balsamita	0,1	1,2	0,43	3,48	0,04
T. balsamita	0,05	1,1	0,21	3,19	0,04

PI : période d'induction

FP : facteur de protection

CV : coefficient de variation (%), (n=3)

L'efficacité des huiles essentielles dans les conditions appliquées (T°C: 110°C, P: 5 bars) est dans l'ordre décroissant suivant : *M. didyma* (0,2%) > *A. millefolium* (0,2%) > *C. grandiflora* (0,2%) > *M. odorata* (0,2%) > *T. balsamita* (0,2%) > *M. didyma* (0,1%) > *A. millefolium* (0,1%) > *C. grandiflora* (0,1%) > *M. odorata* (0,1%) > *T. balsamita* (0,1%) > *M. didyma* (0,05%) > *C. grandiflora* (0,05%) > *A. millefolium* (0,1%) > *M. odorata* (0,1%) > *T. balsamita* (0,1%)

L'huile essentielle est un complexe mixte de composés naturels volatils. Ainsi, l'activité antioxydante totale de l'huile essentielle va dépendre de la présence du composé actif dans cette huile ainsi que de sa concentration. Certains composés phénoliques comme le thymol

qui est présent dans plusieurs huiles essentielles, particulièrement celles isolées des plantes contenant le gène Thymus, présentent une activité antioxydante élevée à cause de la présence du radical hydroxyle libre dans sa structure chimique (figure 19).

C'est le cas chez *M. didyma* qui contient 47,06% de thymol dans la composition de son huile essentielle (voir Tableau 13). L'activité antioxydante de *M. didyma* a été testée via la méthode de DPPH par Fraternal *et al.* pour laquelle l'HE a montré une activité antioxydante comparable à celle du Trolox (Fraternale *et al.*, 2006) (figure 19). Ce dernier est une molécule dérivée de la vitamine E et de référence pour la mesure du pouvoir antioxydant de mélanges complexes.

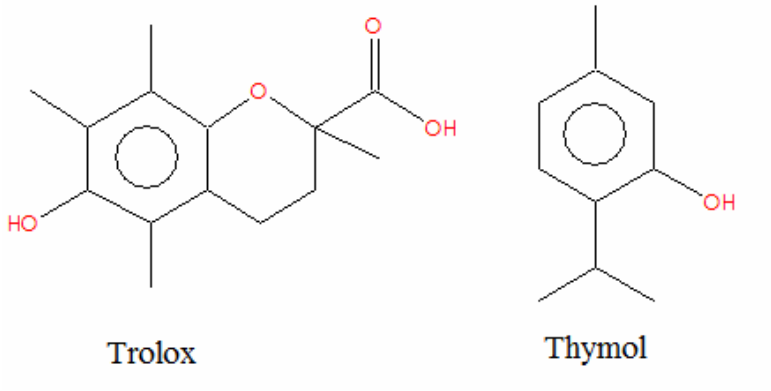


Figure 19: structures chimiques du Trolox et du Thymol

L'activité antioxydante des huiles essentielles dépend également de la concentration de celles-ci. Dans le cas d'une dose élevée (0,2%) de *M. didyma, d'A. millefolium, de C. grandiflora* et de *M. odorata,* l'activité de leurs huiles est comparable à celle du BHT ajouté à une concentration de 0,02%.

Dans la littérature, l'activité antioxydante d'*A. millefolium* a été évaluée par des méthodes autres que l'Oxipress, comme la DPPH (Candan *et al.*, 2003) où il a été démontré que l'extrait méthanolique (fraction hydrophile) de l'Achillée millefeuille présente une activité (IC_{50} : 45,60µg/ml) deux fois plus faible de celle du BHT (IC_{50} : 19,30µg/ml). Par contre, l'activité antioxydante de l'HE s'est révélée être plus efficace (IC_{50} : 1,56µg/ml) que celle du BHT (IC_{50} : 19,30µg/ml).

Il faut se placer à une concentration de 0,2% pour avoir une activité antioxydante d'*A. millefolium* (FP=1,71) plus efficace que celle de la référence synthétique (BHT) utilisée à 0,02% (voir tableau 15). Ceci pourrait être relié à la présence de composés phénoliques (voir Tableau 4). Il a été démontré que l'efficacité antioxydative dans des sources naturelles, était

en particulier liée à la présence de composés phénoliques. Ces derniers ont un rôle important dans l'inhibition de l'auto-oxydation des huiles (Ramarathnam *et al.*, 1995).

Dans le but de détecter les composés bioactifs parmi les composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle d'*A.millefolium*, des tests d'activité individuelle ont été effectués par Candan et al sur les molécules suivantes : eucalyptol, camphre, béta-pinène, bornéol, terpinène-4-ol et alpha-pinène. Aucune activité *in-vitro* n'a été détectée pour ces composés. En conclusion, ces résultats montrent qu'il existe une synergie entre les composés majoritaires de l'huile essentielle offrant à cette huile une activité antioxydante globale efficace.

D'après la Figure 20, on peut conclure que l'ajout de 0,2% de l'huile essentielle d'Achillée millefeuille permet de préserver l'huile de tournesol et de retarder l'oxydation de celle-ci de deux heures à 110°C et sous 5 bars. Cela correspond à une augmentation de la résistance de l'huile de tournesol de 71%.

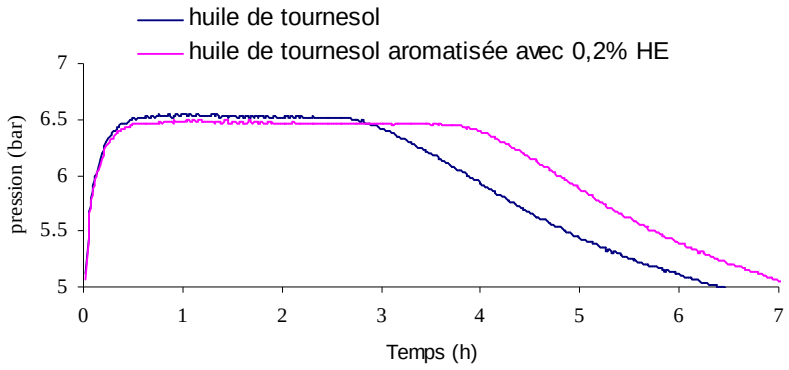


Figure 20: courbe d'oxydation de l'huile de tournesol en présence de l'HE d'*Achillea millefolium*

L'activité antioxydante du thé d'Aubrac est très semblable à celle de *Myrrhis odorata* pour les différentes doses (0,05%, 0,1% et 0,2%). Sachant que le composé majoritaire du cerfeuil musqué est l'anéthole et qu'il est présent à 75%, on peut relier de façon quasi évidente l'activité antioxydante modeste de cette plante à la présence de ce terpène ou éther-oxyde apolaire (figure 21). Ceci est en accord avec les travaux de Freire *et al.* dans lequel l'anéthole révèle une activité anti-oxydante modeste (Freire *et al.*, 2005).

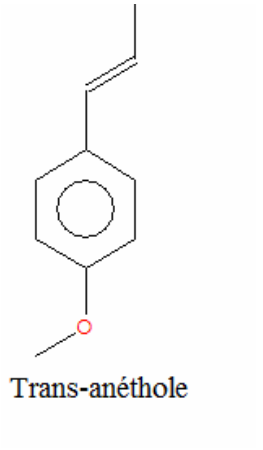


Figure 21: structure chimique du Trans-anéthole

Dans le cas du thé d'Aubrac, les composés majoritaires de l'HE sont : l'isomenthone, l'isomenthol et le néo-isomenthol. Ces composés aromatiques par la présence d'un groupe hydroxyle (voir figure 22) sont responsables de l'activité antioxydante de *Calamintha grandiflora*.

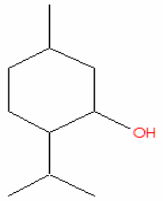


Figure 22: structure chimique de l'isomenthol (trans) et du néo-isomenthol (cis)

D'après la figure 23, on remarque que la période d'induction de l'huile de tournesol aromatisée par l'HE de *C. grandiflora* a été augmentée de 30 minutes. La présence de 0,1% de cette HE a été suffisante pour augmenter la résistance de l'huile de tournesol d'une valeur de 16% face à l'oxydation.

Ces résultats montrent une activité antioxydante non négligeable de *Calamintha grandiflora* alors qu'aucune étude n'en a fait état jusqu'à présent dans la littérature.

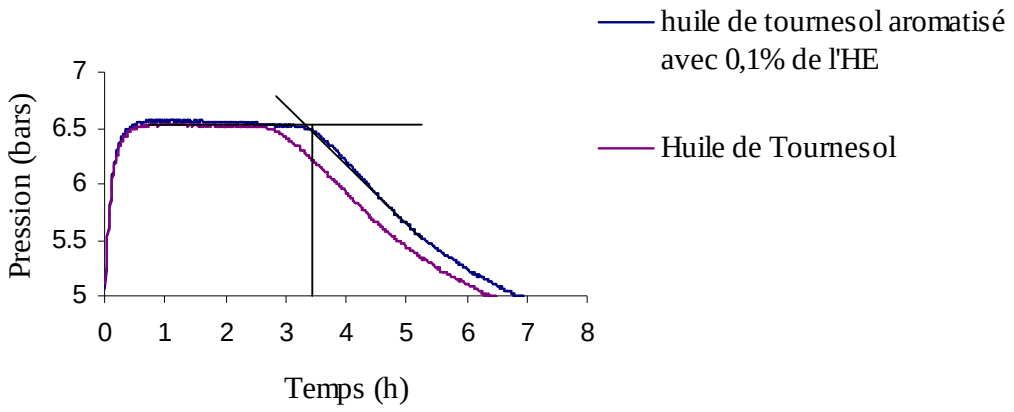


Figure 23: Courbe d'oxydation de l'huile de tournesol en présence de l'HE de la *Calamintha grandiflora*

Il existe un nombre très faible d'études scientifiques qui font état de l'activité antioxydante de *Tanacetum balsamita*. En 2000, Bandonienne *et al.* ont comparé l'activité antioxydant de l'extrait acétonique de Balsamite avec d'autres extraits des autres plantes aromatiques en utilisant différentes méthodes dont l'Oxipress (Bandoniene *et al.*, 2000). Les facteurs de protection de l'extrait acétonique de la Balsamite ont été calculés à partir des périodes d'inductions. Si on compare ces résultats à ceux obtenus à partir de l'espèce d'origine française, on remarque que l'activité antioxydante à une concentration donnée (0,2%) est légèrement plus élevée (FP : 1,66) dans le cas de l'extrait acétonique que dans le cas de notre huile essentielle (FP : 1,41). L'extrait acétonique contient également des composés non volatils dont certains sont certainement susceptibles d'avoir une activité antioxydante. D'autre part, le facteur de protection est dépendant de la concentration pour l'huile essentielle, et dose indépendant pour l'extrait acétonique de la Balsamite étudiée par Bandoniene *et al.* pour lequel le facteur de protection est relativement stable dans la gamme de concentration étudiée. Il est nécessaire de signaler que l'espèce utilisée par Bandonienne *et al.* posséde la carvone comme composé majoritaire à la différence de notre espèce où la tanacétone (béta-thujone) constituait 83,57% (voir Tableau 9).

III.2.2. Evaluation de l'activité antioxydante des HE via des méthodes spectrophotométriques (diènes et triènes conjuguées)

Aujourd'hui, la recherche se concentre sur l'extraction d'antioxydants naturels qui seraient moins toxiques et plus efficaces que les antioxydants synthétiques généralement utilisés pour combattre le " stress oxydant ", qui possède à priori un effet fortement pathologique. Dans des organismes vivants, la protection contre des radicaux libres et l'espèce d'oxygène réactive est réalisée par des enzymes antioxydatives, comme la glutathion peroxydase ou bien les vitamines, les pigments, les phénols et polyphénols. Des antioxydants synthétiques, comme le butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA), sont bien connus pour la capacité qu'ils ont d'arrêter les réactions en chaîne de peroxydation d'un lipide.

Malheureusement, il a été montré qu'ils sont capables d'augmenter le risque des maladies cancérigènes, de causer des dégâts pulmonaires chez les souris, une nécrose du foie, des hémorragies ainsi que la mort des rats (Branen, 1975). À cet égard, les flavonoïdes et d'autres polyphénols ont capté l'attention en raison de leur non toxicité et de leur potentialité pour la mise en œuvre dans les régimes alimentaires chez l'homme.

L'oxydation des lipides, autrement dit la peroxydation des acides gras polyinsaturés (PUFA) génère une grande quantité de produits dérivés comme les diènes conjugués dont la coupure des doubles liaisons génère des aldéhydes. Le stress oxydant correspond à une perturbation dans le fonctionnement du statut oxydatif intracellulaire. C'est un déséquilibre entre les systèmes de défense antioxydants et la production des radicaux libres oxygénés. Les marqueurs du stress oxydant sont surtout les produits de l'oxydation des lipides : diènes conjugués, hydroperoxydes, aldéhydes, TBARS (tiobarbituric acid reactive substances). L'estimation des diènes conjugués est déterminée à partir de l'absorption différentielle à 234 nm. Les molécules comportant un diène conjugué sont caractérisées par une absorption intense de lumière (Σ = 27000 mol^{-1} $l.cm^{-1}$) entre 215 nm et 250 nm (λ_{max} = 232 nm). La mesure de la quantité de diènes conjugués dans les acides gras donne une indication sur le degré d'insaturation des acides contenus dans l'huile. Ainsi il existe plusieurs paramètres qui permettent de contrôler l'évolution de l'oxydation des huiles (voir chapitre 1, paragraphe VII.2), parmi eux, la valeur des acides gras (FFA, Free Fatty Acid Value), la valeur de peroxydation (PV, peroxidation value), les diènes conjugués (CD) et les triènes conjugués (CT). Les diènes et les triènes conjugués constituent de bonnes sources de mesures pour l'état d'oxydation des huiles (Dapkevicius, 1998).

L'objectif de ce travail est d'étudier l'impact des huiles essentielles des plantes aromatiques oubliées dans le retardement du processus d'oxydation de l'huile de tournesol. L'huile de tournesol a été utilisée comme huile vecteur. Nous avons préparé 5 échantillons de l'huile de tournesol aromatisée par les cinq huiles essentielles à deux concentrations différentes. Les quantités exactes ainsi que la procédure expérimentale et les paramètres sont décrits en détail dans la partie expérimentale (cf. V.2).

Par la suite, à l'aide de la méthode des diènes conjugués, qui mesure le coefficient d'extinction en fonction du temps et en fonction de chaque huile essentielle, on a pu distinguer l'impact de chaque huile essentielle dans l'inhibition de la formation des diènes ou des triènes conjugués en travaillant à deux longueurs d'ondes différentes (232nm et 268nm).

Après 15 jours d'incubation à 80°C des échantillons d'huiles aromatisées, on remarque que l'huile essentielle de *M. didyma* a été la plus efficace comparativement aux autres huiles essentielles. Ainsi l'ordre d'efficacité de l'activité antioxydante des huiles essentielles étudiées est le même que celui observé en utilisant la méthode Oxipress.

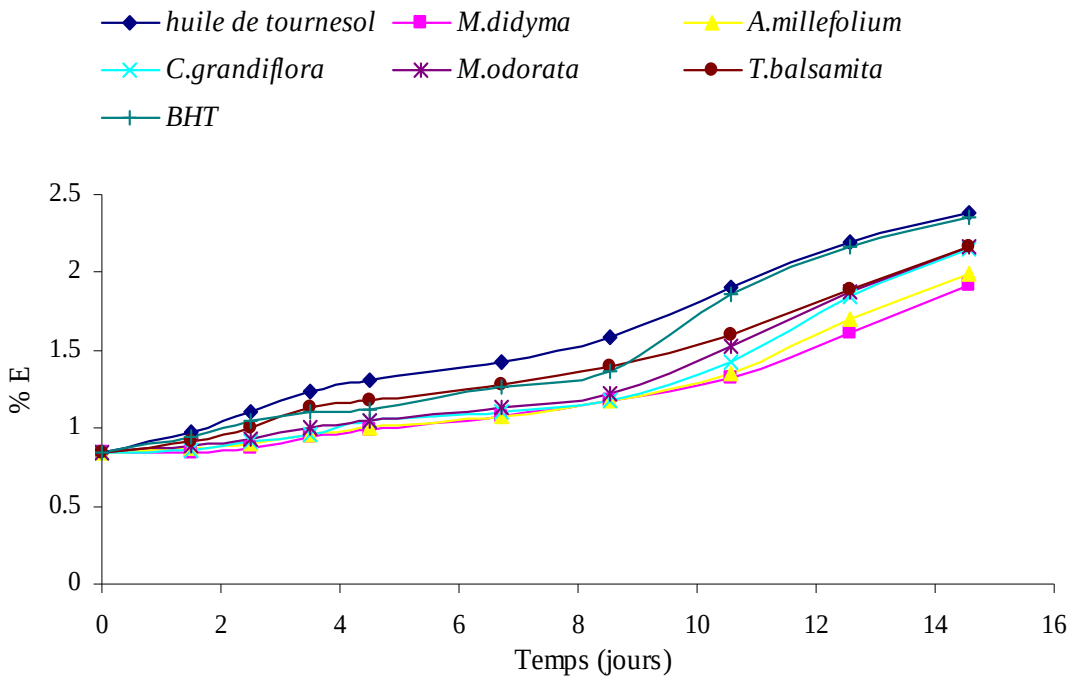


Figure 24: Contrôle de l'évolution de l'oxydation de l'huile de tournesol en fonction de la quantité de triènes conjugués mesurés à 268nm, (% de l'HE dans l'huile de tournesol = 0,1%)

On peut remarquer qu'en aromatisant l'huile de tournesol avec 0,1% d'huile essentielle on a retardé la formation des produits d'oxydation secondaire (triènes conjugués). L'huile de tournesol utilisée a résisté à l'oxydation secondaire pendant 8 jours. Au-delà, les produits d'oxydation secondaire ont commencé à se former (figure 24). En fonction de l'activité antioxydante de chaque huile essentielle, un retardement de la progression de l'oxydation est observé, sachant que toutes les huiles essentielles étudiées ont été plus efficaces que la référence synthétique utilisée (BHT).

Si on travaille à une concentration plus faible en huiles essentielles soit à 0,05% (figure 25), l'efficacité antioxydante diminue. Cependant l'ordre d'efficacité est le même que celui obtenu dans les cas d'ajout de 0.1% de l'HE. Toujours au-delà de 8 jours, l'évolution de l'oxydation dans les huiles aromatisées commence à progresser de plus en plus rapidement, contrairement à l'huile de tournesol pour laquelle la formation des produits d'oxydation secondaire (triènes conjugués) commence au-delà d'une journée à 80°C.

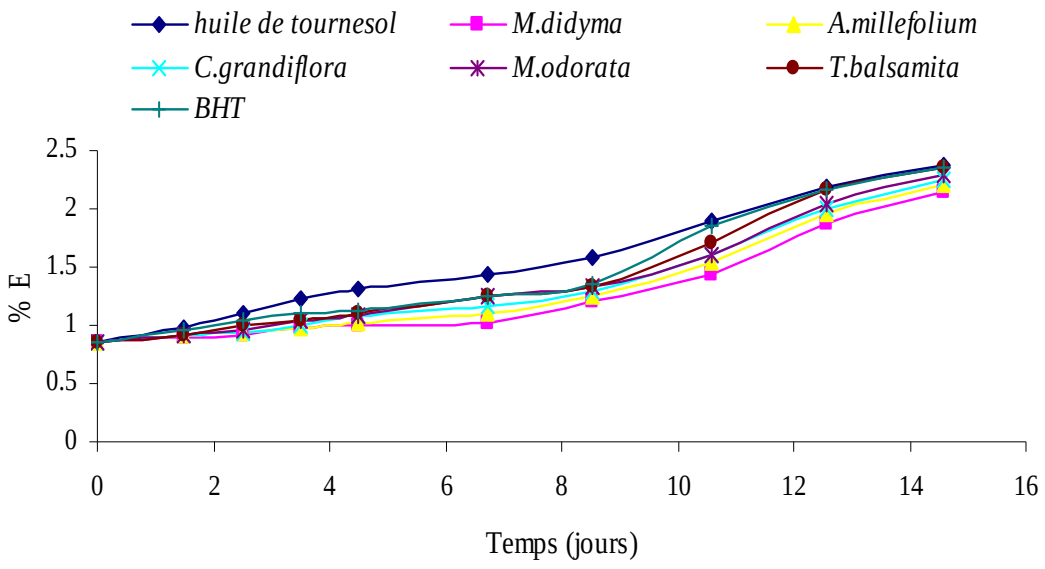


Figure 25: Contrôle de l'évolution de l'oxydation de l'huile de tournesol en fonction de la quantité de triènes conjugués mesurés à 268nm, (% de l'HE dans l'huile de tournesol = 0,05%)

En mesurant l'absorption à la longueur d'onde de 232nm, on détecte cette fois-ci les diènes conjugués (figure 26). On remarque que la formation des diènes conjugués a été plus rapide que celle des triènes. Dès les premières heures, la concentration en produits d'oxydation primaire a augmenté d'une façon très rapide à 80°C. Cependant, la différence d'activité antioxydante entre les huiles essentielles est très faible pour 0,05% d'HE. La concentration en

diènes conjugués formés lors de l'oxydation primaire est très élevée par rapport à celle des triènes conjugués.

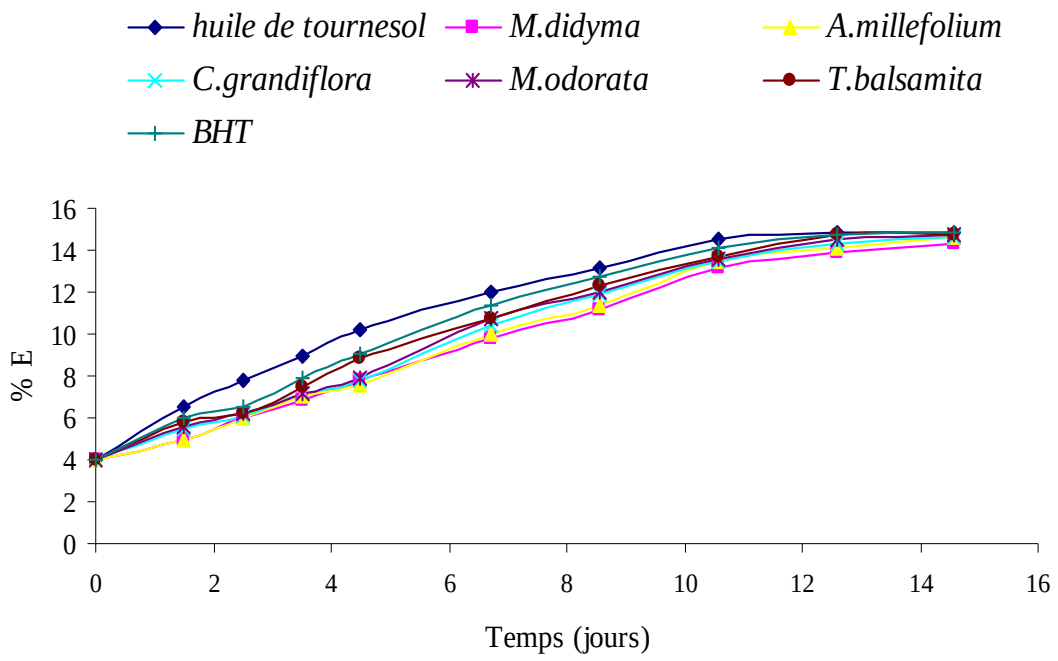


Figure 26: Contrôle de l'évolution de l'oxydation de l'huile de tournesol en fonction de la quantité de diènes conjugués mesurés à 232nm, (% de l'HE dans l'huile de tournesol = 0,05%)

En appliquant une dose d'huile essentielle deux fois plus élevée (0,1%), on arrive à distinguer des activités antioxydantes distinctes pour chacune des huiles essentielles. Par exemple, à partir de la figure 27 on peut conclure que l'huile essentielle de *M. didyma* est la plus efficace en retardant le plus longtemps la formation des produits d'oxydation primaire, et l'ordre d'efficacité antioxydante est le même que celui obtenue *via* la méthode Oxipress.

En général, la méthode spectrophotometrique est très performante, elle donne une idée très rapide sur l'évolution du processus d'oxydation, et permet de distinguer les deux stades d'oxydation primaire et secondaire. Cette méthode est plus avantageuse car on travaille dans des conditions plus proches des conditions de stockage des aliments (pression atmosphérique, T° : 80°C), que celles utilisées pour l'Oxipress où les conditions sont accélérées (T° :110°C, Pression : 5 bars). En outre, la méthode Oxipress permet de comparer d'une façon plus fine la différence entre les activités antioxydantes, grâce aux valeurs des facteurs de protection que l'on peut calculer.

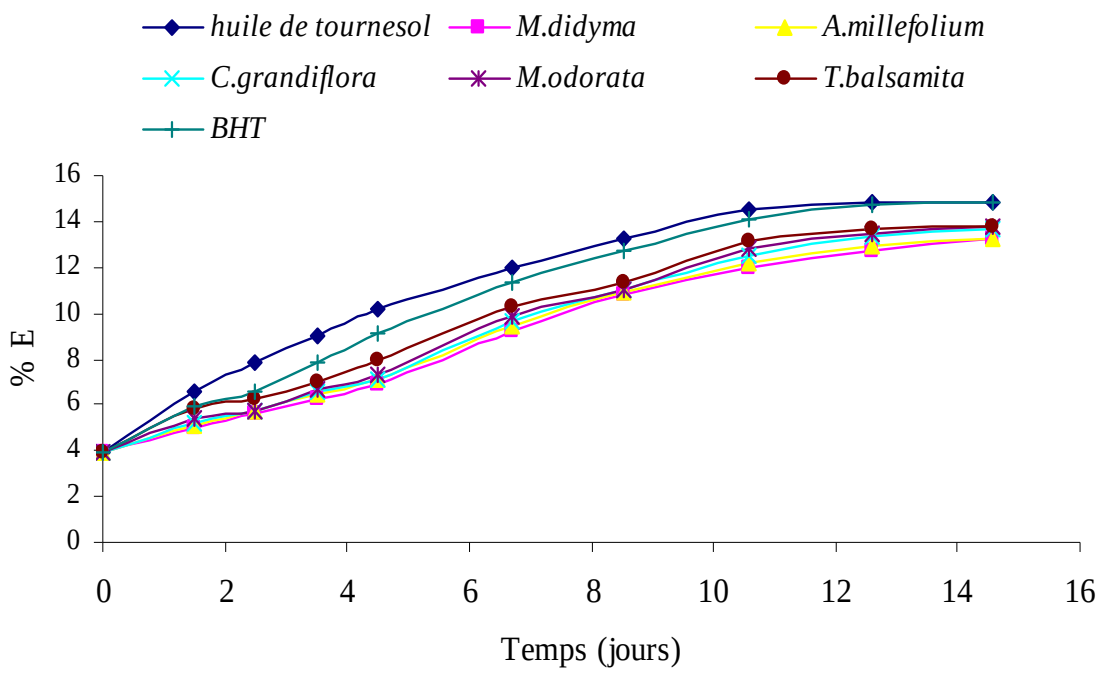


Figure 27: Contrôle de l'évolution de l'oxydation de l'huile de tournesol en fonction de la quantité de diènes conjugués mesurés à 232nm, (% de l'HE dans l'huile de tournesol = 0,1%)

En appliquant ces deux méthodes de mesure nous avons pu observer que les cinq huiles essentielles possédaient une activité antioxydante significative avec des variations qui dépendent de plusieurs facteurs, comme ; le taux des composés phénoliques, les groupements fonctionnels donneurs d'électrons, les fonctions hydroxyles, ainsi que des synergies entre les composés actifs qui constituent chaque huile essentielle.

Ces résultats positifs sur l'activité antioxydante des huiles essentielles suggèrent des études plus approfondies de leur activité biologique, afin d'élaborer des produits naturels de valeur pouvant être commercialisés et substitués aux antioxydants existants.

Ces propriétés antioxydantes obtenues à partir des fractions volatiles des plantes aromatiques oubliées, peuvent être complétées et renforcées par des activités biologiques des résidus d'hydrodistillation. Nous avons alors décidé de faire des extractions de ces résidus par différents solvants pour évaluer leur potentiel antioxydant.

III.3. Evaluation de l'activité antioxydante des résidus d'hydrodistillation des 5 plantes aromatiques par la méthode de DPPH

III.3.1. Principe de la méthode de DPPH

L'oxydation des lipides contenus dans les aliments est responsable de la formation des mauvaises odeurs (off-odors) et des composés chimiques indésirables nocifs pour la santé humaine. Les antioxydants sont utilisés dans les industries alimentaires pour retarder le processus d'oxydation. Plusieurs tests ont été utilisés pour mesurer la résistance des lipides face à l'oxydation en présence d'antioxydants (cf. Chapitre I, paragraphe V.3.2). Ces tests sont généralement adaptés pour des milieux sous forme d'émulsion lipidique. L'auto-oxydation est un phénomène lent, le processus de formation radicalaire inclut les réactions en chaîne, induction, propagation et terminaison. Pendant la période d'induction, des radicaux alkyles sont formés et réagissent avec les molécules d'oxygène pour générer les hydroperoxydes et les peroxydes durant la phase de propagation. La phase de terminaison consiste à l'association des deux radicaux afin de former un produit stable. La majorité des tests consiste à réduire la période d'induction, en utilisant des températures hautes, et, ou des pressions fortes. A partir de ces tests, l'activité antioxydante de plusieurs extraits de plantes a été évaluée en mesurant la consommation d'oxygène ou la production des hydroperoxydes ou autres produits de dégradations.

La méthode de DPPH, consiste à utiliser un radical stable, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\cdot}$, figure 28) dans du méthanol (dans la plupart des cas) (Dvaranauskaite *et al.*, 2008). La réduction du $DPPH^{\cdot}$ est contrôlée en mesurant l'absorbance de la solution à une longueur d'onde caractéristique (515 nm). A cette longueur d'onde le radical absorbe, mais après sa réduction par l'antioxydant (AH) ou un autre radical, l'absorption diminue.

$$DPPH^{\cdot} + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\cdot}$$

$$DPPH^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow DPPH\text{-}R$$

Brand-Williams *et al.* ont émis trois hypothèses qui expliqueraient l'efficacité anti-radicalaire de plusieurs composés phénoliques (Brand-Williams, 1995).

La première hypothèse consiste en une réaction de donation d'un hydrogène suivie de la délocalisation du groupe substitué en *para* (voir figure 28, Réaction 1). Le modèle était l'eugénol ; cette hypothèse est valable pour tous les phénols qui possèdent deux ou trois atomes d'hydrogène sur le carbone en position *para* du groupe aromatique.

La deuxième hypothèse consiste à une dimérisation entre deux radicaux phenoxyles (figure 28, réaction 2), comme décrite par Pokorny *et al.* pour le phénol avec la position *ortho* et *para*. Après dimérisation, deux groupements hydroxyles régénèrent un transfert intramoléculaire de H˙ , ce dernier peut réagir avec le DPPH˙ .

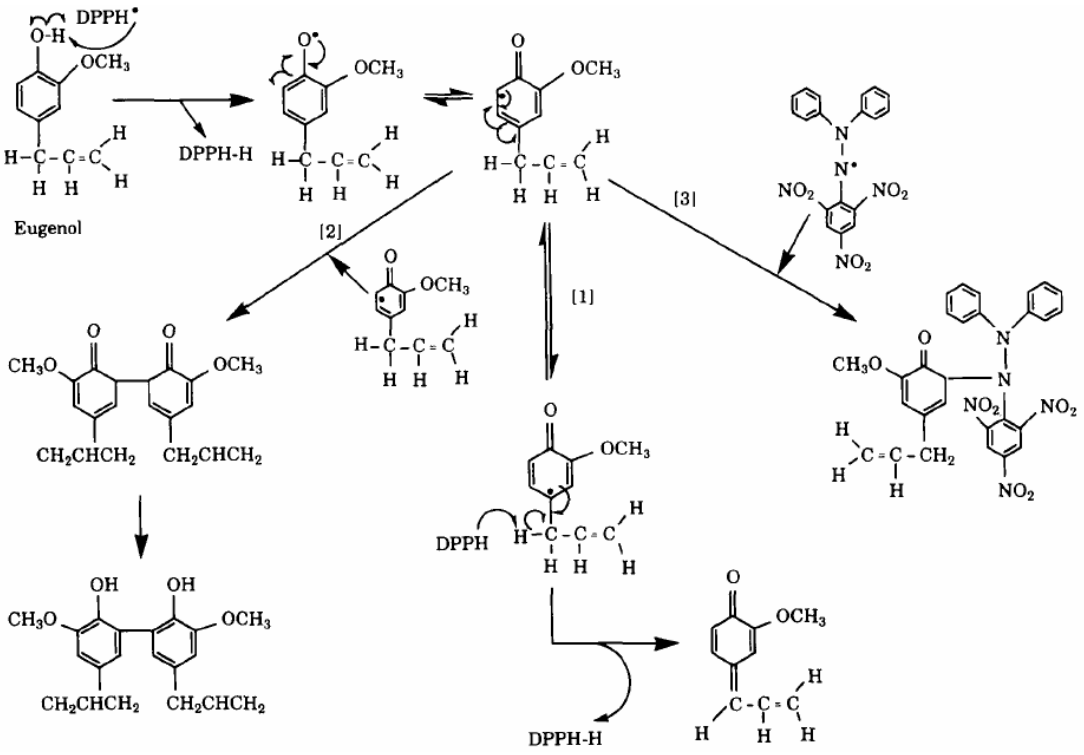


Figure 28: Réactions proposées par Brand-Williams et al, de l'eugénol avec le DPPH˙

La troisième hypothèse consiste en la complexation du DPPH˙ avec un radical aryle (figure 28, réaction 3)

Il est connu que les polyphénols ont une activité antioxydante plus efficace que les monophénols, par exemple l'acide caféique possède une activité antiradicalaire plus efficace que l'acide coumarique (monophénol). L'acide gallique, un triphénol est plus actif que l'acide protocatechique (ARP : anti radical power = 12,5 et 7,15 respectivement) (Brand-Williams, 1995)

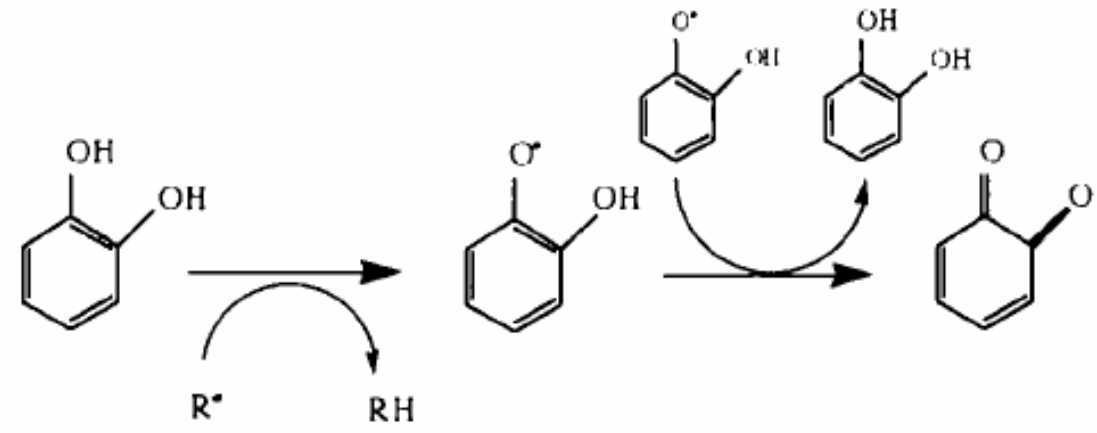


Figure 29 : Mécanisme de régénération de l'*ortho*-diphénol

La position du groupement hydroxyle est très importante. Les composés qui possèdent le groupement hydroxyle en position *ortho* et *para* ont une activité antioxydante très forte en comparaison avec ceux qui possèdent un groupement hydroxyl en position *meta*. L'efficacité des diphénols (position *ortho* et *para*) est due à la stabilisation du radical (aryloxyle) par une liaison hydrogène ou par régénération des autres diphénols comme il est indiqué dans la figure 29.

Au départ le DPPH est sous sa forme 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl radicalaire. Ce radical a une couleur violette en raison de l'électron non apparié et de l'azote. Après réaction avec l'atome d'oxygène d'un capteur de radicaux, le DPPH-H réduit (2,2-diphényl-1-picrylhydrazin) qui est formé est jaune (figure 30).

Le changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie à 517 nm.

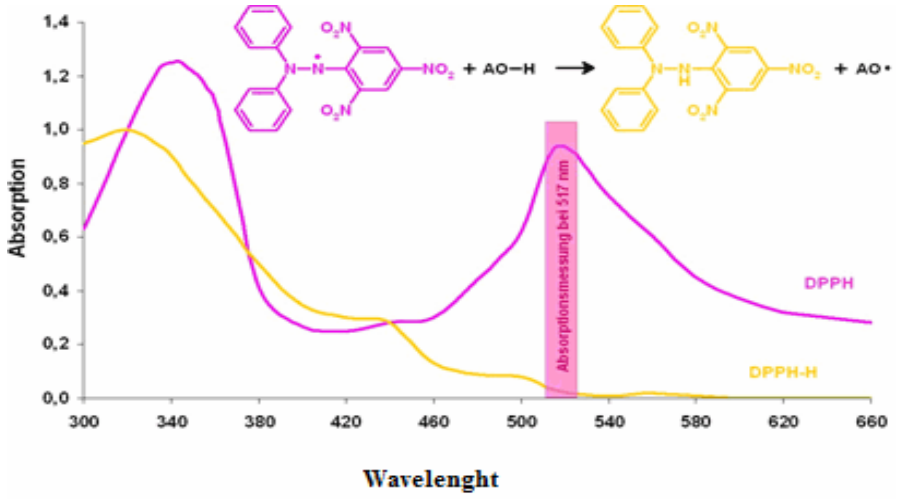


Figure 30: Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive

III.3.2. Comparaison des activités antioxydantes des résidus d'hydrodistillation mesurées par la méthode de DPPH.

Les résidus de chaque hydrodistillation, ont été extraits par l'intermédiaire d'un Soxhlet en utilisant trois solvants différents : le méthanol, l'éthanol, et l'acétone (figure 31). L'objectif de cette étude était de tester l'activité antioxydante des résidus, de les comparer pour chaque plante et d'évaluer l'efficacité des différents solvants sur l'extraction des composés antioxydants des résidus d'hydrodistillation. Le protocole expérimental de l'extraction, les quantités et les différents paramètres utilisés sont décrits en détails dans la partie expérimentale (Cf. III.2).

