



UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE 1

**INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION
ET DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES
I.N.A.T.A.A.**

Département de Biotechnologie

N° d'ordre : 49/D3C/2023

N° de série : 02/INT/2023

Thèse de Doctorat 3^{ème} cycle

Filière : Sciences Alimentaires

Spécialité : Sciences alimentaires et Biotechnologie

Présentée par :

Karima BENGUEDOUAR

**Analyse de la composition chimique et évaluation des propriétés
biologiques des huiles essentielles de trois plantes aromatiques et
médicinales (*Thymus willdenowii*, *Aloysia citriodora* et *Cymbopogon
citrat*) et impact de leur incorporation dans le yaourt étuvé**

Soutenue le : 11 /07/2023

Devant le Jury composé de :

Président (e) :	Samira BECILA	Prof.	Université Frères Mentouri Constantine1
Promoteur :	Malika BARKAT	Prof.	Université Frères Mentouri Constantine1
Co-Promoteur :	Soumeya BENCHARIF- BETINA	M.C.B.	Université Frères Mentouri Constantine1
Examineurs :	Ramazan ERENLER	Prof.	Gaziosmanpasa University, Tokat, Turkey
	Zoubida BENMAKHLOUF	M.C.A.	Centre Univ. Abdelhafid Boussouf Mila
	Imène LAIB	M.C.A.	Université 20 août 1955, Skikda

Année universitaire 2022-2023

Remerciements

Il m'est tout d'abord agréable de remercier ma directrice de thèse, Madame le Professeur BARKAT Malika, qui m'a accueillie dans son laboratoire BIOQUAL et qui a dirigé ce travail de recherche. J'ai ainsi eu la chance de bénéficier de ses encouragements pendant les durs moments de doute et de découragement. Elle m'a donnée sa confiance, son temps et a su me faire transmettre son goût pour la rigueur. Merci pour vos précieux conseils.

Ce travail a également été co-encadré par Docteur BETINA BENCHARIF Soumeiya, grâce à vous j'ai pu apprendre et appréhender un monde qui m'était inconnu jusqu'alors : le monde des huiles essentielles. Merci pour vos précieux conseils, pour la grande compétence et l'humanisme qui vous caractérisent.

Je remercie infiniment Madame le Professeur BECILA Samira qui a bien voulu assumer la présidence du jury, tout en lui témoignant mon admiration pour sa force de caractère. Elle compte parmi les personnes qui m'ont formée scientifiquement. Merci pour vos encouragements et votre soutien moral.

Professeur ERENLER Ramazan, c'est un honneur pour moi de présenter mon travail devant vous et de prendre de votre temps pour siéger dans mon jury de thèse. Votre expérience et rigueur ne feront qu'enrichir ce travail.

Docteur BENMAKHLOUF Zoubida, merci d'avoir accepté avec tant d'enthousiasme de nous faire partager vos impressions avisées en examinant ce travail. C'est un immense honneur de profiter de votre expérience et de prendre en considération vos recommandations.

Docteur LAIB Imen, votre intérêt pour le domaine de l'alimentaire et votre expérience ne feront que valoriser notre travail, vos conseils ne seront qu'enrichissants et bénéfiques, merci d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je n'oublierai pas de remercier Dr. Genç Nusret du laboratoire de Chimie de l'université Gaziosmanpasa et Dr. Gok Mesut de l'université de Siirt qui m'ont consacré du temps et permis d'effectuer quelques analyses.

Un grand merci est adressé au Professeur Yusuf YANAR et son équipe à leur tête Dr. Sabriye BELGÜZAR du département de Protection des plantes à l'université Gaziosmanpasa, Turquie, je vous exprime toute ma gratitude pour le temps que vous m'avez consacré.

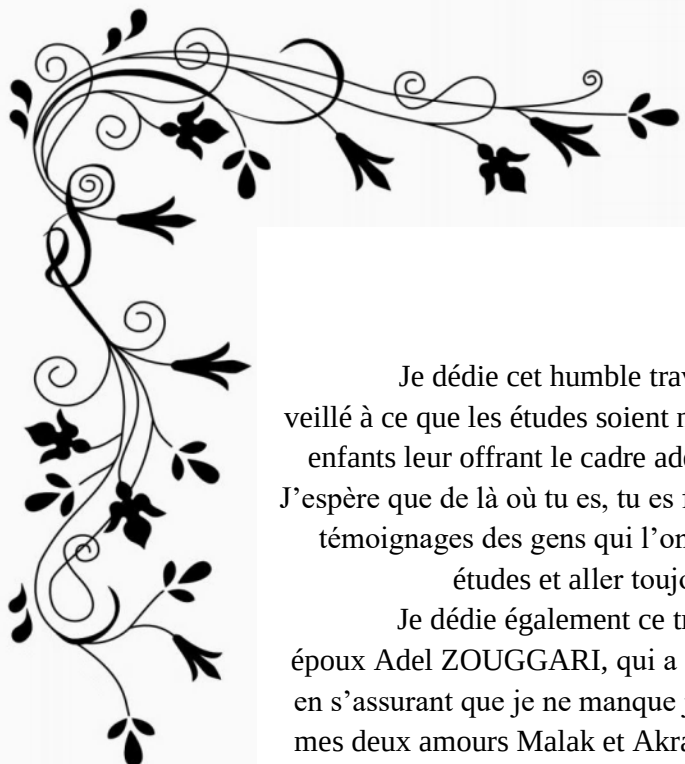
Un grand merci à toute l'équipe du CRBt qui m'a suivie et à leur tête Docteur Nassim Madi qui avec son humanisme et professionnalisme a su m'encourager et me fournir le nécessaire afin de réaliser mes travaux. Sans oublier son équipe : Dr. Loubna Mekdade, Assia Ikhlef et Asma Meghezzi.

Mes remerciements vont également vers le Docteur Chawki Bensouici qui m'a accueillie dans son laboratoire de biochimie et a été patient et très gentil avec toute son équipe : Lynda Gali, Karima Ouffroukh.

Je n'oublierai pas les bons moments que j'ai passé au laboratoire de Biotechnologie animale à leur tête Docteur Smadi Mustapha Adnène qui m'a été d'un grand support ainsi que son équipe de choc : Medjedoub Sarra, Lamamria Romeissa, Aroui Dounia, Sedira chemseddine et Aissous Redouane. Merci infiniment de m'avoir créé l'environnement adéquat pour réussir mes travaux.

Un grand merci est adressé au Directeur de l'Institut National de la Recherche Forestière Docteur ZANDOUCHE Ouahid et son honorable équipe d'extraction des huiles essentielles.

Sans oublier toute l'équipe de la laiterie GIPLAIT de Constantine, Alger et Boudouaou qui ont accepté de m'accueillir en stage, ce fut une très bonne expérience pour moi.



Dédicaces

Je dédie cet humble travail à la mémoire de ma maman qui a toujours veillé à ce que les études soient notre priorité, elle a sacrifié toute sa vie pour ses enfants leur offrant le cadre adéquat pour persévérer et apprendre davantage. J'espère que de là où tu es, tu es fière de moi toi et mon cher père qui, d'après les témoignages des gens qui l'ont connu, souhaitait nous voir percer dans nos études et aller toujours de l'avant comme il le faisait.

Je dédie également ce travail aux membres de ma petite famille ; mon époux Adel ZOUGGARI, qui a su m'encourager à toujours aller de l'avant tout en s'assurant que je ne manque jamais de rien, merci du fond du cœur à toi et à mes deux amours Malak et Akram qui à leur âge connaissent la biotechnologie mieux que moi maintenant !

A toi ma sœur adorée, sans toi je n'aurai pas pu aller au bout de ce chemin périlleux, tu as toujours su comment me sortir des moments de doutes et d'abandon et m'encourager tout en m'offrant ton support scientifique et affectueux, aucun merci ne suffira à représenter tes vraies valeurs. Sans oublier ta petite famille Ryad, Wassim et Meriem.

Je dédie également ce travail à mon grand frère Mamine, pilier de notre famille qui m'a toujours fait sentir que j'étais à la hauteur de ce travail sans oublier son épouse Soulef et ses enfants Maya et Zakaria.

J'adresse mes vifs remerciements au directeur de l'INATAA le Professeur Boudjellal Abdelghani ainsi qu'à tous les enseignants qui m'ont apporté du savoir pour toujours aller de l'avant, merci Professeur Kharroub Karima, Dr Sebti Mohamed, Dr Bechkri Sarah, Dr Maougal Rym, Dr Bouchedja Neila, Dr Kechid Maya, Dr Gagaoua Mohamed, Dr Benchikh Yassine et Dr El Hade El Okki Mohamed.

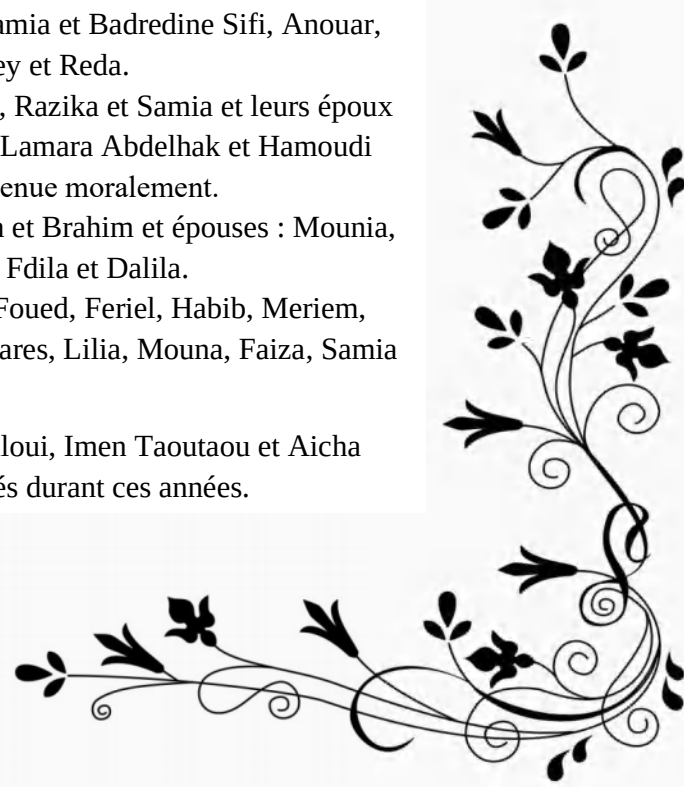
A Ma belle-famille : Hadja Rahima, Lamia et Badredine Sifi, Anouar, Mouna, Selma, Hadjer, Bey et Reda.

A vous mes chères tantes : Lydia, Saida, Razika et Samia et leurs époux respectifs Betina Kaddour, Gradin Boubaker, Lamara Abdelhak et Hamoudi Azzedine qui m'ont toujours soutenue moralement.

A mes oncles Benguedouar Amar, Salah et Brahim et épouses : Mounia, Dalila, lynda ainsi que Samira, Fdila et Dalila.

A mes cousins et cousines : Sabrina, Foued, Ferial, Habib, Meriem, Doria, Sandra, Radia, Nadia, Maroua, Didine, Fares, Lilia, Mouna, Faiza, Samia et Djalila

A mes amies de toujours : Karima Laloui, Imen Taoutaou et Aicha Karoui, merci d'avoir été à mes côtés durant ces années.



Liste des productions scientifiques

Publication :

Benguedouar, K., Betina, S.B., Erenler, R., Genç, N., Gok, M., Sebti, M., Madi, N., Mekdade, L., Gali, L., Barkat, M., 2022. Evaluation of the antioxidant properties and total phenolic content of a dairy product (yogurt) supplemented with *Thymus wilsonianus* essential oil from Algeria. *Journal of Food Measurement and Characterization* 1–10. <https://www.springer.com/journal/11694>

Communications nationales :

- 1) **Benguedouar K.**, Bencharif Betina S., Erenler R., Barkat M. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de Verveine contre deux souches lactiques utilisées en Industrie laitière. Séminaire National sur les Biotechnologies en Algérie : Quelles biotechnologies pour un développement durable ? École National Supérieure de Biotechnologie, Constantine. 3-4 Décembre 2019. <https://www.ensbiotech.edu.dz/fr/formations/formation-continue/19-evenement/1326-2seminaire-nationale-sur-les-biotechnologies-en-algerie>
- 2) **Benguedouar K.**, Bencharif Betina S., Barkat M. Extraction, détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de Verveine et évaluation de son activité antibactérienne contre quelques bactéries pathogènes. Valorization of medicinal plants to fight cell damage, Université Larbi Ben M'Hidi – Oum El Bouaghi. 18-19 Octobre 2019.
- 3) **Benguedouar K.**, Bencharif Betina S., Barkat M. Effet des HEs de plantes aromatiques sur des bactéries lactiques utilisées en industrie alimentaire. Séminaire national de biodiversité, biologie médicale et écotoxicologie environnementale. Université 20Aout1955 – Skikda. 30-31 Octobre 2019. <http://fs.univ-skikda.dz/documents/Snbsee-2019.pdf>
- 4) **Benguedouar K.**, Bencharif Betina S., Barkat M. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus hirtus* contre quelques bactéries pathogènes. Séminaire national sur la microbiologie et les sciences alimentaires. Université Mohamed Seddik Benyahia-Jijel. 06-07 Novembre 2019.

Communications internationales :

- 1) **Benguedouar K.**, Bencharif Betina S., Erenler R., Genç N. Madi N., Ikhlef A., Barkat M. Extraction, analyse de la composition par GC/MS, activité antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* contre des bactéries pathogènes et Probiotiques. Third International Symposium : Medicinal Plants and Materials (MPM-2020). Université LaarbiTebessi – Tébessa. 25-27 Février 2020. <https://mpm-2020dz.sciencesconf.org/>
- 2) **Benguedouar K.**, Bencharif Betina S., Barkat M. Evaluation de l'effet de l'huile essentielle d'une plante médicinale et aromatique d'Algérie : *Thymus hirtus* sur les bactéries starter du yaourt. Séminaire international sur les sciences naturelles et de la vie en ligne (webinaire). International Journal of Human Settlements /Oran. 19- 20 Février 2021. <https://www.aneau.org/ijhs/>
- 3) **Benguedouar K.**, Bencharif Betina S., Erenler R., Barkat M. Activité antifongique de l'huile essentielle de *C. citratus* (citronnelle) contre un champignon phytopathogène : *fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. The 1st International Seminar on technological innovations in the service of sustainable agriculture (SIITA ,2021). 18-19 Octobre 2021. http://www.centre-univ-mila.dz/?u_event=the-1st-international-seminar-on-technological-innovations-in-the-service-of-sustainable-agriculture-siita-2021&lang=en
- 4) **Benguedouar K.**, Bencharif Betina S., Erenler R., Madi N., Barkat M. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *T. hirtus* d'Algérie contre *Salmonella enteritidis* responsable de toxi-infections alimentaires. The 1st International Webinar on Innovative Applications of Biotechnologies in the Food Industry: From the Laboratory to The Enterprise (WAIBIA). INATAA, UPMC1. 01-02 Décembre 2021. https://fac.umc.edu.dz/inataa/waibia/files/WAIBIA2021_Affiche.pdf

Membre du comité d'organisation de manifestations scientifiques :

- 1) 1st International Seminar on Technological Innovations In The Service Of Sustainable Agriculture (SIITA 2021). Université Abdelhafid Boussouf, Mila, Algérie.
- 2) 1er Webinaire International sur les Applications Innovantes des Biotechnologies en Industrie Alimentaire : du Laboratoire à l'Entreprise (WAIBIA 2021). INATAA, UPMC1, Algérie.

Liste des figures

Figure 1. Origine des différents radicaux libres oxygénés et (RLO) et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) impliqués en biologie	10
Figure 2. Transformation du radical DPPH• en DPPHH	11
Figure 3. Mécanismes chimiques de la méthode d'Ellman	16
Figure 4. Photo de <i>Thymus wilddenowii</i>	27
Figure 5. Photo de plante <i>Cymbopogon citratus</i>	30
Figure 6. Photo de <i>Aloysia citriodora</i>	34
Figure 7. Composés aromatiques majoritaires dans le yaourt	42
Figure 8. Aspect interactif entre <i>L. bulgaricus</i> et <i>S. thermophilus</i> dans le yaourt	48
Figure 9. Récapitulation de la démarche expérimentale	52
Figure 10. Photos des trois espèces de plantes sélectionnées	54
Figure 11. Sites de collecte (d'approvisionnement) des trois espèces de plantes sélectionnées	54
Figure 12. Dispositif Clevenger	56
Figure 13. Dispositif du test de cytotoxicité des larves d' <i>Artémia salina</i> (Brine Shrimp).....	65
Figure 14. Diagramme de fabrication des yaourts	68
Figure 15. a. Profil des informateurs ayant participé au sondage selon le genre	75
Figure 15. b. Profil des informateurs ayant participé au sondage selon l'âge	75
Figure 15. c. Profil des Informateurs ayant participé au sondage selon le niveau d'instruction	75
Figure 15. d. Répartition des informateurs selon les wilayas d'appartenance	76
Figure 16. a. Degré de Connaissance des informateurs des plantes aromatiques.....	76
Figure 16. b. Degré de Connaissance des informateurs du thym, de la verveine et de la citronnelle	77
Figure 17. a. Différentes appellations attribuées au thym par les informateurs	78
Figure 17. b. Différentes appellations attribuées à la verveine par les informateurs	78
Figure 17. c. Différentes appellations attribuées à la citronnelle par les informateurs	79
Figure 18. Critères d'identification du thym, de la verveine et de la citronnelle	80
Figure 19. Lieux d'achat du thym, de la verveine et de la citronnelle	81
Figure 20. Raisons d'utilisation du thym, de la verveine et de la citronnelle	82
Figure 21. Parties végétatives utilisées du thym, de la verveine et de la citronnelle	83
Figure 22. Initiations à l'utilisation du thym, de la verveine et de la citronnelle	83

Figure 23. Utilisation des huiles essentielles du thym, de la verveine et de la citronnelle.....	84
Figure 24. Rendements d'extraction en huiles essentielles du thym, de la verveine et de la citronnelle	86
Figure 25. Observations microscopiques des poils sécréteurs (au grossissement 2,5 X 40).....	87
Figure 26. Spectres des composés révélés dans l'HE de <i>T. wilddenowi</i> par GC/MS	89
Figure 27. Spectres des composés révélés dans l'HE de <i>C. citratus</i> par GC/MS	91
Figure 28. Spectres des composés révélés dans l'HE d' <i>A. citriodora</i> par GC/MS	93
Figure 29. a. Observations macroscopique de l'effet antibactérien des HEs de thym, de la verveine et de la citronnelle sur les bactéries pathogènes sélectionnées	101
Figure 29. b. Observation macroscopique de l'effet des HEs de thym, de la verveine et de la citronnelle sur les bactéries lactiques étudiées	102
Figure 30. Modes d'action des HEs sur les bactéries	105
Figure 31. Résultats des activités anti acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase sur microplaque	110
Figure 32. Résultats de l'activité anti uréase sur microplaque	111
Figure 33. a. Aspect microscopique des bactéries lactiques <i>L. bulgaricus</i> et <i>S.thermophilus</i> dans les différents yaourts formulés au J1 du stockage	117
Figure 33. b. Aspect microscopique des bactéries lactiques <i>L. bulgaricus</i> et <i>S.thermophilus</i> dans les différents yaourts formulés au J28 du stockage	117
Figure 34. Variation de l'acidité titrable des yaourts formulés durant le stockage	120
Figure 35. Evolution des pH des yaourts formulés durant le stockage	121
Figure 36. Comparaison des pH des yaourts formulés durant le stockage	122
Figure 37. Activité antioxydante des yaourts formulés évaluée par le test ABTS	125
Figure 38. Comparaison de l'activité antioxydante des Yaourts YST, YSC et YSV au contrôle YN (évaluée par le test ABTS)	126
Figure 39. Effet de l'incorporation des HEs sur l'activité antioxydante des yaourts formulés (évaluée par le test CUPRAC)	129
Figure 40. Comparaison de l'activité antioxydante des yaourts formulés YST, YSC et YSV au contrôle YN (évaluée par le test CUPRAC)	130
Figure 41. Effet de l'incorporation des HEs sur les valeurs de l'activité antioxydante des yaourts (évalués par le test ORAC)	131

Figure 42. Comparaison de l'activité antioxydante des yaourts formulés (évaluée par le test ORAC).....	132
Figure 43. Activité antioxydante des bactéries lactiques fermentées en absence des HEs (évaluée par le test ORAC)	135
Figure 44. Activité antioxydante des bactéries lactiques fermentées en présence HEs (évaluée par le test ORAC)	137
Figure 45. Evolution et comparaison de la production de l'acide lactique au cours du stockage des yaourts formulés	139
Figure 46. Evolution et comparaison de la production de l'acide formique au cours du stockage des yaourts formulés	141
Figure 47. Evolution et comparaison de la production de l'acide acétique au cours du stockage des yaourts formulés	143
Figure 48. Evolution et comparaison de la production de l'acide citrique au cours du stockage des yaourts formulés	144
Figure 49. Evolution et comparaison de la production de l'acétaldéhyde au cours du stockage des yaourts formulés	146
Figure 50. Teneurs moyennes en composés phénoliques totaux des des HEs du thym, de la verveine et de la citronnelle.....	148
Figure 51. Teneurs moyennes en composés phénoliques totaux des yaourts formulés.....	148
Figure 52. Comparaison des teneurs en composés phénoliques totaux des yaourts formulés	149
Figure 53. Analyse sensorielle des yaourts formulés	151

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des terpénoides	2
Tableau 2. Synonyme du yaourt dans différents pays	37
Tableau 3. Valeur nutritionnelle moyenne des yaourts	40
Tableau 4. Critères microbiologiques du yaourt à l'échelle industrielle	41
Tableau 5. Liste de quelques travaux antérieurs d'incorporation des HEs dans le yaourt.....	50
Tableau 6. Souches bactériennes testées	60
Tableau 7. CL50 de référence du test de cytotoxicité	66
Tableau 8. Caractéristiques organoleptiques des HEs extraites	87
Tableau 9. Composition chimique de l'HE de <i>T. wilddenowii</i>	88
Tableau 10. Composition chimique de l'HE de <i>C. citratus</i>	90
Tableau 11. Composition chimique de l'HE d' <i>A. citriodora</i>	92
Tableau 12. Activité antiradicalaire des huiles essentielles de <i>T. will.denowii</i> , <i>C. citratus</i> et <i>A. citriodora</i> (révélée par le test DPPH)	94
Tableau 13. Activité antioxydante des HEs de <i>T. wilddenowii</i> , <i>C. citratus</i> et <i>A. citriodora</i> (révélée par le test ABTS)	95
Tableau 14. Activité antioxydante des Huiles essentielles de <i>T. wilddenowii</i> , <i>C. citratus</i> et <i>A. citriodora</i> (révélée par le test CUPRAC)	95
Tableau 15. Activité antioxydante des Huiles essentielles de <i>T. wilddenowii</i> , <i>C. citratus</i> et <i>A. citriodora</i> révélée par le test de réduction de fer	96
Tableau 16. Activité antioxydante des huiles essentielles de <i>T. wilddenowii</i> , <i>C. citratus</i> et <i>A. citriodora</i> (révélée par le test de blanchissement du β -carotène/acide linoléique)	96
Tableau 17. Récapitulation des différents paramètres de l'activité antibactérienne (CMI, CMB) des huiles essentielles de <i>T. wilddenowii</i> , <i>C. citratus</i> , et <i>A. citriodora</i>	103
Tableau 18. Pourcentages d'inhibitions des huiles essentielles de <i>T. wilddenowii</i> , <i>C. citratus</i> , <i>A. citriodora</i> testées pour l'activité fongique sur de <i>Fusarium oxysporum</i> <i>F. sp licopersici</i>	107
Tableau 19. Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase.....	108
Tableau 20. Activité inhibitrice de l'uréase	110
Tableau 21. Activité inhibitrice de l' α -amylase	112
Tableau 22. Activité inhibitrice de la tyrosinase	113
Tableau 23. Valeurs de LC50 des trois huiles essentielles testées	114
Tableau 24. Analyse microbiologique des yaourts préparés	118

Tableau 25. Acidité titrable des yaourts formulés durant le stockage	119
Tableau 26. pH des yaourts formulés durant le stockage	120
Tableau 27. Activité antioxydante des yaourts formulés (évaluée par le test ABTS)	123
Tableau 28. Activité antioxydante des yaourts formulés (évaluée par le test CUPRAC)	127
Tableau 29. Activité antioxydante des yaourts formulés (évaluée par le test ORAC)	130
Tableau 30. Activité antioxydante des bactéries lactiques fermentées sans HEs (évaluée par le test ORAC)	134
Tableau 31. Activité antioxydante des bactéries lactiques fermentées en présence des HEs évaluée par le test ORAC	134
Tableau 32. Effet de l'incorporation des HEs sur la teneur en acides organiques et arôme.....	138
Tableau 33. Teneurs moyennes en composés phénoliques totaux des HEs	147
Tableau 34. Teneurs moyennes en composés phénoliques totaux des yaourts formulés.....	147

Liste des abréviations

AAPH : 2,2'-azo-bis (2-méthylpropionamidine dichlorhydrate)

ABTS : 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

ATCC : American Type Culture Collection

AUC : Area under the curve (aire sous la courbe)

BL : Bactéries Lactiques

BHA : ButylHydroxyAnisole

BHT : ButylHydroxyToluene

CI50 : Concentration Inhibitrice à 50%

CMB : Concentration Minimale bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CUPRAC : CupricReducingAntioxidantCapacity

DPPH : 1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyl

DO : Densité Optique

DTNB : 5,5'- dithiobis-[2nitrobenzoïque]