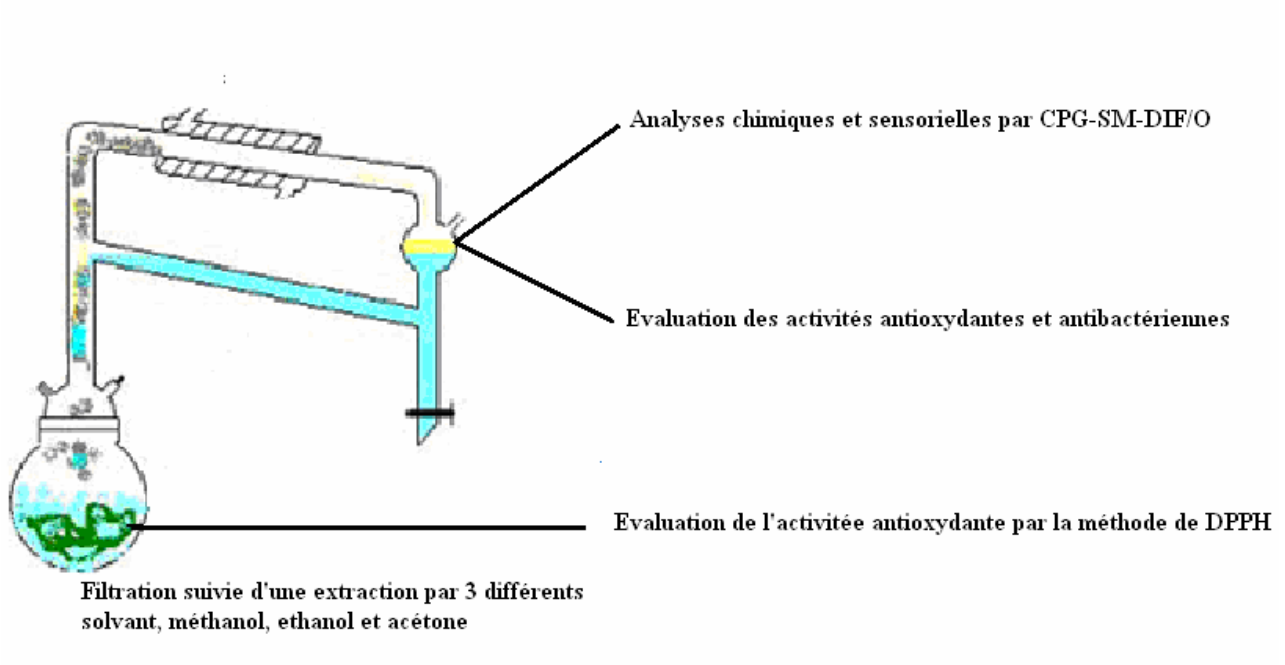


Figure 31: Schéma expérimental du protocole d'analyse chimique des HE et d'evaluation des activités antioxydantes et antibactériennes

L'activité antioxydante des extraits de résidus des plantes a été examinée en comparant cette activité avec celle du résidu d'hydrodistillation du Romarin (*Rosmarinus officinalis*) connu comme référence antioxydant naturel et traité dans les mêmes conditions.

Pourquoi la comparaison avec le Romarin ?

Le 30 juin 2008, l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (E.F.S.A.) a rendu un avis indiquant que l'utilisation d'extraits de romarin en tant qu'antioxydant dans les aliments ne présentait pas de risque pour la santé des consommateurs. Cet avis ouvre la voie à l'adoption officielle des extraits de Romarin dans la réglementation sur les additifs alimentaires, permettant de les étiqueter « antioxydant : extrait de romarin ». Cela répond parfaitement aux exigences croissantes des consommateurs pour la naturalité des produits alimentaires.

L'inhibition du DPPH radicalaire a été évaluée pour chaque résidu et pour chaque solvant et les résultats sont présentés dans le Tableau16. Une valeur faible d'IC_{50} indique une activité antioxydante forte. Le pourcentage d'inhibition (% I) pour chaque résidu a été calculé, les essais ont été réalisés en triplicata et les résultats sont exprimés en ± ET (Ecart type), la valeur d'IC50, la concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculé en fonction de quatre concentrations différentes d'échantillons préparés. (Cf. Partie Expérimentale, paragraphe IV.2.1).

Tableau 16: Activité antioxydante des extraits de résidus d'hydrodistillation

	IC_{50} (mg/mL) ± ET (n=3)		
Plante	Extraits Méthanoliques	Extraits Ethanoliques	Extraits Acétoniques
Achillea millefolium	0.45 ± 0.09	1.17 ± 0.08	1.22 ± 0.13
Monarda didyma	1.54 ± 0.12	1.85 ± 0.11	2.01 ± 0.12
Tanacetum balsamita	1.84 ± 0.1	2.53 ± 0.15	2.6 ± 0.12
Calamintha grandiflora	2.54 ± 0.12	2.69 ± 0.16	2.9 ± 0.21
Myrrhis odorata	2.60 ± 0.13	2,70 ± 0.14	2.95 ± 0.13
Rosmarinus officinalis	0.95 ± 0.08	1.19 ± 0.08	1.25 ± 0.14

ET : écart type

D'après le tableau 16, on remarque que l'activité antioxydante du résidu d'*Achillea millefolium* a été la plus efficace parmi les autres. L'ordre d'efficacité est le suivant *Achillea millefolium* > *M. didyma* > *T. balsamita* > *C. grandiflora* > *M. odorata.*

Les extraits méthanoliques ont été légèrement plus efficaces que les extraits éthanoliques et acétoniques. L'activité du résidu d'*A. millefolium* (0 .45mg/mL) a été plus efficace que celle de la référence naturelle « Romarin » (0.95 mg/mL).

En 2003, Candan *et al.* ont montré que l'activité antioxydante de la phase polaire de l'huile essentielle était plus intense (IC_{50} : 1,56µg/ml) que celle de l'extrait méthanolique (IC_{50} : 45,60 µg/ml) de la plante entière, *Achillea millefolium.* L'activité antioxydante de notre extrait méthanolique des résidus d'hydrodistillation d'Achillée millefeuille possède une activité 10 fois moins intense que l'extrait méthanolique de la plante entière d'origine turque étudiée par Candan *et al.* en 2003 (Candan *et al.*, 2003). Néanmoins, nos résidus d'hydrodistillation possèdent une activité antioxydante six fois supérieure à celle du thymol (IC_{50} :13,3 mg/ml ±0.19) testé dans les travaux de Cavar *et al.* sur la plante Sariette en utilisant le thymol comme contrôle (Cavar *et al.*, 2008).

A notre connaissance, aucune donnée n'a été publiée sur l'activité antioxydante utilisant le DPPH sur les résidus d'hydrodistillation de ces cinq plantes. La littérature décrit des approches différentes pour la détermination des activités antioxydantes des extraits de plantes. Ces approches méthodologiques différentes mènent à des résultats dispersés, qui ne sont pas toujours comparables.

Nous avons choisi la méthode DPPH en raison de sa simplicité, rapidité, sensibilité et de sa reproductibilité, mais aussi parce que les mesures IC_{50} exprimées en mg/mL sont comparables entre elles et non pas seulement à celle d'une référence.

III.4. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

La décomposition des denrées alimentaires est un problème sérieux en termes de sécurité sanitaire, de valeur nutritive et de perte économique pour l'industrie agroalimentaire. Depuis l'antiquité, les aliments ont toujours été préservés par chauffage, séchage, refroidissement ou fermentation. Depuis quelques années, les conservateurs alimentaires synthétiques sont devenus largement utilisés et des techniques ont été développées pour augmenter la durée de vie des produits. Cependant des conservateurs chimiques synthétiques, comme le benzoate, les nitrites et les sulfites posent des problèmes en termes de sécurité et de santé humaine. La recherche de nouveaux agents antibactériens d'origine naturelle s'oriente alors de plus en plus vers les acides organiques, les huiles essentielles ou bien les extraits végétaux. Les plantes restent la source la plus commune d'agents antimicrobiens. Leur utilisation comme remèdes traditionnels est la plus populaire pour 80 % de la population mondiale. En Asie, Amérique Latine et Afrique, plus de 35000 espèces de plantes sont utilisées à des fins médicinales. Les huiles essentielles, les épices ainsi que les plantes médicinales sont connues depuis des siècles pour leur activité biologique, en particulier antifongique, antibactérienne et antioxydante. Ces propriétés dépendent du chémotype de la plante qui détermine la composition chimique de ses propres substances de réserve (Rauha *et al.*, 2000). Ces dernières années, les laboratoires pharmaceutiques ont beaucoup investi dans le développement d'extraits de produits naturels à base de plantes pour contrecarrer la résistance des microorganismes pathogènes vis-à-vis d'agents antimicrobiens classiques.

Plusieurs études concernant les propriétés antimicrobiennes des extraits de plantes, que ce soit dans un système modèle ou dans un produit commercialisé peuvent être trouvées dans la littérature. Par exemple, Hao *et al.* en 1998 ont étudié l'efficacité d'extraits de plantes dans l'inhibition de l'activité pathogène de *Aeromonas hydrophilia* et *Listeria monocytogenes* dans les volailles cuisinées et réfrigérées (Hao *et al.*, 1998). Friedman *et al.* en 2002 eux, ont étudié l'activité antibactérienne du thym, de l'origan et de la cannelle, vis-à-vis d'*Escherichia coli.* Ils ont attribué l'activité antibactérienne de ces épices à la présence du thymol, du carvacrol, du cinnamaldehyde, de l'eugénol, du géraniol, du citral et du méthyle chavicol (Friedman *et al.*, 2002). Les terpènes, *para*-cymène et *gamma*-terpinène qui sont abondants dans la composition chimique de l'huile de Thym n'ont cependant pas d'effet contre la *Salmonella typhimurium.*

Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude qui puisse nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des HE. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à

penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action.

Shapiro *et al.* en 1994 ont démontré que le thymol inhibe la voie de génération de l'ATP (adénosine tri-phosphate) (Shapiro *et al.*, 1994). Ultée *et al.* en 2000 ont montré que le carvacrol provoque également un effet inhibiteur chez *Bacillus cereus* de l'ATP intracellulaire (Ultée *et al.*, 2000), comme dans le cas du thymol. Une réduction du potentiel membranaire et du pH intracellulaire impacte sur le flux de potassium (intra et extracellulaire) qui endommage la membrane cytoplasmique.

L'objectif de cette dernière étude présenté dans ce chapitre est d'évaluer l'activité antimicrobienne des cinq huiles essentielles via deux méthodes différentes. La première est la méthode de diffusion sur Agar. Le taux d'efficacité de l'HE vis-à-vis de chacune des bactéries utilisées est alors mesuré par le diamètre d'inhibition. La deuxième méthode est la Plaque de Microtitrage qui permet de calculer la concentration minimale inhibitrice (CMI) en huile essentielle nécessaire pour inhiber 50% des bactéries.

III.4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne en utilisant la méthode de diffusion sur Agar

Neuf bactéries pathogènes, cinq à Gram positif, Bacillus subtilus, Bacilus cereus, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis et quatre à Gram négatif, à savoir Salmonella typhymurium, Salmonella typhymurium D338, Salmonella enteritidis, Salmonella agona et Escherichia coli, ont été utilisées dans cette étude. L'activité antibactérienne a été évaluée par la méthode de diffusion sur agar.

10 µL de solution méthanolique d'HE à 1,0 % et 0,5 % ont été ajoutés dans les puits d'agar. Le méthanol pur a été utilisé comme un contrôle dans des échantillons blancs. Après incubation, les diamètres d'inhibition ont été mesurés au moyen d'un pied à coulisse avec une exactitude de 0,1 mm. L'activité antibactérienne a été calculée en une moyenne de trois répétitions, pour chaque HE et pour chaque bactérie. Le protocole ainsi que les différentes quantités sont décrites en détail dans la partie expérimentale (cf. VI.1).

Tableau 17: Activité antibactérienne des huiles essentielles mesurée à différentes concentrations et exprimée en diamètre d'inhibition

Bactéries	*M. didyma*		*C. grandiflora*		*A. millefolium*		*M. odorata*		*T. balsamita*		Antibiotique
	1%	0,5%	1%	0,5%	1%	0.5%	1%	0,5%	1%	0,5%	
	DI ±ET	DI ± ET	DI ± ET	DI ± ET	DI ± ET	DI ± ET	DI ± ET	DI ± ET	DI ± ET	DI ± ET	sensi-disc
Bacillus subtilis	16,5 ±0,1	12,8 ±0,2	19,1 ±0,1	8,5 ±0,2	11.0 ±0,2	8.6 ±0,1	9,2 ±0,2	8,5 ±0,2	10,2 ±0,1	8,2 ±0,1	16,8 ±0,1
Bacillus cereus	40 ±0,0	13,1 ±0,1	9,8 ±0,2	10,6 ±0,3	13.6 ±0,2	10.7 ±0,2	10,6 ±0,5	9,9 ±0,1	11,4 ±0,1	8,8 ±0,2	29,0 ±0,2
Staphylococcus aureus	13,1 ±0,1	10,2 ±0,3	9,7 ±0,3	na	12.8 ±0,1	8.8 ±0,2	8,8 ±0,2	na	9 ±0,2	na	21,0 ±0,3
Staphylococcus epidermidis	14,7 ±0,2	11,5 ±0,3	10 ±0,5	na	na	na	9,1 ±0,3	na	8,5 ±0,2	na	25,8 ±0,1
Salmonella typhimurium	15 ±0,3	11 ±0,2	8,9 ±0,2	na	9.2 ±0,2	na	8,1 ±0,3	na	8,4 ±0,2	na	31,2 ±0,3
Salmonella typhymurium D338	16,2 ±0,2	12,2 ±0,3	9,3 ±0,2	8,8 ±0,4	na	na	9 ±0,5	na	9,7 ±0,1	na	34,0 ±0,1
Salmonella enteritidis	15,2 ±0,1	11,5 ±0,2	10,1 ±0,4	9,1 ±0,1	na	na	8,1 ±0,5	na	8,9 ±0,1	na	32,2 ±0,3
Salmonella agona	13,8 ±0,3	10,7 ±0,2	8,4 ±0,3	na	10.4 ±0,4	9.1 ±0,3	na	na	na	na	20,8 ±0,3
Esherichia coli	18,9 ±0,4	14,4 ±0,4	10,3 ±0,1	na	na	na	10,2 ±0,4	na	9,7 ±0,2	na	26,4 ±0,2

DI : Diamètre d'inhibition en mm, ET : ecartype, na : non active

Un disque d'antibiotique de référence approprié a été appliqué sur chaque boite de pétri (ceftazidine/ l'acide clavulanique, 30/10 µg; BBL, CAZ/CLA, 231753); ces disques ont servi de contrôle positif efficace contre toutes les espèces bactériennes utilisées dans l'étude.

L'activité antimicrobienne des solutions méthanoliques d'HE a été évaluée *in vitro* contre ces neuf espèces bactériennes (Tableau 17). Les bactéries à Gram positif ont été plus sensibles que celles à Gram négatif, particulièrement *Bacillus cereus*, qui était l'espèce la plus sensible vis-à-vis de l'HE de *M. didyma*. Cette dernière, a montré une efficacité élevée contre toutes les cultures microbiennes pour une concentration de 1%. Très probablement le pourcentage élevé de thymol dans la composition chimique de l'HE de *M. didyma* a été le facteur favorable à son activité antimicrobienne. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment publiés sur les huiles essentielles riches en thymol, comme *Thymus vulgaris* aux propriétés antimicrobiennes reconnues fortes contre des bactéries pathogènes diverses (Loziene *et al.*, 2007).

Les HEs de *T. balsamita* et *M. odorata* à 0.5 % possèdent les activités antimicrobiennes les plus faibles contre la majorité des bactéries en comparaison avec les autres huiles appliquées à la même concentration. Elles montrent une activité antibactérienne seulement contre *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilus*.

L'huile essentielle de *C. grandiflora* a été la plus efficace contre *Bacillus subtilus*, cette huile s'est montrée plus active que l'antibiotique utilisé.

La majorité des huiles essentielles étudiées, présentent une faible activité inhibitrice marquée sur les deux espèces de *Salmonella*.

L'effet inhibiteur de l'HE de *M. didyma* (1%) contre *Escherichia coli, Salmonella enteritidis, Salmonella typhymurium et Staphylococcus epidermidis* était aussi bas que l'effet de l'antibiotique de référence; cependant, dans le cas de *Bacillus subtilus*, l'effet de l'HE de *M. didyma* était équivalent à celui de l'antibiotique.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*A. millefolium* a été plus efficace contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. Par contre, l'huile essentielle d'*A. millefolium* n'est pas active vis-à-vis d'*Escherichia coli*. Ces résultats sont très cohérents avec la littérature et en particulier avec les travaux de Candan et al (Candan *et al.*, 2003).

III.4.2. Evaluation de l'activité antibactérienne en utilisant la méthode de plaque de micro titrage.

Trois bactéries pathogènes ont été utilisées dans cette étude, deux bactéries à Gram Positif, *Bacilus cereus*, et *Staphylococcus aureus* et une à Gram négatif, *Salmonella typhimurium.* Les huiles essentielles ont été dissoutes au 1/1000 (v/v) dans de l'éthanol. Des plaques de micro-titrage ont été utilisées pour la détermination de la CMI. La procédure expérimentale est décrite en détail dans la partie expérimentale (cf. VI.2).

Le tableau 18 montre que l'huile essentielle de *C. grandiflora* est la plus efficace contre *Bacillus cereus* (CMI : 0,08 µg/mL), résultat cohérent avec les expériences de diffusion sur Agar. Par contre *Bacillus cereus* est la bactérie la plus résistante vis-à-vis des quatre autres huiles essentielles. *Salmonella typhimurium* est la moins sensible parmi les trois bactéries. Les activités antibactériennes des cinq huiles essentielles vis-à-vis de *Salmonella* sont presque équivalentes, mise à part l'huile essentielle de *M. didyma* qui est légèrement plus forte (CMI : 0,12 µg/mL). La résistance de *Staphylococcus aureus* est plus forte vis-à-vis de l'HE de *T. balsamita* comparativement aux quatre autres huiles essentielles.

Tableau 18: Concentration inhibitrice minimale (CMI) des huiles essentielles

Matériels	Bactérie/ CMI, µg/mL		
	Salmonella typhimurium ATCC14028	*Staphylococcus aureus* ATCC25923	*Bacillus cereus* ATCC10876
A. millefolium	0.15	0.12	0.31
T. balsamita	0.15	0.31	0.31
M. odorata	0.15	0.15	0.15
M. didyma	0.12	0.12	0.31
C. grandiflora	0.15	0.15	0.08
Ethanol	0.31	0.47	0.31

En comparant nos travaux avec ceux de Yousefzadi *et al.* dans lesquels la CMI de l'huile essentielle de *T. balsamita* a été déterminée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, on remarque que notre espèce est bien plus efficace vis-à-vis de cette bactérie que celle étudiée par ces auteurs (CMI : 7,5 µg/mL) (Yousefzadi *et al.*, 2009). L'espèce Iranienne étudiée dans ces travaux possède la carvone comme composé majoritaire alors que dans notre cas, c'est la béta-thujone.

On remarque que l'espèce sauvage d'origine française, fournit une huile essentielle beaucoup plus efficace vis-à-vis des deux souches bactériennes, *Staphylococcus aureus* (CMI : 0,117 µg/mL) et *Bacillus cereus* (CMI : 0,313 µg/mL), par rapport à l'espèce sauvage d'origine turque étudiée par Candan *et al.* où la concentration inhibitrice minimale de cette espèce vis-à-vis de ces deux bactéries est égale à 72mg/mL (Candan *et al.*, 2003).

Ces travaux montrent que les huiles essentielles des plantes aromatiques oubliées sélectionnées dans la région de Midi-Pyrénées possèdent des activités antioxydantes non négligeables ainsi que des activités antibactériennes remarquables vis-à-vis de nombreuses bactéries pathogènes. Ces résultats confirment l'utilisation potentielle de ces 5 huiles essentielles dans le domaine agroalimentaire pour la conservation des aliments. Néanmoins, il faudra prendre en compte l'impact organoleptique que pourraient amener les propriétés aromatiques marquées de ces huiles sur le produit final.

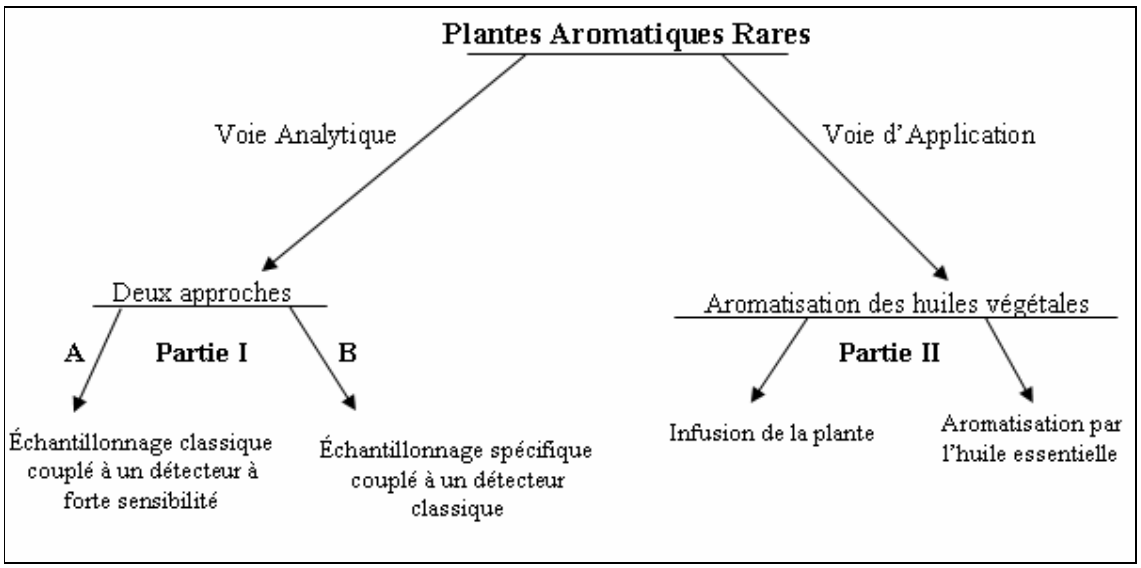
Chapitre III :

Mise en place d'une méthodologie instrumentalisée de caractérisation rapide des huiles essentielles natives ; Application pré-industrielle à l'aromatisation des huiles végétales par les plantes aromatiques

Résumé :

Ce chapitre est composé de deux parties distinctes. La première partie (**Partie I**) concerne l'exploitation de deux voies analytiques de COVs pour contrecarrer la faible disponibilité de la matière végétale, et accéder à une évaluation rapide du potentiel aromatique de la plante. Pour cela, deux approches ont été envisagées. La première concerne l'utilisation d'un échantillonnage classique couplé à un détecteur à forte sensibilité comme la chromatographie bidimensionnelle et la seconde concerne un échantillonnage spécifique dédié à l'analyse des effluves émis par le froissement du végétal dans un système dénomé « Crushing Finger Device », CFD.

La deuxième partie de ce chapitre **(Partie II)** est l'application dans le domaine agroalimentaire des 5 plantes à une étude de faisabilité d'aromatisation de l'huile de tournesol par macération.



Partie I. Voie analytique

Introduction :

Lors de l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des plantes aromatiques oubliées et l'évaluation de leurs activités biologiques, nous avons souvent été confronté au problème de rareté. Ainsi donc, nous devions faire face à la difficulté d'approvisionnement en plantes, excepté pour *Achillea millefolium* qui a été récoltée sous sa forme sauvage à Toulouse. Nous avions des problèmes pour obtenir des quantités suffisantes de matière végétale nécessaire afin de pouvoir faire non seulement les expérimentations d'hydrodistillation mais aussi les tests de bio-activité. Suite à ce problème, nous avons décidé de développer deux approches analytiques A et B. La première (A) est basée sur une technique d'échantillonnage classique (SPME) couplée à un système de séparation/détection sophistiqué (CPG-2D/TOF), la deuxième (B) quant à elle fait appel à un système d'échantillonnage sophistiqué (CFD-DHS) couplé à un système de séparation/détection classique (CPG-SM).

Les plantes à huiles essentielles désignent des végétaux odorants utilisés en parfumerie, cosmétique, culinaire et en médecine douce dont les extraits aromatiques peuvent être obtenus par entraînement à la vapeur ou par hydrodistillation de leurs feuilles ou de leurs fleurs. Cette phase d'extraction provoque la destruction par éclatement des vésicules de stockage surfaciques qui contiennent les huiles essentielle ; nous avons imaginé qu'une pré-évaluation du potentiel aromatique des plantes pourrait être réalisée en mimant le froissement de la feuille entre les doigts pour libérer les substances volatiles qui seront analysées par "sniffing".

Nous nous sommes donc intéressé à la mise au point d'un système instrumental d'évaluation rapide du potentiel aromatique de plantes à huile essentielle basé sur l'analyse des effluves (HeadSpace). Un appareillage novateur dénommé "Crushing Finger Device" (CFD) (EL Kalamouni *et al.*, 2010) basé sur le concept de "Scratch'n Sniff" a été mis au point afin de mimer instrumentalement le froissement de la feuille entre les doigts suivi du piégeage des composés volatils odorants émis en vue de leur analyse chromatographique ultérieure. *Tanacetum balsamita* a été choisie comme plante modèle pour la mise au point du CFD.

Dans ce chapitre nous avons d'une part procédé à la comparaison du profil chromatographique de l'huile essentielle de feuilles fraîches de la plante modèle, obtenue par hydrodistillation avec celui des effluves de feuilles fraîches et natives extraites par CFD et

analysé d'autre part les effluves de feuilles fraîches entières, concentrées par SPME puis analysées en CPG-2D/TOF-SM.

(A) Première approche analytique basée sur une technique d'échantillonnage classique couplée à un système de séparation/détection sophistiqué

I. Analyses des COVs émis par les feuilles par l'intermédiaire de la CPG bidimensionnelle.

La première approche abordée dans ce chapitre, est l'utilisation d'une technique d'extraction en Headspace classique (SPME), couplée à un système de séparation/détection sophistiqué (CPG-2D/TOF).

I.1. Principe de la CPG bidimensionnelle

La CPG bidimensionnelle est une technique de séparation de chromatographie en phase gazeuse dans laquelle tous les composés élués d'une première colonne sont successivement soumis à une séparation dans une deuxième colonne de sélectivité différente. Les deux colonnes sont connectées en série au moyen d'un modulateur (figure 32) qui échantillonne l'effluent de la première colonne sous forme d'impulsions chimiques et les transfère en continu vers la deuxième colonne. La durée requise pour effectuer cette opération, appelée période de modulation, impose une deuxième séparation très rapide (quelques secondes). Afin que chaque impulsion soit séparée dans un temps inferieur à la période de modulation, on choisit une colonne courte et de faible diamètre interne (typiquement 1 m × 0,1 mm d.i.). Le pic d'élution issu de la première colonne (A) est échantillonné par le modulateur. Chaque fraction est focalisée puis injectée en continu dans la deuxième colonne. Le signal détecté correspond donc une succession de séparations réalisées dans la deuxième dimension (B). En accolant ces chromatogrammes, le signal est reconstruit dans un plan de rétention à deux dimensions qui s'apparente à une cartographie de l'échantillon dans laquelle l'intensité des pics chromatographiques est traduite par une dégradation de la couleur.

Pour que la séparation CPG-2D soit effective, deux contraintes sont fixées pour le choix de la période de modulation. On considère qu'un minimum de trois échantillonnages par pic élué de la première dimension est nécessaire. Par ailleurs, si le temps de rétention d'un

composé dans la seconde dimension est supérieur à la période de modulation, alors son pic d'élution appartient au cycle(s) de modulation suivant(s), ce qui entraine une mauvaise représentation du chromatogramme 2D conduisant a des problèmes d'identification et a une baisse de la résolution.

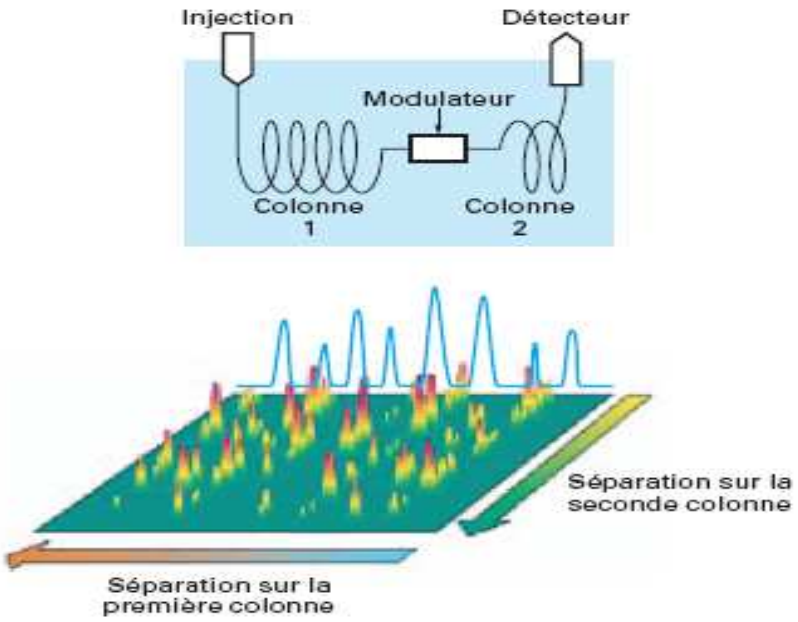


Figure 32: Schéma représentatif du modulateur d'une CPD-2D

I.1.1. Séparations orthogonales

La séparation est dite orthogonale si les mécanismes de rétention dans chaque dimension sont indépendants l'un de l'autre. Cette condition est réalisée par la mise en œuvre de colonnes dont les phases stationnaires sont de natures chimiques différentes pour une séparation en programmation de température. Généralement, les systèmes de CPG-2D associent une première colonne de type apolaire (dimethylpolysiloxane) à une seconde colonne de type polaire (polyethyleneglycol, phenylmethylpolysiloxane ou cyclodextrine). La polarite d'une phase stationnaire désigne sa faculté à développer des interactions spécifiques par effets électroniques, stériques ou chiraux. En CPG, le facteur de rétention d'un soluté est inversement proportionnel à sa tension de vapeur. Si la première séparation est réalisée dans une colonne de type apolaire, les coefficients d'activité sont tous proches de l'unité car il n'y a pas d'interactions spécifiques. La rétention est gouvernée uniquement par la tension de vapeur et les composés sont séparés par température d'ébullition croissante. Dans la seconde

colonne, polaire, la séparation est très rapide (< 10 secondes) et a donc lieu dans des conditions pratiquement isothermes, compte tenu de la faible rampe de température (~ 2°C/min). Les solutés injectés dans la deuxième colonne étant élués de la première dimension à la même température (T°C), leur température d'ébullition n'a plus d'influence sur la deuxième séparation et leur rétention est donc uniquement gouvernée par leur coefficient d'activité. Le chromatogramme est donc structuré selon les propriétés physico-chimiques des constituants du mélange à séparer : tension de vapeur dans un premier temps puis la polarité. Ainsi, l'organisation en bandes d'élution spécifiques à chaque famille chimique facilite l'identification des composés par la combinaison de deux informations indépendantes.

I.2. Matériels et méthodes

I.2.1. Echantillons

Les feuilles de *Tanacetum balsamita* utilisées pendant le piégeage en mode HeadSpace semi statique ont été coupées délicatement à partir des pots obtenus pendant la période de février 2008.

I.2.2. Extraction des COV par SPME

Une feuille de *Tanacetum balsamita* a été mise dans un vial serti avec un septum en téflon. L'éclatement des vésicules a été induit par agitation par l'intermédiaire d'un barreau aimanté. Les COVs émis par la feuille ont été piégés pendant 2 minutes par l'intermédiaire de la fibre SPME de type Carb/PDMS (75µm).

I.2.3. Analyses chromatographiques des COVs par CPG-2D

Les analyses des COVs piégés par la fibre SPME ont été faites par un CPG-2D/TOF *Agilent 6890*, après 2 minutes de désorption de la fibre à la température de l'injecteur (280°C). Le gaz vecteur est l'hélium (Débit 1ml/min) et la programmation de température pour la première colonne (DB-5, 30m, 320µm de diamètre intérieur et de 1µm d'épaisseur de film) est la suivante : 40°C durant 5 minutes, un gradient de 4°C/min jusqu'au 230°C et 10 minutes d'isotherme à 230°C. La programmation de température pour la seconde colonne (DB-17 2.290m de longueur, 178 µm de diamètre intérieur et de 0.30 µm d'épaisseur) quant à elle est de 55°C durant 5 minutes avec un gradient de 4°C/min jusqu'au 245°C et 10 minutes en isotherme à 245°C.

II. Résultats de l'extraction et de l'analyse des COVs des feuilles de Tanacetum balsamita par SPME/CPG-2D

L'analyse par CPG-2D de l'extrait SPME des feuilles de la Balsamite conduit à plusieurs milliers de composés organiques volatils, environ 4000 dans le cas d'une feuille écrasée et 2000 dans le cas d'une feuille entière non écrasée (voir figure 34 et 35).

La coloration rouge dans la figure 33, révèle la concentration de la tanacetone. La CPG-2D permet de détecter les composés qui possèdent les mêmes temps de rétention en CPG classiques (mêmes températures d'ébullition) et qui par la suite seront séparés sous une deuxième dimension par ordre de polarité comme c'est le cas pour le thymol et de l'acétate bornyle. Ces deux derniers composés obtenus à l'état de trace dans le cas de la séparation sur une CPG, ont été détectés et séparés en CPG-2D.

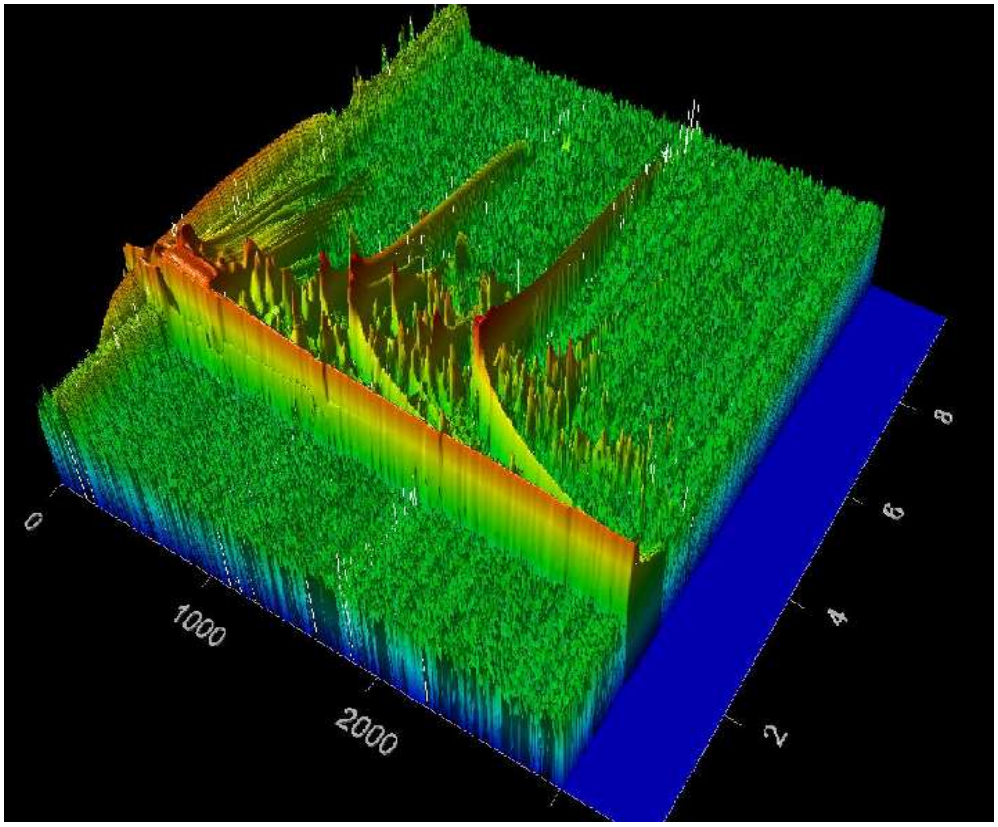


Figure 33: Coupe en 3D du profil chomatographique des effluves émis d'une feuille de Balsamite non écrasée

L'avantage de la CPG-2D, est d'avoir une facilité de classification aisée par famille chimique, par ions communs mais aussi une différenciation en une seule étape de composés, même à l'état de traces, ayant les mêmes points d'ébullition mais des polarités différentes.