DMSO : diméthylsulfoxyde

FAO : Food and Agriculture Organization

GC : Chromatographie gazeuse

GRAS : Generally recognized as safe

HE : Huile Essentielle

HPLC : Chromatographie liquide de haute performance

J : Jour

L-DOPA : L-3,4-dihydroxyphénylalanine

MS : Spectrométrie de masse

PAM : Plantes Aromatiques et Médicinales

ORAC : Oxygen radical absorbance capacity (capacité d'absorption des radicaux oxygénés)

YN : yaourt nature sans HEs

YST : Yaourt Supplémenté de l'HE de Thym

YSC : Yaourt Supplémenté de l'HE de Citronnelle

YSV : Yaourt Supplémenté de l'HE de Verveine

Table des matières

Liste des productions scientifiques

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

INTRODUCTION GENERALE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Plantes aromatiques et médicinales.....	4
1.1. Concepts généraux.....	4
1.2. Répartition.....	4
1.3. Protection et développement des PAM en Algérie.....	5
2. Huiles essentielles	6
2.1. Généralités sur les huiles essentielles	6
2.2. Localisation des sites sécréteurs	6
2.3. Méthodes d'extraction	7
2.3.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	7
2.3.2. Extraction par hydrodiffusion	7
2.3.3. Extraction par hydrodistillation	8
2.3.4. Extraction par expression à froid	8
2.3.5. Extraction par solvants organiques	8
2.3.6. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes	9
2.3.7. Extraction par fluide à l'état supercritique	9
2.4. Propriétés biologiques	10
2.4.1. Propriété antioxydante	10
2.4.1.1. Méthode de DPPH	11
2.4.1.2. Méthode de piégeage de l'ABTS	11
2.4.1.3. Méthode CUPRAC	12
2.4.2. Activité antibactérienne	12
2.4.2.1. Mécanisme d'action	12
2.4.2.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne	13
2.4.3. Activité antifongique	14

2.4.4. Activité anti-inflammatoire	14
2.4.5. Activité cytotoxique	15
2.4.6. Activité inhibitrice d'enzymes	15
2.4.6.1. Activité anti-acétylcholinestérase	15
2.4.6.2. Activité inhibitrice de l'uréase	16
2.4.6.3. Activité inhibitrice de l' α -amylase	17
2.4.6.4. Activité inhibitrice de la tyrosinase	17
2.5. Domaines d'utilisation	18
2.5.1. En agroalimentaire	18
2.5.2. En agriculture	19
2.6. Composition chimique	20
2.6.1. Généralités structurales	20
2.6.1.1. Les composés terpéniques	20
2.6.1.2. Les hémiterpènes	22
2.6.1.3. Les monoterpènes.....	22
2.6.1.4. Les sesquiterpènes	22
2.6.2. Analyses chromatographiques	23
3. Données bibliographiques sur les plantes étudiées	25
3.1. <i>Thymus willdenowii</i> Boiss	25
3.1.1. Origine et répartition géographique	25
3.1.2. Classification	25
3.1.3. Description botanique	26
3.1.4. Utilisation	27
3.1.5. Activités pharmacologiques	27
3.1.5.1. Activité anti-inflammatoire	27
3.1.5.2. Activité antimicrobienne	28
3.2. <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf	28
3.2.1. Origine et répartition géographique	28
3.2.2. Classification	29
3.2.3. Description botanique	29
3.2.4. Utilisation	30
3.2.5. Propriétés pharmacologiques	31
3.2.5.1. Propriété antimicrobienne	31

3.2.5.2. Propriété anti-inflammatoire	31
3.2.5.3. Toxicité	32
3.3. <i>Aloysia citriodora</i> Palau	32
3.3.1. Origine et répartition géographique	32
3.2. Classification	33
3.3. Description botanique	33
3.4. Utilisation	34
3.5. Propriétés pharmacologiques	35
3.5.1. Propriétés thérapeutiques	35
3.5.2. Propriété anti-inflammatoire	35
4. Yaourt	36
4.1. Généralités sur le yaourt	36
4.2. Procédé de fabrication de yaourt	37
4.3. Qualités des yaourts	39
4.3.1. Qualité nutritionnelle	39
4.3.2. Qualité microbiologique.....	41
4.3.3. Qualité organoleptique	41
4.4. Généralités sur les bactéries lactiques.....	43
4.4.1. Ecologie	43
4.4.2. Caractéristiques biochimiques et physiologiques	43
4.4.3. Classification	44
4.4.4. Métabolisme	45
4.4.4.1. Dégradation des polysaccharides indigestes	45
4.4.4.2. Dégradation des protéines	45
4.4.4.3. Catabolisme des acides aminés	45
4.4.5. Potentiel antioxydant	46
4.4.6. Action des bactéries lactiques dans le yaourt	46
4.4.5. Principales caractéristiques morphologiques et culturelles des bactéries lactiques	46
4.4.5.1. <i>Streptococcus thermophilus</i>	46
4.4.5.2. <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	47
4.4.5.3. Interaction entre <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	47
4.5. Potentiel antioxydant des yaourts	48
4.6. Aperçu sur quelques travaux d'incorporation des HEs dans le yaourt	49

MATERIEL ET METHODES

1. Rappel du contexte de l'étude et démarche expérimentale	51
2. Matériel végétal	53
3. Méthodes	55
3.1. Enquête sur l'utilisation des espèces de plantes étudiées	55
3.2. Extraction et analyse des huiles essentielles	55
3.2.1. Procédés d'extraction et rendement	55
3.2.2. Analyse de la composition chimique par Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse (GC/MS).....	56
3.3. Activités biologiques des huiles essentielles	57
3.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	57
3.3.1.1. Activité anti radicalaire avec la méthode du DPPH	57
3.3.1.2. Piégeage de l'ABTS (2,2'-azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid])	58
3.3.1.3. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	58
3.3.1.4. Méthode de réduction de l'ion ferrique	59
3.3.1.5. Test de blanchissement du β -carotène/acide linoléique	59
3.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles	59
3.3.2.1. Souches bactériennes	60
3.3.2.2. Préparation des suspensions bactériennes et activité antibactérienne	60
3.3.2.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	61
3.3.2.4. Détermination des concentrations minimales bactéricide (CMB)	62
3.3.3. Evaluation de l'activité antifongique des trois huiles essentielles	62
3.3.4. Evaluation, <i>in vitro</i> , des activités anti enzymatiques des trois huiles essentielles ...	63
3.3.4.1. Inhibition de l'acétylcholinésterase.....	63
3.3.4.2. Activité inhibitrice de l'uréase	63
3.3.4.3. Activité inhibitrice de l'alpha amylase	64
3.3.4.4. Activité inhibitrice de la tyrosinase	65
3.3.5. Evaluation de l'activité cytotoxique, <i>in vitro</i> , test Brines shrimp sur les larves d' <i>Artemia salina</i>	65
3.4. Essai d'incorporation des huiles essentielles dans le yaourt.....	66
3.4.1. Préparation yaourt	66
3.4.2. Analyse hygiénique des yaourts formulés	68
3.4.3. Analyse physicochimique des yaourts formulés	70

3.4.4. Observation microscopique de l'effet des HEs sur les bactéries <i>L. bulgaricus</i> et <i>S. thermophilus</i> dans les yaourts formulés	71
3.5. Evaluation de l'activité antioxydante des yaourts formulés	71
3.5.1. Test ABTS	71
3.5.2. Test CUPRAC.....	72
3.5.3. Test ORAC.....	72
3.6. Evaluation de l'activité antioxydante des bactéries lactiques fermentées en présence et en absence des HEs	73
3.7. Evaluation de l'effet des HEs sur la teneur en acides organiques et arôme des yaourts incorporés	73
3.8. Evaluation de l'effet des HEs sur la teneur en polyphénols dans les yaourts formulés.....	74
3.9. Analyse sensorielle	74
3.10. Analyse statistique	74

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats de l'enquête réalisée	75
1.1. Profil des informateurs	75
1.2. Renseignements sur les trois espèces de plantes sélectionnées	76
1.2.1. Connaissance	76
1.2.2. Appellations locales des trois plantes	77
1.2.3. Critères d'identification	78
1.2.4. Lieux d'achat	79
1.2.5. Utilisation dans le domaine alimentaire	81
1.2.6. Parties des plantes utilisées	82
1.2.7. Initiation à l'utilisation des plantes étudiées	83
1.2.8. Utilisation des huiles essentielles des plantes étudiées	84
2. Rendements et activités des HEs étudiées	85
2.1. Rendement et caractéristiques organoleptiques des HEs extraites	88
2.2. Composition chimique des HEs extraites	88
2.2.1. Huile essentielle de <i>T. willdenowii</i>	88
2.2.2. Huile essentielle de <i>C.citratus</i>	90
2.2.3. Huile essentielle d' <i>A. citriodora</i>	91
2.3. Activité antioxydante.....	93

2.3.1. Test de DPPH.....	94
2.3.2. Test de l'ABTS.....	94
2.3.3. Test CUPRAC.....	95
2.3.4. Méthode de réduction de l'ion ferrique.....	95
2.3.5. Test de blanchissement du β -carotène/acide linoléique.....	96
2.4. Activité antibactérienne.....	98
2.4.1. Sensibilité aux huiles essentielles.....	98
2.4.2. Détermination des CMI et CMB des huiles essentielles	103
2.5. Evaluation de l'activité antifongique des trois HEs	106
2.6. Evaluation, <i>in vitro</i> , de l'activité anti- enzymatique des huiles essentielles.....	108
2.6.1. Inhibition de l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase	108
2.6.2. Inhibition de l'activité de l'uréase	110
2.6.3. Inhibition de l'activité de l' α -amylase.....	112
2.6.4. Inhibition de l'activité de la tyrosinase	112
2.7. Evaluation de l'activité cytotoxique, <i>in vitro</i> , sur les larves d' <i>Artemia salina</i>	114
3. Yaourt incorporé d'huile essentielle	116
3.1. Essai d'incorporation des HEs dans le yaourt	116
3.1.1. Observation microscopique des bactéries lactiques es différents yaourts	116
3.1.2. Analyse hygiénique des yaourts formulés	118
3.1.3. Effet de l'incorporation des HEs sur les paramètres physicochimiques des yaourts..	119
3.1.3.1. Acidité titrable des yaourts	119
3.1.3.2. pH des yaourts	120
3.2. Effet de l'incorporation des HEs sur l'activité antioxydante des yaourts	123
3.2.1. Test ABTS	123
3.4.2. Test CUPRAC	127
3.4.3. Test ORAC	129
3.5. Effet des HEs sur l'activité antioxydante des bactéries lactiques du yaourt	134
3.6. Effet de l'incorporation des HEs sur la production d'acides organiques et d'arôme par les bactéries lactique dans les yaourts formulés	138
3.6.1. Production de l'acide lactique	138
3.6.2. Production de l'acide formique	140
3.6.3. Production de l'acide acétique	141
3.6.4. Production de l'acide citrique	143

3.6.5. Production de l'acétaldéhyde	145
3.7. Effet de l'incorporation des HEs sur la teneur totale en composés phénoliques dans les yaourts	147
3.8. Analyse sensorielle	150
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	152

REFEERENCES BIBIOGRAPHIQUES

ANNEXES

RESUMES

INTRODUCTION GENERALE



Les laits fermentés et y compris le yaourt sont des produits laitiers obtenus par une fermentation essentiellement lactique du lait, qui aboutit à son acidification et à sa gélification. Depuis le siècle dernier, ces produits ont gagné de l'intérêt auprès des consommateurs du fait de leurs propriétés nutritionnelles mieux connues et de leurs caractéristiques organoleptiques agréables. L'importance de ces produits, tant pour les consommateurs, qui les choisissent pour leur apport nutritionnel, leurs caractères sensoriels, leur facilité d'emploi et leur diversité, que sur les plans industriel et économique, justifie l'intérêt permanent qui leur est porté. La qualité de ces produits et la régularité de leur production représentent en outre des sujets sur lesquels les efforts se poursuivent (Béal et Helinck, 2022).

Les évolutions des marchés (prix, concurrence accrue entre produits sous signe de qualité notamment) et l'émergence de nouvelles demandes sociétales amènent l'industriel en produits laitiers à s'interroger constamment sur de nouvelles opportunités de diversifier ces produits par l'incorporation d'additifs alimentaires pour différents buts (aromatisation, conservation, apparence, ...).

De nombreux chercheurs se sont intéressés ces dernières années à l'étude de nouvelles alternatives à ces additifs alimentaires en les substituant par des composés naturels extraits de plantes aromatiques et médicinales (PAM) suivant leurs usages traditionnels et propriétés curatives avérées (Ekpenyong et Akpan, 2015; Caleja *et al.*, 2016; Wińska *et al.*, 2019).