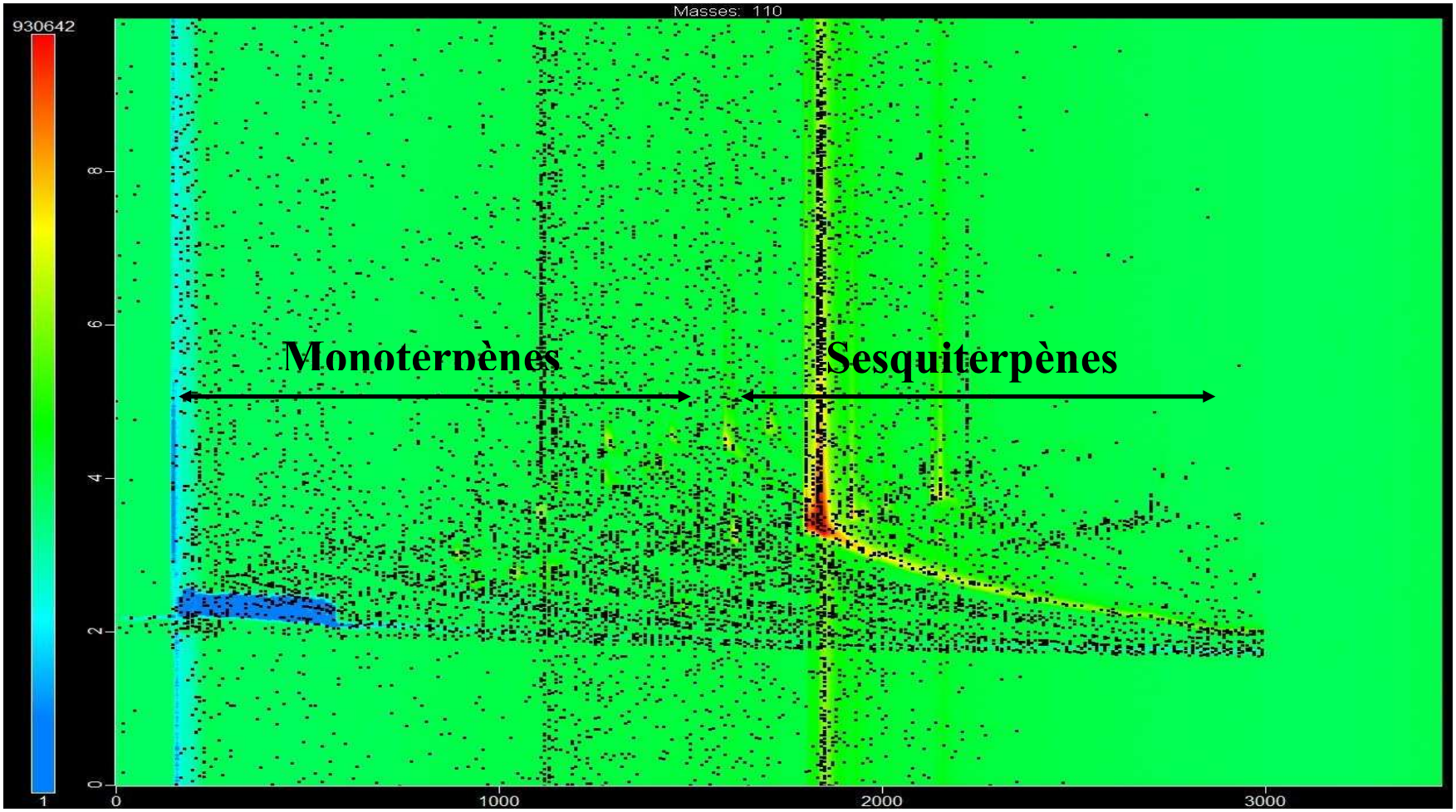


Figure 34: profil chromatographique en CPG-2D des effluves émis à partir d'une feuille de Balsamite écrasée

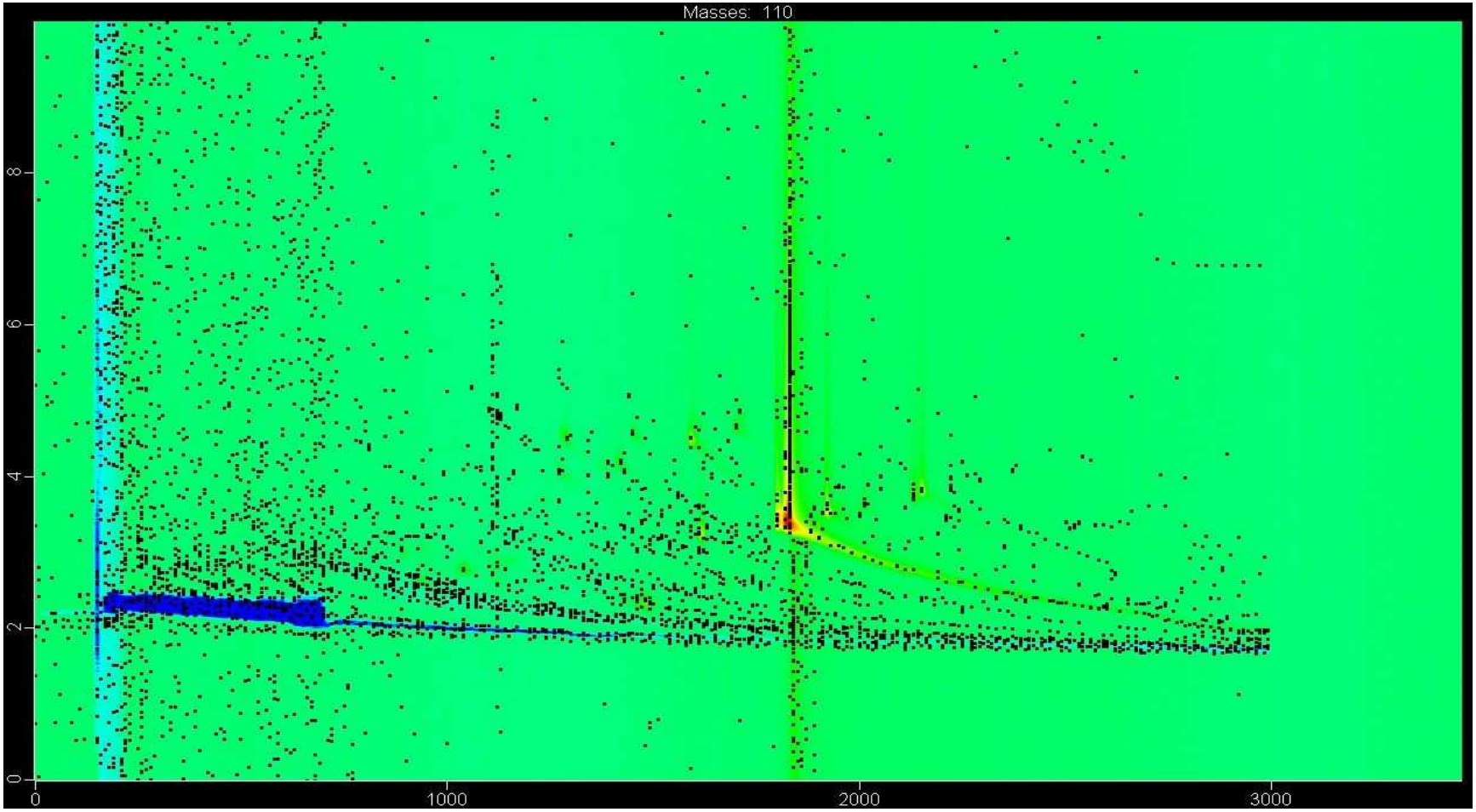


Figure 35: Profil chromatographique en CPG-2D des effluves émis à partir d'une feuille de Balsamite non écrasée

(B) Deuxième approche analytique basée sur un système d'échantillonnage couplé à un système de séparation/détection classique

I. Description du système

Dans un premier temps, les essais ont été mis au point sur un système de simulateur de mastication commercial, (Mouth model equipment) en mode DHM (Dynamic Headspace and Mastication) (Wageningen University and research center, Dept. Agrotechnology and Food Sciences), Le réacteur est une cellule en verre à double enveloppe permettant une régulation de la température (voir figure 36). La cellule peut être balayée par un gaz vecteur (N_2). Le gaz N_2 entre via une connexion GL14 en bas du système. Les COVs émis durant le froissement des feuilles et l'éclatement des vésicules sont entraînés par le gaz inerte et piégées sur le piège tenax.

Le mouvement du piston à l'intérieur du système, est rotatif et longitudinal, ce mouvement est contrôlé par une unité d'alimentation stabilisée variable, compacte à tension continue ayant les caractéristiques suivantes :

$$\left.\begin{array}{r}\text{Tension de sortie …..0-30 Vdc}\\ \text{Courant de sortie…...0-2,5A}\end{array}\right\}\ \text{76,8 rpm max}$$

Afin d'étudier l'huile essentielle native (équivalent à l'odeur émise par la plante) et pour que le dispositif puisse mimer le froissement des feuilles entre les doigts, la base du piston a été modifiée et dentelée. Par explosion des vésicules de stockage situées sur la partie abaxiale des feuilles, une évaluation rapide du contenu en huile essentielle native avec seulement deux ou trois feuilles peut être effectuée.

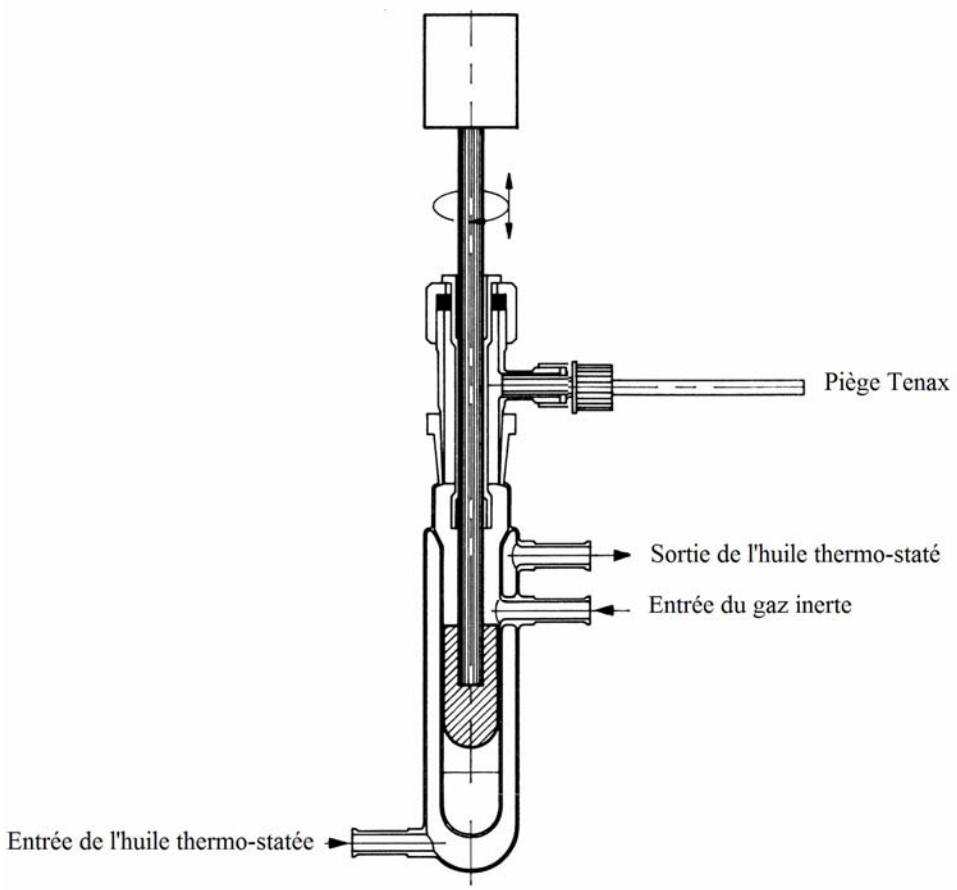


Figure 36: Stimulateur de mastication mode DHM (Wageningen University and Research Centre)

II. Comparaison du profil aromatique de l'huile essentielle de *Tanacetum balsamita* et du profil CFD-DHS/GC de la plante

II.1. Matériel et Méthodes

II.1.1. Concentration des COV par Headspace dynamique

Deux feuilles fraîches de Balsamite sont placées dans le réacteur du DHM thermostaté à 25°C et balayé par un courant d'azote (100mL/min). Les feuilles sont ensuite froissées pendant 5 minutes au moyen d'un piston à tête en téflon ayant un déplacement linéaire et rotatif. Les COV sont piégés par l'intermédiaire d'un piège Tenax situé dans la partie supérieure du DHM (figure 36). 3 réplicatas ont été effectués.

II.1.2. Concentration des COV d'une feuille non froissée par Headspace dynamique.

Le piston a été enlevé du dispositif pour se retrouver en condition d'Headspace dynamique. Des feuilles fraîches ont été soigneusement placées en évitant tous écrasement des tissus. La cellule est balayée par un courant d'azote à 100mL/min pendant 5 minutes et thermo-statée à 25°C. Ces expériences ont été reproduites trois fois.

II.1.3. Isolement de l'huile essentielle de *Tanacetum balsamita*

100g de feuilles ont été hydrodistillées pendant 3 heures à 100°C au moyen d'un hydrodistillateur de 6 litres. Une huile essentielle jaune a été obtenue avec un rendement de 0,53%. Ces expériences ont été reproduites trois fois.

II.1.4. Analyses chromatographiques des extraits

Les pièges Tenax ont été analysés au moyen d'un CPG-SM-DIF (Perkin Elmer Clarus 500) équipé d'un thermodésorbeur TurboMatrix TD et d'une colonne capillaire en silice fondue DB5 (0,25 mm x 30m, 0,25 µm épaisseur de film). Le gaz vecteur est de l'hélium (1.3 mL/min) et la programmation de température: 30°C durant 5 minutes, puis 5°C/min jusqu'au 200°C et 10 minutes à 200°C. L'identification des composés est basée sur les comparaisons des indices de rétention expérimentaux et bibliographiques et des spectres de masse expérimentaux et contenus dans les bases de données NIST 2005 et WILEY.

Le gamma-terpinène a été utilisé comme un standard interne pour évaluer la concentration de composés organiques volatiles en µg/Kg de matière sèche émis dans le DHM. Les concentrations des COVs ont été estimées par rapport à l'étalon interne. La courbe d'étalonnage a été effectuée à partir de 5 solutions méthanoliques de *gamma*-terpinène à des concentrations différentes (2100, 420, 84, 16,8 et 3,3 µg/L). 1 mL de chaque solution préparée a été directement injecté par une seringue dans des pièges Tenax. Les conditions de thermodésorbtion et de l'analyse chromatographique étaient identiques à celles appliquées dans le cas des échantillons CFD-DHS/GC.

II.2. Résultats de la comparaison entre une huile essentielle extraite par hydrodistillation et une huile essentielle native

La composition de l'huile essentielle de *Tanacetum balsamita* de couleur jaune obtenue avec un rendement de 0,53 % sur une base de poids sec de matière végétale. La béta thujone

(tanacetone), est le composé principal tant dans l'huile essentielle (63,3 %) que dans le profil de COVs émis des feuilles non froissées (82,5 %) et froissées (67,7 %). Le rendement de COVS émis par les feuilles de costmary fraîches augmente en suivant l'ordre suivant: DHM/ DHS > > DHS. La conséquence du froissement des feuilles par DHM est l'explosion des vésicules de stockage de l'huile essentielle et la libération des composés volatils principaux de la plante dans le système. La comparaison des profils chromatographiques de feuilles froissées (figure 38) et de feuilles non froissées (figure 39) a montré une augmentation du nombre de composés de notes de tête (4 à 20) (voir Tableau 19). Les composés volatils majeurs émis pendant le froissement de feuilles par DHM étaient le 1,8-cinéole (21 %), l'alpha-thujone (3,3 %), le béta-terpinène (2,4 %), l'alpha-pinène (0,7 %), le gamma-terpinène (0,5%), le béta-pinène (0,4 %), 3-méthyle hexanal (0,3 %), l'alpha-thujène (0,2 %), et le p-mentha-1,4 (8)-diène (0,2 %). Dans le cas de l'huile essentielle, les composés majoritaires étaient le 1,8-cinéole (27,5 %), l'alpha thujone (4,2 %), germacrène-D (0,9 %), béta eudesmol (0,4%), terpinéol-4 (0,6 %), l'alpha terpinéol (0,2 %), le gamma-terpinène (0,1 %) et le bicyclogermacrène (0,1 %).

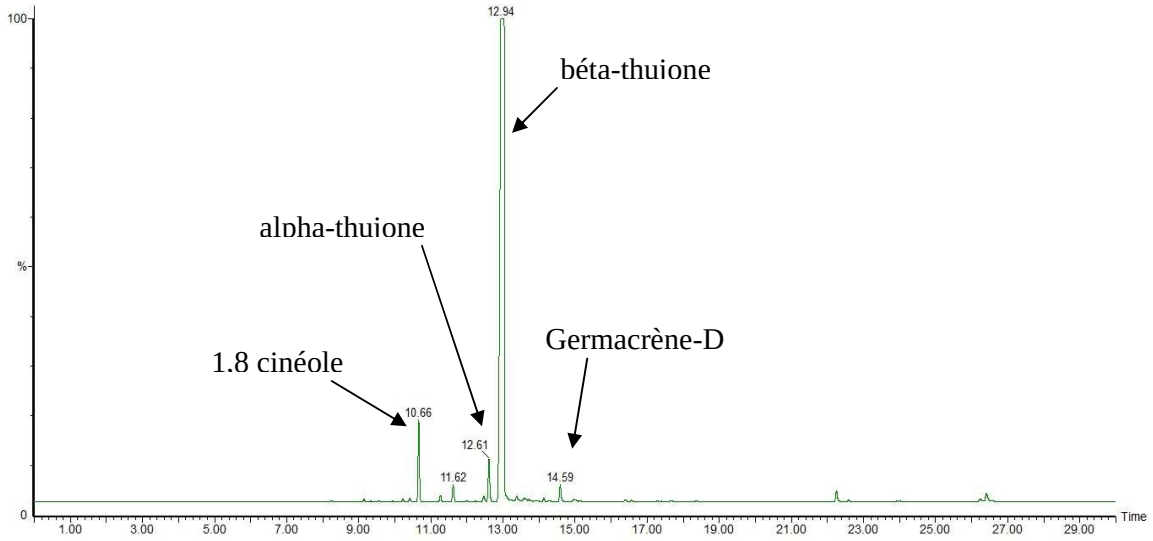


Figure 37: Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Tanacetum balsamita* obtenue par hydrodistillation

Ces résultats préliminaires ont montré que les profils chromatographiques de l'huile essentielle (figure 37) et des composés volatils émis à partir de feuilles froissées (figure 38) en

utilisant le DHM présentent des similitudes au niveau des notes de tête et de cœur ; par contre, l'absence des sesquiterpènes (notes de fond) a été bien marquée.

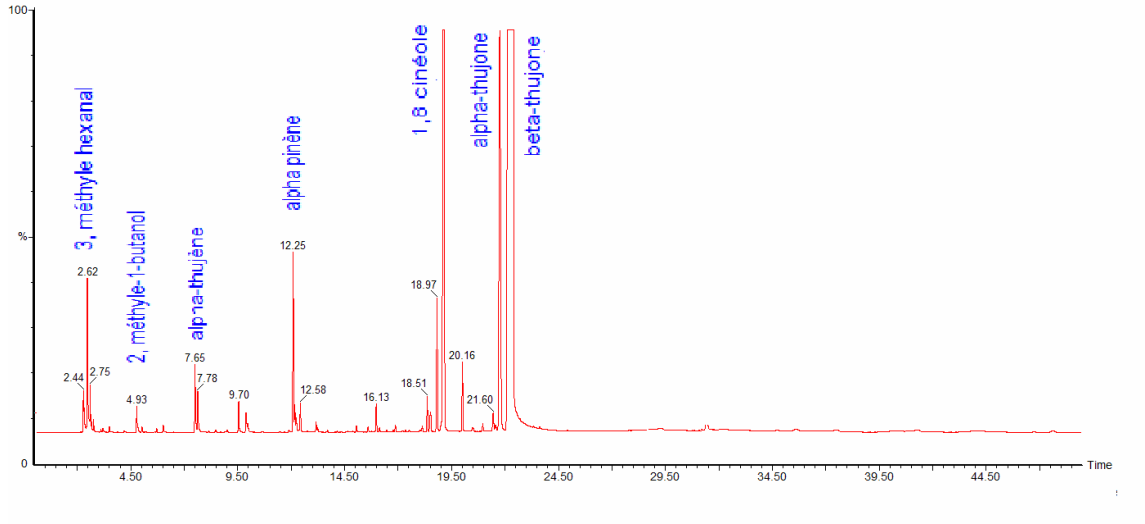


Figure 38: Profil chromatographique des COVs des feuilles froissées de *Tanacetum baslamita* émis par DHM

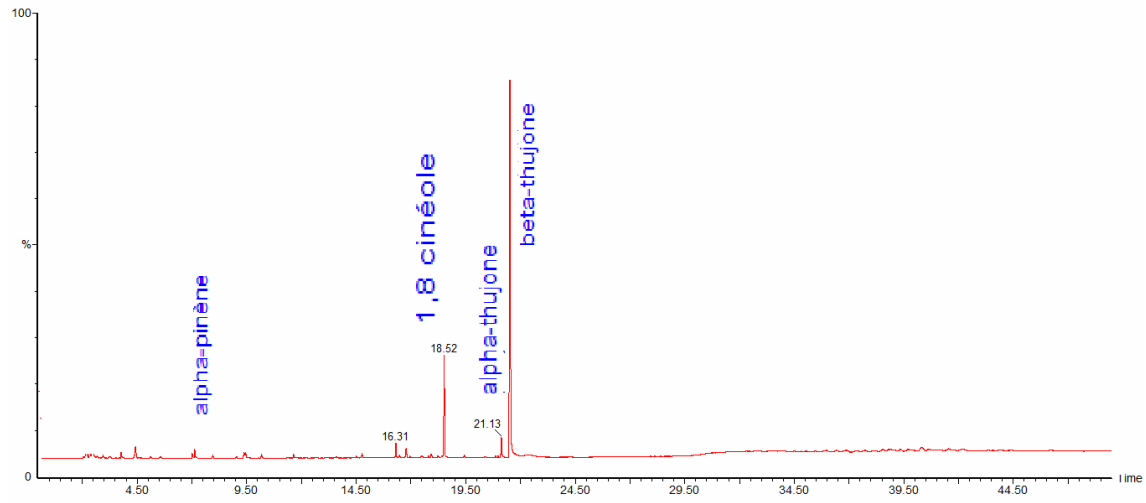


Figure 39: Profil chromatographique des COVs des feuilles non froissées de *Tanacetum balsamita* émis par DHM

La béta thujone et le 1,8-cinéole sont les composés majoritaires dans les deux extraits. Les notes de fond sont différentes, ceci étant lié à la technique d'extraction utilisée : hydrodistillation ou espace de tête dynamique.

Tableau 19: Principaux composés organiques volatils identifiés à partir de l'huile essentielle, des feuilles froissées et des feuilles non froissées de *Tanacetum balsamita*

Pics	IR	Composés Volatils	HE (n=4) %	DHS[a] (n=3) %	DHM[b] (n=4) %	DHM[c] [c] µg/kg/5min	DHM CV[d]
1	738	3-méthyl-hexanal			0.3	0.5	11
2	742	2-méthyl-1-butanol			0.1	0.2	23
3	791	1-octène			0.4	0.5	15
4	857	3-hexèn-1-ol			0.3	0.4	34
5	879	1-butanol, acétate, 3-méthyl			0.1	0.1	17
6	926	alpha-thujène			0.2	0.1	23
7	933	alpha-pinène		0.6	0.7	0.9	12
8	944	bicyclo[3.1.0]hex-2-ène, 4-méthylène-1-(1-méthyléthyle)			0.1	0.1	18
9	950	camphène			0.1	0.2	7
10	973	béta-terpinène		1.7	2.4	3.7	26
11	978	béta-pinène		1.5	0.4	0.5	9
12	989	cis-pinène-3-ol			0.1	0.3	25
13	1004	acétate-3-hexène-1-ol			0.4	0.3	22
14	1012	ni			0.2	0.6	21
15	1017	*ortho*-cymène			0.4	0.5	18
16	1023	*para*-cymène	tr				
17	1031	1,8-cinéole	**27.5**	**12.6**	**21**	21.3	4
18	1057	gamma-terpinène	0.1		0.5	0.6	13
19	1071	ni	0.3				
20	1072	ni			0.2		
21	1086	p-mentha-1,4(8)-diène			0.2	0.2	19
22	1100	acide butanoique, 2-méthyl-3méthyl butyl ester			0.2	0.3	49
23	1107	alpha -thujone	**4.2**	**1.1**	**3.3**	4.9	9
24	1121	béta -thujone	**63.3**	**82.5**	**67.7**	103.8	27
25	1166	4-terpinéol	0.6				
26	1185	alpha-terpinéol	0.2				
27	1282	acétate de sabinyle	tr				
28	1476	germacrène-D	0.9				
29	1489	bicyclo-germacrène	0.1				
30	1650	béta-eudesmol	0.4				

ni : non identifié , [a]composés volatils émis des feuilles non froissées , [b]composés volatils émis des feuilles froissées par DHM, [c]concentrations des COVs émis en µg/Kg/5min calculées par rapport à l'étalon externe (gamma terpinène), [d]coefficient de variation %

Cette étude préliminaire a permis de démontrer que le système DHM modifié possède de réelles potentialités pour une pré-évaluation rapide du potentiel aromatique de plantes à huiles essentielles.

III. Conception d'une cellule d'extraction dédiée « CFD » couplée à un système de piégeage Headspace dynamique et semi-statique

Suite aux résultats positifs obtenus par le système DHM modifié, deux cellules d'extraction « CFD » ont été spécifiquement conçues pour ces analyses. La première est couplée à un système de Headspace semi statique dédié, pour concentrer les effluves émis par le froissement des feuilles sur une fibre SPME, la deuxième est couplée à un système de Headspace dynamique. Dans les deux cas, la position des pièges ou des fibres SPME est plus proche de la chambre de froissement que dans le système DHM modifié (voir figure 40).

Dans ce travail, nous avons comparé le profil chromatographique de l'huile essentielle des feuilles de Thé d'Aubrac (*Calamintha grandiflora*) obtenue par hydrodistillation non seulement avec celui des effluves de feuilles fraîches traitées et non traitées par CFD, concentrées sur piège tenax puis analysées en CPG-SM mais aussi avec celui des effluves de feuilles fraîches entières extraites par SPME (PDMS, CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS).

Les techniques d'adsorption ou d'absorption sont très utilisées pour l'analyse des COVs. Elles permettent l'extraction et la concentration des composés volatils sans solvant. Elles sont basées sur la partition des composés organiques entre une phase aqueuse ou gazeuse et un film polymérique de faible épaisseur.

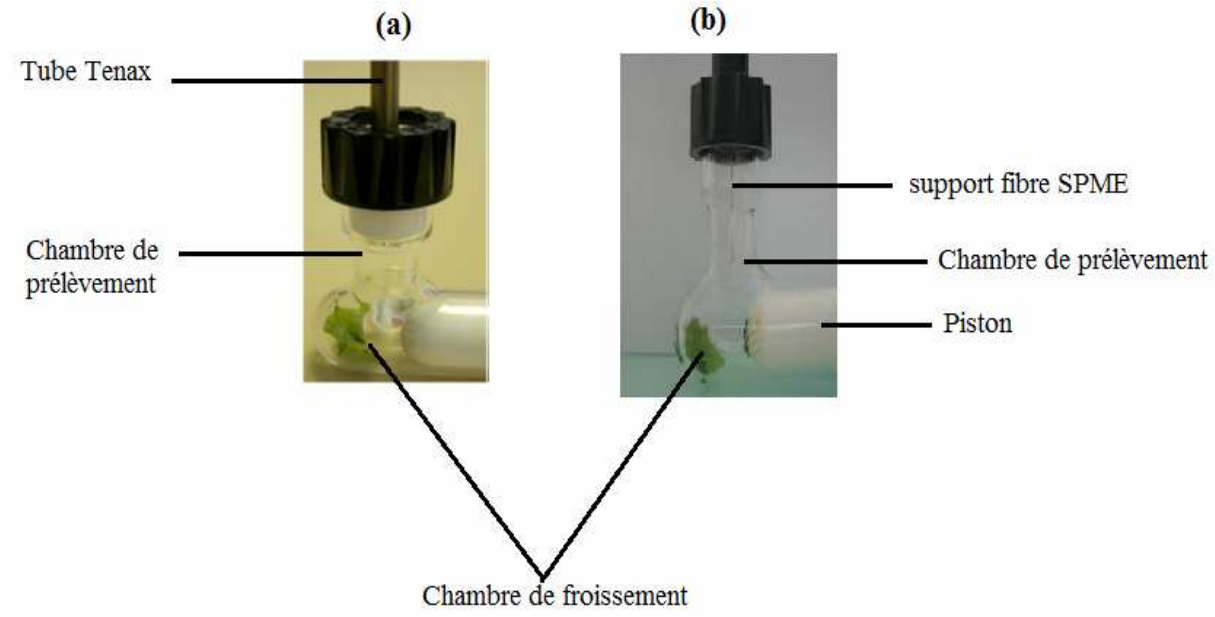


Figure 40: schéma du CFD, le prélèvement des COVs est effectué au niveau de la chambre de froissement (a) par une piège tenax ou (b) par une fibre SPME

IV. Application du système CFD à l'analyse de la fraction volatile de *Calamintha grandiflora*

IV.1. Analyses chromatographiques

Les pièges tenax ont été désorbés et analysés au moyen d'un CPG-SM-FID (Perkin Elmer Clarus 500) équipé d'un thermodésorbeur TurboMatrix TD et d'une colonne capillaire en silice fondue DB5 (0,25 mm x 30m, 0,25 µm épaisseur de film). Tandis que les fibres SPME ont été analysées au moyen d'un Varian CP 3800 CPG-FID, et un Agilent 5973 Network CPG-SM. Le gaz vecteur est de l'hélium (1.3 mL/min) et la programmation de température: 30°C pendant 5 minutes, puis à 5°C/min jusqu'au 200°C et 10 minutes d'isotherme à 200°C. L'identification des composés est basée sur les comparaisons des indices de rétention expérimentaux et bibliographiques et des spectres de masse expérimentaux et contenus dans les bases de données NIST 2005 et WILEY

IV.2. Optimisation des conditions d'extractions par CFD-SPME ou CFD-DHS

Trois paramètres ont été optimisés durant ce travail, la nature de la fibre SPME, le nombre de coups de froissement des feuilles ainsi que le temps de piégeage.

IV.2.1. Choix des fibres SPME : cinétique d'adsorption et d'absorption de la pulegone

Pour tester le système CFD sur la plante modèle, Thé d'Aubrac, nous avons utilisé 3 types de fibres SPME (Carb, Carb/PDMS et DVB/Carb/PDMS), afin de savoir laquelle est la plus efficace ou la plus adaptée aux composés organiques volatils émis lors du froissement des feuilles de la plante.

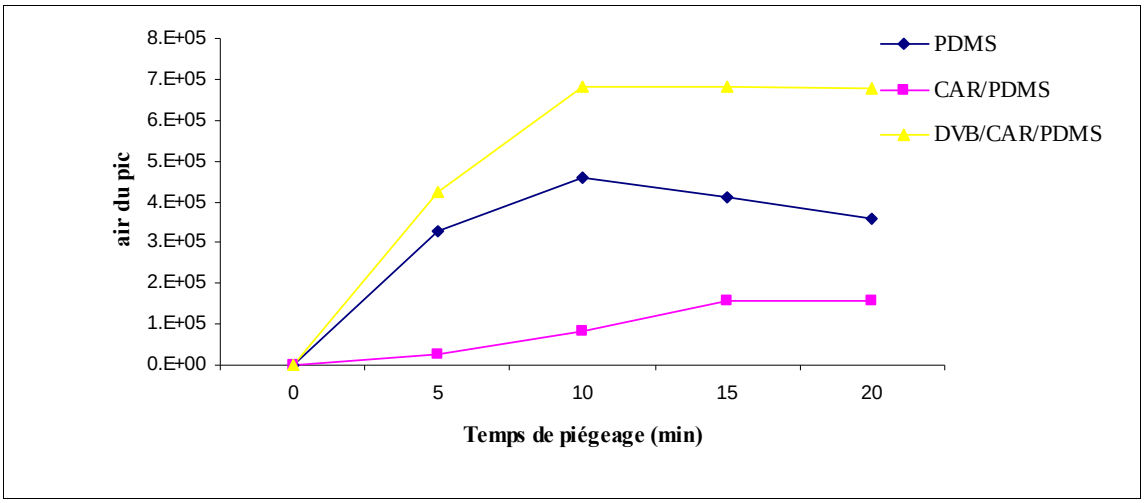


Figure 41: Aire du pic de la pulegone en fonction du temps de piégeage et de la nature de la fibre SPME à 20°C

Les courbes d'absorption (cas du PDMS) ou d'adsorption et d'absorption (CAR/PDMS et DVB/CAR/PDMS) obtenues par les différentes fibres en fonction de l'aire de la pulégone montrent qu'au bout de 10 minutes les fibres PDMS et DVB/CAR/PDMS atteignent leur seuil de saturation, alors qu'il faut 15 minutes pour la fibre CAR/PDMS. On s'aperçoit que pour un temps de piégeage de 10 minutes la fibre DVB/CAR/PDMS a une capacité d'absorption plus élevée que les deux autres fibres.

D'après la figure 41, on peut remarquer que la fibre SPME possédant trois phases était la plus efficace vis-à-vis de la pulégone, mais aussi que le temps optimum de piégeage pour cette fibre est de 10 minutes. Cette fibre sera choisie pour la concentration des COVs émis par le froissement des feuilles.

IV.2.2. Optimisation du froissement du végétal

Un couple de feuilles de *Calamintha grandiflora* a été déposé délicatement dans la cellule, la fibre SPME est monté au dessus de la cellule (en position fermé), après froissement par 0, 10 et 15 coups de piston, la fibre SPME est mise en position ouverte pour piéger dans la chambre de prélèvement pendant 10 minutes à température ambiante. La fibre DVB/Carb/PDMS est la plus efficace (figure 42).

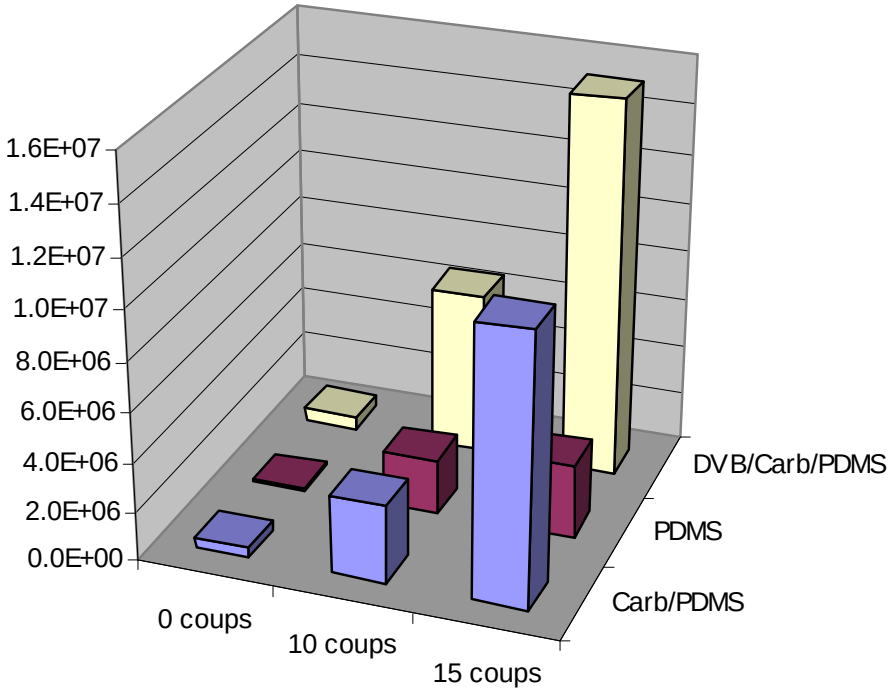
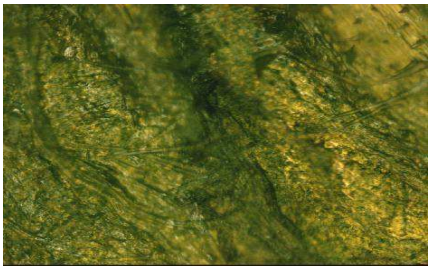


Figure 42: concentration en pulegone en fonction de la nature de fibre utilisée et du nombre de coups de piston effectués

IV.2.3. Observation microscopique au niveau du limbe des feuilles



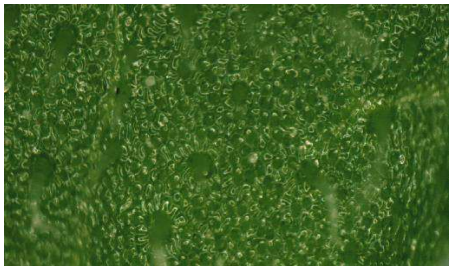


Figure 43: Micrographie (x400) d'un fragment de limbe de la feuille de *Calamintha grandiflora* froissée à gauche et non froissée à droite.

D'après les figures 43, on peut remarquer que suite au traitement des feuilles de la *Calamintha grandiflora* par le CFD, les poils sécréteurs ainsi que les vésicules ont été éclatés, favorisant ainsi la libération des COVs dans la cellule du CFD.

IV.2.4. Comparaison des fractions volatiles extraites par CFD-SPME et CFD-DHS et de l'huile essentielle

Quarante COVs ont été identifiés dans l'huile essentielle du Thé d'Aubrac. Ils constituent 93 % de la composition chimique totale de cette huile. Les principaux composés de l'huile essentielle du Thé d'Aubrac, obtenue par hydrodistillation des tiges et de feuilles sont présentés dans le Tableau 20. L'isomenthone (34,07%), le néoisomenthol (19,83%), la pulégone (19,54%), l'isomenthol (7,65%), La menthone (4,40%), le germacrène-D (3,55%), le bicyclogermacrène (1,78%) et le caryophyllène-Z (1,99%) sont les molécules les plus abondantes.

Tableau 20: Comparaison entre la composition chimique de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation et celle de l'huile essentielle native extraite par CFD-SPME et CFD-DHS

Pics	Composés	IR[a]	%[b] HE	%[c] CFD-SPME	%[d] CFD-DHS
1	hexanal	853	-	2.53	-
2	cis-3-hexénol	870	-	0.18	-
3	alpha-thujène	930	-	1.46	-
4	alpha-pinène	931	0,03	2.38	3.32
5	sabinène	970	0,19	4.17	6.12
6	béta-pinène	976	0,21	2.06	4.02
7	béta-myrcène	987	0,09	2.07	3.56
8	3-octanol	995	0,25	0.54	0.89
9	limonène	1027	0,71	0.86	1.37
10	béta-trans-ocimène	1032	0,08	-	-
11	terpinolène	1068	0,03	1.37	-
12	linalol	1100	0,04	-	-
13	*para*-Menth-8-en-3-ol	1148	0,24	-	-
14	**menthone**	1155	4,40	0.25	2.57

15	**isomenthone**	1168	34,07	25.63	27.81
16	**isomenthol**	1181	7,65	5.75	5.38
17	**néo-isomenthol**	1191	19,83	27.94	19.58
18	**pulégone**	1240	19,54	20.73	22.06
19	**pipéritone**	1251	1,28	0.38	-
20	ni	1284	0,03	-	-
21	acétate d'isomenthyle	1301	0,03	-	-
22	ni	1335	0,14	-	-
23	copaène	1370	0,04	-	-
24	béta-bourbonène	1378	0,13	-	-
25	caryophyllène	1413	1,99	0.67	1.66
26	santalène	1448	0,37	-	-
27	**germacrène-D**	1474	3,55	0.58	1.33
28	bicyclogermacrène	1487	1,78	0.32	0.70
29	alpha-Farnesène	1499	0,11	-	-
30	gamma-cadinène	1510	0,12	0.13	-
31	acétate d'isogénol	1568	0,93	-	-
32	oxyde de caryophyllène	1572	0,43	-	-
33	ni	1599	0,06	-	-
34	ni	1605	0,28	-	-
35	alpha-cadinol	1646	0,20	-	-
36	ni	1781	0,15	-	-
37	ni	1786	0,07	-	-
38	ni	1790	0,08	-	-
39	ni	1802	0,16	-	-
40	ni	1806	0,05	-	-
41	ni	1810	0,18	-	-
42	ni	1830	0,04	-	-
43	ni	1850	0,14	-	-
44	ni	1860	0,17	-	-

ni : non identifié, [a] indice de rétention calculé à partir des n-alcanes C_5-C_{18}, [b] % des composés volatils de l'huile essentielle, [c] % des COVs émis par le froissement des feuilles et concentrés sur la fibre SPME (DVB/Carb/PDMS), [d] % des COVs émis par le froissement des feuilles et concentrés sur un piège Tenax

Parmi les 40 composés organiques volatils identifiés dans l'huile essentielle extraite par hydrodistillation, 21 composés ont été identifiés dans le cas de CFD-SPME tandis que 15 composés ont été identifiés dans le cas de CFD-DHS. On remarque la présence de composés très volatils, comme l'hexanal, le cis-3-hexénol et l'alpha thujene, ces trois derniers composés n'ont pas été identifiés dans l'huile essentielle. D'après le tableau 20 on peut remarquer l'abondance des notes de tête ainsi que les composés majoritaires de notes de cœur. L'absence des sesquiterpènes (notes de fond) a été bien marquée dans le cas des huiles essentielles natives.