Parmi les composés naturels, les HE sont trouvés récemment un intérêt grandissant auprès de l'industrie agroalimentaire. Elles sont reconnues comme étant l'un des métabolites secondaires des PAM. Elles ont été utilisées depuis l'antiquité pour leur pouvoir conservateur et leurs propriétés médicinales, mais aussi pour apporter un arôme et saveur aux aliments (Irkine et Korukluoglu, 2009). Les multiples propriétés exploitables (aromatisant, antioxydant, antibactérien, antifongique, etc.) leur permettent de trouver des applications dans l'industrie agro-alimentaire.

En effet, l'utilisation des HES dans l'agroalimentaire suit la croissance de la consommation des aliments formulés, ceci en réponse à une demande croissante de produits naturels de la part des consommateurs et à la mauvaise publicité faite aux conservateurs de synthèse (Deschepper, 2017).

Rappelons que les additifs alimentaires sont définis selon le comité mixte FAO/OMS (1990) comme des substances n'ayant pas de valeur nutritive, ajoutées intentionnellement aux aliments le plus souvent en faible quantité pour en améliorer l'apparence, la saveur, la consistance ou la conservation. Cependant, l'ajout de ces substances chimiques n'est pas sans effets néfastes pour la santé, il faut redouter les intoxications à caractère chronique surtout concernant les substances présentant une tendance cumulative (Clémens, 1955).

L'intérêt des HEs réside dans le fait qu'elles sont à la fois actives, odorantes et vectrices d'une image de produit « naturel ». En parallèle, si ces HEs sont un atout pour remplacer les ingrédients chimiques, elles sont loin d'être sans danger. Pour se faire dans de bonnes conditions alimentaires, leur usage doit passer par la maîtrise de leurs propriétés et de leurs dangers. Ceci nécessite d'identifier leur composition chimique, sachant que l'activité et la composition d'une huile essentielle ne sont pas liées de manière linéaire, mais un changement important du profil chimique d'une HE permet d'anticiper les variations de son activité.

Récemment, on voit se multiplier les études sur de nouvelles applications que pourraient trouver les HEs dans l'agroalimentaire. Leurs activités antioxydante et antimicrobienne sont bien reconnues et exploitées pour augmenter la durée de conservation des aliments. A titre d'exemple, l'HE de thym (*Thymus vulgaris* L.) présente une meilleure activité antifongique que la plupart des agents chimiques actuellement utilisés (benzimidazole, diphénylamine, etc.) (Kumar *et al.*, 2016).

L'utilisation des HEs se heurte parfois à certaines limites (Deschepper, 2017), c'est le cas pour les produits laitiers fermentés contenant des bactéries lactiques. La double casquette (arômes et antimicrobiens) des HEs peut être à la fois un atout mais également un obstacle à leur utilisation si on ne souhaite pas modifier les propriétés organoleptiques des aliments (Fernandez, 2012), en occurrence le yaourt qui contient les bactéries lactiques.

Dans ce contexte, cette étude a pour objectif en premier lieu, de connaître l'utilisation populaire de ces trois espèces de plantes, puis de déterminer la composition chimique et l'évaluation des propriétés biologiques (antioxydante, antibactérienne, antifongique, antienzyme, et toxicité) de leurs HEs (*Thymus willdenowii*, *Aloysia citriodora* et *Cymbopogon citratus*), et en second lieu leur incorporation dans le yaourt étuvé et de voir le comportement des bactéries lactiques des yaourts formulés à travers l'évolution de production des acides organiques (acide lactique, formique, acétique et acétaldéhyde) durant 28 jours de stockage.

Introduction générale

Afin de garantir la qualité sanitaire des yaourts formulés, nous avons jugé aussi indispensable de réaliser des analyses hygiéniques (recherche de la flore totale mésophile, coliformes, salmonelles, staphylocoques, levures et moisissures), ainsi que d'autres caractéristiques sur les yaourts conservés (composés phénoliques, activité antioxydante, etc.) depuis le premier jour au 28^{ème} jour de stockage.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons structuré le manuscrit en trois principaux chapitres hormis l'introduction et la conclusion générale et perspectives.

Le premier chapitre a été consacré à une synthèse bibliographique mettant l'accent sur le concept des plantes aromatiques et médicinales, les huiles essentielles, un bref exposé sur les espèces de plantes sélectionnées et à la fin le yaourt en tant que modèle de matrice alimentaire. Ce chapitre sera un appui pour la compréhension des différents résultats obtenus.

Dans le deuxième chapitre, nous décrirons d'abord le questionnaire de l'enquête lancée en ligne sur les trois plantes sélectionnées. En deuxième lieu, les différentes analyses effectuées afin d'évaluer la composition chimique des trois huiles essentielles, l'étude de leurs activités biologiques, l'évaluation de l'effet de l'addition de ces HEs sur la qualité physicochimique, microbiologique et organoleptique des yaourts formulés durant leur stockage ainsi que leur activité antioxydante et leur teneur en composés phénoliques. Ce chapitre sera achevé par une analyse sensorielle afin d'évaluer le degré de leur acceptabilité.

Dans le troisième chapitre sont décrits les principaux résultats obtenus, discutés et souvent comparés aux résultats des travaux antérieurs.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche du laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), à l'institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agroalimentaires INATAA, Université Frères Mentouri Constantine1, Algérie. Il s'intègre dans le projet intitulé : valorisation de sous-produits issus de l'industrie agroalimentaire et d'extraits de végétaux par leur incorporation dans la formulation d'aliments.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE



1.1. Concepts généraux

Plusieurs définitions ont été données aux plantes aromatiques et médicinales (PAM) et la gamme de ces plantes s'avère très longue et élastique et peut concerner la plupart des plantes spontanées et de nombreuses espèces arboricoles et herbacées cultivées. En effet en l'absence de définitions précises des notions des plantes aromatiques et de plantes médicinales, il apparaît difficile de délimiter leur secteur, ou de dresser une liste exhaustive des produits concernés (Neffati et Sghaier, 2014).

Selon l'OMS (Organisation mondiale de la santé), une plante médicinale est une plante qui contient, dans un ou plusieurs de ses organes, des substances qui peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques, ou qui sont des précurseurs de la chimio-pharmaceutique « hémisynthèse ». Cette définition permet de distinguer entre les plantes médicinales déjà connues dont les propriétés thérapeutiques, ont été scientifiquement établies, et d'autres plantes utilisées en médecine traditionnelle (Abayomi, 2010).

Les PAM sont celles qui sont recherchées pour leurs qualités aromatiques (aromatisation alimentaire, aromatisation de produits pharmaceutiques) et en même temps thérapeutiques (Zouaoui, 2020). Elles sont considérées comme des ressources précieuses pour la majorité des populations rurales et urbaines et représentent le principal moyen par lequel les individus se soignent (Badiaga, 2011). Malgré les progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des PAM est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement (Tabuti *et al.*, 2003).

1.2. Répartition

Les PAM poussent en abondance dans les régions côtières, montagneuses et aussi sahariennes, dont beaucoup sont réputées pour leur importance agro-forestière, leurs vertus médicinales et à des fins culinaires et cosmétiques (Tabuti *et al.*, 2003). Autour du bassin méditerranéen, l'usage des plantes aromatiques occupaient une place prépondérante aussi bien dans la vie quotidienne que lors des rituels dans les civilisations égyptiennes, grecque et romaine. En Egypte, entre 3000 et 2000 ans avant l'ère chrétienne, (dynastie pharaonique) une méthode rudimentaire de distillation était déjà utilisée. Afin de préserver les chairs du défunt, l'embaumement utilisait, entre autres, *Myrtus communis* (myrte) et *Cinnamomum verum* (cannelle), ainsi que d'autres huiles essentielles. A partir de 1200 ans avant l'ère, les Grecs et

les Romains grands navigateurs et commerçants, étaient de grands utilisateurs d'onguents et de parfums (Bouzabata, 2015).

L'Algérie, de par sa situation géographique, bénéficie d'un climat et d'une flore très diversifiés. Le réservoir phylogénétique de l'Algérie reflète la richesse et la diversité de sa flore avec environ 4000 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires (Tarek *et al.*, 2018). Des progrès récents ont été notés concernant l'inventaire de la flore Algérienne à travers plusieurs travaux. Avec une superficie de 2 381 741 km², l'Algérie est le plus grand pays riverain de la Méditerranée. Il est reconnu par sa diversité variétale en PAM, elle recèle un grand nombre d'espèces classées en fonction de leur degré de rareté : 289 espèces assez rares, 647 espèces rares, 640 espèces très rares, 35 espèces rarissimes et 168 espèces endémiques (Hadjadj *et al.*, 2019).

Ces plantes se localisent majoritairement dans des ZIP (Zones Importantes pour les Plantes). Une ZIP est un « site naturel ou semi-naturel présentant une richesse botanique exceptionnelle et/ou une composition remarquable de plantes ». 14 ZIP ont été définis en Algérie tellienne (Annexe1). La plupart de ces ZIP se situent en zones forestières. Deux seulement en zones humides et une dernière en zone littorale (Sahi, 2016).

1.3. Protection et développement des PAM en Algérie

L'Algérie, dispose d'un important patrimoine en PAM, dont plusieurs plantes endémiques que l'on peut exploiter à plusieurs fins : médecine traditionnelle, aromates, cosmétiques. conservation alimentaire, exportations de plantes brutes et d'HEs (Omari, 2018).

Cependant, en dépit de cette richesse, l'économie algérienne n'utilise que 1%. Très peu d'espèces et variétés sont exploitées en tant que PAM. La valorisation de ce patrimoine nécessite des inventaires et des enquêtes ethnobotaniques pour une meilleure connaissance (Bensmira et Meribai, 2019).

Pour cela, le ministère de l'Agriculture a mis en place une stratégie visant à insuffler une dynamique au développement de la filière PAM, et à mettre à profit et de valoriser les potentialités agricoles de chaque région. Cette stratégie consiste en la création d'associations spécialisées et des conseils professionnels des PAM dans chaque wilaya, afin d'encourager l'investissement dans cette filière et d'assurer une prise en charge en matière de formation et d'appui technique et scientifique en faveur des agriculteurs (Omari, 2018).

2.1. Généralités sur les huiles essentielles

Ce qui fait qu'un végétal est dit « à huiles essentielles » c'est sa capacité à développer des structures anatomiques de stockage de composés organiques volatils (COV), exemple des poches d'HEs au sommet de trichomes de menthe, dans le flavedo et des canaux résinifères des aiguilles de pins (Fernandez et Chemat, 2012).

Les HEs sont des mélanges complexes de COV produits par des organismes végétaux et isolées par des moyens physiques uniquement (pressage et distillation) à partir d'une plante entière ou d'une partie de plante connue (Hüsni Can et Gerhard, 2010). Ce sont des composés secondaires de la synthèse des glucides par les végétaux lors de la photosynthèse (Fernandez et Chemat, 2012).

L'Agence Française de Normalisation (AFNOR) (NF T 75-006) définit l'HE comme étant le produit obtenu à partir d'une matière première, soit par distillation à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des agrumes, ou distillation sèche. L'HE est ensuite séparée de la phase aqueuse par des moyens physiques. Cette définition englobe les produits obtenus toujours à partir de matières premières végétales, mais en utilisant d'autres méthodes d'extraction, telles que l'utilisation de solvants non aqueux ou l'absorption à froid.

2.2. Localisation et répartition des sites sécréteurs

Beaucoup de cellules spécialisées excrètent des COV, c'est le cas de cellules épidermiques de la plupart des pétales, ces cellules libèrent directement ces COV dans l'air. C'est aussi le cas des cellules qui tapissent l'intérieur des canaux comme dans les feuilles et tiges des Apiécées (céleri, anis, fenouil). La plupart de ces COV sont lipophiles voir lipidiques mais moins volatils (Fernandez et Chemat, 2012).

Les HEs n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Une cinquantaine de familles sont connues de posséder les HEs dont les plus importantes sont : les *Lamiacées* ; les *Myrtacées*, les *Rutacées*, les *Astéracées*, mais aussi des *Apiécées*. On trouve les HEs dans presque tous les organes de la plante : sommités fleuries des *Lamiacées* (lavande vraie, sauge officinale), graines (ambrette), racines (vétiver), rhizome (gingembre), fruits (anis, fenouil), bois (santal), feuille (eucalyptus), oléorésines (myrrhe) (Bouzabata, 2015). Il existe trois types de structures sécrétrices dans les plantes : les poils glandulaires épidermiques (*Lamiacées*, *Géraniacées* et *Verbenacées*) ; les poches sphériques schizogènes (*Astéracées*, *Hypéricacées*, *Rosacées*,

Rubiacees, *Rutacees* et autres); les canaux glandulaires lysigènes (*Apiacees*, *Diptérocarpacees*, *Burséracees*, et *Anacardiacees*) et aussi tous les bois résineux (*Abiétacees* et *Cupressacees*) (Sebti, 2019).

2.3. Méthodes d'extraction

Les HEs peuvent être extraites de plusieurs plantes et des parties différentes par diverses méthodes d'extraction. La méthode utilisée pour l'extraction dépend du matériel botanique utilisé, son état et sa forme. Elle est l'un des principaux facteurs déterminant la qualité d'une HE. Une procédure d'extraction inappropriée peut endommager ou altérer la composition chimique de l'HE, ceci entraîne la perte de la bioactivité et les caractéristiques naturelles.