Conclusion Partie I

Le "Crushing Finger Device" (CFD) montre de réelles potentialités pour une évaluation qualitative rapide des huiles essentielles contenues dans les feuilles de plantes aromatiques.
La richesse des résultats obtenus par SPME/CPG-2D permet d'établir un Finger Print complet des COV émis par les feuilles mais l'utilisation complexe et coûteuse de cette technologie limite son domaine d'application dans la recherche.

Partie II : Approche préindustrielle de l'aromatisation des huiles végétales par les plantes aromatiques

Introduction

L'aromatisation des huiles peut être une des voies possibles pour élargir le marché des huiles végétales. Pendant le processus d'aromatisation de l'huile, les volatils des épices incorporés diffusent dans l'huile et lui donnent un goût et une odeur (Moldao-Martins *et al.*, 2004).

Un faible nombre d'études scientifiques sont trouvées dans la bibliographie traitant l'aromatisation des huiles végétales par des plantes aromatiques (Kruma *et al.*, 2006), sous les différents états de la matière végétale, fraîche ou sèche infusées dans l'huile ou sous forme d'huiles essentielles.

Dans l'étude réalisée dans le chapitre II sur les activités antioxydantes des huiles essentielles où l'huile de tournesol a été utilisée comme huile vecteur, nous avons démontré que les huiles essentielles étudiées étaient capable de protéger l'huile de tournesol contre l'oxydation par l'oxygène (Somogyi, 2008). Au-delà de cette activité biologique, nous avons voulu étudier l'impact sensoriel de l'incorporation de ces huiles essentielles ou de la matière végétale entière sur les huiles végétales notamment sur l'huile de tournesol.

L'objectif général de ces travaux est d'élargir le champ d'application des plantes aromatiques, via leur utilisation comme ingrédient d'arôme dans les huiles végétales assurant une activité biologique notable associée.

L'objectif spécifique a été de comparer trois différentes méthodes d'aromatisation des huiles végétales notamment l'huile de tournesol. La première en infusant la matière végétale sous sa forme sèche, la deuxième en infusant la matière végétale sous sa forme fraîche, la troisième en aromatisant l'huile de tournesol directement par ajout de l'huile essentielle.

Les feuilles ou les fleurs séchées ou les feuilles fraîches seront mélangées à l'huile de tournesol pour obtenir deux essais d'huiles dites infusées qui seront comparées à un essai d'huile dite aromatisée contenant de l'huile de tournesol et l'huile essentielle obtenue à partir de chacune des plantes. Il faut signaler que peu d'informations sur les protocoles des différentes méthodes utilisées dans l'industrie ont été trouvées.

La comparaison des trois méthodes se fera sur la base des composés volatils de l'huile de tournesol aromatisée extraits par micro-extraction en phase solide (SPME) puis analysés en CPG/SM.

Étant donné que la finalité de ce projet est d'envisager la production d'une huile infusée ou aromatisée à un niveau industriel, ces analyses nous permettront d'évaluer la méthode la plus avantageuse économiquement et la plus transférable à l'industrie agroalimentaire.

I. Matériels et méthodes

L'optimisation des méthodes en termes de quantité de matière végétale infusée et de temps de sonification appliqué, a été tout d'abord testée sur le Basilic, puis transférée sur les autres plantes aromatiques sélectionnées, *Achillea millefolium*, *Calamintha grandiflora*, *Tanacetum balsamita*, *Myrrhis odorata* et *Monarda didyma.*

I.1. Huile de tournesol

Cette huile végétale, obtenue à partir des graines de tournesol, est composée à 98% de triesters d'acides gras, le reste contenant entre autres des stérols et des tocophérols.

La composition en acides gras de l'huile de tournesol utilisée pour l'alimentation humaine est la suivante (en pourcentage massique) :

- Acide linoléique (C18:2 ω-6 polyinsaturé) 70%
- Acide oléique (C18:1 ω-9 mono insaturé) 20%
- Acide palmitique (C16:0 saturé) 6%
- Acide stéarique (C18:0 saturé) 5%
- Autres : 2%

L'huile de tournesol est une huile végétale riche en acide gras essentiel oméga-6 mais on note cependant sa pauvreté en acide gras essentiel oméga-3.

Tableau 21: Propriétés physicochimiques de l'huile de tournesol

Huile de tournesol	
Général	
N° CAS	8001-21-6
N° EINECS	232-273-9
Propriétés chimiques	
Indice d'iode	125 – 144 ; Hydrogénée : 70 – 75
Indice de saponification	188 – 194
Matières non saponifiables	0.4 – 1.4 %
Propriétés physiques	
Température de fusion	Hydrogénée : 32 à 35 °C
Propriétés optiques	
Indice de réfraction	N_D^{40} 1.466 – 1.468

L'huile de tournesol utilisée est une huile commerciale conservée à 4°C afin d'éviter l'auto-oxydation et la formation des composés volatils de dégradation.

I.2. Préparation des échantillons feuilles fraîches infusées dans l'huile de tournesol : HI.FF

Avant de réaliser les échantillons qui seront utilisés pour les analyses, un échantillon modèle a été préparé avec des feuilles de Basilic afin de trouver le temps optimum d'exposition aux ultrasons. La méthode à ultrasons favorise et intensifie le procédé d'éclatement des vésicules tout en libérant les COVs qui vont diffuser dans l'huile de tournesol et permettre son aromatisation.

Après exposition aux ultrasons, l'ensemble est filtré afin d'enlever les feuilles. L'huile ainsi aromatisée est transférée dans des bouteilles hermétiquement fermées et stockées à 4°C avant les analyses chromatographiques.

I.2.1. Optimisation du temps d'exposition de l'huile infusée et soumise aux ultrasons

Après avoir détaché les feuilles fraîches de la tige, on les immerge dans un bécher contenant l'huile de tournesol. L'ensemble est placé dans une cuve à ultrasons de capacité de 3 litres et de fréquence de 20 à 25 Khz, rempli avec un litre d'eau. (Voir figure 44).

Pour déterminer le temps d'exposition aux ultrasons le plus adéquat, un échantillon à 1% de feuilles fraîches de basilic et de balsamite a été réalisé avec les données suivantes :

- Volume d'huile dans le bécher : 100 mL
- Masse d'huile dans le bécher : 81,787 g
- Masse de feuilles fraîches théorique : 81,787 * 1/100 = 0,81787 g
- Masse de feuilles fraîches incorporées réellement : 0,835 g

Figure 44 : Cuve à ultrasons de capacité 3 Litres

Une fois le bécher placé dans la cuve, il va être successivement exposé aux ultrasons de fréquence 20 Khz, pendant 10, 20, 30 et 40 minutes. A chaque fois, une feuille présente dans l'échantillon sera prélevée pour être observée au microscope optique (*Nikon Eclipse E600*), afin de suivre l'évolution de la structure des vésicules au cours du temps.

Après 10 minutes d'exposition aux ultrasons, la feuille présente quelques lésions, repérables par certains endroits noircis. On suppose que les endroits noircis représentent le contenu de certaines vésicules qui auraient éclaté. (Figure 45)

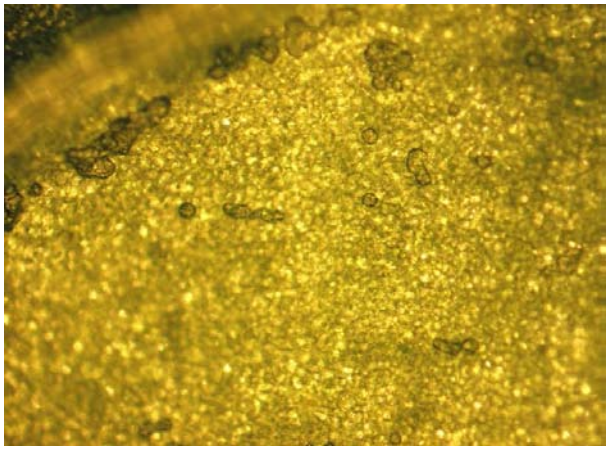


Figure 45: Micrographie d'une feuille de Balsamite après son exposition 10 min aux ultrasons (20khz), avec un grossissement x 100

D'après la figure 46, on peut remarquer que la feuille de Balsamite présente un nombre plus important de lésions suite à son exposition 10 minutes de plus aux ultrasons.

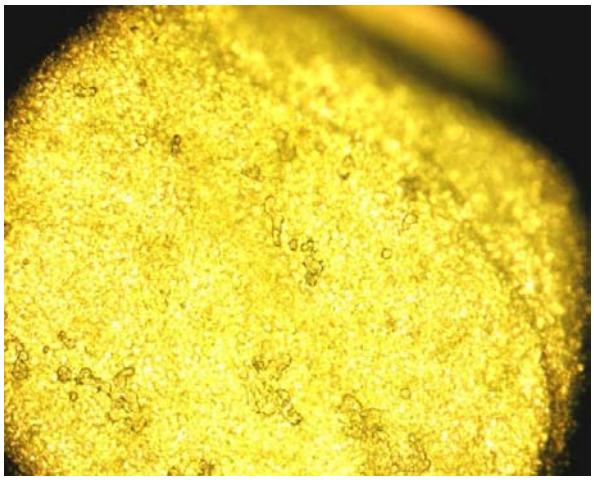


Figure 46: Micrographie d'une feuille de Balsamite après son exposition 20 minutes aux ultrasons (20khz), grossissement x 100

Après 30 minutes aux ultrasons, on remarque que la majorité de la feuille est noircie laissant supposer l'éclatement de nombreuses vésicules. (Figure 47)

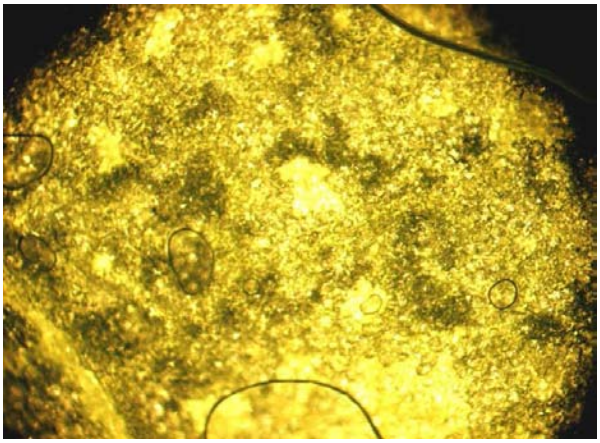


Figure 47: Micrographie d'une feuille de Balsamite après son exposition 30 minutes aux ultrasons (20khz), grossissement x 100

Après 40 minutes aux ultrasons (figure 48) l'observation microscopique ne montre pas de différence significative avec celle réalisée après 30 minutes d'exposition aux ultrasons.

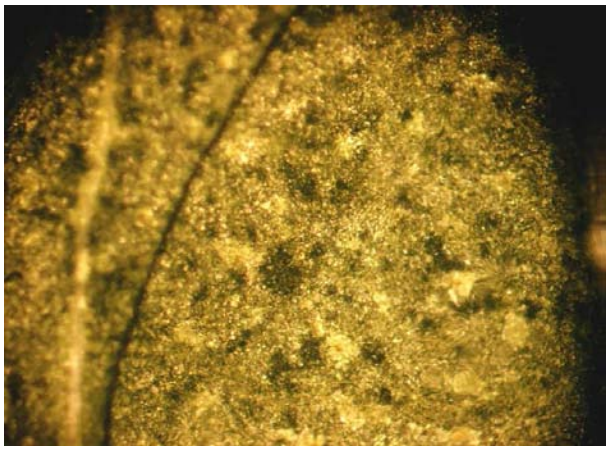


Figure 48: Micrographie d'une feuille de Balsamite après son exposition 40 minutes aux ultrasons (20khz), grossissement x 100

Au vue des résultats des observations microscopiques, le temps optimal est considéré entre 30 et 40 minutes. Les extractions des 5 plantes seront donc exposées 35 minutes aux ultrasons.

I.2.2. Préparation des infusions de plantes aromatiques fraîches dans l'huile de tournesol

Des échantillons des huiles infusées préparées à partir de la matière végétale ont été mis en place.

- **Préparation des échantillons à partir : Thé d'Aubrac, Balsamite, Myrrhis et Monarde à 1 % de feuille fraiches (35 min aux ultrasons)**

Une infusion à 1% a été préparée à partir des feuilles de plantes aromatiques dans l'huile de tournesol avec les quantités suivantes :

- Volume d'huile de tournesol : 1 L
- Masse d'huile : 906, 7 g
- Masse de feuille incorporée : 9, 0 g
- Masse de feuille théorique : 9, 067 g
- Fréquence des ultrasons : 20 Khz
- Temps de sonification : 35 minutes

L'huile de tournesol aromatisée est filtrée et conservée à 4°C dans des bouteilles hermétiquement fermées pour les analyses chromatographiques ultérieures

I.3. Préparation d'infusions de plantes aromatiques séchées dans l'huile de tournesol : HI.FS

La meilleure façon de commercialiser l'huile de tournesol aromatisée est de faire apparaitre les feuilles immergées dans l'huile, qui vont offrir au fur et à mesure leurs arômes à l'huile de tournesol en donnant un effet esthétique au produit.

Pour préparer ces échantillons, les feuilles des 4 plantes aromatiques (*Calamintha grandiflora, Tanacetum balsamita, Myrrhis odorata* et *Monarda didyma*) et les fleurs *d'Achillea millefolium* ont été préalablement desséchées dans un déshydrateur alimentaire (figure 49) pendant environ 3 heures.

Figure 49 : Déshydrateur alimentaire

Le déshydrateur envoie de l'air chaud (environ à 65°C) à partir du centre du plateau le plus bas et se propage sur tous les niveaux dessèchant ainsi les feuilles. Une petite aération située au centre du plateau le plus haut permet d'éviter la condensation. Les feuilles et fleurs une fois séchées sont conservées dans des petits bocaux en verre.

Plusieurs échantillons d'huile de tournesol ont été préparés à différentes concentrations en feuilles/fleurs sèches (de 0,8 à 2%) et analysés à intervalles de temps réguliers. Les échantillons sont préparés dans des bouteilles en verre de capacité de 100 ou 200 mL.

I.4. Préparation des infusions de plantes aromatiques séchées et d'huile essentielle HI.HE.FS

Les échantillons sont réalisés en rajoutant 2% des feuilles sèches et 0,1% de l'huile essentielle de chaque plante aromatique dans l'huile de tournesol

Volume d'huile : 200 mL

Masse d'huile : 174,06 g

Masse de feuilles théorique pour 2 % : 174,06 * 2/100 = 3,4812 g

Masse de feuilles réelle incorporée dans l'huile : 3,48 g

Masse d'huile essentielle théorique à incorporée : 174,06 * 0,1/100 = 0,17406 g

Masse d'huile essentielle incorporée réellement : 0,18 g

I.5. Analyses de l'espace de tête des huiles infusées

I.5.1. Fibre SPME, choix de la fibre et conditionnement

Les analyses en espace de tête ont été effectuées par l'intermédiaire d'une fibre SPME à trois phases DVB/CAR/PDMS (Divinylbenzène/Carboxen/Polydiméthylsiloxane) possédant un revêtement de 50/30 µm, cette fibre bipolaire extrait les composés volatils et semi-volatils à la fois. Le choix de cette fibre a été basé sur les résultats obtenus dans la première partie de ce chapitre sur le développement du système (CFD).

Le conditionnement de cette fibre a été effectué via l'injecteur de la CPG Varian (CP 3800), dans lequel on expose la fibre pendant 1 heure à 250°C.

I.5.2. Préparation des huiles infusées à analyser : extraction des COVs

On prélève via une seringue 4 grammes d'échantillon d'huile aromatisée ou infusée (stocké dans des bouteilles à capacité 100 ou 200 mL). On dépose l'échantillon prélevé dans un vial de 5 ml qui sera clos par un septum et mis à agiter pendant 5 minutes à T°C ambiante.

On fait passer l'aiguille de la fibre (en position fermée) à travers le septum ; par la suite, on fait descendre le piston (fibre en position ouverte) de façon à exposer la fibre à l'espace de tête. On veillera à ce que la fibre se retrouve toujours au même niveau dans l'espace de tête pour toutes les répétitions.

Le temps optimum d'adsorption est estimé à 10 minutes (résultats obtenus dans la première partie de ce Chapitre). Une fois l'adsorption terminée, la fibre est rétractée dans l'aiguille et injectée dans le chromatographe immédiatement. Les analyses ont été effectuées en triplicata.

I.5.3. Analyse chromatographique des échantillons des huiles infusées ou aromatisées

Le chromatographe utilisé est le CP 3800 Varian équipé d'une colonne capillaire DB5-MS (30m x 0,25 mm D.I, 0,25 µm épaisseur de film). Le gaz vecteur est l'hélium (1.3 mL/min). Le temps de désorption de la fibre dans l'injecteur est de 3 minutes à la température de l'injecteur (250°C). La programmation du four est la suivante : 30°C durant 5 minutes, puis 5°C/min jusqu'au 200°C et 10 minutes à 250°C. La T°C du détecteur DIF est de 250°C.

II. Résultats et interprétations

II.1. Evolution de la concentration des COVs émis des huiles aromatisées ou infusées en fonction du temps

Dans le but de suivre l'évolution de la concentration en COVs dans l'espace de tête de l'huile aromatisée, nous avons effectué des analyses de l'espace de tête de l'huile aromatisée tous les 2 jours. La concentration du composé majoritaire a été suivie dans l'huile aromatisée au cours du temps. Les graphiques ci-dessous ont été réalisés en se basant sur la moyenne des aires de pics par 3 répétitions d'échantillonnage.

II.1.1. Evolution de la quantité de tanacetone dans l'espace de tête de l'huile de tournesol infusée par les feuilles séchées de la Balsamite et son HE

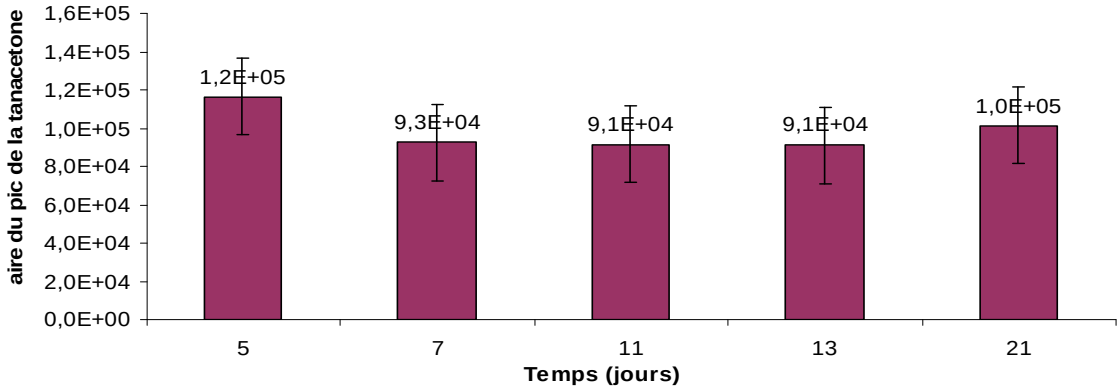


Figure 50: Evolution de la quantité de tanacétone présente dans l'espace de tête de l'huile de tournesol infusée par 2 % de feuilles sèches et aromatisée par 0,1% de l'HE de la Balsamite en fonction du temps

D'après la figure 50, on peut remarquer que la concentration de tanacetone en fonction du temps est relativement stable et après 3 semaines d'aromatisation l'espace de tête de l'huile de tournesol garde une concentration quasi stable en tanacetone.

II.1.2. Evolution de la quantité du camphre (exprimée par l'aire du pic) dans d'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par les feuilles séchés d'*A. millefolium* et son HE

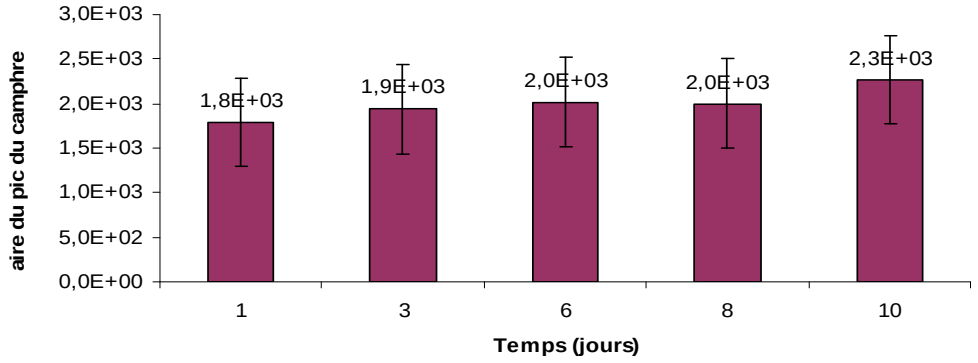


Figure 51: Evolution de la quantité de camphre dans d'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par 0,1 % d'HE *d'Achillea millefolium* et par 0,2% des ses feuilles sèches en fonction du temps

D'après la figure 51, on remarque que la concentration en camphre dans l'huile aromatisée par l'huile essentielle d'Achillée reste quasi stable en fonction du temps, ainsi même après 10 jours d'aromatisation.

II.1.3. Evolution, de la quantité de tanacetone dans l'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par les feuilles fraîches de Balsamite

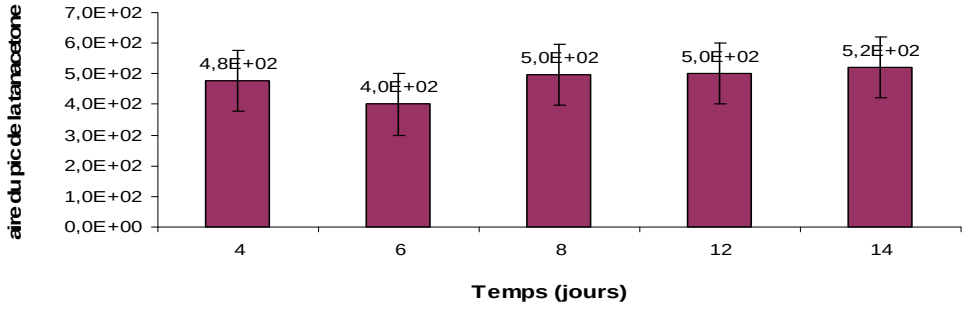


Figure 52: Evolution de la quantité de tanacétone dans l'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par les feuilles fraîches de Balsamite en fonction du temps

D'après la figure 52 on remarque que la concentration en tanacétone dans l'espace de tête varie peu en fonction du temps ; ainsi, l'huile aromatisée par les feuilles fraîches de la Balsamite n'est pas stable.

II.1.4. Evolution de la quantité de tanacétone dans l'espace de tête de l'huile de tournesol infusée par les feuilles séchées de la Balsamite

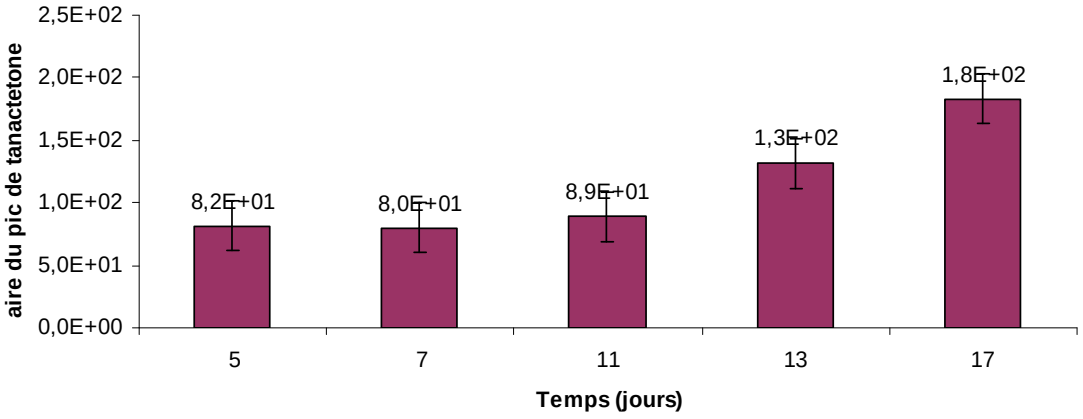


Figure 53: Evolution de la quantité de tanacétone dans l'espace de tête de l'huile de tournesol infusée par 2% des feuilles sèches de la Balsamite en fonction du temps

D'après la figure 53, on remarque que la concentration en tanacétone évolue en fonction du temps. Après environ 3 semaines, la concentration a été doublée. Cette représentation montre la cinétique de libération des COVs à partir des feuilles sèches macérées dans l'huile de tournesol.

II.2. Résultats de l'aromatisation par infusion de matière végétale et par ajout d'HE dans les huiles végétales

Les résultats des analyses des huiles infusées à partir de la matière fraîche (HI.FF) n'ont pas été positifs. En utilisant 1 % de matière fraîche infusée, on observe la présence des 2 composés majoritaires de l'huile essentielle. Si on augmente le taux de matière fraîche à 2% l'huile de tournesol devient trouble. Les molécules d'eau présentes dans les feuilles passent dans l'huile vecteur et créent une émulsion. L'huile ainsi obtenue n'est pas stable. Nous avons alors abandonné cette méthode d'aromatisation qui conduit à une huile aromatisée non commercialisable.

Dans le cas de l'huile infusée à 1% de matière sèche, aucun composé aromatique n'est détecté dans l'huile. En doublant le taux de matière sèche à 2%, on observe la présence dans l'huile de 2 à 3 composés majoritaires de l'huile essentielle. Une tentative d'augmentation du taux d'infusion à 3% a été effectuée mais dans ce cas la quantité de matière végétale par rapport à la quantité de l'huile est trop importante et l'huile devient de couleur vert.

Finalement l'huile a été aromatisée par 0,1% d'huile essentielle pour chacune des plantes aromatiques et 2% de matière végétale sèche correspondante.

Les résultats d'aromatisation de l'huile de tournesol par l'huile essentielle sont présentés dans les tableaux ci-après. Pour chacune de ces huiles, les principales notes odorantes des huiles essentielles ont été perçues.

II.2.1. Huile de tournesol aromatisée par l'HE d'*Achillea millefolium*

12 COVs ont été identifiés dans l'espace de tête de l'huile aromatisée par l'Achillée millefeuille dans les conditions SPME choisies. Les composés identifiés sont 6 monoterpènes, 4 monoterpènes oxygénés, 2 sesquiterpènes et un sesquiterpène lactone. Les composés majoritaires sont le camphre (31,23%), le germacrène D (17,73%), le sabinène (16,51%), l'acétate de chrysanthényle (10,25%), le nérolidol (10,20%), la béta-pinène (9,28%), l'eucalyptol (9,35%) et le 4-terpinéol (7,65%) (Voir tableau 22).

Tableau 22: Identification des COVs dans l'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par l'huile essentielle d'Achillée millefeuille et par ses feuilles sèches

Composés	IR[a] (TIC)	IRth[b]	%[c] HE	HI/FS	%[c] HI/HE/FS	CV[d] HI/HE/FS
hexane2,3-dione	801	790	0,05		nd	
3-hexène-1-ol	848	854	0,22		nd	
hexanoate de méthyl	923	927	0,18		nd	
alpha-pinène	931	939	1,70		3,51	12,89
camphène	947	954	1,60		3,48	14,29
sabinène	970	975	6,72	+	**16,51**	8,98
béta-pinène	976	979	3,28		**9,28**	11,36
alpha-terpinène	1015	1017	0,70		1,87	12,98
para-cymène	1022	1026	0,82		nd	
1,8-cinéole	1030	1031	4,03		**9,35**	14,87
gama-terpinène	1055	1060	1,71		3,48	17,36
terpinolène	1083	1089	0,35		nd	
linalol	1099	1097	1,78		3,69	5,89
nonanal	1103	1101	0,61		nd	
isocyclocitral	1115	_	4,48		nd	
béta-terpinène	1122	_	0,39		nd	
ni	1134		0,28		nd	
trans-pinocarvéol	1138	1139	0,55		nd	
camphre	1146	1146	12,64	+	**34,23**	4,28
3-cyclohexen-1-carboxaldéhyde,2,4,6-triméthyl	1160	_	1,76		nd	
bornéol	1170	1169	2,25		nd	

4-terpinéol	1179	1189	4,70		**7,65**	16,58
menthan-2-one	1193	1196	1,46		nd	
trans-acétate de chrysanthényle	1228	1236	6,55		**10,25**	22,69
acétate de bornyle	1280	1289	1,17		nd	
1,3,8 p-menthatriène	1317	_	0,31		nd	
acétate de linalyle	1355	_	0,31		nd	
alpha-copaène	1370	1377	0,52		nd	
isoledène	1382	_	0,12		nd	
béta-caryophyllène	1422	1419	1,42		nd	
cis-alpha-bisabolène	1447	_	0,54		nd	
germacrène-D	1474	1485	11,73	+	**17,73**	10,69
methyl-isogénol	1487	1492	0,98		nd	
gamma-cadinène	1505	1514	0,35		nd	
delta-cadinène	1509	1523	1,22		nd	
alpha-calacorène	1532	1546	0,35		nd	
élemol	1547	1550	1,57		nd	
(E)-nérolidol	1555	1563	7,23		**10,20**	14,72
ni	1567		0,84		nd	
alcool caryophyllenique	1572	1572	1,97		nd	
oxyde de caryophyllène	1584	1583	1,88		nd	
ni	1594		1,21		nd	
viridiflorol	1598	1596	1,41		nd	
céderène-epoxide	1616	1623	0,46		nd	
ni	1626		1,14		nd	
ni	1631		0,54		nd	
béta-eudesmol	1644	1651	1,09		nd	
cedr-8(15)-en-10-ol	1653	1652	0,19		nd	
alcool patchoulique	1661	1658	0,79		nd	
alpha-bisabolol	1674	1686	1,49		nd	

[a]indice de rétention calculé à partir des n-alcanes C_5-C_{18},, [b]indices de rétention théoriques (IRth) des librairies Adams, NIST, Agilent France, Wiley, Hewlett Packard, France et de la littérature, [c]pourcentage moyen sur 3 réplicats, [d]coefficient de variation (%), + présence du composé organique volatil à l'état de trace, nd : non détéctée

II.2.2. Huile de tournesol aromatisée par l'HE de *Calamintha grandiflora*

8 COVs ont été identifiés dans l'espace de tête de l'huile de tournesol dans les conditions SPME choisies dont 3 monoterpènes et 5 monoterpènes oxygénés : l'isomenthone (38,97%), le néo-isomenthol (21,61%), la pulegone (17,87%), l'isomenthol (9.14%), la menthone (6,28%), le limonène (2,86%), le 3-octanol (1,69%) et la béta-pinène (1,58%). On remarque la présence majorotaire de la famille de menthone. L'absence des sesquiterpènes dans l'espace de tête est due aux conditions d'extraction. On retrouve le germacrène en état de trace (voir Tableau 23)

Tableau 23: Identification des COVs dans l'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par l'HE de *Calamintha grandiflora* et par ses feuilles sèches

Composés	IR[a] (TIC)	IRth[b]	%[c] HE	HI/FS	%[c] HI/HE/FS	CV[d] HI/HE/FS
alpha-pinène	931	939	0,03		nd	
sabinène	970	975	0,19		nd	
béta-pinène	976	979	0,21		**1,58**	14,69
béta-myrcène	987	991	0,09		nd	
3-octanol	995	991	0,25		**1,69**	18,36
limonène	1027	1029	0,71		**2,86**	13,68
béta-trans-ocimène	1032	1037	0,08		nd	
terpinolène	1068	1089	0,03		nd	
béta-linalol	1100	1091	0,04		nd	
para-Menth-8-en-3-ol	1148	1150	0,24		nd	
menthone	1155	1153	4,40		**6,28**	12,65
isomenthone	1168	1162	34,07	+	**38,97**	7,65
isomenthol	1181	1183	7,65		**9,14**	6,28
néo-isomenthol	1191	1187	19,83	+	**21,61**	5,99
pulégone	1240	1237	19,54	+	**17,87**	14,61
pipéritone	1251	1253	1,28		tr	
ni	1284		0,03		nd	
acétate d'isomenthyle	1301	1305	0,03		nd	
ni	1335		0,14		nd	

copaène	1370	1377	0,04	nd
béta-bourbonène	1378	1388	0,13	nd
caryophyllène	1413	1409	1,99	nd
santalène	1448	1447	0,37	nd
germacrène-D	1474	1485	3,55	tr
bicyclogermacrène	1487	1500	1,78	nd
alpha-farnesène	1499	1506	0,11	nd
gamma-cadinène	1510	1514	0,12	nd
acétate d'isogénol	1568	1568	0,93	nd
oxyde de caryophyllène	1572	1583	0,43	nd
ni	1599		0,06	nd
ni	1605		0,28	nd
alpha-cadinol	1646	1654	0,20	nd
ni	1781		0,15	nd
ni	1786		0,07	nd
ni	1790		0,08	nd
ni	1802		0,16	nd
ni	1806		0,05	nd
ni	1810		0,18	nd
ni	1830		0,04	nd
ni	1850		0,14	nd
ni	1860		0,17	nd

[a]indice de rétention calculé à partir des n-alcanes C_5-$C_{18,}$

[b]indices de rétention théoriques (IRth) des librairies Adams, NIST, Agilent France, Wiley, Hewlett Packard, France et de la littérature

[c]pourcentage moyen sur 3 réplicats

[d]coefficient de variation (%)

+ : présence du composé organique volatil à l'état de trace

nd : non détéctée

II.2.3. Huile de tournesol aromatisée par l'HE de *Tanacetum balsamita*

7 COVs ont été identifiés dans l'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par l'huile essentielle de Balsamite et de ses feuilles séchées dans les conditions SPME choisies. 3 monoterpènes, 3 monoterpènes oxygénés et 1 sesquiterpène ont été identifiés dont la tanacetone (76,31%), l'eucalyptol (7,68%), la béta thujone (5,12%), la béta-terpinène (4,88%), le gamma-terpinène (3,14%), le germacrène-D (1,51%) et le sabinène (1,36%) (Tableau 24).

Tableau 24: Identification des COVs dans l'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par l'HE de *Tanacetum balsamita* et par ses feuilles sèches

Composés	IR[a] (TIC)	IRth[b]	%[c] HE	HI/FS	%[c] HI/HE/FS	CV[d] HI/HE/FS
alpha-pinène	933	939	0,05		nd	
sabinène	973	975	0,19		**1,36**	9,68
béta-pinène	979	979	0,04		nd	
mentha-2,8-diène	987	984	0,05		nd	
myrcène	991	991	0,09		nd	
isoamyl butylate	1010	_	0,06		nd	
alpha-terpinène	1017	1017	0,14		nd	
para-cymène	1025	1026	0,26		nd	
1,8-cinéole	1033	1031	3,97	+	**7,68**	11,58
gamma-terpinène	1058	1060	0,53		**3,14**	10,28
béta-terpinène	1072	1072	1,55		**4,88**	11,69
alpha-terpinolène	1086	1089	0,09		nd	
2-méthyl-butyrate d'isoamyl	1099	1100	0,07		nd	
cis-thujone	1109	1102	3,33		**5,12**	4,32
trans-thujone	1128	1144	83,57	+	**76,31**	3,87
isothujanol-3	1140	1138	0,23		nd	
para menth-3-en-8-ol	1144	1150	0,39		nd	
ni	1148	_	0,05		nd	
ni	1151	_	0,05		nd	
bicyclo[4,1,0] heptan-3-one,7,7 diméthyl-4 méthylène	1157	_	0,03		nd	

pinocarvone	1165	1165	0,28	nd	
acétate de santolinyle	1172	1175	0,16	nd	
pinocarveol	1183	1184	1,48	nd	
ocimène	1198	1186	0,16	nd	
carvotanacetone	1251	_	0,15	nd	
4-carène	1260	_	0,14	nd	
bicyclo[3,1,0] hex-2-ene,4-methylène-1-(1-méthyléthyl)	1288	_	0,11	nd	
3-carène,10-acétylméthyl	1296	_	0,04	nd	
acétate de dihydrocarvéol	1303	1307	0,18	nd	
ni	1323	_	0,03	nd	
ni	1329	_	0,14	nd	
ni	1336	_	0,02	nd	
ni	1352	_	0,02	nd	
alpha-bourbonène	1385	1388	0,02	nd	
isobutanoate de phenyléthyl	1395	1394	0,02	nd	
caryophyllène	1421	1419	0,02	nd	
gamma-gurjunène	1474	1477	0,07	nd	
germacrène-D	1482	1485	1,50	**1,51**	22,87
bicyclogermacrène	1496	1500	0,19	nd	
delta-cadinène	1518	1523	0,02	nd	
ni	1560	_	0,05	nd	
ni	1578	_	0,03	nd	
dihydro eudesmol	1656	1663	0,38	nd	
Pirétrinal	1733	_	0,03	nd	
ni	1788	_	0,03	nd	

[a]indice de rétention calculé à partir des n-alcanes C_5-$C_{18,}$

[b]indices de rétention théoriques (IRth) des librairies Adams, NIST, Agilent France, Wiley, Hewlett Packard, France et de la littérature

[c]pourcentage moyen sur 3 réplicats

[d]coefficient de variation (%)

+ : présence du composé organique volatil à l'état de trace, nd : non détécté

II.2.4. Huile de tournesol aromatisée par l'HE de *Myrrhis odorata*

5 COVs ont été identifiés dans l'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par l'huile essentielle de Myrrhis dans les conditions SPME choisies. 1 monoterpène, 2 monoterpènes oxygénés et 2 sesquiterpènes dont l'anéthole (61,18%), le germacrène-D (13,10%), le limonène (10,29%), l'estragole (8,56%) et le béta-caryophyllène (6,87%) (Voir tableau 25).

Tableau 25: Identification des COVs dans l'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par l'HE de *Myrrhis odorata* et ses feuilles sèches.

Composés	IR[a] (TIC)	IRth[b]	%[c] HE	HI/FS	%[c] HI/HE/FS	CV[d] HI/HE/FS
alpha-pinène	934	939	0,03		nd	
sabinène	973	975	0,02		nd	
béta-pinène	979	979	0,02		nd	
béta-myrcène	987	991	0,63		nd	
limonène	1030	1029	4,42	+	**10,29**	16,58
béta-cis-ocimène	1047	1050	0,32		nd	
gamma-terpinène	1059	1060	0,24		nd	
terpinolène	1088	1089	0,04		nd	
estragole	1199	1196	3,04		**8,56**	7,69
cis-3 hexenyl isovalerate	1229	-	0,01		nd	
ni	1253		0,06		nd	
trans-anéthole	1290	1285	75,12	+	**61,18**	3,12
ni	1376	-	0,05		nd	
ni	1388	-	0,10		nd	
ni	1404	-	0,17		nd	
béta-caryophyllène	1420	1419	2,71		**6,87**	8,66
béta-farnesène	1457	1457	0,22		nd	
germacrène-D	1482	1485	6,19		**13,10**	5,41
ni	1489	-	0,01		nd	
bicyclogermacrène	1496	1500	3,18		tr	
alpha-farnesène	1504	1506	0,48		nd	
ni	1518	-	0,10		nd	
ni	1562	-	2,74		nd	

[a]indice de rétention calculé à partir des n-alcanes C_5-$C_{18,,}$ [b]indices de rétention théoriques (IRth) des librairies Adams, NIST, Agilent France, Wiley, Hewlett Packard, France et de la littérature, [c]pourcentage moyen sur 3

réplicats, [d]coefficient de variation (%), + présence du composé organique volatil à l'état de trace, nd : non détéctée

II.2.5. Huile de tournesol aromatisée par l'HE de *Monarda didyma*

La moitié des COVs identifiés présents dans l'huile essentielle de *Monarda didyma* ont été retrouvés dans l'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par l'huile essentielle de Monarda et ses feuilles sèches. 6 monoterpènes, 5 monoterpènes oxygénés, et 2 sesquiterpènes ont été identifiés dont thymol (34,79%), eucalyptol (14,31%), D-limonène (8,71%), sabinène (8,65%), O-méthyle-thymol (7,39%), germacrène-D (6,28%), gamma-terpinéol (5,63%), camphène (3,67%), caryophyllène (2.57%), alpha-pinène (2,36%), linalool (2,12%), alpha thujène (1,89%) et béta-pinène(1,63%) (Voir tableau 26).

Tableau 26: Identification des COVs dans l'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par l'huile essentielle de *Monarda didyma* et par ses feuilles sèches

Composés	IR[a] (TIC)	IRth[b]	%[c] HE	HI/FS	%[c] HI/HE/FS	CV[d] HI/HE/FS
alpha-thujène	925	930	0,35		**1,89**	9,31
alpha-pinène	933	939	0,88		**2,36**	9,72
camphène	951	954	1,39		**3,67**	8,25
sabinène	973	975	5,53		**8,65**	7,16
béta-pinène	979	979	1,05		**1,63**	8.01
béta-myrcène	987	991	1,10		nd	
alpha-phellandrène	1008	1003	0,10		nd	
alpha-terpinène	1017	1017	1,04		nd	
para-cymène	1025	1026	2,78		nd	
limonène	1030	1029	3,46	+	**8,71**	4,87
1,8-cinéole	1033	1031	9,68	+	**14,31**	6,32
gamma-terpinène	1058	1060	2,68		nd	

hydrate de sabinène	1072	1073	0,55		nd	
alpha-terpinène	1086	1089	1,02		nd	
linalol	1100	1102	1,83		**2,12**	7,36
chrysanténone	1120	1128	0,44		nd	
bornéol	1174	1180	1,13		nd	
alpha-terpinéol	1182	1189	0,47		nd	
gamma-terpinéol	1197	1199	8,52		**5,63**	8,22
thymol-méthyl ether	1238	1235	3,20		**7,39**	5,39
thymol	1290	1290	47,06	+	**34,79**	3,25
béta-cubebène	1376	1388	0,09		nd	
ni	1389	_	0,14		nd	
caryophyllène	1421	1419	0,89		**2.57**	9,28
germacrène-D	1482	1485	4,04		**6,28**	19,61
alpha-farnesène	1507	1506	0,54		nd	
delta-cadinène	1518	1523	0,04		nd	

[a]indice de rétention calculé à partir des n-alcanes C_5-C_{18},, [b]indices de rétention théoriques (IRth) des librairies Adams, NIST, Agilent France, Wiley, Hewlett Packard, France et de la littérature, [c]pourcentage moyen sur 3 réplicats, [d]coefficient de variation (%), + présence du composé organique volatil à l'état de trace, nd : non détéctée

Conclusion Partie II

Parmi les trois méthodes évaluées une seule est à retenir. Il s'agit de celle combinant l'huile essentielle aux feuilles séchées car elle offre le plus d'intérêt pour la production industrielle et la commercialisation. En effet, quelques gouttes d'huile essentielle (0,1%) suffisent pour retrouver en quantité importante les composés majoritaires de l'huile essentielle dans l'huile vecteur et d'aromatiser le produit. Quelques feuilles séchées sont nécessaires pour appuyer le côté naturel de l'huile aromatisée.

Concernant les autres méthodes, celle utilisant les ultrasons aurait pu être intéressante car elle nécessite encore moins de matière première que celle retenue mais elle n'est pas généralisable et applicable à toutes les plantes. Effectivement il se peut qu'une émulsion se crée et rende l'échantillon inexploitable au niveau industriel. La concentration des COVs émis en fonction du temps était très variable.

Les feuilles séchées quant à elles ne sont pas exploitables lorsqu'elles sont introduites seules dans l'échantillon car elles n'aromatisent pas suffisamment le produit. Quant à l'huile essentielle incorporée seule dans l'huile de tournesol, elle aromatise très bien le produit mais le fait que l'huile soit aussi limpide que l'huile de tournesol vierge pourrait poser problème quant à l'acceptabilité du produit par le consommateur.

Conclusion générale

Les objectifs scientifiques de ces travaux ont été dans un premier temps d'appliquer le concept d'agro-raffinage aux plantes aromatiques médiévales du patrimoine végétal de Midi-Pyrénées, afin de valoriser de manière séquencée les différents métabolites secondaires. Nous avons pour cela sélectionné cinq plantes aromatiques médiévales : *Achillea millefolium, Tanacetum balsamita, Calamintha grandiflora, Myrrhis odorata* et *Monarda didyma*. L'analyse chimique et sensorielle de la fraction volatile de ces plantes a été effectuée. Les activités biologiques des extraits volatils et non volatils des plantes ont été évaluées. Dans un second temps, confrontés au problème de rareté du végétal étudié, nous avons développé une méthodologie instrumentalisée permettant d'évaluer le potentiel aromatique des plantes à partir d'une seule feuille. Enfin nous avons essayé d'élargir le champ d'application des plantes aromatiques, par leur utilisation en tant qu'ingrédients d'arôme dans les huiles végétales assurant une activité biologique notable associée.

L'huile essentielle *d'Achillea millefolium* obtenue par hydrodistillation de la partie aérienne fraîche est composée de 50 constituants dont 45 ont été identifiés constituant 96% de la quantité totale de l'huile. Le béta-pinène (3,3%), le sabinène (6,7%), et l'eucalyptol (4%) assurent une note de tête mentholée boisée. Le camphre (12,6%), le trans-acétate de chrysantényle (6,6%), le 4-terpinéol (5%) et l'isocyclocitral (4.5%) assurent une note de cœur camphrée boisée. Le germacrène-D (11,73%) et le (E)-nérolidol (7,2%) quant à eux assurent une note de fond florale.

L'huile essentielle de l'espèce française de *Calamintha grandiflora*, obtenue à partir de l'hydrodistillation des tiges et de feuilles a été caractérisée pour la première fois. 29 composés organiques volatils ont été identifiés et constituent 93 % de la composition chimique totale de l'huile essentielle. Le sabinène (0,19%) et le béta-pinène (0,21%) assurent une note de tête boisée citronnée, l'isomenthone (34,07%), le néoisomenthol (19,83%), la pulegone (19,54%), l'isomenthol (7,65%), et la menthone (4,40%) assurent une note de cœur mentholée épicée. Le germacrène-D (3,55%) amène une note de fond florale.

L'huile essentielle des deux origines de *Tanacetum balsamita* (sauvage et cultivée sous serre) a été analysée. 34 composés ont été détectés dont 27 ont été identifiés dans l'huile essentielle de l'espèce sauvage, correspondant à 96% de la composition totale de l'extrait. Les composés majoritaires de l'extrait sauvage sont la carvone (56,72%), la tanacetone (9,08%), le germacrène-D (2,43%), le limonène (2,51%), et le béta-bisabolène (2,46%).

45 composés organiques volatils ont été détectés dont 38 sont identifiés dans l'huile essentielle de l'espèce cultivée sous serre correspondant à 96% de la composition totale de l'extrait. Le 1,8 cinéole (3,97%) et l'alpha-thujone (3,3%) assurent une note de tête mentholée citronnée, la tanacetone ou béta-thujone (83,57%) fournit une note de cœur mentholée herbacée, le germacrène-D (1,50%) et le bicyclogermacrène (0,19%) amènent une note de fond thé sec (doux, infusion).

Nous pouvons conclure que l'espèce sauvage française et spécifiquement celles récoltées dans la région de Midi-Pyrénées se diffère de l'espace cultivée sous serre où la prédominance de Tanacetone et l'absence de carvone dans les huile essentielles des parties aériennes de cette dernière suggère qu'il pourrait s'agir d'un cinquième chimiotype : le type tanacétone induit par les conditions de culture sous serre.

L'huile essentielle de *Myrrhis odorata* est composée de 20 composés organiques volatils qui constituent 96% de la composition totale de l'extrait. Les composés majoritaires, le sabinène (0,63%), limonène (4,42%) apportent une note de tête fraîches herbacée, l'anéthole (75,12%), le germacrène-D (6,19%), le bicyclogermacrène (3,18%), l'estragole (3,04%) et le caryophyllène (2,71%) assurent une note de cœur anisée boisée, deux derniers composés non identifiés assurent une note de fond boisée.

Nous avons identifié 26 composés organiques volatils dans l'huile essentielle obtenue à partir des tiges et les feuilles de *Monarda didyma*. L'eucalyptol (9,68%), le limonène (3,46%) et le gamma-terpinène (2,68%) assurent une note de tête citronnée mentholée, le thymol (47,06%) apporte une note de cœur thymolé, le germacrène (4,04%) et le caryophyllène (0,89%) donnent une note de fond boisée.

L'activité antioxydante des huiles essentielles des plantes aromatiques oubliées ainsi que de leurs résidus d'hydrodistillation a été évaluée et comparée en utilisant les méthodes suivantes : la méthode Oxipress, la méthode d'évaluation des diènes et triènes conjugués et la méthode de détermination de l'oxydation du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl. On a pu calculer le facteur de protection de chaque huile essentielle, ainsi on a pu conclure que l'efficacité des huiles essentielles diminue dans l'ordre suivant : *M. didyma* > *A. millefolium* > *C. grandiflora* >*M. odorata* >*T. balsamita* pour des concentrations de 0,05%, 0,1% et 0,2%. On a remarqué que l'activité antioxydante des 5 huiles essentielles dépendait de leur concentration.

D'après cette étude nous avons pu démontrer que l'aromatisation de l'huile de tournesol par ces huiles essentielles contribue à prolonger la résistance de l'huile végétale contre l'oxydation par l'oxygène. Ceci a été validé en mesurant la période d'induction de chaque huile essentielle. On peut conclure que l'ajout par exemple de 0,2% de l'huile essentielle de l'Achillée millefeuille permet de préserver l'huile de tournesol et de retarder son oxydation de deux heures à 110°C et sous 5 bars. Cela correspond à une augmentation de la résistance de l'huile de tournesol de 71%.

Nous avons comparé l'activité antioxydante des extraits de résidus d'hydrodistillation des 5 plantes via la méthode DPPH. Cette comparaison a été faite sur la base de la concentration minimale inhibitrice calculée pour chaque résidu. Nous avons remarqué que l'activité antioxydante du résidu d'*Achillea millefolium* a été la plus efficace parmi les autres. L'ordre d'efficacité est le suivant *Achillea millefolium* > *M. didyma* > *T. balsamita* > *C. grandiflora* > *M. odorata.* Les extraits méthanoliques ont été légèrement plus efficaces que les extraits éthanoliques et acétoniques.

L'activité antimicrobienne des solutions méthanoliques d'huile essentielle a été évaluée *in vitro* contre neuf espèces bactériennes pathogènes. Les bactéries à Gram positif ont été plus sensibles que celles à Gram négatif, particulièrement *Bacillus cereus*, qui s'est montré être l'espèce la plus sensible vis-à-vis de l'HE de *M. didyma*. Cette dernière, a montré une efficacité élevée contre toutes les cultures microbiennes pour une concentration de 1%. Les solutions d'HEs à 0,5% de *T. balsamita* et *M. odorata* possèdent les activités antimicrobiennes les plus faibles contre la majorité des bactéries en comparaison avec les autres huiles appliquées à la même concentration. Elles montrent une activité antibactérienne seulement contre *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilus*. L'huile essentielle de *C. grandiflora* a été la plus efficace contre *Bacillus subtilus*, cette huile s'est montrée plus active que l'antibiotique utilisé.

L'effet inhibiteur de l'HE de *M. didyma* (1%) contre *Escherichia coli, Salmonella enteritidis, Salmonella typhymurium et Staphylococcus epidermidis* était aussi bas que l'effet de l'antibiotique de référence; cependant, dans le cas de *Bacillus subtilus*, l'effet de l'HE de *M. didyma* était équivalent à celui de l'antibiotique.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*A. millefolium* a été plus efficace contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. Par contre, l'huile essentielle de *l'A. millefolium* n'est pas active vis-à-vis d'*Escherichia coli*.

Nous avons réussi à mettre en place un système instrumental d'évaluation rapide du potentiel aromatique de plantes à huiles essentielles basé sur l'analyse des effluves. Un appareillage novateur dénommé "Crushing Finger Device" (CFD) basé sur le concept de "Scratch'n Sniff" a été mis au point afin de mimer instrumentalement le froissement de la feuille entre les doigts suivi du piégeage des composés volatils odorants émis. Ce système a montré de réelles potentialités pour une évaluation qualitative rapide des huiles essentielles contenues dans les feuilles de plantes aromatiques. Grâce à ce système la composition des notes de tête et de cœur de l'huile essentielle native peut être rapidement évaluée.

La richesse des résultats obtenus par SPME/CPG-2D ainsi que l'utilisation complexe et coûteuse de cette technologie limite son domaine d'application à la recherche.

Finalement, pour un objectif d'application pré-industrielle, nous avons comparé trois différentes méthodes d'aromatisation des huiles végétales, La première en infusant la matière végétale sous sa forme sèche, la deuxième en infusant la matière végétale sous sa forme fraîche, et la troisième en aromatisant l'huile de tournesol directement par ajout de l'huile essentielle. Les résultats des analyses des huiles infusées à partir de la matière fraîche ne sont pas concluants. En utilisant 1 % de matière fraîche pour réaliser l'infusion, seulement un ou deux composés majoritaires de l'huile essentielle sont retrouvés dans l'espace de tête de l'huile végétale. Le passage à 2% limite l'utilisation de cette méthode à cause de la formation d'émulsions dues au passage de l'eau de la plante vers l'huile végétale. Les feuilles sèches ne sont pas exploitables quand elles sont introduites seules dans l'échantillon car elles n'aromatisent pas suffisamment le produit. Dans le cas des huiles aromatisées par les huiles essentielles, environ 50% des composés de l'huile essentielle sont retrouvés dans l'espace de tête de l'huile de tournesol.

Des études complémentaires pourront être envisagées dans plusieurs domaines.

La composition chimique des résidus d'hydrodistillation devrait être caractérisée pour connaître les composés responsables de l'activité antioxydante des cinq plantes.

Les concentrations inhibitrices minimales des cinq huiles essentielles pourront être calculées pour mieux comparer nos résultats avec les travaux de la littérature.

L'activité antioxydante individuelle de chaque composé devrait être évaluée par une méthode de couplage type on-line CLHP-DPPH-SM, pour savoir s'il existe ou non une synergie entre ces composés pour donner à la fin une activité antioxydante globale.

Partie Expérimentale

I. Techniques d'extraction des huiles essentielles

Malgré les progrès considérables réalisés ces dernières années dans le domaine de la chimie analytique, la caractérisation des huiles essentielles ou des COVs demeure un challenge. L'analyse des COVs émis par une plante se déroule en trois étapes : extraction des composés aromatiques, analyse de l'extrait et traitement des résultats pour identifier et/ou quantifier les COVs.

Les composés organiques volatils sont généralement présents dans les matrices végétales à de très faibles concentrations [de l'ordre du ppm (mg/Kg) ou du ppb (µg/Kg)] et sont de polarités, solubilités, volatilités et stabilités très variables.

Les molécules odorantes sont constituées d'un squelette hydrocarboné qui peut être linéaire, cyclique ou aromatique. Presque toutes les fonctions chimiques portées par ces chaînes sont représentées : alcools, composés carbonylés (principalement les aldéhydes), esters, éthers, phénols et enfin dérivés soufrés et hétérocycles.

I.1. Différentes techniques d'extraction des huiles essentielles

La matière végétale est dispersée dans de l'eau et placée dans un ballon chauffé directement (hydrodistillation) ou indirectement (distillation à la vapeur) par de la vapeur d'eau. Les composés volatils et semi volatils sont entraînés par la vapeur d'eau, qui est ensuite condensée. On récupère un surnageant nommé huile essentielle (HE), composée de molécules peu solubles dans l'eau.

D'une façon générale, la distillation est un procédé de séparation basé sur la différence de composition entre un liquide et la vapeur engendrée (Garnero, 1996). La technique implique la condensation de la vapeur et la récupération des fractions liquides résultantes. On parle de distillation simple ou fractionnée.

Nous avons utilisé deux techniques différentes d'extraction : l'entraînement à la vapeur et l'hydrodistillation.

I.1.1. Entraînement à la vapeur

Le procédé correspondant à une distillation hétérogène, met en jeu l'application de deux lois physiques :

La loi de Dalton: dans laquelle la pression du mélange de vapeurs est égale à la somme des tensions de vapeur de divers constituants. $P_T = T_H + T_E$

La loi de Raoult: le rapport des quantités des entités distillées simultanément est fonction de la tension et des densités des vapeurs (donc des masses moléculaires) à la température de distillation choisie.

$$\frac{MoleH}{MoleE} = \frac{T_H}{T_E}$$

La relation de ces deux lois donne respectivement la pression totale et la composition des vapeurs en fonction des pressions partielles, d'où le calcul du taux de corps entraîné appelé également rapport d'entraînement :

$$R = \frac{T_H}{T_E} \cdot \frac{M^0{}_H}{M^0{}_E} = \frac{P_H}{P_E}$$

H et E désignent respectivement l'huile essentielle et l'eau

P_T = Pression totale

T = Tension de vapeur

M^0 = Masse molaire

P = Poids

R = Rapport d'entraînement

La température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeurs de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation. Elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures.

Ainsi le mélange eau/huile essentielle distillée possède une température inférieure à 100°C à pression atmosphérique (généralement proche de 100°C en raison de la faible tension des constituants odorants) alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées. La figure 54 montre l'évolution de la température de co-distillation d'un mélange hétérogène d'eau et d'huile essentielle.

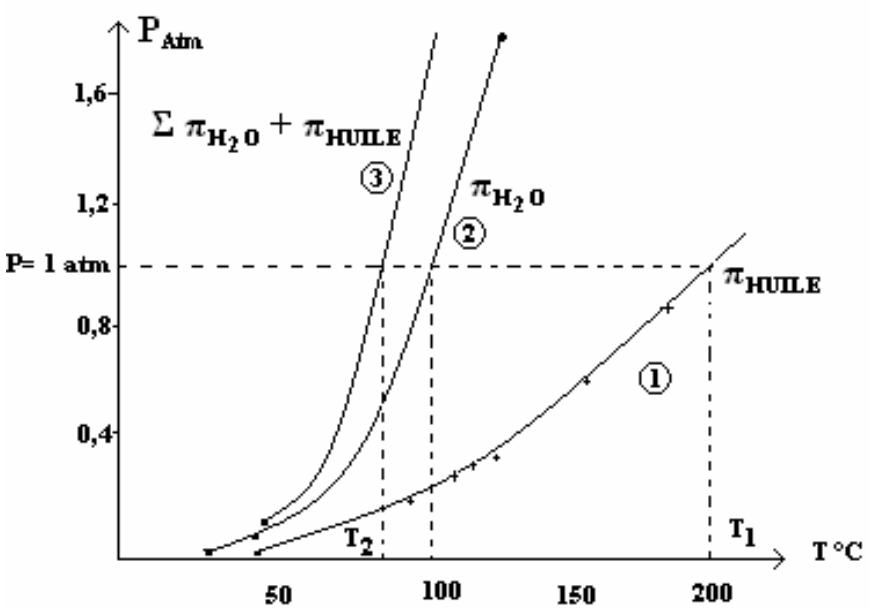


Figure 54: Evolution des températures de distillation de l'eau et l'huile essentielle, et du mélange eau/huile essentielle en fonction de la pression du milieu

Pendant l'entraînement à la vapeur, les liquides non miscibles semblent distiller simultanément comme s'il s'agissait de deux compartiments séparés (figure 55), bien qu'en pratique, ils soient mêlés. Or leurs vapeurs constituent un gaz homogène. On parle alors de co-distillation. Dans les deux cas, représentés dans la figure 1, si la pression partielle de l'eau est égale à celle de l'huile ($P^0{}_E = P^0{}_H$), nous avons respectivement :

I	II
Phase liquide : mole d'eau = mole d'huile	mole d'eau >mole d'huile
Phase vapeur : mole d'eau = mole d'huile	mole d'eau = mole d'huile

La pression totale (P_T) est indépendante des quantités d'eau et d'huile :

$$P_T = P^0{}_E + P^0{}_H$$

Où P^0 désigne la pression partielle.

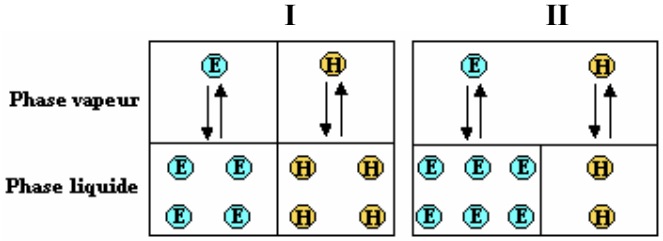


Figure 55: Répartition de l'eau (E) et de l'huile essentielle (H) entre les phases liquide et vapeur en fonction de la pression lors de l'hydrodistillation

I.1.2. Hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage communément appelé cohobage ;

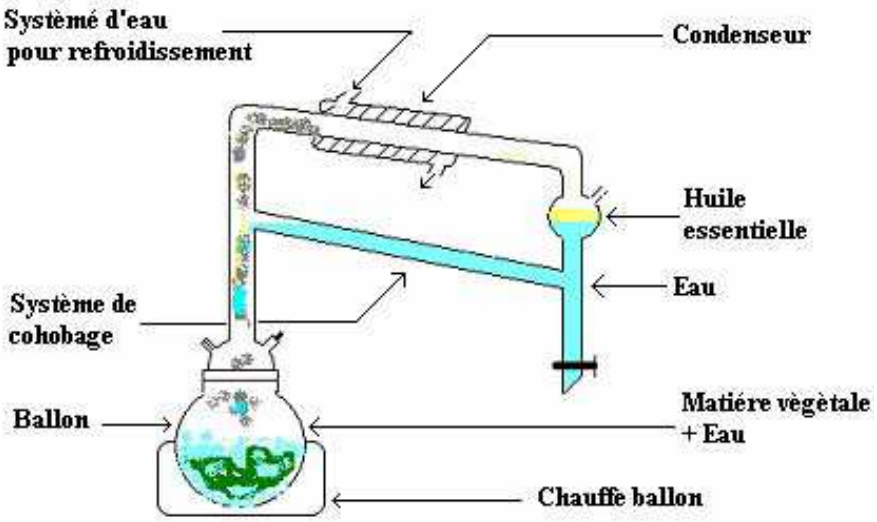


Figure 56: Montage de l'hydrodistillation (type clevenger)

Le montage de type Clevenger réprésenté dans la figure 56 est composé de quatre parties principales :

Le réacteur, un ballon dans lequel on introduit la matière végétale et l'eau

La colonne, un cylindre en verre placé au-dessus du réacteur qui recueille la phase vapeur

Le réfrigérant dans lequel se recondensent les vapeurs

Le vase florentin dans lequel vont décanter les phases organique (huile essentielle) et aqueuse (eau aromatique).

Calcul de la teneur en matière sèche et du rendement en huile essentielle

La teneur en eau et en matières volatiles (ou humidité) relative, est déterminée selon la norme française NF V 03-909. Elle correspond à la perte de masse subie par l'échantillon après chauffage dans une étuve à 103 ± 2 °C jusqu'à poids constant. La teneur en eau et en matières volatiles est exprimée en pourcentage massique :

$$\% \, Eau = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} * 100 = (H)$$

Où :

m_0 est la tare de la coupelle en g

m_1 est la masse de la coupelle et de la prise d'essai avant chauffage en g

m_2 est la masse de la coupelle et du résidu après chauffage jusqu'à poids constant en g

Exprimée aussi en pourcentage en masse, la teneur en matière sèche de l'échantillon, se déduit de la valeur de H :

$$\%\ Matière\ Sèche = 100 - H = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100$$

Trois mesures ont été effectuées sur le même échantillon. Ensuite le rendement de chaque hydrodistillation est calculé, en effectuant un rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse de la matière végétale sèche utilisée.

I.1.3. Hydrodistillation d'*Achillea millefolium*

Une fois que la matière végétale est récoltée, la partie aérienne de la plante est récupérée et nettoyée de la terre et des autres herbes contaminantes. Triée et nettoyée, la matière végétale est introduite dans un ballon de 5 litres après avoir été coupée en petits morceaux. L'extraction a été répétée 6 fois. La quantité d'eau et la masse de matière végétale ont été identiques. Pour chaque extraction 500 g de la partie aérienne ont été mixés avec 4 litres d'eau distillée, puis hydrodistillés pendant 3 heures. (Figure 57)

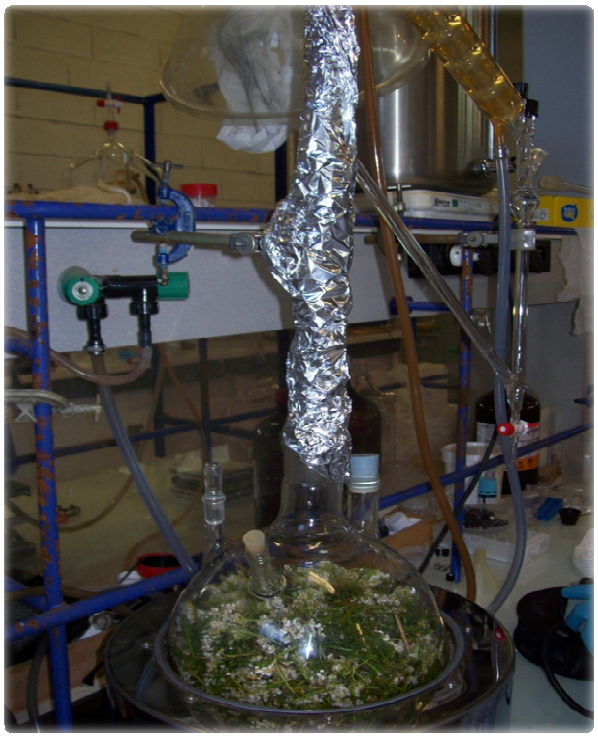


Figure 57: Hydrodistillation de l'Achillée millefeuille

A la fin de l'hydrodistillation l'huile essentielle de couleur jaune à tendance verte est récupérée à l'aide d'une pipette pasteur, et mise dans un petit flacon à bouchon en téflon taré afin de calculer le rendement.

I.1.4. Hydrodistillation de *Calamintha grandiflora*

Les sommités fleuries ont été enlevées et 300 g de la partie aérienne (tiges et feuilles) ont été coupés en petits morceaux et introduits dans le ballon de 5 litres contenant 3 litres d'eau distillée. L'ensemble est distillé pendant 3 heures, afin de récupérer l'huile essentielle dans un flacon taré pour une analyse chromatographique ultérieure. Les conditions d'extraction par hydrodistillation du Thé d'Aubrac ont été répétées 3 fois.

I.1.5. Hydrodistillation de *Tanacetum balsamita*

400 g de la partie aérienne (tiges et feuilles) ont été coupés en petits morceaux et introduits dans le ballon de 5 litres et mixés avec 3,5 litres d'eau distillée. L'ensemble est hydrodistillé pendant 3 heures, afin de récupérer l'huile essentielle dans un petit flacon taré stockée à 4°C pour une analyse chromatographique ultérieure. Les conditions d'extraction par hydrodistillation de la Balsamite ont été répétées 3 fois.

I.1.6. Hydrodistillation de *Myrrhis odorata*

500 g de la partie aérienne (tiges et feuilles) ont été coupés en petits morceaux et introduites dans le ballon de 5 litres contenant 4 litres d'eau distillée. L'ensemble est distillé pendant 3 heures, afin de récupérer à la fin l'huile essentielle stocké à 4°C dans un flacon taré pour une analyse chromatographique ultérieure. Les conditions d'extraction par hydrodistillation de *Myrrhis odorata* ont été répétées 3 fois.

I.1.7. Hydrodistillation de *Monarda didyma*

Les sommités fleuries ont été enlevées et 480 g de la partie aérienne (tiges et feuilles) ont été coupés en petits morceaux et introduits dans un ballon de 5 litres contenant 4 litres d'eau distillée. L'ensemble est distillé pendant 3 heures, un liquide jaunâtre (huile essentielle) est récupéré et mis dans un flacon taré et stocké à 4°C pour une analyse chromatographique ultérieure. Les conditions d'extraction par hydrodistillation de *Monarda didyma* ont été répétées 3 fois.

I.2. Extraction des composés organiques volatils (COVs)

I.2.1. Microextraction en phase solide (SPME)

La micro-extraction en phase solide est une méthode complémentaire d'extraction par la caractérisation des COVs. Elle présente l'avantage de regrouper toutes les étapes de la préparation d'un échantillon (extraction, concentration et transfert au chromatographe) en un seul procédé. En particulier, elle peut se révéler une meilleure méthode pour les analyses qui requièrent des extractions longues et coûteuses et nécessitent une grande consommation de solvants.

La SPME utilise une fibre de silice (1 à 2 cm de long) recouverte d'un film polymérique qui permet d'adsorber ou d'absorber les composés organiques d'un échantillon (Burgot *et al.*, 2003). De nombreuses fibres polaires, apolaires ou mixtes sont actuellement disponibles (tableau 27). La fibre peut se rétracter à l'intérieur d'une aiguille, qui est placée dans un

support pour l'échantillonnage et la désorption. L'échantillon est placé dans un flacon serti par un septum en téflon. L'aiguille perce le septum pour permettre l'introduction de la fibre dans l'espace de tête de l'échantillon ou son immersion dans un échantillon liquide. Une fois l'extraction terminée, la fibre est retirée et désorbée directement dans l'injecteur d'un CPG. La fibre est ensuite reconditionnée par chauffage dans l'injecteur pendant 5 à 15 min ou dans un module de conditionnement pour les échantillonneurs automatiques.

Tableau 27: Fibres disponibles pour l'analyse des COVs

Nature de la phase stationnaire	Polarité	T°C maximale d'utilisation	Composés extraits
Polydiméthylsiloxane (PDMS), 100 et 30µm	Apolaire	280	Composés volatils
Polydiméthylsiloxane (PDMS), 100 et 30µm	Apolaire	340	Composés semi-volatils et apolaires
Polydiméthylsiloxane/divinylbenzène (PDMS/DVB) 30/50 µm	Bipolaire	270	Composés volatils polaires
Polyacrylate (PA) 85 µm	Polaire	320	Composés semi-volatils polaires
Carboxen/divinylbenzène (CAR/PDMS) 85µm	Bipolaire	320	Composés gazeux et très volatils
Carbowax/divinylbenzène (CW/DVB) 65 et 70 µm	Polaire	260	Composés polaires
Divinylbenzène/Carboxen/polydiméthylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) 50/30µm	Bipolaire	270	Composés volatils et semi-volatils

I.2.2. Choix de la fibre SPME

En effet, il est nécessaire de déterminer la fibre la plus efficace, les temps et les températures d'incubation et d'échantillonnage, pour chaque échantillon.

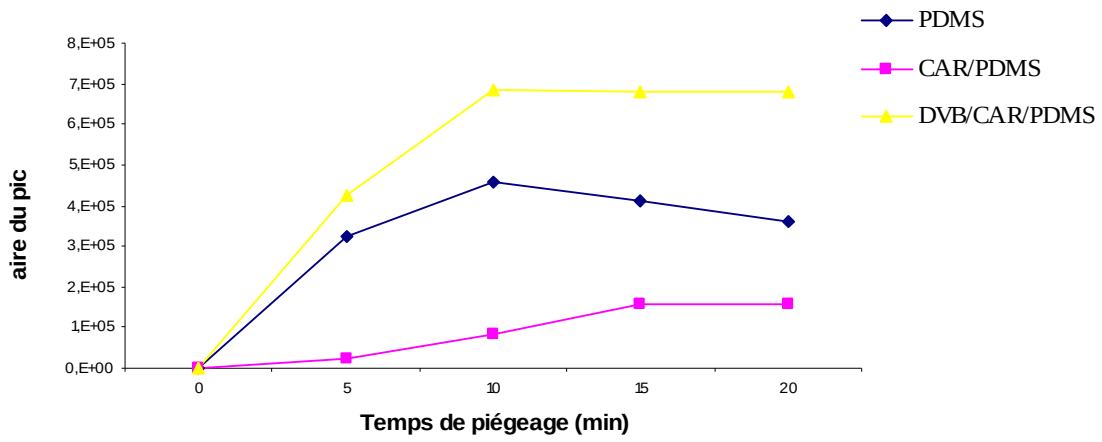


Figure 58: Aire du pic de la pulégone en fonction du temps de piégeage et de la nature de la fibre SPME à 20 °C

En effet, la quantité du composé cible adsorbée dépend fortement des conditions d'extraction : température, temps d'incubation et d'extraction, agitation, volume de l'échantillon et de la phase gazeuse. Elle dépend également de la nature, de l'usure de la phase d'extraction (perte de sa capacité d'adsorption ou de sorption au cours du temps) et de la nature des autres constituants caractérisant le mélange

Différents types de fibres SPME (PDMS, Carb/PDMS et DVB/Carb/PDMS) ont été testéEs, afin d'optimiser les conditions d'extraction des composés organiques volatils émis par l'écrasement des feuilles de *Calamintha grandiflora* dans le système CFD.

II. Analyses chimiques et sensorielles des huiles essentielles et des COVs

Une fois l'extrait le plus représentatif obtenu, l'analyse permet d'identifier et de quantifier les produits qui le composent.

II.1. Analyse par chromatographie phase gazeuse

La séparation et l'identification des constituants volatils d'un extrait présentent bien moins d'alternatives que sa préparation. En effet, la CPG est la méthode de référence pour l'analyse des huiles essentielles et des COVs (Lehotay *et al.*, 2002) ; elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées (Arpino *et al.*, 1995). La

diversité des méthodes d'injection, de détection et le grand choix de colonnes permettent des analyses de plus en plus efficaces. Comme toutes les méthodes chromatographiques, la CPG repose sur le principe de migration différentielle des constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire. La CPG est basée sur la partition des composés injectés entre une phase stationnaire (liquide ou solide) et une phase mobile gazeuse. Durant leur passage à travers la colonne, les composés analysés se répartissent entre la phase mobile et la phase gazeuse suivant les règles physico-chimiques de partition (gaz-liquide) ou d'adsorption (gaz-solide). Chaque constituant du mélange analysé parcourt la colonne chromatographique et en sort à des temps différents (temps de rétention) sur la base de ses propriétés physico-chimiques propres, de la nature de la phase stationnaire, de la longueur, du diamètre interne de la colonne, mais aussi de la programmation de température du four et du débit du gaz vecteur. Le calcul d'indice de rétention permet de s'affranchir de la variabilité des temps de rétention avec les conditions opératoires (Castello, 1999). Pour un composé donné, il ne dépend que de la phase stationnaire et non des conditions chromatographiques, ce qui a permis la publication de banques de données d'indices de rétention relatifs à différentes phases stationnaires(Kovats, 1958; Jennings, 1980; Davies, 1990; Adams, 2001). Le calcul s'appuie sur le principe suivant : lorsqu'on injecte un mélange de composés appartenant à une série homologue de *n*-alcanes ou d'esters méthyliques linéaires, les temps de rétention croissent linéairement avec le nombre d'atomes de carbone (*n*) (alcanes ou esters) correspondants. Initialement développé par Kovats en mode isotherme(Kovats, 1958), le calcul des indices de rétention a évolué pour tenir compte de la programmation de température. Ainsi, l'équation linéaire développée par Vandendool et Kratz(Vandendool *et al.*, 1962) est utilisée pour calculer les indices de rétention pour chaque composé analysés en programmation de température. La formule est basée sur les temps de rétention de deux alcanes (à n et $n + 1$ atome de carbone) qui encadrent le composé inconnu (X) sur le chromatogramme :

$$IRX = 100n + 100[(tR(X) - tR(n)) / (tR(n+1) - tR(n))]$$

II.1.1. Détecteurs

Le détecteur FID s'est imposé comme un détecteur universel de choix en CPG. En effet, il possède de nombreux avantages. Il est très sensible à presque tous les composés organiques, sa réponse est linéaire en concentration et il montre une bonne stabilité de la ligne de base, son temps de réponse est rapide et il est simple d'usage et d'entretien.

II.2. Les méthodes couplées

II.2.1. Chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse

La simplicité du couplage entre ces deux techniques, les progrès accomplis dans le traitement en temps réel du signal, la constitution de banques de données de spectres de masse et le développement des algorithmes de comparaison entre le spectre d'un composé inconnu avec ceux répertoriés dans la banque sont à l'origine de la généralisation de l'usage de la CPG/SM dans les laboratoires d'analyse des composés aromatiques. La CPG sur colonne capillaire constitue une excellente méthode d'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse. Ainsi, la colonne capillaire est directement couplée à la source d'ions permettant l'ionisation en impact électronique.

Le couplage CPG/SM impose peu de contraintes techniques. Seul l'hélium peut être utilisé comme gaz vecteur car les ions He^+ formés lors de l'ionisation électronique n'interfèrent pas avec ceux de l'analyte en raison de leur faible rapport *m*/*z*. Tous les types d'injecteurs sont utilisables et les appareils actuels utilisent exclusivement des colonnes capillaires.