Dans certains cas, la décoloration, les odeurs/saveurs ainsi que les changements physiques tels que l'augmentation de la viscosité peuvent se produire, ces changements dans l'HE extraite doivent être évités (Tongnuanchan et Benjakul, 2014). Parmi les méthodes d'extraction des HEs, figurent :

2.3.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

La distillation à la vapeur est la méthode d'extraction la plus utilisée. La proportion d'HEs extraites par entraînement à la vapeur est de 93% et les 7% restants peuvent être encore extraits par d'autres méthodes. Au départ, l'échantillon de plante est placé dans l'eau chauffée à la vapeur. La chaleur appliquée est la principale cause d'éclatement et de décomposition de la structure cellulaire de la plante. En conséquence, les composés aromatiques des HEs sont libérés (Masango 2005).

2.3.2. Extraction par hydrodiffusion

L'hydrodiffusion, technique relativement récente, est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas (perdescendum) et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale (Annexe 2.a). L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. Cependant, l'HE obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale : « essence de percolation »(Bouadjemi,2018).

2.3.3. Extraction par hydrodistillation

L'extraction par hydrodistillation est la plus simple et la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un ballon rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'HE se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'HE étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolat (Bouadjemi, 2018).

La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. Le principe de recyclage est communément appelé cohobage. En laboratoire le système équipé d'une cohobe qui est généralement utilisé pour l'extraction des HEs en accord avec la Pharmacopée Européenne est le Clevenger (Clevenger, 1928) (Annexe 2.b).

2.3.4. Extraction par expression à froid

L'expression à froid, appelée aussi « pression à froid » ou « grattage » est principalement utilisée pour les écorces (pelures) d'agrumes (citron, pamplemousse, bergamote, orange amère, mandarine), qui renferment une quantité importante d'HEs (Annexe 2.c). Cette opération mécanique vise à extraire les molécules contenues dans les zestes des agrumes frais. Dans ce cas, on utilise le terme « essence » plutôt que « huile essentielle » (Sebti, 2019)

2.3.5. Extraction par solvants organiques

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer, dans un extracteur, un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, cyclohexane, l'éthanol, moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé, devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène. Sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extract. L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils, mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres substances (Boukhatem, 2019).

2.3.6. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes

Basée sur un principe relativement simple, l'extraction sans solvant assistée par microondes (SFME : solvent free microwave extraction) consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajout d'eau ou de solvant organique (Annexe 2.d). Le chauffage de l'eau contenue dans la plante permet la rupture des glandes renfermant l'HE.

Cette étape libère l'HE qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite par la matière végétale. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation du distillat, composé d'eau et d'HE, par la suite facilement séparable par simple décantation (Lucchesi, 2005). Cette méthode présente des avantages comparés à la méthode conventionnelle d'hydrodistillation et qui se résument en :

- D'un point de vue quantitatif : des rendements similaires ou parfois meilleur à ceux obtenus par hydrodistillation classique.
- D'un point de vue qualitatif : les HEs obtenues par SFME présentent une proportion plus importante de composés oxygénés, les plus valorisables sur le plan olfactif.
- D'un point de vue économique et environnemental : comme le procédé SFME se réalise avec un court temps d'extraction, le procédé est plus économique en temps et en énergie et par la suite en cout. De plus, il n'utilise ni solvant organique ni eau (Farhat, 2010)

2.3.7. Extraction par fluide à l'état supercritique

L'originalité de la technique d'extraction par fluide supercritique (SFE), provient de l'utilisation de solvants dans leur état supercritique, c'est-à-dire dans des conditions de températures et de pressions où le solvant se trouve dans un état intermédiaire aux phases liquide et gazeuse et présente des propriétés physico-chimiques différentes, notamment un pouvoir de solvatation accru. Si, en pratique, de nombreux solvants peuvent être employés, 90% des SFE sont réalisées avec le dioxyde de carbone (CO₂), principalement pour des raisons pratiques. En plus de sa facilité d'obtention due à ses pression et température critiques relativement basses, le CO₂ est relativement non toxique, disponible à haute pureté et à faible prix, et il possède l'avantage d'être éliminé aisément de l'extrait (Boukhatem, 2019).

2.4. Propriétés biologiques

2.4.1. Propriété antioxydante

Le stress oxydatif, dû à la génération de radicaux libres oxygénés (RLO) et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), endommage les macromolécules cellulaires (figure 1). Les dommages oxydatifs ont été liés à divers problèmes de santé tels que le vieillissement, l'artériosclérose, le cancer, la maladie d'alzheimer, la maladie de Parkinson, le diabète et l'asthme. L'équilibre cellulaire des radicaux libres est maintenu par différents antioxydants.

Les flavonoïdes, les terpénoïdes et les composés phénoliques constituant des HEs présentent des effets antioxydants significatifs (Raut et Karuppayil, 2014).

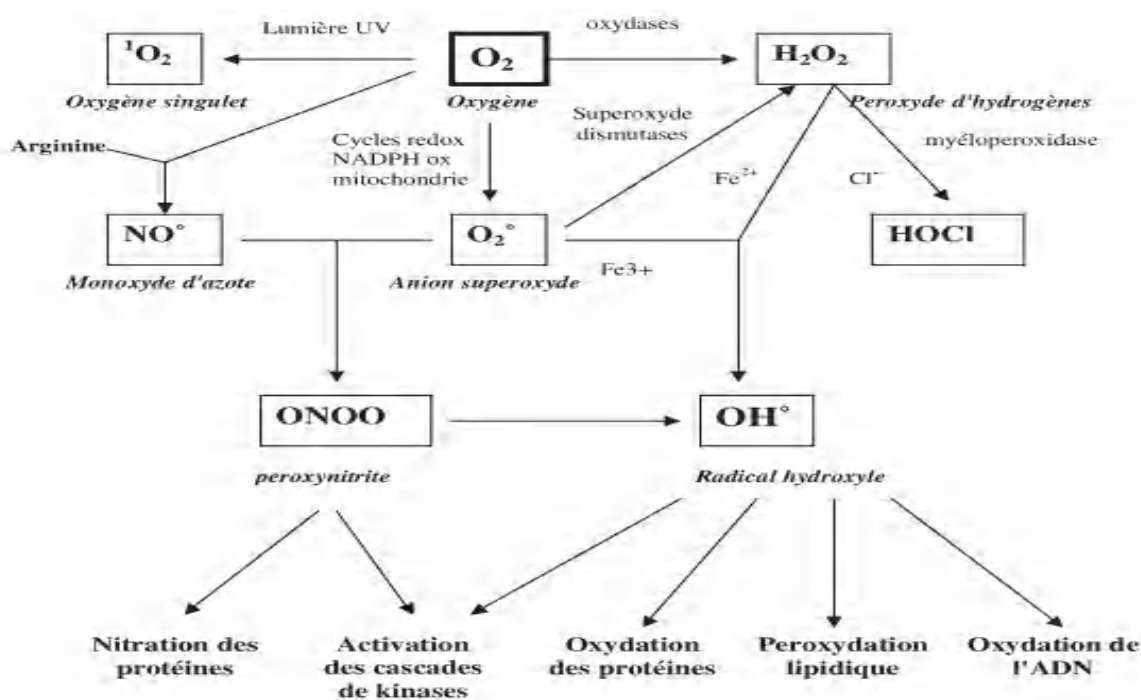


Figure 1. Origine des différents radicaux libres oxygénés et (RLO) et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) impliqués en biologie (Favier, 2003)

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer ces activités, parmi lesquelles figurent la méthode de DPPH (2,2-DiPhényl-1-Picrylhydrazyl), le piégeage de l'ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), la méthode CUPRAC (Cupric Reducing Antioxydant Capacity).

2.4.1.1. Méthode de DPPH

Le DPPH est un radical stable de couleur violette en solution. Lorsqu'il est réduit en présence d'une substance réductrice (par un mécanisme combinant le transfert d'un atome d'hydrogène et le transfert d'électrons), la couleur de la solution devient jaune. Le monitoring de la disparition de la couleur se fait à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 540nm (Bensouici, 2015). Dans le cas des composés phénoliques par exemple, le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• alors transformé en une molécule stable DPPH-H (figure 2). La réduction du DPPH• est facilement mesurée par spectrophotométrie à 515 nm (λ_{max} DPPH•). La réaction sera plus ou moins rapide selon la nature de l'antioxydant, et la quantité de DPPH-H formée dépendra de la concentration en antioxydant (Kalinowska *et al.*, 2022)

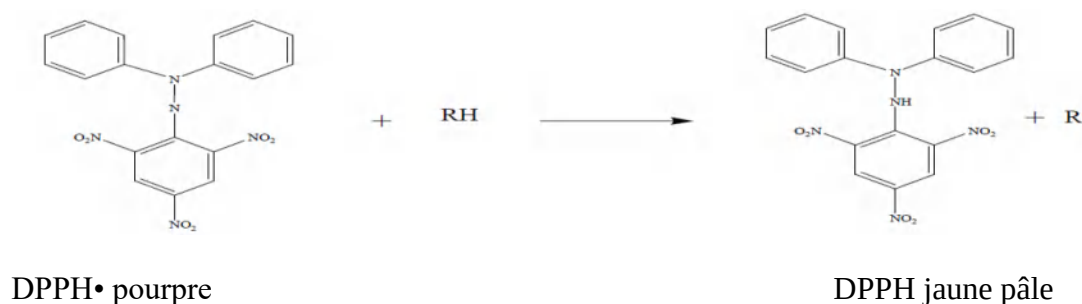


Figure 2. Transformation du radical DPPH• en DPPHH (Bensouici, 2015)

2.4.1.2. Méthode de piégeage de l'ABTS

Cette méthode est appelée aussi TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), la capacité d'une molécule à inhiber le radical stable ABTS•+ exprime l'activité antioxydante totale de cette molécule comparée à une molécule de référence comme le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E. Cette méthode consiste en une mesure colorimétrique du transfert d'électrons d'un antioxydant vers un accepteur d'électrons de sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique ABTS•+. Il s'agit d'un radical relativement stable de coloration bleu vert possédant une forte absorption dans l'intervalle 600-750 nm (Fernandez et Chemat, 2012).

2.4.1.3. Méthode CUPRAC

Le principe de cette méthode est basé sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproène (NC)-cuivre (Cu^{+2}) $\text{Nc}_2\text{-Cu}^{+2}$. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-neocuproène est réduit et cette réaction est quantifiée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm. Le principe de ce test se base sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe Cu^{+2} -Nc, produisant ainsi un complexe chromogène de Cu^{+2} -Nc qui absorbe à 450 nm (Bensouici, 2015).

2.4.2. Activité antibactérienne

2.4.2.1. Mécanisme d'action

Les HEs peuvent avoir des activités cytotoxiques sur les bactéries en agissant sur plusieurs structures : altération de la paroi bactérienne ; altération de la membrane plasmique ; altération des protéines membranaires ; coagulation du cytoplasme ; déplétion de la force proton motrice et fuite des composants du cytoplasme (métabolites et cytoplasme)

Les bactéries Gram⁺ sont plus sensibles aux HEs que les Gram⁻. En effet, il semblerait que la membrane externe des bactéries Gram⁻ étant rigide, riche en LPS (lipopolysaccharides) et plus complexe que les molécules aromatiques des HEs aient plus de difficulté à la traverser. En revanche, ce système extra-membranaire complexe étant absent des bactéries Gram⁺, les composés aromatiques peuvent atteindre plus facilement la membrane plasmique, occasionnant ainsi une meilleure activité antibiotique (Chouhan *et al.*, 2017). L'efficacité antibactérienne peut varier avec les HEs ainsi qu'avec différentes bactéries.

Par exemple, le bois de santal (*S. album*), l'HE de manuka (*L. scoparium*) et l'HE de vétiver (*C. zizanioides*), sont très actives contre les bactéries Gram ⁺, mais n'ont pas d'activité contre les bactéries Gram ⁻ (Hammer *et al.*, 1999). Les HEs de baie, clou de girofle, citronnelle, origan et thym inhibent la croissance d'*Escherichia coli* à des concentrations de 0,02, 0,04, 0,06, 0,05 et 0,05 %, respectivement. Les HEs de thym, de romarin, de la menthe poivrée, de citronnelle, de clou de girofle et de laurier ont le potentiel de prévenir *Staphylococcus aureus* à des concentrations $\leq 0,05$ % (Raut et Karuppayil, 2014).