À la sortie du chromatographe, la colonne capillaire entre dans le spectromètre de masse, *via* une ligne de transfert qui est simplement un cylindre chauffé à une température supérieure à la température finale programmée pour l'analyse chromatographique. Le couplage avec un analyseur quadripolaire nécessite un vide de 10^{-4} à 10^{-5} mbar. Ce vide est nécessaire à l'élimination des molécules résiduelles comme l'azote, l'eau, et les composés élués qui n'auraient pas été ionisés et qui peuvent alors polluer le spectromètre de masse et gêner l'analyse.

II.2.2. Protocoles des analyses quantitatives et qualitatives des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été analysées au moyen d'un CPG-DIF-SM (Perkin Elmer Clarus MS 500) équipé d'une colonne capillaire DB5-MS (30m x 0,25 mm D.I, 0,25 µm épaisseur de film). La Quantité injectée est : 1µL HE 10%v/v (Hexane). Le débit d'hélium dans la colonne était de 1,3 mL/min.

La Programmation en température du four : 30°C durant 5 minutes, puis 5°C/min jusqu'à 250°C et 10 minutes à 250°C. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur DIF est de 250°C. On a appliqué un split de 50 : 1.

Les spectres de masse sont enregistrés en mode d'impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV.

L'identification des composés est basée sur les comparaisons des indices de rétention expérimentaux (IR) et bibliographiques (Kondjoyan *et al.*, 1996; Adams, 2001) et des

spectres de masse expérimentaux et contenus dans les bases de données NIST 2005 et WILEY (275L).

II.2.3. Chromatographie en phase gazeuse / olfactométrie (CPG/O)

Les huiles essentielles obtenues renferment très souvent des centaines de composés volatils. Le couplage CPG/O combine la séparation des composés volatils par CPG avec l'évaluation olfactive. En sortie de colonne, une partie des composés élués est envoyée vers un cône de détection nasale qui permet l'évaluation olfactive en même temps que l'enregistrement du chromatogramme.

Tous les types de détecteurs peuvent être utilisés en parallèle au port d'olfaction, mais ce sont les détecteurs FID ou de masse qui sont les plus fréquemment utilisés.

Afin d'avoir un langage commun, il est préférable d'utiliser un vocabulaire normalisé pour décrire les odeurs. Le «Champs des odeurs®» introduit par J. N. Jaubert (Jaubert *et al.*, 1987; Jaubert *et al.*, 1987) trouve son intérêt dans la formation des opérateurs et est bien adapté aux études CPG/O.

Les huiles essentielles obtenues ont été injectées (0.05µl) sur un CPG-SM (Agilent 5973 Network) équipé d'une colonne DB5 (0.25mm x 30m, 0.25µm), pour laquelle la programmation de température est la suivante : 30°C durant 5 minutes, un gradient de 5°C/min jusqu'au 250°C et 10 minutes d'isotherme à 250°C.

Les analyses ont été réalisées en triplicata, par l'intermédiaire de deux expérimentateurs (J): n = 2J x 1,5 répétitions ou n= 2J x 2 répétitions selon les cas.

II.3. Etablissement des pyramides olfactives

Elle consiste à repérer les différentes notes dominantes dans l'huile essentielle comme on le ferait pour un parfum. On suit l'évolution de l'odeur des huiles essentielles sur une mouillette afin de déterminer les notes de tête, notes de cœur et notes de fond. Une dilution de 1/10 dans l'éthanol anhydre pour chaque huile essentielle a été effectuée. On trempe des mouillettes dans chaque solution d'huile essentielle diluée, et on suit l'évolution des notes en fonction du temps.

L'odeur évolue dans le temps et ne laisse pas les mêmes traces à partir du moment où on commence à sentir les mouillettes et quelques heures après. Suivant leur composition, certains effluves sont plus tenaces et d'autres moins, les plus résistants persistent et les plus éphémères s'évaporent et disparaissent. Les différents éléments constitutifs d'une huile essentielle sont regroupés dans les trois familles de notes olfactives.

Durée approximative de persistance des notes

- Notes de tête : de 0 à 2h00
- Notes de cœur : de 2h00 à 4h00
- Notes de fond : de 4h00 jusqu'à 24h00

Notes de Tête :

C'est la note que l'on distingue en premier. Les éléments constitutifs sont plutôt éphémères et légers. L'odeur persistera jusqu'à environ 2 heures. Ce sont les odeurs les plus perceptibles mais les plus volatiles. Elles sont généralement fraîches et vives et donnent la première impression olfactive d'une composition aromatique.

Notes de Cœur :

Quand la note de tête commence à s'atténuer, la note de cœur prend sa place. Elle peut durer entre 2 h et 4h. La note de cœur est moins intense mais tient plus longtemps. C'est cette note qui constitue le « cœur » du parfum, comme son nom l'indique et qui donne le thème principal du mélange aromatique.

Notes de Fond :

C'est la note qui fait durer la composition aromatique dans le temps, qui laisse des souvenirs de celle-ci. Les notes de Tête et de Cœur s'appuient sur cette note de Fond qui peut durer jusqu'à 24 h, voir plusieurs jours. Les ingrédients de cette note sont très tenaces.

III. Extraction des antioxydants à partir des résidus d'hydrodistillation

III.1. Principe d'extraction par soxhlet

Un extracteur Soxhlet est une pièce de verrerie utilisée en chimie analytique et en chimie organique qui permet de faire l'extraction continue par solvant d'un solide (figure 59). Il se compose d'un corps en verre (4) dans lequel est placé une cartouche en papier filtre épais (5), d'un tube siphon (6/7) et d'un tube d'adduction (3). Le corps de l'extracteur est placé sur un ballon (2) contenant le solvant d'extraction. Les résidus à extraire sont placés dans l'extracteur surmonté d'un réfrigérant (9).

Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvants passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'adducteur, faisant ainsi macérer les résidus dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites. Le solvant contenu dans le ballon s'enrichit progressivement en composés solubles. La taille du corps en verre étant limitée, il peut être nécessaire de réaliser

plusieurs extractions successives pour récupérer une quantité suffisante d'extraits. L'extraction à chaud peut dégrader certaines substances chimiques.

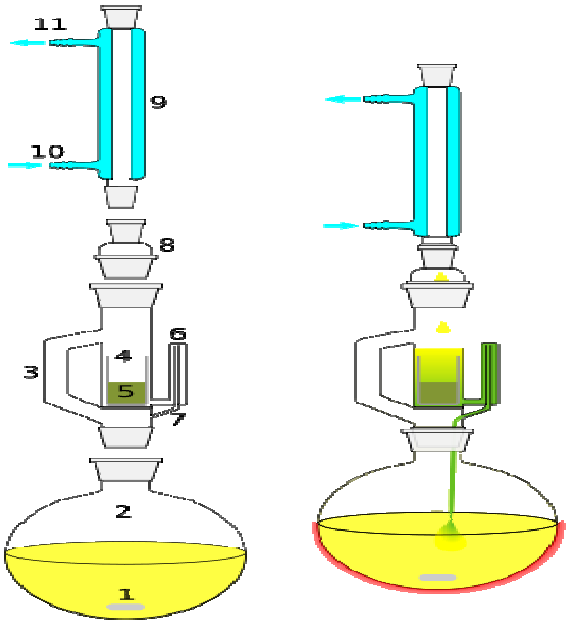


Figure 59: Soxhlet

III.2. Extraction des antioxydants

Suite à l'hydrodistillation des plantes, les résidus d'hydrodistillation sont récupérés du ballon filtré afin d'enlever l'eau, et séchés pendant 4 heures dans une étuve à 80°C. Environ 30 g de résidus d'hydrodistillation séchés de chaque plante sont introduits dans le corps en verre, où du coton a été introduit en bas du corps afin d'éviter le passage de la matière végétale dans le ballon contenant 100 mL du solvant organique. Le système est chauffé à reflux pendant 6 heures, jusqu'à la décoloration de la matière végétale.

Pour chaque plante, trois différents solvants ont été utilisés pour l'extraction (méthanol, éthanol et acétone), les extractions ont été faites en triplicata.

IV. Evaluation de l'activité antioxydante des résidus d'hydrodistillation par la méthode de DPPH

IV.1. Préparation des échantillons à doser

Suite à l'extraction soxhlet des résidus d'hydrodistillation, le solvant organique de couleur vert foncé enrichi en antioxydants est récupéré, et concentré par évaporation sous vide pendant une demi-heure. Un liquide visqueux est obtenu puis concentré à nouveau pendant

une heure sous azote liquide jusqu'à évaporation totale du solvant. Un extrait visqueux de couleur verte très foncée est alors obtenu.

20 mg de cette matière visqueuse sont dissouts dans 500µL de solvant organique (méthanol, éthanol ou acétone, suivant le solvant avec lequel l'extraction a été faite), l'ensemble est mis dans un vials puis soumis aux ultrasons pendant 15 minutes afin de favoriser la dissolution totale de la matière visqueuse.

On prépare 6 échantillons de concentrations décroissantes à partir de la solution mère obtenue après dissolution complète de l'extrait. La couleur des solutions préparées diminue progressivement jusqu'à obtention d'une solution transparente.

IV.2. Dosage spectrophptométrique par la méthode du DPPH des solutions issues des résidus d'hydrodistillation

La méthode de DPPH, consiste à utiliser un radical stable, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH˙) dans du méthanol (la plupart des cas). La réduction du DPPH˙ est contrôlée en mesurant l'absorbance de la solution à une longueur d'onde caractéristique (515 nm). A cette longueur d'onde le radical absorbe, mais après sa réduction par l'antioxydant (AH) ou un autre radical, l'absorption diminue(Dvaranauskaite *et al.*, 2008).

On prépare une solution pour laquelle on dissout 1,2 mg dans 50 mL de méthanol, par suite l'absorbance de la solution de couleur rouge violette est de 0,8 à λ= 515 nm.

Les dosages sont effectués dans des microcuvettes en quartz (OS), où on mélange 2 ml de la solution de DPPH avec 50µL de la solution à doser. L'absorbance est ensuite mesurée après 30 minutes. Les mesures ont été faites en triplicata.

IV.2.1. Calcul du pourcentage d'inhibition (%I) et de la concentration inhibitrice minimale (IC_{50})

I est calculé suivant la formule suivante :

$$\% I = \frac{ABS_{30} - ABS_0}{ABS_{30}}$$

Où :

ABS_{30} : absorbance à t=30 min

ABS_0 : absorbance à t= 0 min

La concentration inhibitrice minimale (IC_{50}) est estimée par extrapolation à I=50% en traçant la courbe % I = f ([concentration]), (voir figure 60).

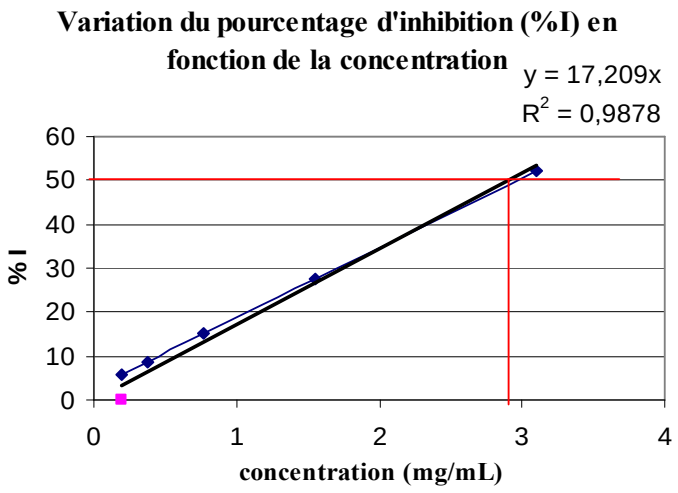


Figure 60: estimation de l'IC_{50}

V. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles

V.1. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles par la méthode Oxipress

La méthode Oxipress est très avantageuse car elle ne nécessite pas de phase de prétraitement d'échantillon. La capacité de l'antioxydant à protéger l'aliment ou la matière lipidique est mesurée. Les résultats sont reproductibles et facilement interprétables et comparables grâce à des paramètres physiques calculés via cette méthode.

L'huile de tournesol a été utilisée comme vecteur, ou comme matrice lipidique. Des modèles d'huiles infusées ont été préparés, dans lesquels l'huile essentielle est mélangée en proportions massiques différentes (0,05, 0,1 et 0,2%) avec de l'huile de tournesol en appliquant 5 minutes d'ultrasons. L'appareil Oxipress (Mikrolab Aarhus) est équipé de deux cellules de mesure en acier (figure 61). L'échantillon (huile infusée) est dosé à 0,001g prés directement dans un tube réacteur en pyrex. Ce dernier est placé dans une cellule en acier, dans laquelle, on applique un lavage à l'oxygène, deux à trois fois, avant de serrer la cellule et d'appliquer une pression en O_2 constante de 5 bars. Ensuite l'ensemble, cellule et réacteur est placé dans un thermostat spécifique réglé à 110°C où le changement de la pression en fonction du temps est enregistré.

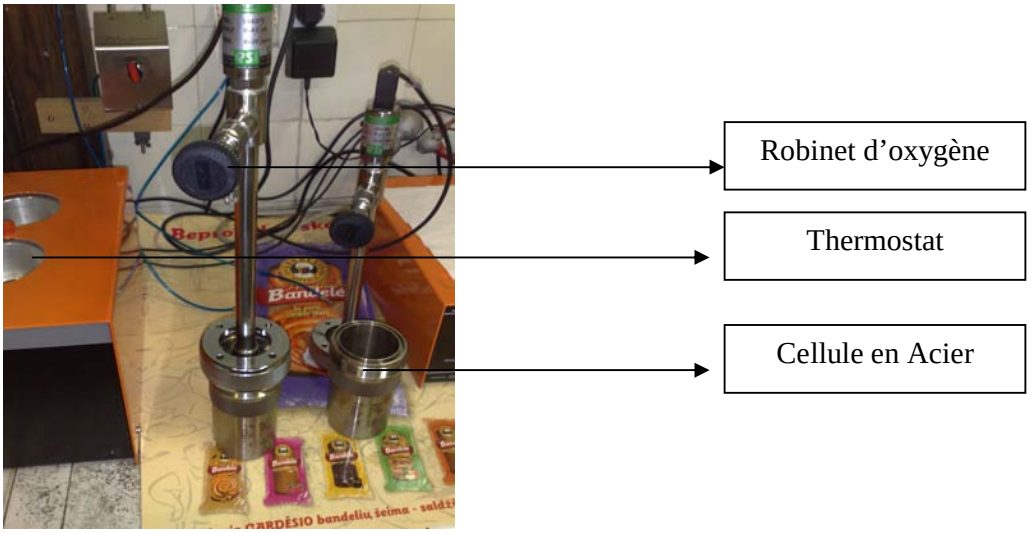


Figure 61: système Oxipress

La période d'induction est calculée en fonction du temps nécessaire pour que la pression commence à chuter brusquement. Elle est mesurée via le point de rencontre des deux tangentes de la première et la deuxième partie de la courbe sur la figure 62.

Pour l'analyse des huiles comestibles, les conditions optimums sont les suivants : 5,0g d'échantillon, soumis à une pression de 0,5 MPa et une température de 110°C.

Les analyses ont été exécutées en triplicata. L'écart-type dans tous les cas était compris contre 0,1 et 1 % en moyenne. Un blanc (huile de tournesol) a été préparé, dans une cellule adjacente dans les mêmes conditions, sans ajouter d'additif.

Les changements de la période d'induction (PI) en fonction de chaque huile essentielle aux 3 concentrations différentes ont été déterminés. Le facteur de protection (PF) (Bandoniene *et al.*, 2000) de l'huile de tournesol ainsi que les activités antioxydantes (AA) des huiles essentielles ont été calculés par l'intermédiaire des formules suivantes :

$$PF = PI_X/PI_K;$$

$$AA = PI_X - PI_K / PI_{BHT} - PI_K ;$$

Où: PI_X: période d'induction de l'échantillon en présence de l'additif (huile essentielle), h;

PI_K: période d'induction de l'échantillon en absence de l'additif, h;

PI_{BHT}: période d'induction de l'échantillon en présence du BHT, h ;

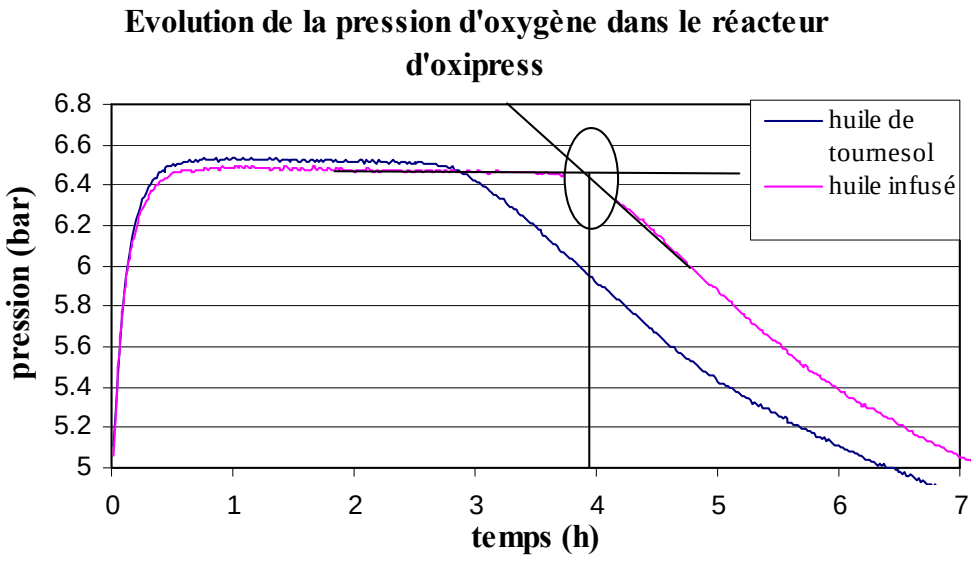


Figure 62: Cinétique de l'oxydation de l'huile de tournesol en présence ou pas d'un additif, à 110°C et 5bars

V.2. Evaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle par des méthodes spectroscopiques (diènes et triènes conjugués)

Des modèles d'huiles infusées ont été préparés, en mélangeant les huiles essentielles dans de l'huile de tournesol à des concentrations massiques différentes (0,05 et 0,1%) en appliquant 5 minutes d'ultrasons pour chaque cas.

Les huiles infusées sont placées dans des cuves hermétiquement fermées, qu'on introduit dans une étuve à 80°C, pour un dosage spectrométrique ultérieur.

A chaque mesure, on prélève 0,05 g de chaque huile infusée, cette dernière sera diluée et mélangée avec l'hexane dans une fiole jaugée de 25 mL. Les solutions préparées sont mesurées dans des micro-cuvettes de quartz à l'aide d'un spectrophotomètre (Varian Cary 219), en utilisant l'hexane comme blanc. L'absorbance est mesurée à une longeur d'onde de 232 nm (diènes conjugués) et 268 nm (triènes conjugués). L'absorbance (E) est calculée pour 1% de solution suivant la formule suivante (Miliauskas, 2006):

$$E_{1\%} = A_{\lambda} \times C^{-1} \times d^{-1}$$

Où : A_{λ} : absorbance mesurée à λ

C : concentration de l'échantillon g/100mL

d : diamètre de la microcuvette, 1cm

VI. Evaluation de l'activité antimicrobienne

VI.1. Evaluation de l'activité bactéricide par la méthode de diffusion sur Agar

Neuf bactéries ont été utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne via la méthode d'Agar(Sipailiene *et al.*, 2006). Des bactéries à Gram positif, *Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus,* et à Gram négatif pathogènes, *Salmonella typhymurium, Salmonella typhymurium D338, Salmonella enteritidis, Salmonella agona* et *Escherichia coli*. Les bactéries ont été ensemencées dans de l'Agar (CM 325 Oxiod) et laissées pendant 24 heures à 37°C. Après culture, un inoculum des cellules bactériennes est introduit dans un bouillon nutritif et mixé via un minishaker MS 1 (Wilmington, USA). Les suspensions cellulaires ont été ajustées suivant la norme McFarland N° 0.5 Standard. Les suspensions bactériennes dissoutes dans 2 mL de liquide nutritif sont mélangées avec l'Agar. 10 ml de la solution d'Agar sont déposés dans des boites de pétri (90 mm). Une fois l'Agar gélifié, des puits de 8 mm sont crées dans lesquels 10µL de solution méthanolique d'huile essentielle à deux différentes concentrations massiques (0,5 et 1%) sont introduites via des micropipettes jaugées. Certains puits ont été remplis par du méthanol afin de connaître l'effet du solvant. Après une incubation d'une nuit à 37°C, les diamètres d'inhibition sont mesurés par l'intermédiaire d'un pied à coulisse à 0,1 mm prés. Les essais ont été effectués en triplicata pour chaque huile essentielle et pour chaque espèce bactérienne.L'antibiotique (ceftazidine/clavulanic acid, 30/10µg (*BBL, CAZ/CLA, 231753*) a été utilisé comme référence. Un disque d'antibiotique a été déposé sur chaque boite de pétrie.

VI.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de micro dilution

Deux bactéries à Gram positif, *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus* et une à Gram négatif, *Salmonella typhymurium* ont été utilisées dans cette méthode. L'activité antimicrobienne a été déterminée par des essais de micro-titrage sur des plaques de microtitration (Holo *et al.*, 1991). Chaque puits de plaque de microtitration (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne) contient 50 µL d'une solution éthanolique d'huile essentielle et 150µL des solutions diluées de bactéries cultivées pendant 12 heures. Les plaques ont été incubées à 37°C pour 24 heures. La croissance microbienne a été déterminée par absorbance à 620 nm en utilisant un lecteur de microplaque (Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific, Loughborough, UK). La concentration minimale inhibitrice (CMI) représente la concentration de l'huile essentielle nécessaire pour inhiber 50% de la croissance des bactéries

Références Bibliographiques

Acquaronne, L., Corticchiato, M., Ramazotti, J. et Raoul, J.L. (**1998)** "Growing of *Monarda fistulosa* in France and getting of essential oils by hydrodiffusion." *Rivista Italiana* 761-765.

Adams, R.P. (**2001)** "Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy." *Allured Publishing Corp., Carol Stream (III, USA.)*

AFSSAPS. (**2009)** "Pharmacopée Française." *Ed. St. Denis France*.

Altarejos, J., Salido, S., Perez-Bonilla, M., Linares-Palomino, P.J., Van Beek, T.A., Nogueras, M. et Sanchez, A. (**2005)** "Preliminary assay on the radical scavenging activity of the olive wood extracts." *Fetoterapia, 76*: 348-351.

Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S. et Robards, K. (**2002)** "Methods for testing antioxidant activity." *Analyst, 127*: 183-198.

Arpino, P., Prévôt, A., Serpinet, J., Tranchant, J., Vergnol, A. et Witier, P. (**1995)** "Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse." *Ed. Masson, Paris*.

Bandoniene, D., Pukalskas, A., Venskutonis, P.R. et Gruzdiene, D. (**2000)** "Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil." *Food Research International, 33*: 785-791.

Barlow, S.M. (**1990)** "Toxicological aspects of antioxidants used as food additives." *Ed. Hudson, B.J.F, Food Antioxidants*: 253-307.

Baser, K.H.C., Demirci, B., Tabanca, N., Ozek, T. et Goren, N. (**2001)** "Composition of the essential oils of *Tanacetum armenum* (DC.) Schultz Bip., *T. balsamita* L., *T. chiliophyllum* (Fisch. & mey.) Schultz bip. var. chiliophyllum and T. haradjani (Rech. fil.) grierson and the enantiomeric distribution of camphor and carvone." *Flavour and Fragrance Journal, 16*: 195-200.

Baser, K.H.C. et Ozek, T. (**1993)** "Composition of the Essential Oil of *Calamintha grandiflora*." *Planta Medica, 59*: 390.

Beens, J. et Brinkman, U.A.T. (**2005)** "Comprehensive two-dimensional gas chromatography– a powerful and versatile technique." *Analyst 130*: 123-127.

Bermond, P. (**1990)** "Biological effects of food antioxidants." *Ed. Hudson, B.J.F, Food Antioxidants*: 193-251.

Bertrand, B. (**2003)** "L'herbier oublié." *Ed. Plume de carotte*.

Bertrand, B. (**2004)** "Glaner dans les Pyrénées." *Ed. Tétras*.

Bestmann, H.J., Classen, B., Kobold, U., Vostrowsky, O., Klingauf, F., Strobel, H. et Knobloch, K. (**1984)** "Herbal insecticides. II. Essential oil from leaves of

Chrysanthemum balsamita L.. Insecticidal activity and composition." *Zeitschrift für Naturforschung, C: Journal of Biosciences, 39*: 543-547.

Bestmann, H.J., Classen, B., Vostrowsky, O., Klingauf, F. et Stein, U. (**1988)** "Plant insecticides. VIII: Synergistic activity of (-)-carvone and pyrethrine I in the essential oil of *Chrysanthemum balsamita* L." *Journal of Applied Entomology, 106*: 144-9.

Bley, L.F. (**1928)** *Trommsdorf's Newes Jour. d. Pharm, 16*: 94-120.

Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H. et Berest, C. (**1998)** "The antioxidant activity of various phenolic compounds measured by an accelerated test based on citronellal oxidation." *Sci.Alim, 18*: 13-23.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berest, C. (**1995)** "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." *Lebensm-Wiss-Technol*: 25-30.

Branen, A.L. (**1975)** "Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene." *Journal of the American Oil Chemists' Society, 52*: 59-63.

Burgot, G. et Pellerin, F. (**2003)** "Microextraction en phase solide (SPME)." *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation, P2, n°P1430*: 1430.1-1430.20.

Bylaite, E., Venskutonis, P.R., Roozen, J.P. et Posthumus, M.A. (**2000)** "Composition of essential oil of costmary [*Balsamita major* (L.) Desf.] at different growth phases." *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48*: 2409-2414.

Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A. et Akpulat, H.A. (**2003)** "Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. millefolium Afan. (Asteraceae)." *Journal of Ethnopharmacology, 87*: 215-220.

Cao, G. et Prior, R.L. (**1998)** "Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum." *Clin.Chem, 44*: 1309-1315.

Carnat, A.P. et Lamaison, J.L. (**1991)** "Composition of Leaf and Flower Essential Oil from *Monarda didyma* L. cultivated in France." *Flavour and Fragrance Journal, 6*: 79-80.

Castello, G. (**1999)** "Retention index systems: alternatives to n-alkanes as calibration standards." *Journal of Chromatography A, 842*: 51-64.

Cavar, S., Maksimovic, M., Solic, M., Jerkovic-Mujkic, A. et Besta, R. (**2008)** "Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two Satureja essential oils " *Food Chemistry, 111*: 648-653.

Chaintreau, A. (**2001)** "Simultaneous distillation-extraction: from birth to maturity–review." *Flavour and Fragrance Journal, 16*: 136-148.

Chen, J.H. et Ho, C.T. (**1997)** "Antioxydant Activity of caffeic acid and its related hydroxcinnamic acid compounds." *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45*: 2374-2378.

Cisowski, W. (**1985)** "Flavonoid compounds in *Myrrhis odorata* (L.) Scop." *Herba Polonica, 31*: 13-19.

Cuvelier, M., Richard, H. et Berset, C. (**1992)** "Comparaison of the antioxydant activity of some acid-phenols: structure-activity relationship." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry 56*: 324-325.

Da Costa, N.C. et Eri, S. (**2005)** "Identification of Aroma Chemical." *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*: 12-31.

Dalluge, J., Beens, J. et Brinkman, U.A.T. (**2003)** "Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool." *Journal of chromatography A, 1000*: 69-108.

Dalton, D.A. (**1995)** "Antioxidant defences of plants and fungi." *Ed. Oxidative Stress and Antioxidant Defences in Biology*: 298-355.

Dapkevicius, A. (**1998)** "Antioxidant activity of extract obtained by different isolation procedures from some Aromatic herbs grown in Lithuania." *Journal of science of food and agriculture, 77*: 140-146.

Davies, N.W. (**1990)** "Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases." *Journal of Chromatography A, 503*: 1-24.

De Gubernatis, A. (**1976)** "La Mythologie des plantes, Tome Premier, Botanique Générale." *Ed. Arche Milano*.

De Gubernatis, A. (**1976)** "La Mythologie des plantes, Tome Second, Botanique spéciale." *Ed. Arche Milano*.

Decker, E.A. (**1998)** "Antioxydant mechanisms." *Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and biotechnology*: 397-423.

Dugo, G., Tranchida, P., Cotroneo, A., Dugo, P., Bonaccorsi, I., Marriott, P., Shellie, R. et Mondello, L. (**2005)** "Advanced and innovative chromatographic techniques for the study of citrus essential oils." *Flavour and Fragrance Journal, 20*: 249-264.

Dunn, M., Shellie, R., Morrison, P. et Marriott, P. (**2004)** "Rapid sequential heart-cut multidimensional gas chromatographicanalysis." *Journal of chromatography A, 1056*: 163-169.

Dvaranauskaite, A., Venskutonis, P.R., Raynaud, C., Talou, T., Viskelis, P. et Dambrauskiene, E. (**2008)** "Characterization of Steam Volatiles in the Essential Oil of Black Currant Buds and the Antioxidant Properties of Different Bud Extracts." *journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*: 3279-3286.

Economou, K.D., Oreopoulou, V. et Thomopoulous, C.D. (**1991)** "Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiatae." *Journal of the American Oil Chemists' Society, 68*: 109-111.

EL Kalamouni, C., Raynaud, C. et Talou, T. (**2010)** "Design of an Artificial Crushing Finger Device for Rapid Evaluation of Essential Oils from Aromatic plants leaves." *Expression of Multidisciplinary Flavour Science, Ed. Imre Blank, Matthias Wüst, Chahan Yeretzian*: 525-528.

Essawi, T. et Srour, M. (**2000)** "Screening of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity." *Journal Of Ethnopharmacology, 70*: 343-349.

Evans, R.J. et Reynhout, G.S. (**1992)** "Alternates to synthetic antioxidants." *Food Science and human Nutrition, 29*: 27-42.

Finely, J.W. et Otterburn, M.S. (**1993)** "The consequence of free radical in foods. in Antioxydants. chemical, physiological, nutitional and toxicological aspects." *Toxicology and industrial Health*: 77-91.

Fleming Jones, M.E. et Smith, R.E. (**2003)** "Volatile Organic Compounds in Foods: A Five Years Study." *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*: 8120-8127.

Frankel, E.N. (**1996)** "Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality." *Food Chemistry, 57*: 51-55.

Frankel, E.N. (**1998)** "Lipid oxidation." *The oily Press, 1st edition.*

Frankel, E.N. et Meyer, A.S. (**2000)** "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants." *Journal of science of food and agriculture, 80*: 1925-1941.

Fraternale, D., Giamperi, L., Bucchini, A. et Ricci, D. (**2006)** "Chemical Composition, Antifungal and In Vitro Antioxidant Properties of *Monarda didyma* L. Essential Oil." *Journal of Essential Oil Research, 18*: 581-585.

Freire, R., Morais, S., Catunda-Junior, F. et Pinheiro, D. (**2005)** "Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds." *Bioorganic and medicinal chemistry 13*: 4353-4358.

Friedman, M., Henika, P.R. et 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, 64*: 1445-1560.

Fukumoto, L.R. et Mazza, G. (**2000)** "Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds." *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48*: 3597-3604.

Gallori, S., Flamini, G., Bilia, A.R., Morelli, I., Landini, A. et Vincieri, F.F. (**2001)** "Chemical Composition of Some Traditional Herbal Drug Preparations: Essential Oil and Aromatic Water of Costmary (*Balsamita suaveolens* Pers.)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49*: 5907-5910.

Garcia-Plazaola, J.I. et Becerril, J.M. (**1999)** "A rapid HPLC method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols." *Phytochemical Analysis, 10*: 307-313.

Garnero, J. (**1996)** "Huiles essentielles." *Techniques de l'ingénieur, 45*: 10.

Gebicki, J.M. et Guille, J. (**1989)** "Spectophotometric and High-performance Chromatographic assays of hydroperoxides by the iodometric technique." *Anal. BioChem, 176*: 360-364.

Goeckeritz, D. (**1968)** "Essential oil of *Chrysanthemum balsamita*." *Pharmazie, 23*: 515-518.

Grualbo, R.P., Sesé, J.A. et Villar, L. (**1993)** "Nouvelle localité de *Calamintha grandiflora* (L.) Moench (Labiatae) dans les Pyrénées espagnoles." *Le monde des plantes, 447*: 7-10.

Hachey, J., Collin, M., Gagnon, S.S., Simard, S., Dufour, S. et France-Ida, J. (**1990)** "Extraction and GC/MS Analysis of the essential oil of *Achillea millefolium* L. Complex (Compositae)." *Journal of Essential Oil Research, 2*: 317-326.

Hajji, S., Beliveau, J. et Simon, D. (**1985)** "Comparative study of an essential oil obtained according to two different extraction procedures: steam distillation and hydrodiffusion." *Actes - Colloq. Int. Plant. Aromat. Med. Maroc*: 229-230.

Halliwell, B. (**1995)** "Antioxydant characterisation. ." *Methodology and mechanism, 49*: 1341-1348.

Hanaoka, K., Sieffermann, J.-M. et Giampaoli, P. (**2000)** "Effects of the sniffing port air makeup in gas chromatography-olfactometry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48*: 2368-2371.

Hanasaki, Y., Ogawa, S. et Fukui, S. (**1994)** "The correlation between active oxygen scavenging and oxidative effects of flavonoids." *Free.Rad.Biol.Med, 16*: 845-850.

Hao, Y.Y., Brackett, R.E. et Doyle, M.P. (**1998)** "Efficacy of plant extracts in inhibiting Aeromonas hydrophila and Listeria monocytogenes in refrigerated, cooked poultry." *Food Microbiology*, *15*: 367-378.

Heath, H.B. (**1981)** "Source book of flavours." *Ed. Springer, 1st edition*.

Heilman, J., Merfort, I. et Weiss, M. (**1995)** "Radical Scavenging activity of different 3',4' dihydroxyflavonols and 1,5-dicaffeoylquinic acid studied by inhibition of chemiluminescence." *Planta Medica*, *61*: 435-438.

Heinrich, G., Schultze, W., Pfab, I. et Boettger, M. (**1983)** "The site of essential oil biosynthesis in *Poncirus trifoliata* and *Monarda fistulosa*." *Physiologie Vegetale*, *21*: 257-268.

Hiramatsu, M., Yoshikawa, T. et Inoue, M. (**1994)** "Food and free radicals." *Proceedings of the first symposium on Food and Free radicals, Yamagata, Japan*.

Hoffman, F. (**1935)** "De Millefolio, germanice Schaaf-garden." *American Journal of Pharmacy*, *107*: 33.

Holo, H., Nilssen, O. et Nes, I.F. (**1991)** "Lactococcin A, a New Bacteriocin from Lactococcus lactis subsp. cremoris: Isolation and Characterization of the Protein and Its Gene." *Journal of Bacteriology*, *173*: 3879-3887.

Huang, D., Ou, B. et Prior, R.L. (**2005)** "The chemistry behind antioxidant capacity assays." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*: 1841-1856.

Hussain, R.A., Poveda, L.J., Pezzuto, J.M., Soejarto, D.D. et Kinghorn, A.D. (**1990)** "Sweetening agents of plant origin: phenylpropanoid constituents of seven sweet-tasting plants." *Economic Botany*, *44*: 174-182.

Ivancheva, S. et Tsvetkova, R. (**2003)** "Distribution of flavonoid aglycones in tribe Anthemideae (Asteraceae)." *Advances in Phytochemistry*: 85-95.

Jacobson, G.A. (**1993)** "Evaluation of oxidized lipids in food." *Inform*, *4*: 811-819.

Jaimand, K. et Rezaee, M.B. (**2005)** "Chemical constituents of essential oils from *Tanacetum balsamita* L. ssp. balsamitoides (Schultz-Bip.) Grierson. from Iran." *Journal of Essential Oil Research*, *17*: 565-566.

Jaubert, J.N., Gordon, G. et Doré, J.C. (**1987)** "Une organisation du champ des odeurs. Deuxième partie : modèle descriptif de l'organisation de l'espace odorant." *Parfums, Cosmétiques et Arômes*, *78*: 71-82.

Jaubert, J.N., Gordon, G. et Doré, J.C. (**1987)** "Une organisation du champ des odeurs. Première partie : recherche de critères objectifs. ." *Parfums, Cosmétiques et Arômes*, *77*: 53-56.

Jennings, W., Shibamoto, T. (**1980)** "Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography." *Academic Press, New York.*

Kalinkina, G.I., Dembitsky, A.D. et Berezovskaya, T.P. (**2000)** "Chemical composition of essential oils of Achillea species from Siberia." *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*: 13-18.

Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B. et Kinsella, J.E. (**1994)** "Natural Antioxidants in grapes and wines." *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42*: 64-69.

Kaufmann, M. et Wink, M. (**1994)** "Molecular systematics of the Nepetoideae (family Labiatae): phylogenetic implications from rbcL gene sequences." *A Journal of Biosciences 49*: 635-645.

Kim, M.H., Chung, W.T., Kim, Y.K., Lee, J.H., Lee, H.Y., Hwang, B., Park, Y.S., Hwang, S.J. et Kim, J.H. (**2001)** "The effect of the oil of Agastache rugosa O. Kuntze and three of its components on human cancer cell lines." *Journal of Essential Oil Research, 13*: 214-218.

Kitic, D., Stojanovic, G., Palic, R. et Randjelovic, V. (**2005)** "Chemical composition and microbial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. nepeta var. subisodonda (Borb.) Hayek from Serbia." *Journal of Essential Oil Research, 17*: 701-703.

Koedam, A. (**1982)** "The influence of some distillation conditions on essential oil composition." *World Crops: Production, Utilization, Description, 7*: 229-236.

Koedam, A., Scheffer, J.J.C. et Svendsen, A.B. (**1980)** "Comparison of isolation procedures for essential oils. VI. Rosemary and sage." *Riechstoffe, Aromen, Kosmetica, 30*: 271-276.

Kolb, B. (**1999)** "Headspace sampling with capillary columns." *Journal of chromatography A, 842*: 163-205.

Kondjoyan, N. et Bergdague, J.-L. (**1996)** "A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds." *Laboratoire Flaveur, INRA, Clermont-Ferrand.*

Kovats, E. (**1958)** "Gas chromatographic characterization of organic compounds, I. Retention indexes of aliphatic halides, alcohols, aldehydes, and ketones." *Helvetiva Chimica Acta, 41*: 1915-1932.