2.4.2.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne, *in vitro*, mesure le potentiel et l'efficacité d'un agent antibactérien dans une solution tout en exprimant la sensibilité des microorganismes à des substances antimicrobiennes testées de concentrations connues (Djermane, 2021). Il existe plusieurs techniques d'évaluation des activités antibactériennes des HEs, cette variabilité est due principalement à l'insolubilité des HEs dans les milieux aqueux.

a. Méthode de diffusion en milieu solide

Appelée aussi technique de l'aromatogramme ou antibioaromatogramme ou encore méthode de Vincent mise au point par Schroeder et Messing en 1949 (Benzeggouta, 2005). Le principe suit celui de l'antibiogramme où le disque d'antibiotique est remplacé par l'essence aromatique à tester. Des boîtes de Pétri préalablement coulées d'une gélose convenable solidifiée et inoculée d'une suspension bactérienne à tester sont utilisées. Des dilutions des HEs se font dans des solvants tels que l'acétone, le méthanol, l'éthylène glycol, l'éthanol (Toure, 2015). Quand la concentration de l'antimicrobien devient très diluée, il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Le diamètre de cette zone d'inhibition est corrélé 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 petite, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance des microorganismes est faible (Toure, 2015 ; Chebaibi *et al.*, 2016).

b. Méthode de micro-dilution en milieu liquide

Le même but est à noter pour cette technique aussi à savoir la détermination de la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe les microorganismes testés.

Cette technique repose sur la mise en culture d'un inoculum bactérien standardisé (1 à 5.10^5 UFC/ml) en présence de séries de dilutions de l'antimicrobien de raison 2. Les plaques de microdilution contiennent 96 puits et permettent de tester 8 concentrations croissantes d'antibiotiques différentes. Après 18 à 24 heures d'incubation, la lecture des résultats se fait par une évaluation visuelle de la turbidité des différents puits de la microplaque. Ainsi, cette technique fournit des résultats quantitatifs (Soares, 2015).

2.4.3. Activité antifongique

Le développement de l'HE naturelle comme alternative aux produits chimiques de synthèse dans le contrôle de la pourriture post-récolte est actuellement à l'honneur. Certaines HEs sont utilisées pour leur propriétés antifongiques et suivent les mêmes mécanismes cités ci-dessus cependant la durée est plus longue (Mayer, 2012). Des études ont été menées contre des phytopathogènes tel que le *Fusarium spp* qui cause des dégâts importants aux champs de quelques légumes à travers le monde (Sharma *et al.*, 2017). Certains fongiques pathogènes opportunistes (par exemple, *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus sp.*) sont notoires et infectent une grande population de patients immunodéprimés. Il y a des options limitées de médicaments disponibles pour une chimiothérapie antifongique réussie (Kathiravan *et al.*, 2012).

2.4.4. Activité anti-inflammatoire

Les réactions inflammatoires sont induites par les infections microbiennes et virales; l'exposition aux allergènes, les radiations et les produits chimiques toxiques, les maladies auto-immunes et chroniques, l'obésité, la consommation d'alcool, l'utilisation de tabac, et une alimentation riche en calories (Bayala, 2014). L'inflammation est une réponse naturelle de l'organisme à une agression physique, chimique ou biologique. Elle est utile lorsqu'elle ne s'installe pas dans la durée. Son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Mais elle favorise également différents processus pathologiques. La phagocytose des bactéries, qui survient lors de l'inflammation, s'accompagne d'une augmentation spectaculaire de la consommation d'oxygène entraînant la formation d'un radical anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) qui est rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), spontanément, ou par l'enzyme superoxyde dismutases (Miguel, 2010). Néanmoins, la surproduction de ces ROS peut être responsable des dommages au niveau des sites inflammatoires. De plus ces espèces réactives jouent des rôles importants dans l'inflammation en étant des éléments déclencheurs ou en étant des molécules messagères de signalisation. Les ROS agissent comme modulateurs des protéines et lipides, kinases et phosphatases, récepteurs membranaires, canaux ioniques et des facteurs de transcription (Gomes *et al.*, 2008).

Si les HEs sont capables de piéger certains radicaux libres, elles peuvent également agir comme agents anti-inflammatoires, car l'une des réponses inflammatoires est la poussée

oxydative qui se produit dans diverses cellules (monocytes, neutrophiles, éosinophiles et macrophages) (Miguel, 2010). Par exemple, l'HE de camomille est utilisée depuis des siècles comme anti-inflammatoire et également pour soulager les symptômes associés à l'eczéma, à la dermatite et à d'autres irritations prononcées (Kamatou et Viljoen, 2010). D'autres HEs sont éventuellement utilisées telles que l'eucalyptus, romarin, lavande et girofle seules ou en mixture (Miguel, 2010).

2.4.5. Activité cytotoxique

Les HEs peuvent exercer des effets cytotoxiques sur les cellules eucaryotes, la perméabilisation des membranes mitochondriales externes et internes provoque la mort cellulaire par nécrose et l'apoptose (Raut et Karuppayil, 2014). La cytotoxicité des HEs est provoquée généralement par les alcools, les aldéhydes et les composés phénoliques, ce qui est très important dans l'application chimio thérapeutique des HEs (Bruni *et al.*, 2004). Par exemple, le géraniol composant la plante *Cymbopogon martini* (l'huile de palmarosa) interférerait avec les fonctions membranaires, les ions d'homéostasie ainsi que les événements de signalisation cellulaire des lignées cellulaires cancéreuses, inhibe aussi la synthèse de l'ADN et réduit la taille des tumeurs du côlon (Raut et Karuppayil, 2014). Les terpénoïdes ainsi que les constituants polyphénoliques des HEs empêchent la prolifération des cellules tumorales par nécrose ou induction de l'apoptose (kaefer, 2008).

2.4.6. Activité inhibitrice d'enzymes

Les enzymes jouent un rôle crucial dans les processus biochimiques de l'organisme en catalysant des réactions chimiques spécifiques. Cependant, dans certains cas, une activité enzymatique excessive peut être indésirable et conduit à des déséquilibres physiologiques ou à des maladies. C'est pourquoi l'inhibition sélective des enzymes peut être une stratégie thérapeutique prometteuse (Deveci *et al.*, 2018)

2.4.6.1. Activité anti-acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase est une enzyme impliquée dans l'étiologie des maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer (Sharma, 2019). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse rapide de l'acétylcholine en choline et acide acétique entraînant son inactivation,

l'acétylcholine ainsi dégradé peut être recyclé sous forme de choline recaptée par le neurone présynaptique et permettre la transmission d'un nouveau signal (Albano *et al.*, 2012).

Il existe une autre protéine dans le système nerveux central semblable à l'AChE qui est le Butyrylcholinestérase (BChE) identifiée au départ dans le foie, le rôle biologique de la BChE n'est pas encore bien élucidé, mais il a été suggéré qu'elle protège l'AChE contre les inhibiteurs. L'activité inhibitrice de l'AChE et la BChE est déterminée par la méthode d'Ellman *et al.* (1961) qui utilise un substrat artificiel, l'acétylthiocholine (ACH) ou butyrylcholine (BCH), dont l'hydrolyse conduit à la formation de thiocholine. Cette dernière forme un dérivé coloré en jaune avec le DTNB (5,5'- dithiobis-[2nitrobenzoate]) (figure3). L'inhibition de l'acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase par les extraits a été étudiée à l'aide du dosage sur microplaque.

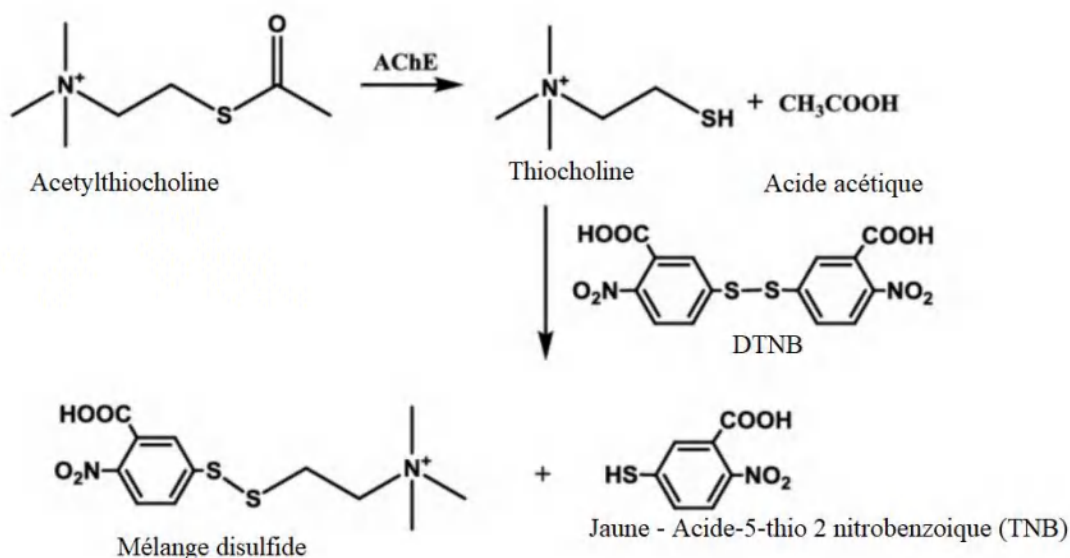


Figure 3. Mécanismes chimiques de la méthode d'Ellman (Pohanka *et al.*, 2011)

2.4.6.2. Activité inhibitrice de l'uréase

Certains microorganismes comme les bactéries, champignons et certaines plantes convertissent l'urée en ammoniacque en faisant intervenir l'uréase, une enzyme (EC 3.5.1.5) qui intervient dans cette conversion. Cette enzyme est considérée comme un facteur de pathogénicité de la bactérie *Helicobacter pylori*, la majeure cause des ulcères gastriques et des autres troubles urinaires comme les calculs urinaires. En effet, la production de l'ammoniacque au niveau de l'estomac où la bactérie se développe dans le mucus, permet l'augmentation du

pH du milieu favorisant ainsi la survie et le développement de la bactérie (Korona-Glowniak *et al.*, 2020).

Des alternatives thérapeutiques au-delà des antibiotiques ont été explorées ces dernières années, notamment les vaccins, probiotiques, inactivation photodynamique, phagothérapie et phytomédecine. Plusieurs études ont été réalisées dans le cadre de la recherche de plantes et d'extraits/constituants de plantes comme possédant une action anti-*H. pylori* et une activité gastroprotectrice. De plus, les composants d'origine naturelle ont été largement étudiés comme inhibiteurs efficaces potentiels de l'uréase pour le traitement de l'infection à *H. pylori* (Korona-Glowniak *et al.*, 2020).

2.4.6.3. Activité inhibitrice de l' α -amylase

L' α -amylase est une endoenzyme [α -(1,4)-D-glucane glucanohydrolase (E.C.3.2.1.1)] appartenant à la famille des hydrolases, responsable de la dégradation des hydrates de carbone au niveau de l'intestin grêle. Cette dégradation permet l'absorption du glucose et fait augmenter la glycémie. De ce fait, l'inhibition de cette enzyme permettra une limitation de l'augmentation de la glycémie postprandiale (Goetz, 2007). Des chercheurs se sont intéressés au développement d'inhibiteurs de l' α -amylase dans le but de ralentir l'absorption des glucides dans le sang et gérer par conséquent l'obésité et le diabète, parmi les inhibiteurs, une attention particulière se fait pour les plantes médicinales dotées d'activité antidiabétique (Bandara *et al.*, 2012 ; Mozaffari-Khosravi *et al.*, 2014 ; Abdollahi et Mobadery, 2020).

2.4.6.4. Activité inhibitrice de la tyrosinase

La tyrosinase (monophenol, dihydroxyphenylalanine:oxygen oxidoreductase EC 1.14.18.1) est une enzyme multifonctionnelle largement distribuée dans la nature (bactéries, champignons, plantes et animaux). Dans le corps humain, elle est responsable de la formation de la mélanine, un pigment biologique présent dans les cheveux, peau et partie colorée des yeux. La formation de mélanine nuit à la qualité de la couleur et entraîne une perte d'éléments nutritifs et les valeurs marchandes des aliments et boissons d'origine végétale (Chang *et al.*, 2013). La tyrosinase catalyse l'hydroxylation de la tyrosine en L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA), qui est en outre oxydée en o-dopaquinone correspondante, conduisant à la formation de la mélanine (Aumeeruddy-Elalfi *et al.*, 2016).

Peu d'études sont effectuées pour évaluer l'activité inhibitrice de la tyrosinase par les HEs, cependant, certains composés tel que le citral possèdent cette capacité (Capetti *et al.*, 2021),

2.5. Domaines d'utilisation

2.5.1. En agroalimentaire

L'homme a utilisé les HEs depuis plusieurs siècles pour enrichir la cuisine. Les Egyptiens diffusaient des odeurs par le chauffage de mélanges contenant des HEs dans le but d'augmenter l'appétit des personnes malades. Les HEs sont finalement devenues des arômes naturels et des rehausseurs de goût dans de nombreux domaines de l'agroalimentaire : liqueurs, boissons, confiseries, plats cuisinés ... S'il n'existe pas réellement de règle, on peut dire que les HEs plébiscitées pour des préparations salées sont issues d'épices et d'aromates alors que les HEs d'agrumes seront préférées pour des parfums plus sucrés (Deschepper, 2017).

L'emballage alimentaire est destiné à protéger les aliments des facteurs externes comme la température, la lumière et l'humidité qui peuvent altérer l'aliment. Ces emballages peuvent aussi protéger le contenu alimentaire des altérations causées par des microorganismes. Une large gamme d'HEs de plantes aromatiques ont été appliquées dans des emballages actifs et qui sont considérées comme (GRAS, generally recognized as safe) (Ribeiro-Santos *et al.*, 2017). Les HEs peuvent être incorporées dans des emballages alimentaires pour libérer leurs composés à l'aliment à travers le temps. L'HE de basilic (*Ocimum basilicum*), les fleurs de camomille (*Matricaria chamomilla*), graines de cardamome (*Elettaria cardamomum*) et de romarin (*Rosmarinus officinalis*), a été appliquée aux aliments ou aux emballages alimentaires comme antimicrobien et antioxydant (Ribeiro-Santos *et al.*, 2017). L'activité antibactérienne des HEs dépend de la disponibilité en oxygène. L'utilisation de l'emballage sous vide avec de l'huile d'origan a un effet synergique sur l'inhibition de *Listeria monocytogenes* et micro-organismes d'altération (Vergis *et al.*, 2015).

Hormis l'utilisation des HEs en emballage, ces dernières sont aussi utilisées pour leur pouvoir conservateur et inhibiteur de germes contaminants, citons par exemple l'effet inhibiteur du thym, de la menthe, du laurier et leurs extraits alcooliques sur la croissance de *S. typhimurium*, *V. parahaemolyticus* et *S. aureus* dans un milieu a été évalué par Ceylan et Fung, (2004). *S. typhimurium* s'est avéré être le moins sensible à ces épices. Le thym était le plus

inhibiteur contre les bactéries testées. L'effet antimicrobien des HEs de sauge, romarin, cumin, carvi, clou de girofle et thym contre *P. fluorescens*, *S. marcescens*, *E. coli*, *Surcinasp.*, *Micrococcus spp.*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Mycobactérium phleiet*, *S. cerevisiae* a été évalué. Les HEs de clou de girofles, baie de piment, feuille de piment ayant de l'eugénol comme composant majeur présentaient la concentration minimale inhibitrice étant de 10 à 100 pg contre les Gram-positif, Gram-négatif, levure et champignons (Macwan *et al.*, 2016).

2.5.2. En agriculture

L'intérêt actuel des chercheurs est de trouver des alternatives aux produits phytosanitaires synthétiques et nocifs pour la population mondiale ainsi que pour la terre. En effet, le contexte réglementaire actuel incite fortement à développer des produits phytosanitaires d'origine naturelle. Les HEs sont actuellement testées sur différentes cibles : les insectes, les champignons, les bactéries, les adventices (mauvaises herbes) et également pour la conservation des semences. Des produits à base d'HEs sont déjà commercialisés dans certains pays d'Europe. L'HE de clou de girofle (*Syzygium aromaticum L.*) est par exemple proposée pour lutter contre des maladies de conservation des pommes et des poires. La menthe verte (*Mentha spicata L.*) est utilisée pour inhiber la germination des pommes de terre. L'orange douce (*Citrus sinensis (L.) Osbeck*) est proposée contre de nombreuses maladies et insectes (mildiou, oïdium, rouille blanche, cicadelles, aleurodes...).

De nouveaux produits à base d'HEs tardent à arriver sur le marché en raison d'une réglementation complexe. En effet, leur autorisation est soumise à la réglementation des produits phytopharmaceutiques, nécessitant d'apporter la preuve de l'efficacité et de la non dangerosité du produit. L'utilisation des HEs en agriculture biologique nécessite également leur inscription sur une liste dite « positive » de produits autorisés (Deschepper, 2017). Des HEs odoriférantes angiospermiqes ont été aussi testées contre la souche toxigène d'*Aspergillus flavus*.

L'HE de *Thymus vulgaris L.* a montré l'efficacité antifongique la plus élevée. L'HE de thym inhibe absolument la croissance mycélienne d'*Aspergillus flavus* à 0,7 µL/mL et présente un large spectre fongitoxique contre huit champignons différents contaminant les aliments, à savoir *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata* et *Botryodiplodia theobromae*.

L'HE a également montré une efficacité antiaflatoxigène significative car elle a complètement arrêté la production d'aflatoxine B1 à 0,6 µL/mL. L'HE de thym en tant que fongicide a également été trouvée supérieure à la plupart des fongicides synthétiques courants. La CL50 de l'HE de thym contre les souris a été enregistrée à 7142,85 µL/kg de poids corporel indiquant sa toxicité pour les non-mammifères et renforçant son exploitation sûre en tant que conservateur pour les produits alimentaires stockés. Les résultats recommandent l'HE de thym comme conservateur botanique potentiel dans le contrôle écologique de la bio détérioration des produits alimentaires pendant le stockage (Kumar *et al.*, 2008).

2.6. Composition chimique

Les avancées spectaculaires de la chimie analytique ces dernières décennies dans le domaine de la chimie analytique ont permis de montrer comment les enzymes végétales sont capable de transformer des substances carbonées nutritives non volatiles en une myriade de composés organiques volatiles et que chaque HE était constitué de dizaine, voire de centaines de composés aux structures chimiques très diversifiées (Fernandez et Chemat, 2012)

2.6.1. Généralités structurales

Les HEs sont des mélanges, souvent complexes, de constituants qui appartiennent, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes et le groupe des phényl propanoïdes qui est cependant moins fréquemment rencontré (Bouzabata, 2015).

La composition chimique d'une HE dépend d'un grand nombre de facteurs. Certains sont liés aux méthodes d'extraction, mais la composition chimique de l'HE dépend principalement de la composition de l'essence produite par la plante, celle-ci étant fonction de facteurs environnementaux mais avant tout du patrimoine génétique de la plante. Tandis que la présence ou l'absence d'un constituant chimique à tout stade de croissance est exclusivement déterminée par le patrimoine génétique de la plante, sa concentration est régie à la fois par la génétique et des facteurs environnementaux (Deschepper, 2017).

Plusieurs milliers de molécules sont susceptibles d'être retrouvées dans les HEs. Une HE renferme à elle seule plusieurs dizaines, parfois centaines, de composés chimiques différents, dans des proportions très variables. À l'inverse, certaines HEs contiennent une

molécule presque pure, rendant anecdotique la présence des autres composants (Deschepper, 2017).

2.6.1.1. Les composés terpéniques

Les composés terpéniques volatils sont les constituants les plus courants, les plus abondants et les plus diversifiés des HES. Le mot « terpène » tire son origine du mot terpentins ou térébenthine, une oléorésine provenant du térébinthe (*Pistacia terebinthus*).

Les composés terpéniques sont des hydrocarbures de structure très diverse (acycliques, monocycliques, bicycliques...) constituant une chaîne plus ou moins longue. Les molécules de cette famille sont formées de l'assemblage de deux ou plusieurs unités, l'unité est composée de cinq carbones isopréniques, de formule brute $(C_5H_8)_n$ (Figueredo, 2007).

Les terpènes peuvent avoir des fonctionnalités chimiques différentes incluant les alcools (linalool, geraniol, carveol, citronellol, terpéol, menthol, borneol, and bisabolol), les aldéhydes (citral et citronellal), les phénols (thymol and carvacrol), les ketones (carvone et camphor), les éthers (eucalyptol) et les hydrocarbures (cymène, pinène, limonène, et phellandrene).

La biosynthèse des isoprénoïdes fait intervenir un mécanisme biogénétique expliquant la formation de la plupart des isoprénoïdes. Ce mécanisme considère l'acide mévalonique ou le mévalonate comme précurseur universel des terpènes (Figueredo, 2007). L'acide mévalonique est formé par condensations successives de 3 molécules d'acétyl-coenzyme A. La conversion de l'acide mévalonique en structures hémiterpéniques débute par une double phosphorylation : l'acide mévalonique-5-phosphate formé subit ensuite une décarboxylation et une déshydratation pour donner l'isopenténylpyrophosphate (IPP). Le pyrophosphate d'isopentényle est isomérisé par l'isopentényle diphosphate isomérase en diméthylallylpyrophosphate (DMAPP). Le DMAPP étant très réactif est susceptible d'alkyler divers sites nucléophiles (Figueredo, 2007).

Le DMAPP qui, par additions séquentielles de l'IPP, aboutit à la formation des précurseurs des différentes classes des terpènes. Ces précurseurs sont des esters pyrophosphoriques d'alcools en $(C_5)_n$ formés par addition séquentielle d'une unité en C_5 , le pyrophosphate d'isopentényle (IPP), sur le pyrophosphate de phénylallyle. L'addition du DMAPP sur la double liaison de l'IPP est catalysée par une GPP synthétase et conduit au pyrophosphate de géranyle (GPP), précurseur des monoterpènes (Annexe 3.a). La réaction

implique l'ionisation du pyrophosphate d'allyle et le départ du groupe pyrophosphate qui permet l'attaque électrophile simultanée et stéréo-sélective du carbocation allylique formé sur la double liaison du pyrophosphate d'isopentényle. Le processus s'accompagne de l'élimination d'un proton H 2-pro-(R) de l'IPP, conduisant à la formation d'une double liaison trans, dans la biosynthèse du GPP. L'élimination d'un proton H 2-pro-(S) conduirait à la formation de l'isomère cis. Cette réaction de prénylation peut se poursuivre par l'addition de l'IPP sur le GPP et conduire au pyrophosphate de farnésyle (FPP), précurseur des sesquiterpènes ; une condensation ultérieure de l'IPP sur le FPP conduira au pyrophosphate de géranylgéranyl (GGPP), précurseur des diterpènes et ainsi de suite pour former la série de pyrophosphates de prénols allyliques homologues (Deschepper, 2017). A titre d'exemple, le pyrophosphate de géranyle (GPP) est précurseur des monoterpènes, le pyrophosphate de farnésyle (FPP) est précurseur des sesquiterpènes, le pyrophosphate de géranylgéranyle (GGPP) est précurseur des diterpènes et le pyrophosphate de géranylfarnésyle (GFPP) est précurseur des sesquiterpènes.

2.6.1.2. Les hémiterpènes

Les hémiterpènes restent minoritaires dans les HEs, ils sont représentés par des alcools, des esters ou des aldéhydes ; ils sont obtenus par des transformations secondaires intervenant directement sur les IPP et le DMAPP. On trouve par exemple le (prénol 3-méthyl-3-butèn-2-ol) qui est le composé hémiterpénique le plus connu (Deschepper, 2017). Ils ne comportent qu'une seule unité isoprène (méthyl-2butadiène-1,3) en C₅ (Teisseire, 1991).

2.6.1.3. Les monoterpènes

La formation d'un monoterpène fait intervenir une liaison 1-4 d'un IPP et d'un DMAPP aboutissant à la formation d'un pyrophosphate de géranyle le précurseur des monoterpènes (C₁₀). Ils peuvent être scindés en deux unités isopréniques, c'est le cas des trois alcools d'un grand intérêt : géraniol, nérol et linalool (Teisseire, 1991).

Les monoterpènes peuvent être acycliques, mono-, bi- voire tricycliques et peuvent être à l'origine d'alcools, esters, phénols, cétones, lactones, aldéhydes ou encore d'oxydes (Deschepper, 2017) (Annexe 3.b).

La grande majorité des composés terpéniques connus résulte d'un couplage dit « tête-queue » d'unité isoprénique (Teisseire, 1991). Le géraniol, le linalol et le citronellol sont des monoterpènes acycliques fréquemment rencontrés dans les huiles essentielles. Le limonène,

l' α -terpinène, le β -terpinène, le γ -terpinène et également le terpinolène sont des monoterpènes monocycliques.

2.6.1.4. Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes (Annexe 3.c) forment un groupe structuellement diversifié mais dont tous les membres dérivent du pyrophosphate de farnésyle qui est le précurseur des sesquiterpènes (C15). D'une manière générale nous pouvons classer ces différentes classes de terpénoïde dans le tableau 1.

Tableau 1. Classification des terpénoïdes (Habtemariam, 2019)

Nom	N° unité 5 x	Exemple de molécule
Hémiterpènes	1	Isoprène
Monoterpènes	2	Aromes volatiles, parfums
Sesquiterpènes	3	Phytoalexines
Diterpènes	4	Phytol, giberellines, phytoalexines
Triterpènes	6	Brassinostéroïdes, stérols de membranes, certaines
Tetraterpènes	8	Caroténoïdes
Polyterpènes	>8	Plastoquinones, ubiquinones, polymère

2.6.2. Analyses chromatographiques

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est un outil primordial dans l'analyse des HEs. Cette technique d'analyse s'est rapidement imposée de par son coût relativement modéré, son automatisation, sa robustesse et sa large gamme de colonnes et de détecteurs disponibles. Basée principalement sur la séparation de composés gazeux selon leur affinité pour la phase stationnaire c'est à dire la colonne (Fernandez et Chemat, 2012).