Kruma, Z., Kreicbergs, V. et Adams, A. (**2006)** "Volatile compounds in oils aromatized with spices grown in Latvia." *Chemine Technologija 4*:74-79.

Kubeczka, K.H., Bartsch, A. et Ullmann, I. (**1982)** "Recent studies on essential oils of Apiaceae." *Aetherische Oele, Ergeb. Int. Arbeitstag.*: 158-187.

Kubo, A. (**1995)** "Antimicrobial Agents from *Tanacetum Balsamita*." *Journal of natural products*, *58*: 1565-1569.

Kudrzycka-Bieloszabska, F.W. et Sawicka, W. (**1970)** "*Myrrhis odorata* as a source of anethole. III. Gas chromatography of the essential oil." *Acta Poloniae Pharmaceutica*, *27*: 313-317.

Labuza, T.P. (**1971)** "Kinetics of lipid oxidation in foods." *Critical Reviews in Food and Technology*, *2*: 355-405.

Larson, R.A. (**1997)** "Naturally occuring antioxidants." *Ed. Boca raton.*

Le réseau de la botanique francophone. "http://www.tela-botanica.org."

Leclerc, H. (**1949)** "Histoire et pharmacologie de la balsamite, *Tanacetum balsamita* L." *Journal de médecine et de chirurgie pratiques*, *120*: 228-31.

Lehotay, S.J. et Hajslova, J. (**2002)** "Application of gas chromatography in food analysis." *Trends in Analytical Chemistry*, *21*: 686-697.

Lieutaghi, P. (**1966)** "Le livre des Bonnes Herbes." *Ed. Robert Morel.*

Linderschmidt, R., Trylka, A., Goad, M. et Witschi, H. (**1986)** "the effects of dietry butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice." *Toxicology*, *38*: 151-160.

Loziene, K., Venskutonis, P.R., Sipailienė, A. et Labokas, J. (**2007)** "Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different Thymus pulegioides L. chemotypes." *Food Chemistry*, *103*: 546-559.

Lubbers, S., Decourcelle, N., Vallet, N. et Guichard, E. (**2004)** "Flavor Release and Rheology Behavior of Strawberry Fat-free Stirred Yogurt during Storage." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*: 3077-3082.

Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. et Salunkhe, D.K. (**1995)** "Toxicological aspects of food antioxidants." *Food antioxidants. Technological and Health perspectives.*

Madsen, H.L., Sorensen, B., Skibsted, L.H. et Bertelsen, G. (**1998)** "The antioxidative activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) in dressing stored exposed to light or in darkness." *Food Chemistry*, *63*: 173-180.

Marco, G.J. (**1968)** "A rapid method for evaluation of antioxidants." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *45*: 594-598.

Marinova, E. et Yanishlieva, N. (**1992)** "Inhibited oxidation of lipids II: comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derrivatives of benzoic and cinnamic acids." *Fat Science Technology*, *94*: 428-432.

Marriott, P.J., Dunn, M., Shellie, R. et Morrison, P. (**2003**) "Targeted Multidimensional Gas Chromatography Using Microswitching and Cryogenic Modulation." *Analytical chemistry*, *20*: 5532-5538.

Matich, A.J., Rowan, D.D. et Banks, N.H. (**1999**) "Solid phase microextraction for quantitative headspace sampling of apple volatiles." *Analytical chemistry*, *68*: 4114-4118.

Mazza, G. et Marshall, H.H. (**1992**) "Geraniol, linalool, thymol and carvacrol-rich essential oils from Monarda hybrids." *Journal of Essential Oil Research*, *4*: 395-400.

Mclafferty, F.W. (**2005**) "Wiley Registry of Mass Spectral Data 7th edition with NIST 2005 Spectral Data." *Wiley*.

Miliauskas, G. (**2006**) "Screening, isolation and evaluation of antioxidative compounds from *Geranium macrorrhizum*, *Potentilla fruticosa* and *Rhaponticum carthamoides*." *Thèse de doctorat en chimie à l'Université de Wageningen, Pays-Bas*

Miller, N.J., Castelluccio, C., Tijburg, L. et Rice-Evans, C. (**1996**) "The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters-radical scavengers or metal chelators." *FEBS Letters*, *392*: 40-44.

Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V. et Milner, A.A. (**1993**) "Novel methods for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates." *Clin.Sci*, *84*: 407-412.

Miura, T., Muraoka, S. et Ogiso, T. (**1998**) "Antioxidant activity of adrenergic agents derived from catechol " *Biochem.Pharmacol*, *55*: 2001-2006.

Moldao-Martins, M., Beirao-da-Costa, S., Neves, C., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. et Luisa Beirao-da-Costa, M. (**2004**) "Olive oil flavoured by the essential oils of *Mentha piperita* and *Thymus mastichina* L." *Food Quality and Preference*, *15*: 447-452.

Moller, J.K.S., Hirai, K. et Tkezoe, R. (**1991**) "Tocopherol and fluorescence levels in deep-frying oil and their measurment for oil assessment." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *68*: 163-166.

Monfared, A., Davarani, S.S.H., Rustaiyan, A. et Masoudi, S. (**2002**) "Composition of the essential oil of *Tanacetum balsamita* L. ssp. balsamitoides (Schultz Bip.) Grierson from Iran." *Journal of Essential Oil Research*, *14*: 1-2.

Moreau, F. (**1960**) "Botanique : Procaryotes (cyanophites et bactéries). Eucaryotes (algues, champignons et végétaux supérieurs). La plante dans ses rapports avec le milieu." *Ed. Paris, Gallimard*.

Morin, P., Gunther, C., Peyron, L. et Richard, H. (**1985)** "Physical and chemical phenomena involved in steam distillation." *Bulletin de la Societe Chimique de France, 5*: 921-930.

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez , J.M. et Sineiro, J. (**2001)** "Natural antioxydants from residual sources." *Food Chemistry, 72*: 145-171.

Murray, A. (**1792)** "Apparatus medicaminum." *Ed. Ludwig Christopher Althof*

Namiki, M. (**1990)** "Antioxidants/Antimutagens in Food." *CRC critical reviews in food science and nutrition, 29*: 273-300.

Nature Midi-Pyrénées. (**2004)** "Les Plantes rares et menacées de la région toulousaine." *Ed. Les Escapades Naturalistes de Nature Midi-Pyrénées*.

Nickavar, B., Amin, G. et Mehregan, N. (**2003)** "Quercetin, a major flavonol aglycon from *Tanacetum balsamita* L." *Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2*: 249-250.

Orav, A., Arak, E. et Raal , A. (**2006)** "Phytochemical analysis of the essential oil of *Achillea millefolium* L. from various European Contries." *Natural product research, 20*: 1082-1088.

Orav, A., Kailas, T. et Ivask, K. (**2001)** "Composition of the essential oil from *Achillea millefolium* L. from Estonia." *Journal of Essential Oil Research, 13*: 290-294.

Oswiecimska, M. (**1974)** "Korrelation zwischen Chromosomenzahl und Prokamazulenen in Achillea von Osteuropa." *Planta Medica, 25*: 389-394.

Pailleux, A. et Bois, D. (**1899)** "Le potager d'un curieux." *Ed. Librairie agricole de la maison rustique*.

Papas, A.M. (**1999)** "Antioxydant status, diet, nutrition, and health." *Ed. CRC Press, Boca raton*.

Pawliszyn, J.P. (**2003)** "Sample Preparation: Quo Vadis." *Analytical chemistry, 75*: 2543-2558.

Perez-Bonilla, M., Salido, S., Van deek, T.A., Linares-Palomino, P.J., Altarejos, J., Nogueras, M. et Sanchez, A. (**2006)** "Isolation and identification of radical scavengers in olive (*Olea Europaea*) wood." *Journal of chromatography A, 1112*: 311-318.

Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R. et Marcheselli, F. (**1994)** "Melatonin : a peroxyl radical scavanger more effective than vitamin E." *Life.Sci, 55*: 271-276.

Pietta, P.G. (**2000)** "Flavonoids as antioxidants." *Journal of natural products, 63*: 1035-1042.

Pillonel, L., Bosset, J.O. et Tabacchi, R. (**2002)** "Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile." *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 35*: 1-14.

Pokorny, J., Nguen, H.T. et Korczak, J. (**1997)** "Antioxidant activities of rosemary and sage extracts in sunflower oil." *Nahrung, 41*: 176-177.

Pollien, P., Ott, A., Fay, L.B., Maignial, L. et Chaintreau, A. (**1998)** "Simultaneous distillation-extraction: preparative recovery of volatiles under mild conditions in batch or continuous operations." *Flavour and fragrance Journal, 13*: 413-423.

Pratt, D.E. (**1980)** "Natural antioxidants of soybean and other oil seeds." *Ed. M.G. Simic, and M. Karel, Plenum, Autoxidation in food and biological systems*: 261-282.

Prior, R.L. et Cao, G. (**1999)** "*In vivo* total antioxidant capacity: comparaison of different analytical methods." *Free Rad. Bio. Med, 27*: 1173-1181.

Ragnarsson, J.O., Leick, D. et Labuza, T.P. (**1977)** "Accelerated temperature study of antioxidants." *Journal of Food Science, 42*: 1536-1544.

Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H. et Kawakishi, S. (**1995)** "The contibution of plant food antioxidants to human health." *Trends Food Science and Technology, 6*: 75-82.

Rancic, A., Sokovic, M., Vukojevic, J., Simic, A., Marin, P., Duletic-Lausevic, S. et Djokovic, D. (**2005)** "Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of *Myrrhis odorata* (L.) Scop, *Hypericum perforatum* L and *Helichrysum arenarium* (L.) Moench." *Journal of Essential Oil Research, 17*: 341-345.

Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H. et Vuorela, P. (**2000)** "Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds." *International Journal of Food Microbiology, 56*: 3-12.

Rice-Even, C. et Miller, N.J. (**1994)** "Total antioxidant status in plasma and body fluids." *Methods in Enzymology, 234*: 279-293.

Richard, H. (**1992)** "Epices et aromates." *Ed. Lavoisier, Paris.*

Sahu, S.C. et Gray, G.C. (**1993)** "Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: Nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin." *Cancer Letters, 70*: 73-79.

Saule, M. (**2002)** "La Grande Flore Illustrée des Pyrénées." *Ed.Milan*.

Sawicka, W., Zgorka, G. et Glowniak, K. (**1999)** "The study on coumarin compounds in the fruits and roots of *Myrrhis odorata* (L.) Scop." *Herba Polonica, 45*: 18-22.

Schmitt, B., Schulz, H., Storsberg, J. et Keusgen, M. (**2005)** "Chemical Characterization of *Allium ursinum* L. Depending on Harvesting Time." *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*: 7288-7294.

Schomburg, G. (**1995)** "Two-dimensional gas chromatography: principles, instrumentation, methods." *Journal of chromatography A, 703*: 309-325.

Schuller, P. (**1990)** "Natural antioxidants exploited commercially." *Ed. Hudson, B.J.F, Food Antioxidants*: 99-113.

Shapiro, S. et Guggenheim, B. (**1994)** "The action of thymol on oral bacteria." *Molecular oral Microbilogy, 9*: 202-208.

Shawl, A.S., Srivastava, S.K., Syamasundar, K.V., Tripathi, S. et Raina, V.K. (**2002)** "Essential oil composition of *Achillea millefolium* L. growing wild in Kashmir, India." *Flavour and Fragrance Journal, 17*: 165-168.

Shervin, E.R. (**1968)** "Methods for stability and antioxidant measurement." *Journal of the American Oil Chemists' Society 45*: 632-634.

Sipailiene, A., Venskutonis, P.R., Baranauskiene, R. et Sarkinas, A. (**2006)** "Antimicrobial activity of commercial samples of thyme and marjoram oils." *Journal of Essential Oil Research, 18*: 698-703.

Somogyi, L. (**2008)** "The role of active materials of Rosemary in sunflower oil." *Thèse de doctorat en biologie à l'Université de Budapest, Hongrie*.

Souleles, C., Argyriadou, N. et Philianos, S. (**1990)** "The Volatile Constituents of *Calamintha grandiflora*." *Planta Medica, 56*: 234-235.

Taga, M.S., Miller, E.E. et Pratt, D.E. (**1984)** "Chia seeds as a natural lipid antioxydants." *Journal of the American Oil Chemists' Society, 61*: 928-931.

Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A. et Sakata, K. (**1994)** "A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish." *Biosci.Biotech.Biochem, 58*: 1780-1783.

Teuscher, E., Anton, R. et Lobstein, A. (**2005)** "Plantes aromatiques - Epices, aromates, condiments et leurs huiles essentielles." *Ed. Tec et Doc*.

Tkachenko, K.G. et Zenkevich, I.G. (**1993)** "Chemical composition of the leaf oil of *Myrrhis odorata* (L.) Scop." *Journal of Essential Oil Research, 5*: 329-331.

Todorova, M., Konakchiev, A. et Tsankova, E. (**2001)** "Chemical composition of the essential oils of three Achillea species growing in Bulgaria." *Dokladi na Bulgarskata Akademiya na Naukite, 54*: 25-28.

Todorova, M. et Ognyanov, I. (**1989)** "Sesquiterpene lactones in a population of *Balsamita major* cultivated in Bulgaria." *Phytochemistry, 28*: 1115-1117.

Ultée, A., Slump, R.A., Steging, G. et Smid, E.J. (**2000)** "Antimicrobial activity of carvacrol towards Bacillus cereus on rice." *Journal of Food Protection, 63*: 620-624.

Uusitalo, J.S., Jalonen, J.E., Aflatuni, A. et Luoma, S.L. (**1999)** "Essential leaf oil composition of *Myrrhis odorata* (L.) Scop. grown in Finland." *Journal of Essential Oil Research, 11*: 423-425.

Vandendool, H. et Kratz, P.D. (**1962)** "A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography." *Journal of chromatography 11*: 463-471.

Veyrat, M. et Couplan, F. (**1997)** "Herbier Gourmand." *Ed. Hachette*.

Voigt, R.F., Rogers, C.H. et Fischer, E.B. (**1938)** "A pharmacognostic study of *Chrysanthemum balsamita* L., var. tanacetoides Boiss., together with a study of its volatile oil." *Journal of the American Pharmaceutical Association, 27*: 643-54.

Wallach, O. (**1907)** "Sabinene and its relationship to the terpinenes." *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 40*: 585-595.

Wanasundara, U.N. et Shahidi, F. (**1994)** "Stabilization of canola oil with flavonoids." *Food Chemistry, 50*: 393-396.

Wang, K., Hiruki, C. et Chen, M.H. (**1998)** "Identification of a phytoplasma causing yellows of Monarda." *Plant Pathology, 47*: 103-106.

Wang, Z., Hennion, B., Urruty, L. et Montury, M. (**2000)** "Solid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography : a complementary technique to solid-phase microextraction gas chromatography for the analysis of pesticide residues in strawberries." *Food additives and contaminants, 17*: 915-923.

Weber, M., Knoy, C., Kindscher, K., Brown, R.C.D., Niemann, S. et Chapman, J. (**2007)** "Identification of medicinally active compounds in prairie plants by HPLC coupled to electron impact-mass spectrometry." *American Laboratory 39*: 9-11.

Wilhelm, O. (**1885)** *Thomé Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, Gera, Germany*

Williams, C.A., Harborne, J.B. et Eagles, J. (**1999)** "Variations in lipophilic and polar flavonoids in the genus Tanacetum." *Phytochemistry, 52*: 1301-1306.

Yang, G.C., Qiang, W., Morehouse, K.M., Rosenthal, I., Ku, Y. et Yurawecz, P. (**1991)** "Determination of hydroperoxides in edible oils by ESR, TBA assay and LC-CL techniques." *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38*: 896-898.

Yen, G.C. et Chen, H.Y. (**1995)** "Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43*: 27-32.

Yousefzadi, M., S.N., E., Sonboli, A., Miraghasi, F., Ghiasi, S., Arman, M. et Mosaffa, N. (**2009)** "Cytotoxicity, antimicrobial activity and composition of essential oil from *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamita*." *natural product communications, 4*: 119-122.

Zhang, H.L., Nagatsu, A. et Sakakibara, J. (**1996)** "Novel antioxidants from safflower (*Carthamus Tinctorius* L.) oil cake." *Chem.Pharm.Bull, 44*: 874-876.

Zielinska-Sowicka, R. et Wolbis, M. (**1970)** "Examination of *Chrysanthemum balsamita* leaves." *Herba Polonica, 16*: 286-295.

Liste des Tableaux

Tableau 1: Liste I des plantes aromatiques médiévales sélectionnées, (*) : plantes correspondent à la deuxième série de sélection 13
Tableau 2: Liste des 5 plantes aromatiques selectionnées 21
Tableau 3: Les avantages et les limites de quelques méthodes d'estimation de la stabilité des lipides et d'évaluation de l'activité antioxydante 65
Tableau 4: Résultats des analyses par CPG-DIF-SM de l'huile essentielle *d'Achillea millefolium* issues de l'hydrodistillation des parties aériennes 78
Tableau 5: Variation des pourcentages des composés majoritaires des huiles essentielles de l'Achillée millefeuille provenant de différentes régions du monde 81
Tableau 6: Composition chimique de l'huile essentielle de *Calamintha grandiflora* 83
Tableau 7: Comparaison des composés majoritaires des extraits des feuilles de *C. grandiflora* France *vs* Turquie, Grèce et *C. Nepeta* 85
Tableau 8: Composition chimique de l'HE de *Tanacetum balsamita* sauvage récoltée à Toulouse pendant la période de floraison 88
Tableau 9: Composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Tanacetum balsamita* cultivée sous serre 89
Tableau 10: Comparaison entre les principaux composés majoritaires de l'huile essentielle de *Tanacetum balsamita* de différentes origines : France *vs* Iran, Italie, Lituanie et Turquie 91
Tableau 11: Composition chimique de l'huile essentielle obtenue à partir de la partie aérienne de *Myrrhis odorata* 93
Tableau 12: Comparaison entre les principaux composés majoritaires de l'HE de *Myrrhis odorata* de différentes origines : France vs Serbie, Finlande, Russie et Amérique du Nord 95
Tableau 13: Composition chimique (%) de l'huile essentielle de *Monarda didyma* 96
Tableau 14 : Comparaison entre les principaux composés majoritaires de l'HE de *M. didyma* provenant de différents pays 98
Tableau 15: Activité antioxydante (AA) des huiles essentielles comparée à l'efficacité du BHT 110
Tableau 16: Activité antioxydante des extraits de résidus d'hydrodistillation 124
Tableau 17: Activité antibactérienne des huiles essentielles mesurée à différentes concentrations et exprimée en diamètre d'inhibition 128
Tableau 18: Concentration inhibitrice minimale (CMI) des huiles essentielles 130
Tableau 19: Principaux composés organiques volatils identifiés à partir de l'huile essentielle, des feuilles froissées et des feuilles non froissées de *Tanacetum balsamita* 147
Tableau 20: Comparaison entre la composition chimique de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation et celle de l'huile essentielle native extraite par CFD-SPME et CFD-DHS 152
Tableau 21: Propriétés physicochimiques de l'huile de tournesol 157
Tableau 22: Identification des COVs dans l'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par l'huile essentielle d'Achillée millefeuille et par ses feuilles sèches 168
Tableau 23: Identification des COVs dans l'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par l'HE de *Calamintha grandiflora* et par ses feuilles sèches 170
Tableau 24: Identification des COVs dans l'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par l'HE de *Tanacetum balsamita* et par ses feuilles sèches 172
Tableau 25: Identification des COVs dans l'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par l'HE de *Myrrhis odorata* et ses feuilles sèches. 174
Tableau 26: Identification des COVs dans l'espace de tête de l'huile de tournesol aromatisée par l'huile essentielle de *Monarda didyma* et par ses feuilles sèches 175
Tableau 27: Fibres disponibles pour l'analyse des COVs 196

Publications et participation à des congrès

Publications

EL Kalamouni Chaker, Raynaud Christine, P.R. Venskutonis, Talou Thierry **(2009),** "Screening of antioxidant and antimicrobial activities of Midi-Pyrénées Medieval Aromatic Plants"
Chemine Technologija, 3 (52), pp: 69-73

Communications par affiche avec actes publiés et comité de lecture

EL Kalamouni Chaker, Raynaud Christine, Talou Thierry **(2010),** "Native vs extracted essential oil: from chemical composition to biological activities", 12th International ACS Flavour Conference, 25-29 Mai 2009, Skiathos (Grèce)
Royal Society of Chemistry, 326, Recent Advances in Food and Flavor Chemistry. Ed. C-T Ho, C.J. Mussinan, F. Shahidi and E.Tratras Contis, pp: 369-378

EL Kalamouni Chaker, Raynaud Christine, P.R. Venskutonis, Talou Thierry **(2010),** "Design of an Artificial Crushing Finger Device for Rapid Evaluation of Essential Oils from Aromatic plants leaves", 12th International Weurman Flavour Research Symposium, 1-4 Juillet 2008, Interlaken (Suisse)
Expression of Multidisciplinary Flavour Science. Ed. Imre Blank, Matthias Wüst, Chahan Yeretzian, pp: 525-528

Communications orales avec actes sur résumé

EL Kalamouni Chaker, Raynaud Christine, Talou Thierry « Evaluation des activités anti-oxydante et antibactérienne d'huiles essentielles de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées », *Journée Jeunes Chercheurs- Société Française de Chimie,* ***29 Avril 2009****, Toulouse (France)*

EL Kalamouni Chaker, Raynaud Christine, Talou Thierry « screening of antioxidant and antibacterial activities of Midi-Pyrenees medieval aromatic plants », *4th Baltic Conference of Food Science and Technology,* ***12-13 Mai 2009****, Kaunas (Lituanie)*

Communications par affiche avec actes sur résumé

EL Kalamouni Chaker, Raynaud Christine, Talou Thierry, "MPAROM Trek: Collect and Analysis of Midi-pyrénées Medieval Aromatic Plants"
38th International Symposium on Essential Oils (ISEO), ***9-12 Septembre 2007****, Graz (Autriche).*

EL Kalamouni Chaker, Raynaud Christine, Talou Thierry, « Evaluation du potentiel aromatique des plantes huiles essentielles »
27èmes Journées Internationales Huiles Essentielles de Digne, ***26-27 juin 2008****, Dignes les bains (France), obtention du prix du Meilleur Poster.*

EL Kalamouni Chaker, Dobravalskyte Diana, Berdague Jean-Louis, Tournayre Pascal, Raynaud Christine, Talou Thierry, « CFD-DHS/GC vs SPME/GC-2D: 2 approches pour une évaluation rapide des plantes à huiles essentielles »
Journées Arômes, ***2-3 Avril 2009****, INRA de Dijon, (France)*

ISSN 1392 – 1231. CHEMINĖ TECHNOLOGIJA. 2009. Nr. 3 (52)

Screening of antioxidant and antimicrobial activities of Midi-Pyrenées aromatic plants

C. El Kalamouni, C. Raynaud, T. Talou
SENSORIC – Agro-industrial Chemistry Laboratory UMR 1010 INRA/INPT, Université de Toulouse – INP Toulouse, ENSIACET, 118 Route de Narbonne 31077, Toulouse, France

P. R. Venskutonis
Department of Food Technology, Kaunas University of Technology,
Radvilėnų pl. 19, LT-50254 Kaunas, Lithuania
E-mail: rimas.venskutonis@ktu.lt

Received 17 July 2009; Accepted 2 September 2009

The antioxidant activity of essential oils from aerial parts of four plants, namely *Tanacetum balsamita, Calamintha grandiflora, Myrrhis odorata* and *Monarda didyma,* from the Midi-Pyrenées region of France were determined by the Oxipress method, and the antimicrobial activity of each oil was evaluated against nine bacteria species. All tested essential oils were able to retard the oxidation of sunflower oil, and their antioxidant capacity decreased in the following order: *M. didyma* > *C. grandiflora* > *M. odorata* > *T. balsamita*. The antioxidant activity of the essential oils was dose-dependent and in case of the highest dose (0.2%) of *M. didyma, C. grandiflora* and *M. odorata* it exceeded the antioxidant capacity of the synthetic compound BHT added at a concentration of 0.02%. Antimicrobial activity tests showed that Gram-positive bacteria to be more sensitive the Gram-negative, especially *Bacillus cereus* which was the most sensitive species for *M. didyma* essential oil at a concentration of 1%. *M. didyma* oil possessed an inhibitory effect against all test cultures. Most likely the high percentage of the strong antimicrobial agent thymol in *M. didyma* oil was the main factor for its pronounced antimicrobial activity.

Introduction

Aromatic, medicinal and spicy plants are an immense and sustainable source of natural compounds with various beneficial properties. Therefore, such materials have been used since ancient ages for various applications, particularly healing of diseases, flavouring of foods and formulation of fragrances. Some of these plants nowadays are grown commercially and serve for the production of a variety of ingredients. However, some of medicinal and aromatic herbs for some reasons have not found wider application and sometimes are referred to as 'forgotten plants'. Taking into account the increasing demand for natural ingredients that might be used as food additives, components of functional foods and nutraceuticals as well as for other applications, it is reasonable to revise the 'forgotten plants' by assessing their applicability and benefits using modern scientific analysis methods. The Midi-Pyrenées region of southwest France has a rich and so for poorly valorized wild vegetal heritage, including a remarkable diversity of aromatic and medicinal plants. Recently, the MIPAROM Trek initiative has been conducted to collect and analyse various regional and 'forgotten' aromatic plants, including such species as *Tanacetum balsamita, Myrrhis odorata, Calamintha grandiflora* and *Monarda didyma*. The first phase in the assessment of these plants includes analysis of their essential oils, antioxidative properties and antimicrobial activity.

The essential oil composition and properties of plants grown in various regions of the world and selected for this investigation have been studied previously. For instance, it was reported that essential oil of *T. balsamita* grown in Iran contained carvone and β-thujone as the main constituents; the results of the antimicrobial activity of the essential oil according to the disc diffusion method and minimal inhibition concentration (MIC) values indicated that the oil exhibited moderate to high antimicrobial activity against eight Gram-positive and Gram-negative bacteria (*Bacillus subtilis, B. pumulis, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, S. epidermidis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*) and three fungi (*Candida albicans, Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*) [1]. In anoher study, essential oil of *T. balsamita* subsp. *Balsamita* from Turkey contained *trans*-chrysanthenol, chrysanthenyl acetate, linalool oxide, camphor and 1,8-cineole as the major components. The antimicrobial activities of the oil and two antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria and two yeasts were investigated *in vitro,* and the results showed the oils to possess moderate activities against all test microorganisms [2]. This example clearly shows that a remarkable diversity in the chemical composition may be characteristic of the same plant species, particularly of those grown in different parts of the world.

The chemical composition and antimicrobial activities of essential oil isolated from *M. odorata* were investigated against seven bacterial and six fungal species. Activity against bacteria and *C. albicans* were investigated by the bioautographic test on TLC plates, while all the other fungi were tested by the microdilution test. *M. odorata* oil showed the lowest effect as compared with commercial products [3]. The composition of *C.*

grandiflora essential oil had been previously studied [4, 5], however, no reports were found in the available literature sources on the antimicrobial and antioxidant properties of this species.

Oxidative and microbial deterioration are the main processes damaging huge amounts of foods. Lipid-containing foods can be stored for a limited time period because of their insufficient resistance to oxidation. Moreover, in dry foods, which are more stable from the microbiological point of view, oxygen can easily enter the lipid phase, and the stability of such foods in many cases is substantially lower than in the presence of water. Therefore, the stability of dry foods should be carefully tested and, if necessary, the lipid fraction should be protected by adding antioxidants. During storage of oils, fats and other fat-containing foods, lipid oxidation is still a major cause of food quality deterioration in spite of a wide use of several antioxidants. The most widely used synthetic antioxidants – butylhydroxyanisole (BHA) and butylhydroxytoluene (BHT) – are quite volatile compounds and easily decompose at high temperatures [6]. There are some serious problems concerning the safety and toxicity of some synthetic antioxidants related to their metabolism and possible absorption and accumulation in body organs and tissues [7]. Therefore, development of preparations based on the antioxidative properties of natural compounds is highly desirable.

The antioxidant extracts isolated from various herbs were reported to be effective in retarding the development of rancidity in oils and fatty foods; however, the antioxidant activity of these extracts depends on the concentration and chemical structure of antioxidatively active components in the raw materials. Since ancient times, aromatic plants have been widely used as flavourings; however, during the last few years they have become a source of natural antioxidants and antibacterial agents [8]. Essential oils are considered among the most important antimicrobial agents present in plants and may possess also antioxidant and anti-inflammatory activities.

The increasing antibiotic resistance of some pathogens that are associated with diseases is another major concern. Therefore, there has been increasing interest in developing a new type of effective and nontoxic antimicrobial compounds. Several authors have proposed essential oils as natural preservative agents [9].

In the present study, a preliminary screening of antioxidant and antimicrobial activities of Midi-Pyrenées aromatic plants grown in France, namely *Tanacetum balsamita, Calamintha grandiflora, Myrrhis odorata* and *Monarda didyma,* was carried out. Essentials oils from these plants were added to sunflower oil, and oxidative deterioration was measured by the Oxipress method. The antimicrobial activities of the essentials oils were evaluated against nine pathogenic bacteria present in various foods.

Materials and methods

The aerial parts of costmary, also known as alecost, balsam herb, Bible leaf (*Tanacetum balsamita* L.), cicely or sweet cicely (*Myrrhis odorata* L. Scop.), large-flowered calamint (*Calamintha grandiflora* L. Moench.) and bergamot, also known as scarlet beebalm, scarlet monarda, oswego tea, or crimson beebalm (*Monarda didyma* L.) were used in the study. The plants were collected in Midi-Pyrenées (south west of France) in April–May 2008 at the vegetation phase which is considered preferable in terms of the functional properties of herbs. Essential oils were isolated from ground plants by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus.

The antioxidant activity of the essentials oils was determined in sunflower oil, using an Oxipress apparatus (Mikrolab Aarhus, Denmark): in the course of oxidation, oxygen consumption is evaluated by measuring changes in its pressure in a hermetically sealed 200 ml vessel containing oxygen and a sample. Five grams of sunflower oil (pure, with essential oils and with the synthetic antioxidant BHT) were placed in the reactor which was connected to the pressurized oxygen cylinder; first, it was washed with oxygen and afterwards filled with oxygen to reach the defined initial pressure (0.5 MPa). The experiments were carried out at a temperature of 110 °C in triplicate. The relative standard deviation was in the range of 0.1 to 3%; in rare cases when it was higher, additional measurements were performed. The induction period (*IP*) of oxidation was read at the time when the pressure began to decrease abruptly (the end was measured from the cross-section point of tangents of the first part and the subsequent part of the curve recording the pressure changes, as evident from Figure). The protection factor (*PF*) value of sunflower oil in case of using essential oils and their antioxidant activities (*AA*) were calculated by the following formulas:

$$PF = \frac{IP_X}{IP_K}; \qquad AA = \frac{IP_X - IP_K}{IP_{BHT} - IP_K};$$

where IP_X is the induction period of a sample with an additive, h; IP_K is the induction period of a sample without additive, h; IP_{BHT} is the induction period of a sample with containing the synthetic antioxidant BHT, h.

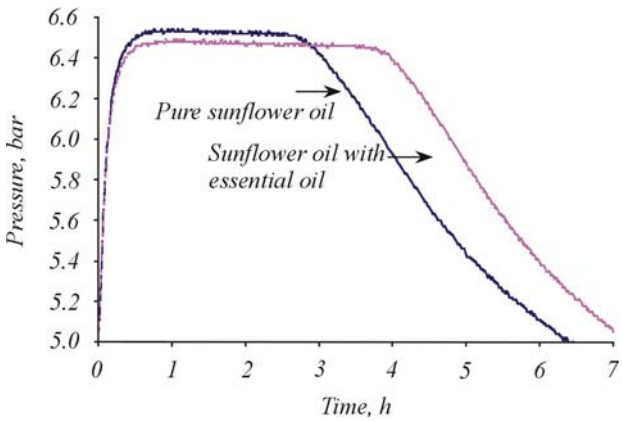


Fig. Sunflower oil oxidation curves at 110 ºC

Nine food spoilage bacteria, including Gram-positive, *Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Staphylococcus*

aureus, *Staphylococcus epidermidis*, and Gram-negative pathogens, namely *Salmonella typhymurium*, *Salmonella typhymurium D338*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella agona* and *Escherichia coli*, were used in this study. The antimicrobial properties were evaluated by the agar diffusion method. Bacteria were grown in plate count agar (CM 325, Oxoid) for 24 h at 37 °C. After cultivation, test culture cells were mixed using an *MS1* mini shaker (Wilmington, USA) and the cell suspensions were adjusted according to McFarland no. 0.5 standard. The suspension of bacteria cells in saline (2 ml) was introduced into the dissolved um agar media; 10 ml of each bacteria culture was pipetted into a 90 mm Petri dish. Eight-millimeter diameter wells were pushed in the agar and filled with methanolic solutions of oils. The plates were incubated overnight at 37 °C.

A 10 µl volume of 1.0 and 0.5% methanolic solutions of the essential oils was added to the agar wells. Pure methanol was used as a control in blank samples for bacteria. After incubation, the inhibition zones were measured with calipers to an accuracy of 0.1 mm, and the effect was calculated as a mean of three replicate tests. An appropriate reference antibiotic disc was applied on each plate depending on the test microorganisms (ceftazidine/clavulanic acid, 30/10 µg; *BBL, CAZ/CLA, 231753*); they served as a positive control which is effective against all species used in the study.

Results and discussion

The oxipress method, which was used to evaluate the antioxidant activity of essential oils, is a very convenient procedure performed without using any chemicals. Typical curves of oxidation are presented in Figure. The change of pressure at the end of the induction period can be rather precisely measured and, as shown in Figure, in case of adding plant essential oil to sunflower oil, the pressure drop was delayed for some period of time, indicating the antioxidative effect of the added substance.

The effects of the applied essential oils at 0.05, 0.1 and 0.2% concentrations are summarized in Table 1; the essential oil of *M. didyma* was found to be the most effective natural antioxidant measured by the Oxipress method as compared with other essentials oils used in this experiment. The effectiveness of the applied essentials oils decreased in the following order: *M. didyma* > *C. grandiflora* > *M. odorata* > *T. balsamita*.

Essential oils are complex mixtures of volatile natural compounds, and their total antioxidant capacity depends on the presence of the most active components and their concentration in the oil. For instance, such phenolic compound as thymol, which is present in many essential oils, particularly in those isolated from plants belonging to the genus *Thymus*, possesses high antioxidant strength due to the presence of the phenolic hydroxyl group. It was also suggested that the presence of an electron donating group in *ortho* position to the hydroxyl moiety may be crucial for exerting an effective antioxidant activity. *M. didyma* essential oil contained up to 50% of thymol, and it may explain the comparatively high antioxidant activity of this additive. The chemical composition of the essential oil obtained from *M. didyma* had been analysed previously, and thymol was also found as the main component constituting more than 50% in the total oil. The antioxidant activity of the oil was evaluated by the DPPH test where the oil showed an effect comparable to Trolox, and by lipid peroxidation test where the activity of the oil was similar to that of BHT [10]. Antioxidant activity of the essential oils was dose-dependent, and in case of the highest dose (0.02%) of *M. didyma*, *C. grandiflora* and *M. odorata* it exceeded the antioxidant capacity of BHT added at a concentration of 0.02%. The main components in the essential oils of *C. grandiflora*, *T. balsamita* and *M. odorata* were menthone, β-thujone and anethol, respectively.

Table 1. Antioxidant activity (*AA*) of essential oils as compared with the effect of BHT and their effect on the stability of sunflower oil, expressed in protection factor values (*PF*)

Species	Conc. %	*PF*	*AA*
Without additive	0.00	1.00	–
BHT	0.02	1.47	1.00
M. didyma	0.2	1.73	1.55
	0.1	1.37	0.79
	0.05	1.29	0.62
C. grandiflora	0.2	1.63	1.34
	0.1	1.22	0.47
	0.05	1.18	0.38
M. odorata	0.2	1.61	1.30
	0.1	1.2	0.43
	0.05	1.17	0.36
T. balsamita	0.2	1.41	0.87
	0.1	1.2	0.43
	0.05	1.1	0.21

Antimicrobial activity of the methanol solutions of essentials oils was evaluated *in vitro* against nine bacteria species known to cause infections in humans (Table 2). Gram-positive bacteria are more sensitive than Gram-negative, especially *Bacillus cereus*, which was the most sensitive species in case of using *M. didyma* essential oil at a concentration of 1%. *M. didyma* oil showed the inhibitory effect against all test cultures. Most likely the high percentage of the strong antimicrobial agent thymol in *M. didyma* essential oil was the main factor for its pronounced antimicrobial activity. It is in agreement with the previously published results; e.g., thymol-rich essential oils from *Thymus pulegioides* were strong antimicrobial substances against various pathogenic bacteria [11]. The fungicidal activity of *Thymus vulgaris* oil correlated also with the content of thymol [12]. The antifungal activity of *M. didyma* oil was evaluated against four phytopathogenic fungi through a direct contact with by agar diffusion method and with the fungistate action of

the vapors using the micro-atmosphere method. The most sensitive fungus was *Rhizoctonia solani* in the first test and *Botrytis cinerea* in the second [10].

Table 2. Antimicrobial activity of the essential oils at different concentrations, expressed in the diameter of inhibition, mm; na – not active

Bacterial species	*M. didyma*		*C. grandiflora*		*M. odorata*		*T. balsamita*		Antibiotic
	1%	0.50%	1%	0.50%	1%	0.50%	1%	0.50%	sensi-disc
Bacillus subtilis	16.5	12.8	19.1	8.5	9.2	8.5	10.2	8.2	16.8
Bacillus cereus	40	13.1	9.8	10.6	10.6	9.9	11.4	8.8	29.0
Staphylococcus aureus	13.1	10.2	9.7	na	8.8	na	9	na	21.0
Staphylococcus epidermidis	14.7	11.5	10	na	9.1	na	8.5	na	25.8
Salmonella typhimurium	15	11	8.9	na	8.1	na	8.4	na	31.2
Salmonella typhymurium D338	16.2	12.2	9.3	8.8	9	na	9.7	na	34.0
Salmonella enteritidis	15.2	11.5	10.1	9.1	8.1	na	8.9	na	32.2
Salmonella agona	13.8	10.7	8.4	na	na	na	na	na	20.8
Esherichia coli	18.9	14.4	10.3	na	10.2	na	9.7	na	26.4

T. balsamita and *M. odorata* oils at 0.5% possessed a weaker antimicrobial activity against the majority of test bacteria as compared to other essentials oils applied at the same concentration; they showed antibacterial activity only against *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. Comparing *Salmonella* spp., *Salmonella agona* was the most resistant species; the smallest zones of inhibition were measured in case of the majority of applied essential oils. *C. grandiflora* oil applied at a concentration of 1% was the most effective antimicrobial agent against *Bacillus subtilis* as compared with the other oils. The inhibitory effect of *M. didyma* oil (1%) against *Escherichia coli, Salmonella enteritidis, Salmonella typhymurium* and *Staphylococcus epidermidis* was halt as low as the effect of the reference antibiotic compound; however, in case of *Bacillus subtilis*, the effect of *M. didyma* oil was equal to that of the antibiotic compound.

Conclusions

A preliminary screening of the bioactivity of *Tanacetum balsamita, Calamintha grandiflora, Myrrhis odorata* and *Monarda didyma* essential oils showed the volatile fractions of these plants to possess antioxidant activity in vegetable oil and antimicrobial activity against various pathogenic bacteria. These results suggest the need of the further studies of these plants to assess their wider application in the production of valuable ingredients. Further studies should be focused on the non-volatile fraction of plant materials.

Acknowledgements

This study was performed in the framework of the bilateral French–Lithuanian programme "Gillibert" and supported by the Lithuanian State Science and Studies Foundation (grant No. V-42/2009) and the Agency for International Science and Technology Development Programmes in Lithuania (grant No. 31V-136.

References

1. **Yousefkadi M., Ebrahimi S. N., Sonboli A., Miraghasi F., Ghiasi S., Arman M., Mosaffa N.** // Natural Product Communications. 2009. Vol. 4, N 1. P. 119–122.
2. **Bagci E., Kursat M., Kocak A., Gur S.** // Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2008. Vol. 11, N 5. P. 476–484.
3. **Rancic A., Sokovic M., Vukojevic J., Simic A., Marin P., Duletic-Lausevic S., Djokovic D.** // Journal of Essential Oil Research. 2005. Vol. 17, N 3. P. 341–345.
4. **Baser K. H. C., Ozek T.** // Planta Medica. 1993. Vol. 59, N 4. P. 390–390.
5. **Souleles C., Argyriadou N.** // Planta Medica. 1990. Vol. 56, N 2. P. 234–235.
6. **Branen A. L.** // Journal of American Oil Chemists' Society. 1975. Vol. 52, N 2. P. 59–63.
7. **Linderschmidt R., Trylka A., Goad M., Witschi H.** // Toxicology. 1986. Vol. 38, N 2. P. 151–160.
8. **Bandonienė D., Pukalskas A., Venskutonis P. R., Gruzdienė D.** // Food Research International. 2000. Vol. 33, N 9. P. 785–791.
9. **Kubo A.** // Journal of Natural Products. 1995. Vol. 58, N 10. P. 1565–1569.
10. **Fraternale D., Giamperi L., Bucchini A., Ricci D., Epifano F., Burini G., Curini M**. // Journal of Essential Oil Research. 2006. Vol. 18, N 5. P. 581–585.
11. **Ložienė K., Venskutonis P. R., Šipailienė A., Labokas J.** // Food Chemistry. 2007. Vol. 103, N 2. P. 546–559.
12. **Zambonelli A, D'Aulerio A. Z., Severi A., Benvenuti S., Maggi L., Bianchi A.** // Journal of Essential Oil Research. 2004. Vol. 16, N 1. P. 69–74.

C. El Kalamouni, C. Raynaud, T. Talou,
P. R. Venskutonis

VIDURIO PIRĖNŲ AROMATINIŲ AUGALŲ ANTIOKSIDACINIO IR ANTIMIKROBINIO AKTYVUMO PIRMINIS ĮVERTINIMAS

S a n t r a u k a

Vidurio Pirėnuose augančių aromatinių augalų *Tanacetum balsamita*, *Calamintha grandiflora*, *Myrrhis odorata* ir *Monarda didyma* eterinio aliejaus antioksidacinės savybės buvo tirtos „oksipres“ metodu, o antimikrobinis aktyvumas įvertintas naudojant 9 bakterijų rūšių kultūras. Nustatyta, kad eterinis aliejus sulėtino saulėgrąžų aliejaus oksidacijos greitį: tirtų augalų antioksidacinis aktyvumas mažėjo tokia tvarka: *M. didyma* > *C. grandiflora* > *M. odorata* > *T. balsamita*. Eterinio aliejaus antioksidacinė galia taip pat priklausė nuo eterinio aliejaus koncentracijos: pavyzdžiui, 0,2 % *M. didyma*, *C. grandiflora* ir *M. odorata* priedų poveikis buvo didesnis, palyginus su sintetiniu antioksidantu BHT, kurio koncentracija buvo 0,02 %. Gramteigiamos bakterijos buvo jautresnės eterinio aliejaus poveikiui negu gramneigiamos. Pavyzdžiui, *M. didyma* eterinis aliejus slopino visų bakterijų kultūras, tačiau 1 % koncentracijos tirpalas buvo efektyviausias slopinant *Bacillus cereus* augimą. Didelė stipraus antimikrobinio junginio timolio koncentracija šio augalo eteriniame aliejuje tikriausiai yra pagrindinė jo išskirtinio antimikrobinio aktyvumo priežastis.

DESIGN OF AN ARTIFICIAL CRUSHING FINGER DEVICE FOR RAPID EVALUATION OF ESSENTIAL OILS FROM AROMATIC PLANTS LEAVES

C. EL KALAMOUNI[1,2], C. Raynaud[1,2], and T. Talou[1,2]

[1] *LCA Université de Toulouse ; INP ; LCA (Laboratoire de Chimie AgroIndustrielle); ENSIACET, 4 Allées Emile Monso, F-31029 Toulouse, France*
[2] *INRA (Laboratoire de Chimie AgroIndustrielle) ; F-31029 Toulouse, France*

Abstract

A special designed apparatus based on “Scratch' n Sniff” concept was developed for copying the crushing of aromatic plants leaves between fingers. The so-called Crushing Finger Device (CFD) was equipped with a TENAX trap for a rapid analysis of emitted volatiles by GC-MS. The CFD efficiency was presently evaluated by comparison of chromatographic profiles obtained with crushed, uncrushed leaves and essential oil of costmary (*Tanacetum Balsamita*) fresh leaves, chosen as model plant.

Introduction

A decade ago, several treks (NEBLINA, TASTETREK) were performed by companies of aromatic industry sector both in South-America and West-Africa in order to investigate the aromatic potentialities of rare exotic plants for novel flavours and fragrances formulations. As Midi-Pyrenees region (Southwest of France) has a rich and unvalorised wild vegetal heritage, especially for aromatic and medicinal plants, the MIPAROM Trek was conducted in order to collect and analyse various regional medieval (aka forgotten) aromatic plants, e.g. *Achillea millefolium, Tanacetum balsamita, Agastache foeniculum, Meum athamanticum, Chrysantemum balsamita, Myrris odorata, Calamintha gradiflora.* As a consequence of a global bibliographical survey study based on historical books, library archived documents and computerized data banks, a list of 20 regional plants to be investigated has been precised [1]. But as such plants being rare or their harvesting problematic as they were protected, sampling could be limiting. We have developed a strategic approach based either on the use of a specific/high effective sampling system with a classic detection or a classic sampling with a specific/ultra sensitive detection. If this last methodology was based on the coupling of SPME to Comprehensive GC (GCxGC-TOFMS) (current works) the first ones was based on a self designed apparatus [2], allowing to copy the crushing of leaves between fingers used by farmers or flavourists to sensorially evaluate the odour of aromatic plants. The so-called Crushing Finger Device (CFD) was based on a modified artificial mouth and has the objective to perform a rapid evaluation of essential oil content with only a couple of leaves through a controlled Dynamic HeadSpace (DHS) concentration of volatiles emitted by crushed fresh leaves. In the present paper we report the comparison of the chromatographic profiles of essential oil of leaves of our model plant, costmary (*Tanacetum Balsamita*), with the ones obtained with leaves without crushing (DHS) and with leaves processed by CFD-DHS.

Experimental

Materials. Costmary (*Tanacetum Balsamita)* plants using in the present study were collected at their optimum biological stage in Midi-Pyrenees area (south West France) in April-May 2008.

Dynamic HeadSpace with crushing (CFD/DHS). Two or three entire fresh leaves of costmary corresponding to 500mg were placed in the glass cell of the CFD thermostated at 25°C. A flow of purified nitrogen (100 ml/min) passed through the leaves for 5 min to trap the volatiles into a TENAX TA trap positioned at the top of the device. The crushing of leaves was set up by a motorized Teflon piston having transverse and rotative movements. 4 replicates were performed

Dynamic HeadSpace without crushing (DHS). The CFD piston was removed from the device and fresh leaves were carefully placed without damaging tissues. Operating conditions were applied as described before with 3 replicates performed.

Isolation of essential oil (EO). 100g of the aerial part of fresh costmary plants was hydrodistilled for 3h at 100°C by using a Clevenger-type apparatus in order to obtain essential oils. 4 replicates were performed.

Gas chromatographic analysis. Volatile analysis (EO) were performed with a Hewlett Packard 5890 SERIES II gas chromatograph equipped with FID and an Agilent 5973 Network GC-MS. (DHS, DHS/CFD) analysis were performed with a Perkin Elmer Clarus 500 GC-MS-FID equipped with a TurboMatrix TD thermodesorber. A fused-silica DB5 (0.25mm x 30m, 0.25µm film thickness) was used throughout this study. Temperature program used was: 30°C for 5min, then 5°C/min up to 200°C and 10 min isotherm at 200°C. γ-Terpinene was used as standard to estimate the concentration of volatiles compounds in CFD in µg/kg of dried material. Identification of volatiles was based on comparison of their retention times with those of authentic samples (calculated RI based on n-hydrocarbons series kit) and on computerized matching with commercial mass spectra data bank (NIST 2005 and WILEY) and Adams library [3].

Results

The composition of the yellow coloured essential oil obtained with a yield of 0,53% on a dry weight basis, was conform to literature [4-8] while thujone (cis and trans isomers) and 1,8-cineole were the main identified volatiles (Table 1). *trans*-Thujone was reported as the main compound of both essential oil (63.3%) and emitted volatiles from uncrushed (82.5%) and crushed ones (67.7%). The yield of emitted volatiles by fresh costmary leaves was by increasing order: CFD / DHS >> DHS.

The consequence of the crushing of the leaves by CFD was the explosion of the vesicles of storage of essential oil and the release of the main volatile compounds of the plant in atmosphere. The comparison of the GC-profiles of crushed leaves (Figure 1A) *versus* leaves without crushing (Figure 1B) showed an increase of number of top notes compounds (4 to 20). The major volatiles emitted during the crushing of leaves were 3-methylhexanal (0.3%), α-thujene (0.2%), α-pinene (0.7%), β-terpinene (2.4%), β-pinene (0.4%), 1,8-cineole (21%), γ-terpinene (0.5%), p-mentha-1,4(8)-diene (0.2%) and *cis*-thujone (3.3%). In case of essential oil, the minor compounds reported were 1,8-cineole (27.5%), γ-terpinene (0.1%), *cis*-thujone (4.2%), terpineol-4 (0.6%), germacrene D(0.9%), bicyclo-germacrene (0.1%), α-terpineol (0.2%), and β-eudesmol (0.4%) and could be assimilated to back notes components generated during hydrodistillation.

Table 1. *Volatile compositions of essential oil, uncrushed and crushed fresh leaves of Tanacetum balsamita*

Peak	Volatile Compound	RI (DB-5)	EO (n=4) %	DHS (n=3) %	CFD (n=4) %	CFD [c] µg/kg/5min	CFD [c] SD %
1	Hexanal, 3-methyl	738			0.3	0.5	11
2	1-Butanol, 2-methyl	742			0.1	0.2	23
3	1-Octen	791			0.4	0.5	15
4	3-Hexen-1-ol	857			0.3	0.4	34
5	1-Butanol, 3methyl-acetate	879			0.1	0.1	17
6	α-Thujene	926			0.2	0.1	23
7	α-Pinene	933		0.6	0.7	0.9	12
8	*bicyclo*[3.1.0]Hex-2-ene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)	944			0.1	0.1	18
9	Camphene	950			0.1	0.2	7
10	β-Terpinene	973		1.7	2.4	3.7	26
11	β-Pinene	978		1.5	0.4	0.5	9
12	*cis*-Pinene-3-ol	989			0.1	0.3	25
13	3-Hexen-1-ol, acetate	1004			0.4	0.3	22
14	NI	1012			0.2	0.6	21
15	*o*-Cymene	1017			0.4	0.5	18
16	*p*-Pymene	1023	tr				
17	1,8-Cineole	1031	27.5	12.6	21	21.3	4
18	γ-Terpinene	1057	0.1		0.5	0.6	13
19	N.I.	1071	0.3				
20	N.I.	1072			0.2		
21	*p*-Mentha-1,4(8)-diene	1086			0.2	0.2	19
22	Butanoic acid, 2-methyl-3 ethylbutylester	1100			0.2	0.3	49
23	*cis*-Thujone	1107	4.2	1.1	3.3	4.9	9
24	*trans*-Thujone	1121	63.3	82.5	67.7	103.8	27
25	4-Terpineol	1166	0.6				
26	α-Terpineol	1185	0.2				
27	Sabinyl acetate	1282	tr				
28	Germacrene-D	1476	0.9				
29	*bicyclo*-Germacrene	1489	0.1				
30	β-Eudesmol	1650	0.4				

tr : Trace (<0,1%), NI : unidentified

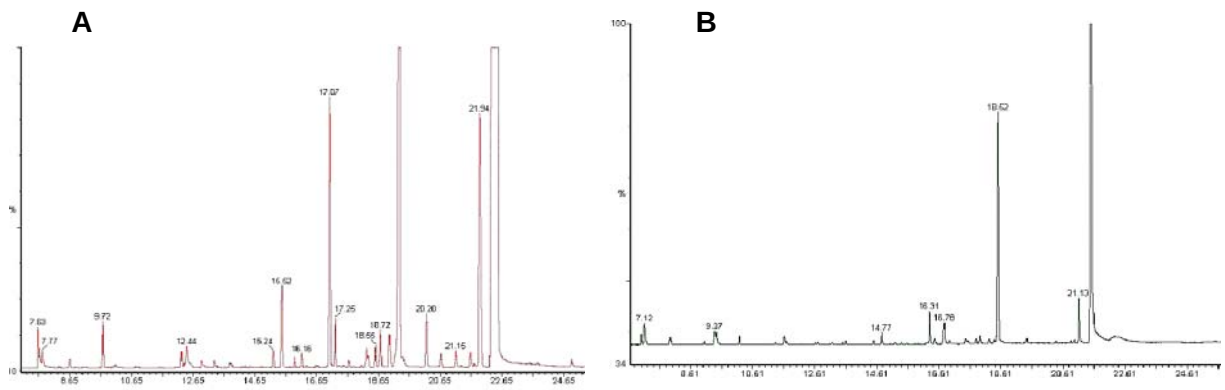


Figure 1. *CFD/DHS-GC profile of crushed leaves* ***(A)*** *and DHS-GC profile of uncrushed leaves* ***(B)***

These preliminary results showed that GC profiles of essential oil (Figure 2) and volatiles emitted from crushed leaves (Figure 1A) by using the CFD had similarities for top and heart notes (*cis*-, *trans*-thujone and 1,8-cineol as major constituents) but also differences, especially for back notes components due to the extraction technique used (hydrodistillation *vs* dynamic headspace).

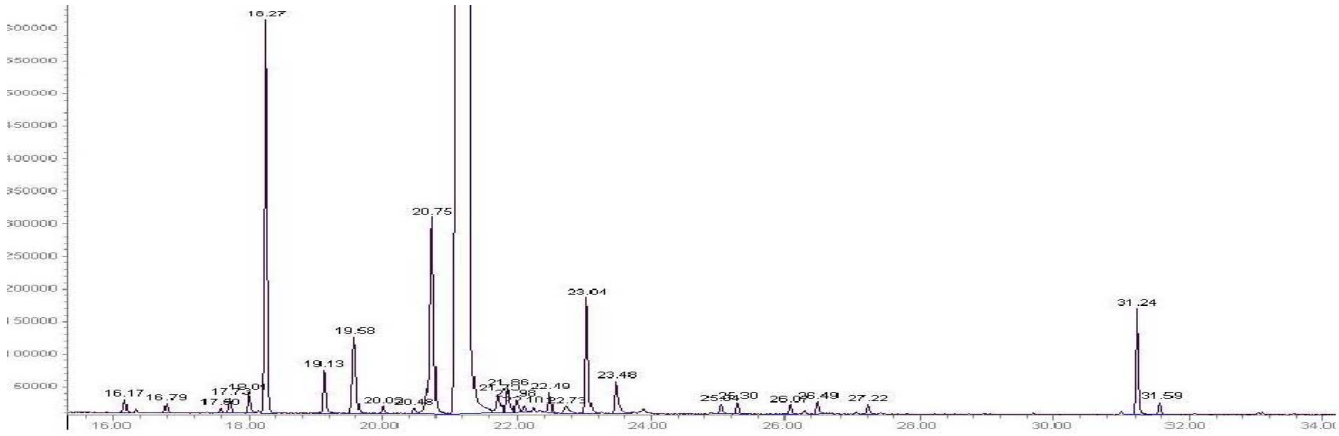


Figure 2. *GC profile of Essential Oil of Tanacetum balsamita.*

The coupling CFD/DHS, demonstrated the potential for rapid evaluation of essential oils from aromatic plant leaves. Indeed, this novel system allowed having a representative finger-print of fresh plant volatiles with similar top and heart notes than the essential oils (qualitatively and quantitatively). Comparison of results obtained with fresh costmary leaves by CFD/DHS-GC/MS *vs* SPME-GCxGC/TOFMS is in progress. The generalization of its use with various medieval aromatic plants from Midi-Pyrénées is suggested. Coupling of CFD/DHS and CFD/SPME with Fast-GC and GC-O for quality control and aroma key compounds identification purposes is being carried out.

References

1. El Kalamouni C. INP Toulouse *Doctorate Thesis,* in progress.
2. Talou T., El Kalamouni C. and Raynaud C. (2008) *Rapid evaluation of essential oil quality based on instrumentalized crushed fresh leaves volatiles assessment.* French Patent trading.
3. Adams R.P. (2001) *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Corporation, Carol Steam, IL.
4. Voigt R.F., Rogers C.H., Fischer E.B. (1938) *J. Am. Phar. Ass.*, 27: 643-654.
5. Bylaite E., Venskutonis R., Roozen J., Posthumus M. (2000) *J. Agric. Food Chem.* 48: 2409-2414.
6. Gallori S., Flamini G., Bilia A., Morelli I., Landini A., Vincieri F. (2001) *J. Agric. Food Chem.* 49: 5907-5910.
7. Monfared A., Davarani S., Rustaiyan A., Masoudi S. (2002) *J. Ess.Oil Res.* 14: 1-2.
8. Baser K.H.C., Demirci B., Tabanca N., Ozek T., Goren N. (2001) *Flav. Frag. J.* 16: 195-200.

Edited by C-T Ho, C. J. Mussinan, F. Shahidi and E. Tratras Contis

Recent Advances in Food and Flavor Chemistry

Food Flavors and Encapsulation, Health Benefits, Analytical Methods, and Molecular Biology of Functional Foods

RSC Publishing

Recent Advances in Food and Flavor Chemistry

Food Flavors and Encapsulation, Health Benefits, Analytical Methods, and Molecular Biology of Functional Foods

Edited by

C.-T. Ho
Rutgers University, New Brunswick, NJ, USA

C. J. Mussinan
International Flavors and Fragrances, Union Beach, NJ, USA

F. Shahidi
Memorial University of Newfoundland, St John's, NL, Canada

E. Tratras Contis
Eastern Michigan University, Ypsilanti, MI, USA

RSC

NATIVE VS EXTRACTED ESSENTIAL OIL: FROM CHEMICAL COMPOSITION TO BIOLOGICAL ACTIVITIES

Chaker El Kalamouni[1], Diana Dobravalskyte[1,2], Christine Raynaud[1], Rimantas Venskutonis[2] and Thierry Talou[1]

[1]Université de Toulouse, INPT, Laboratoire de Chimie Agro-industrielle UMR 1010 INRA-INP, ENSIACET, 4 Allée Emile Monso, 31432 Toulouse
[2]Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology, Department of Food Technology, Radvilenu pl 19 LT-50254 Kaunas

1 INTRODUCTION

Aromatic, medicinal and spicy plants are an immense and sustainable source of natural compounds with various beneficial properties. Such materials have been used since ancient times for various applications, particularly healing of diseases, flavouring of foods and formulation of fragrances. Some of these plants are now grown commercially and produce a variety of ingredients. However, some medicinal and aromatic herbs for some reason have not found wide application and sometimes are referred to as 'forgotten plants'. Taking into account the increasing demand for natural ingredients that might be used as food additives, components of functional foods and nutraceuticals as well as for other applications, it is reasonable to revisit the 'forgotten plants' to assess their applicability and benefits using modern scientific methods. The Midi-Pyrenées region of southwest France has a rich, but sometimes forgotten wild plant heritage, including a remarkable diversity of aromatic and medicinal plants. Recently, the MIPAROM Trek initiative has been conducted to collect and analyse various regional and 'forgotten' aromatic plants, including such species as *Tanacetum balsamita*, *Myrrhis odorata*, *Calamintha grandiflora* and *Monarda didyma*. The first phase in the assessment of these plants includes analysis of their essential oils, antioxidative properties and antimicrobial activity. The essential oil composition and properties of plants grown in various regions of the world and selected for this investigation have been studied previously. For instance, it was reported that the essential oil of *T. Balsamita* grown in Iran contained carvone and β-thujone as the main constituents; the results of the antimicrobial activity of the essential oil, according to the disc diffusion method and minimal inhibition concentration (MIC) values, indicated that the oil exhibited moderate to high antimicrobial activity against eight Gram-positive and Gram-negative bacteria (*Bacillus subtilis*, *B. pumulis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*) and three fungi (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*).[1] In another study, the essential oil of *T. balsamita* subsp. *Balsamita* from Turkey was found to contain *trans*-chrysanthenol, chrysanthenyl acetate, linalool oxide, camphor and 1,8-cineole as the major components. The antimicrobial activities of the oil and two antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria and two yeasts were investigated *in vitro*, and the results showed the oils to possess moderate

activities against all test microorganisms.[2] This example clearly shows that a remarkable diversity in the chemical composition may be characteristic of the same plant species, particularly of those grown in different parts of the world. The chemical composition and antimicrobial activities of essential oil isolated from *M. odorata* were investigated against seven bacterial and six fungal species. Activity against bacteria and *C. albicans* was investigated using the bioautographic test on TLC plates, while all the other fungi were tested using the microdilution test. *M. odorata* oil showed the lowest effect compared to commercial products.[3] The composition of *C. grandiflora* essential oil had been previously studied.[4,5] However, no reports were found in the available literature sources on the antimicrobial and antioxidant properties of this species. Oxidative and microbial deterioration are the main processes damaging huge amounts of foods. Lipid-containing foods can be stored for a limited time period because of their insufficient resistance to oxidation. Moreover, in dry foods, which are more stable from the microbiological point of view, oxygen can easily enter the lipid phase, and the stability of such foods in many cases is substantially lower than in the presence of water. Therefore, the stability of dry foods should be carefully tested and, if necessary, the lipid fraction should be protected by adding antioxidants. During storage of oils, fats and other fat-containing foods, lipid oxidation is still a major cause of food quality deterioration in spite of wide use of several antioxidants. The most widely used synthetic antioxidants, *tert*-butylhydroxyanisole (BHA) and *tert*-butylhydroxytoluene (BHT), are quite volatile compounds and easily decompose at high temperatures.[6] There are some serious questions concerning the safety and toxicity of some synthetic antioxidants related to their metabolism and possible absorption and accumulation in body organs and tissues.[7] Therefore, development of preparations based on the antioxidative properties of natural compounds is highly desirable. The antioxidant extracts isolated from various herbs were reported to be effective in retarding the development of rancidity in oils and fatty foods; however, the antioxidant activity of these extracts depends on the concentration and chemical structure of active antioxidant components in the raw materials. Since ancient times, aromatic plants have been widely used as flavourings. During the last few years they have also become a source of natural antioxidants and antibacterial agents.[8] Essential oils are considered among the most important antimicrobial agents present in plants and may also possess antioxidant and anti-inflammatory activities. The increasing antibiotic resistance of some pathogens that are associated with diseases is another major concern. Therefore, there has been increasing interest in developing new, effective and non-toxic antimicrobial compounds. Several authors have proposed essential oils as natural preservative agents.[9]

In the present study, a preliminary screening of antioxidant and antimicrobial activities of Midi-Pyrenées aromatic plants grown in France, namely *Tanacetum balsamita, Calamintha grandiflora, Myrrhis odorata* and *Monarda didyma*, was carried out. Essential oils from these plants were added to sunflower oil, and oxidative deterioration was measured by the Oxipress method. The antimicrobial activities of the essentials oils were evaluated against nine pathogenic bacteria present in various foods.

We have designed an apparatus,[10] to mimic the crushing of leaves between your fingers as done by farmers or flavorists to sensorially evaluate the odor of aromatic plants. This so-called Artificial Crushing Finger (ACF) device was based on a modified artificial mouth and allows us to perform a rapid evaluation of the essential oil with only a couple of leaves using a controlled Dynamic Headspace (DHS) concentration of the volatiles emitted by the crushed fresh leaves. In the present paper we report the comparison of the chromatographic profiles of essential oil of leaves of our model plant, *Calamintha grandiflora*,[11] with the ones obtained with leaves processed by ACF-DHS.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Volatile Analysis

The ACF was swept with nitrogen (60 mL/min). The crushing of leaves was set up using a motorized Teflon piston having transverse and rotative movements. Emitted volatiles were then concentrated on a Tenax trap located at the top of the device during 10 minutes; three replicates were performed.

2.1.1 Static Headspace (ACF/SPME)

Two entire fresh leaves of *Calamintha Grandiflora* were placed in the glass reactor of the ACF. Volatiles emitted after crushing were absorbed during 10 min using a SPME syringe equipped with a Carboxen/PDMS/DVB fiber. Three replicates were performed.

2.1.2 Gas Chromatographic Analysis

Volatile analysis (SPME) was performed on a Varian 3900 gas chromatograph equipped with FID and an Agilent 5973 Network GC-MS. (DHS/ACF, EO) analysis was performed with a Perkin Elmer Clarus 500 GC-MS-FID equipped with a TurboMatrix TD thermodesorber. A fused-silica DB5 column (0.25 mm x 30 m, 0.25 µm film thickness) was used throughout this study. Temperature program used was: 30°C for 5min, then 5°C/min up to 200°C and 10 min isotherm at 200°C. Identification of volatiles was based on comparison of their retention times with those of authentic samples (calculated RI based on n-hydrocarbons series kit) and on computerized matching with a commercial mass spectra data bank (NIST 2005 and Wiley)

2.2 Plant Materials

The leaves of costmary, also known as alecost, balsam herb, Bible leaf (*Tanacetum balsamita* L.), cicely or sweet cicely (*Myrrhis odorata* L. Scop.), large flowered calamint (*Calamintha grandiflora* L. Moench.) and bergamot, also known as scarlet beebalm, scarlet monarda, oswego tea, or crimson beebalm (*Monarda didyma* L.) were used in the study. The plants were collected in Midi-Pyrenées (south west of France) in April–May 2008 at the vegetation phase which is considered preferable in terms of the functional properties of herbs. Essential oils were isolated from ground plants by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus.

2.3 Antioxidant Test

The antioxidant activity of the essentials oils was determined in sunflower oil, using an Oxipress apparatus (Mikrolab Aarhus, Denmark). In the course of oxidation, oxygen consumption is evaluated by measuring changes in its pressure in a hermetically sealed 200 ml vessel containing oxygen and a sample. Five grams of sunflower oil (pure, with essential oils and with the synthetic antioxidant BHT) were placed in the reactor which was connected to the pressurized oxygen cylinder; first, it was washed with oxygen and afterwards filled with oxygen to reach the defined initial pressure (0.5 MPa). The experiments were carried out at a temperature of 110°C in triplicate. The relative standard deviation was in the range of 0.1 to 3%; in rare cases when it was higher, additional measurements were performed. The induction period (*IP*) of oxidation was read at the time

when the pressure began to decrease abruptly (the end was measured from the cross-section point of tangents of the first part and the subsequent part of the curve recording the pressure changes, as evident from Figure 1). The protection factor (*PF*) value of sunflower oil in case of using essential oils and their antioxidant activities (*AA*) were calculated by the following formulas:

$$PF = \frac{IPX}{IPK}$$

$$AA = \frac{IPX - IPK}{IPBHT - IPK}$$

Where IPX is the induction period of a sample with an additive:
IPK is the induction period of a sample without an additive:
IPBHT is the induction period of a sample containing the synthetic antioxidant BHT;

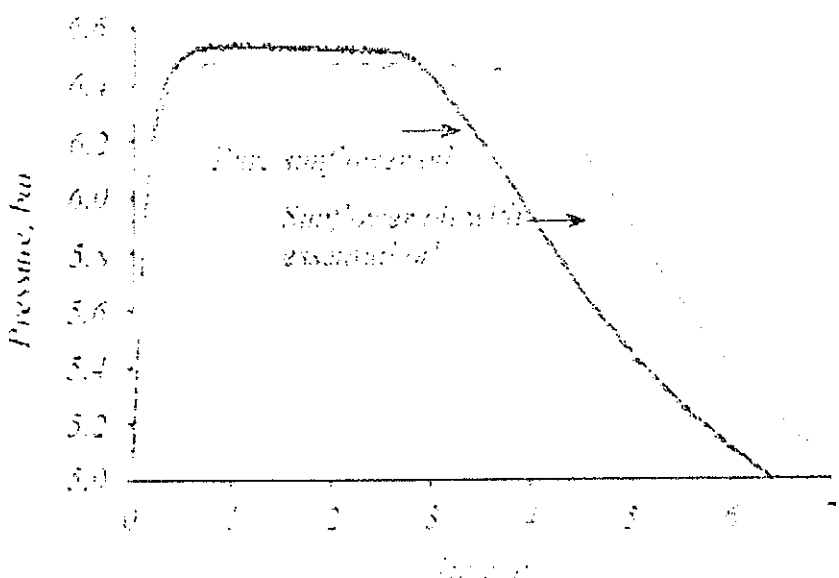


Figure 1: *Sunflower oil oxidation curves at 110 °C*

2.4 Antimicrobial Test

Nine food spoilage bacteria, including Gram-positive, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and Gram-negative pathogens, namely *Salmonella typhymurium*, *Salmonella typhymurium D338*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella agona* and *Escherichia coli*, were used in this study. The antimicrobial properties were evaluated by the agar diffusion method. Bacteria were grown in plate count agar (CM 325, Oxoid) for 24 h at 37 °C. After cultivation, test culture cells were mixed using an *MSI* mini shaker (Wilmington, USA), and the cell suspensions were adjusted according to McFarland no. 0.5 standard. The suspension of bacteria cells in saline (2 mL) was introduced into the dissolved agar media; 10 mL of each bacteria culture was pipetted into a 90 mm Petri dish. Eight-millimeter diameter wells were pushed in the agar and filled with methanolic solutions of oils. The plates were incubated overnight at 37 °C. A 10 µL volume of 1.0 and 0.5% methanolic solutions of the essential oils was added to the agar wells. Pure methanol was used as a control in the blank samples. After incubation, the

inhibition zones were measured with calipers to an accuracy of 0.1 mm, and the effect was calculated as a mean of three replicate tests. An appropriate reference antibiotic disc was applied on each plate depending on the test micro organisms (ceftazidine/clavulanic acid, 30/10 μg; *BBL, CAZ/CLA, 231753*); they served as a positive control, as they are effective against all species used in the study.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The Oxipress method, which was used to evaluate the antioxidant activity of essential oils, is a very convenient procedure performed without any chemicals. Typical curves of oxidation are presented in Figure 1. The change of pressure at the end of the induction period can be rather precisely measured. As shown in Figure 1, when adding plant essential oil to sunflower oil, the pressure drop was delayed for some period of time, indicating the antioxidative effect of the added substance. The effects of the applied essential oils at 0.05, 0.1 and 0.2% concentrations are summarized in Table 1. The essential oil of *M. didyma* was found to be the most effective natural antioxidant measured compared to the other essentials oils tested. The effectiveness of these essentials oils decreased in the following order: *M. didyma* > *C. grandiflora* > *M. odorata* > *T. balsamita*. Essential oils are complex mixtures of volatile natural compounds, and their total antioxidant capacity depends on the presence of the most active components and their concentration in the oil. For instance, such phenolic compounds as thymol, which is present in many essential oils, particularly in those isolated from plants belonging to the genus *Thymus*, possess high antioxidant strength due to the presence of the phenolic hydroxyl group. It was also suggested that the presence of an electron donating group *ortho* to the hydroxyl moiety may be crucial for effective antioxidant activity. *M. didyma* essential oil contained up to 50% thymol which may explain its comparatively high antioxidant activity. The chemical composition of the essential oil obtained from *M. didyma* had been analysed previously. The antioxidant activity of the oil was evaluated by the DPPH test and was found to be comparable to Trolox, and by the lipid peroxidation test where the activity of the oil was similar to that of BHT.[12] Antioxidant activity of the essential oils was dose dependent. In the case of the highest dose (0.2%) of *M. didyma*, *C. grandiflora* and *M. odorata*, it exceeded the antioxidant capacity of BHT added at a concentration of 0.02%. The main components in the essential oils of *C. grandiflora*, *T. balsamita* and *M. odorata* were menthone, β-thujone and anethol, respectively.

Antimicrobial activity of the methanol solutions of essentials oils was evaluated *in vitro* against nine bacteria species known to cause infections in humans (Table 2). Gram-positive bacteria are more sensitive than Gram-negative, especially *Bacillus cereus*, which was the most sensitive species in the case of *M. didyma* essential oil at a concentration of 1%. *M. didyma* oil showed the inhibitory effect against all test cultures. Most likely the high percentage of the strong antimicrobial agent thymol in *M. didyma* essential oil was the main factor for its pronounced antimicrobial activity. It is in agreement with the previously published results; e.g., thymol-rich essential oils from *Thymus pulegioides* were strong antimicrobial substances against various pathogenic bacteria [14]. The fungicidal activity of *Thymus vulgaris* oil correlated also with the content of thymol [15]. The antifungal activity of *M. didyma* oil was evaluated against four phytopathogenic fungi through direct contact using the agar diffusion method and via the fungistatic action of the vapours

Table 1. *Antioxidant activity (AA) of essential oils compared to BHT and their effect on the stability of sunflower oil, expressed in protection factor values (PF)*

Additive	Concentration %	(PF)	Antioxidant Activity (AA)
Without additive	0.00	1.00	-
BHT	0,02	1,47	1,00
Monarda didyma	0,2	1,73	1,55
Monarda didyma	0,1	1,37	0,79
Monarda didyma	0,05	1,29	0,62
Calamintha grandiflora	0,2	1,63	1,34
Calamintha grandiflora	0,1	1,22	0,47
Calamintha grandiflora	0,05	1,18	0,38
Myrhis odorata	0,2	1,61	1,30
Myrhis odorata	0,1	1,2	0,43
Myrhis odorata	0,05	1,17	0,36
Tanacetum balsamita	0,2	1,41	0,87
Tanacetum balsamita	0,1	1,2	0,43
Tanacetum balsamita	0,05	1,1	0,21

Table 2. *Antimicrobial activity of the essential oils at different concentrations, expressed in the diameter of inhibition, mm; na – not active*

Bacterial Species	*M.didyma*		*C.grandiflora*		*M.odorata*		*T.balsamita*		Antibiotic
	1%	0,50%	1%	0,50%	1%	0,50%	1%	0,50%	sensi-disc
Bacillus subtilis	16,5	12,8	19,1	8,5	9,2	8,5	10,2	8,2	16,8
Bacillus cereus	40	13,1	9,8	10,6	10,6	9,9	11,4	8,8	29,0
Staphylococcus aureus	13,1	10,2	9,7	na	8,8	na	9	na	21,0
Staphylococcus epidermidis	14,7	11,5	10	na	9,1	na	8,5	na	25,8
Salmonella typhimurium	15	11	8,9	na	8,1	na	8,4	na	31,2
Salmonella typhymurium D338	16,2	12,2	9,3	8,8	9	na	9,7	na	34,0
Salmonella Enteritidis	15,2	11,5	10,1	9,1	8,1	na	8,9	na	32,2
Salmonella agona	13,8	10,7	8,4	na	na	na	na	na	20,8
Esherichia coli	18,9	14,4	10,3	na	10,2	na	9,7	na	26,4

using the micro-atmosphere method. The most sensitive fungus was *Rhizoctonia solani* in the first test.

T. balsamita and *M. odorata* oils at 0.5% possessed a weaker antimicrobial activity against the majority of test bacteria compared to the other essentials oils applied at the same concentration; they showed antibacterial activity only against *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. Comparing *Salmonella* spp., *Salmonella agona* was the most resistant species. The smallest zones of inhibition were measured for most of the applied essential oils. *C. grandiflora* oil applied at a concentration of 1% was the most effective antimicrobial agent against *Bacillus subtilis* compared to the other oils. The inhibitory effect of *M. didyma* oil (1%) against *Escherichia coli, Salmonella enteritidis, Salmonella typhymurium* and *Staphylococcus epidermidis* was about half that of the reference antibiotic compound; however, in case of *Bacillus subtilis*, the effect of *M. didyma* oil was equal to that of the antibiotic compound.

The composition of the yellow colored essential oil of *Calamintha grandiflora* obtained with a yield of 0,35% on a dry weight basis, conformed to that reported in the literature[11] where menthone, isomenthone and neo-isomenthol were the main volatiles (Table 3). Isomenthone was reported as the main compound of the essential oil (34.65%) while menthone was the main volatile identified in crushed leaves using SPME (21.16%) and Tenax (37.81%).

These preliminary results show that GC profiles of the essential oil (Figure 2) and the volatiles from leaves crushed using the ACF (Figures 3-4) had similarities for top and heart notes (menthone, isomenthone as major constituents) but also differences, especially for back note components due to the extraction technique used (hydrodistillation *vs* dynamic headspace) .

4 CONCLUSIONS

The ACF (Artificial Crushing Finger) device combined with dynamic headspace sampling demonstrated real potential for the rapid evaluation of essential oils from aromatic plant leaves. Indeed, this novel system gave a fingerprint of fresh plant volatiles with top and heart notes similar to those of the essential oil (qualitatively and quantitatively) .

A preliminary screening of the bioactivity of *Tanacetum balsamita, Calamintha grandiflora, Myrrhis odorata* and *Monarda didyma* essential oils showed the volatile fractions of these plants to possess antioxidant activity in vegetable oil and antimicrobial activity against various pathogenic bacteria. These results suggest the need for further study of these plants to assess their wider application in the production of valuable ingredients. Further studies should focus on the non-volatile fraction of the plant material.