Le principe se base sur l'affinité des composés à la phase stationnaire (colonne), de ce fait les composés à identifier doivent être thermostables puisque l'analyse des composés solide ou liquide doit les faire passer par l'état gazeux par chauffage, c'est la contrainte N°1 de la technique (Fernandez et Chemat, 2012). En bref, le principe de la chromatographie est basé sur la séparation des composants d'un mélange liquide volatil en commençant par l'injection au moyen d'une microsiringue à travers une pastille de caoutchouc appelée septum dans une petite chambre se situant en amont de la colonne sur le circuit des gaz appelée injecteur. Les

constituants du mélange injectés seraient entraînés à la même vitesse que celle du gaz porteur s'ils n'auraient pas été freinés par l'interaction de leurs molécules avec celles de la phase stationnaire, de ce fait les constituants du mélange vont se détacher l'un après l'autre dans le parcours de la colonne selon leur affinité à la phase stationnaire jusqu'à arriver au niveau du détecteur qui calcule en continue la conductivité thermique du gaz à la sortie de la colonne et cela permet d'identifier les composants (Tranchant, 1995).

Les détecteurs de la chromatographie en phase gazeuse couplée ne donnent pas d'informations sur la nature des composés élués, donc en adaptant à la sortie de colonne un détecteur de masse (GC-SM), on obtient le spectre de fragmentation de chacun des composés élués en traçant le chromatogramme représentatif de ces composés (Fernandez et Chemat, 2012) (Annexe 4).

3.1. *Thymus willdenowii* Boiss

3.1.1. Origine et répartition géographique

Le Thym (*Thymus willdenowii* Boiss ; Synonyme : *Thymus hirtus*) est l'une des PAM les plus utilisées depuis les temps les plus anciens, rajoutées aux préparations culinaires ou comme infusion. Le nom "*Thymus*" provient du mot grec « *thymon* » qui signifie "parfum" à cause de l'odeur agréable que la plante dégage naturellement ou lorsqu'on la fait brûler (Zeghib *et al.*, 2019).

Les plantes du genre *Thymus* ont comme origine la région méditerranéenne, la péninsule ibérique et le nord-ouest africain, d'où il se propage en Europe, au Groenland, en Amérique du Nord et en Abyssinie, ainsi qu'en Asie (Li *et al.*, 2019). Edmund Boissier (1839-1845) le fameux botaniste suisse a étudié et a décrit de nouvelles espèces de la péninsule Ibérique, le résultat de plusieurs années de recherche en voyageant à travers l'Espagne. Il a également étudié et décrit des espèces de Thym du nord d'Afrique, de la Grèce et de la Turquie. L'espèce *Thymus willdenowii* a été décrite comme étant une plante retrouvée seulement dans le nord-africain spécialement en Algérie et nord du Maroc, qu'il nota dans son livre Flora Orientalis (Stahl-Biskup et Saez, 2002).

3.1.2. Classification

La classification de thym étudié est la suivante :

Classe : Magnoliopsida

Famille : Lamiaceae

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus willdenowii* Boiss

Nom commun : Thym ou Thyme

Nom vernaculaire : « Ziitra » ou « Zaïtra » <https://www.tela-botanica.org/isfan-nn-145452-synthese>

3.1.3. Description botanique

En Algérie, ce genre regroupe 12 espèces qui sont : *T. capitatus* (L.) Hoffin et Link., *T. fontanesii* Boiss et Reut., *T. commutatus* (Bali.) Batt., *T. dreatensis* Batt., *T. numidicus* Poirét., *T. guyoniide* Noé., *T. lanceolatus* Desf., *T. pallidus* Coss., *T. glandulosus* Lag., *T. hirtus* Willd., *T. algeriensis* Boiss et Reut., *T. ciliatus* Desf qui regroupe 3 sub espèces qui sont: *ciliatus* Maire, *coloratus* (Boiss. et Reut) Batt et *munbyanus* (Boiss. et Reut.) (Quezel et Santa, 1963).

D'après Li *et al.* (2019), le genre *Thymus* appartenant à la famille des Lamiaceae, contient environs 250 taxons (214 espèces et 36 sous espèces) à travers le monde. Elle regroupe des herbes annuelles ou vivaces, des arbustes ou encore des sous-arbrisseaux, rarement ligneuses, souvent velues, à tige généralement quadrangulaire. Les feuilles sont opposées et décussées (disposées par paires opposées), dépourvues de stipules, à limbe généralement denté. Les fleurs généralement sont hermaphrodites, à symétrie bilatérale ou parfois presque radiaire. Les sépales (calice) et les pétales (corolle) sont soudés en tubes comportant habituellement quatre ou cinq lobes, ou lèvres, de forme irrégulière (symétrie bilatérale). Les deux, quatre ou cinq étamines sont attachées à l'intérieur du tube corollaire. L'ovaire est supère, libre et possède deux carpelles (Nouioua et Gherabi, 2021).

T. willdenowii est une plante basse sous-ligneuse, caractérisée par des feuilles vert foncé de 4–10 mm de long, et de forme elliptique à oblongue et à tige courte. Ces feuilles sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes), ces derniers contiennent l'HE majoritairement composée de monoterpènes (Nouioua et Gherabi, 2021). La figure 4 représente la plante *Thymus willdenowii* Boiss. C'est un arbrisseau érigé, odorant, à inflorescence, possédant un calice en forme de cloche avec deux lèvres, lèvre supérieure à 3 dents, l'inférieure à deux lobes. La corolle a deux lèvres, 4 étamines saillantes plus ou moins divergentes (Quezel et Santa, 1963 ; Yousfi, 2020).



Figure 4. Photo de *Thymus wilddenowii*

<https://www.teline.fr/en/photos/lamiaceae/thymus-wilddenowii>

3.1.4. Utilisation

Parmi les plantes utilisées en phytothérapie, le thym trouve un large emploi comme antiseptique, antiviral, stomachique et expectorant. L'infusion du thym peut s'utiliser en bain de bouche en cas d'inflammation des gencives et en gargarisme en cas d'irritation de la gorge ou d'angine (Laredj, 2016).

Des enquêtes ethnobotaniques ont été effectuées auprès de la population dans une étude menée au Maroc et il s'en est découlée l'utilisation dominante de la feuille de la plante *Thymus wilddenowii*, la majorité des remèdes est préparée sous forme de décoction et les affections de l'appareil digestif figurent parmi les pathologies les plus traitées (Daoudi *et al.*, 2016). D'autres utilisent cette même plante pour traiter les diarrhées, les infections des voies respiratoires et les infections des voies urinaires mais aussi comme conservateur culinaire (Yousfi, 2020).

3.1.5. Activités pharmacologiques

3.1.5.1. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire topique des feuilles de *Thymus wilddenowii*, a été étudiée à l'aide du test de l'oreille à l'huile de croton chez la souris et a montré que l'activité se concentre dans l'extrait chloroformique, qui a une puissance similaire à celle de l'indométacine, l'anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé comme référence (ID₅₀ (dose donnant 50 % d'inhibition de l'œdème) = 83 µg/cm² et 93 µg/cm², respectivement).

Les principaux composés responsables de l'activité anti-inflammatoire de *T. willdenowii* sont l'acide ursolique et l'acide oléanolique. Les flavonoïdes lutéoline-3'-O-glucuronide et ériodictyol-7-O-glucoside ont été trouvés pour la première fois dans le genre *Thymus* (Ismaili *et al.*, 2001).

Par ailleurs, Guesmi *et al.* (2014) ont conclu que l'administration orale de *T. hirtus sp. algeriensis* Boiss à la dose de 177 et 180 mL/kg inhibait un ulcère gastrique induit par HCl/éthanol.

3.1.5.2. Activité antimicrobienne

L'HE de *T. willdenowii* a été testée pour son activité antimicrobienne, révélant un pouvoir antibactérien avéré avec des valeurs de CMI et CMB intéressantes (diamètre d'inhibition=10mm pour *Staphylococcus aureus* ATCC25923 pour l'HE de la partie végétative et 12mm pour la partie florale), (Bnina *et al.*, 2009). L'activité antibactérienne avérée est probablement due à la présence de monoterpènes et sesquiterpène dans cette huile (thymol, eucalyptol, eamphor) comme reporté par (Guesmi *et al.*, 2018). D'autres activités antifongiques ont été attribuée à cette HE avec une activité plus accrue pour les levures que pour les bactéries, les résultats obtenus par Bnina *et al.* (2009) le confirment.

3.2. *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf

3.2.1. Origine et répartition géographique

La plante est une herbe indigène du sud de l'Inde et du Sri Lanka, mais pousse aujourd'hui spontanément dans le monde entier, en particulier dans d'autres régions tropicales, subtropicales et de savane (Kassahun *et al.*, 2020). Le nom du genre vient des mots grecs « kymbe » signifiant un bateau et « pogon » signifiant une barbe. Connue sous le nom de Citronnelle ou Citronella à travers le monde.

Dans les régions tropicales et subtropicales, environ 140 espèces de *Cymbopogon* sont trouvées. Parmi celles-ci, 52 espèces sont dispersées dans l'Afrique, 45 dans le sous-continent (dont huit espèces poussent au Pakistan), six en Australie et Amérique du Sud, quatre dans les pays européens et deux dans l'hémisphère occidental. Cette plante est endémique de l'Inde et pousse également aux Antilles, au Guatemala, en Haïti et au Pakistan. Peut pousser également

dans divers environnements mais un climat chaud et humide avec un ensoleillement suffisant est idéal pour sa croissance. L'âge total de la citronnelle est de 548 à 730 jours (Abida, 2014)

3.2.2. Classification

D'après Shah *et al.* (2011), la classification de la citronnelle est la suivante :

Règne: Plantae

Division: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordre: Poales

Famille: Poaceae

Genre: *Cymbopogon Spreng*

Espèce: *Cymbopogon citratus*

3.2.3. Description botanique

Cymbopogon citratus, plante vivace aux feuilles longues et fines, fait partie des plantes médicinales largement cultivées pour ses HEs dans de nombreuses régions du monde. Les feuilles en forme de lanière mesurent de 1,3 à 2,5 cm de large, environ 0,9 m de long (Shah *et al.*, 2011). C'est une herbe vivace agglomérante sensible au gel. C'est aussi une herbe ornementale exceptionnelle qui donne une grande beauté aux jardins, que ses utilisations culinaires soient exploitées ou non. La plante forme généralement une touffe dense et arrondie de feuillage en une saison de croissance (figure 5). Les feuilles linéaires sont vert clair et dégagent un parfum citronné lorsqu'elles sont froissées et la plante produit rarement des fleurs.



Figure 5. Photo de *Cymbopogon citratus*

<http://www.homejardin.com/citronnelle/cymbopogon-citratus.html>

3.2.4. Utilisation

La plante est largement répandue et consommée pour ses effets médicaux, cosmétiques et nutritionnels depuis des siècles. La consommation d'infusions et de décoctions à base de *C. citratus* est une pratique courante dans divers pays depuis la découverte de la valeur médicinale de la plante (Ekpenyong *et al.*, 2015).

Cymbopogon citratus est utilisé comme drogue populaire ancienne dans le cadre du traitement de l'affection nerveuse, troubles gastro-intestinaux, fièvre et maladies cardiovasculaires. Elle est également un remède populaire contre la toux, l'hypertrophie, grippe, gingivite, maux de tête, lèpre, paludisme, en ophtalmologie et maladies respiratoires.

C'est surtout pris dans la variété du « thé » comme remède du relâchement des intestins et des douleurs abdominales. *Cymbopogon citratus* a des propriétés carminatives et insectifuges. L'HE de *Cymbopogon citratus* a été revendiquée pour posséder une activité antihelminthique (Kassahun *et al.*, 2020). En Inde, la plante est utilisée pour les problèmes neurologiques, en Chine en tant qu'anxiolytique, en Amérique centrale pour soulager la toux. Au sein des Îles Maurice et dans la péninsule, il est courant d'utiliser la tisane de citronnelle contre la fièvre et la pneumonie. Au Brésil populairement utilisé comme spasmolytique, analgésique, anti-inflammatoire, antipyrétique, médicament et sédatif. Au Nigeria, est utilisée

comme antipyrétique, et pour ses effets stimulants. En République d'Indonésie, est indiquée pour favoriser la diurèse et la transpiration. En Argentine la décoction de feuilles se prend par voie orale pour les maladies inflammatoires. L'extrait à l'eau chaude de la plante entière est utilisé à l'extérieur pour la cicatrisation des plaies et des fractures osseuses. Aux États-Unis et en Thaïlande la plante est prise par voie orale pour le diabète. L'extrait à l'eau chaude de feuilles séchées se prend par voie orale comme hypotenseur, et comme antispasmodique rénal et diurétique en Egypte. En Afrique et en Asie, c'est considéré comme antitussif, antiseptique, stomacal, antirhumatismal et pour traiter les maux de dos (Ekpenyong *et al.*, 2015)

Les extraits de feuilles de citronnelle ont également une protection contre le stress oxydatif, hypotenseur, vaso-relaxant et chimio-prévention du cancer (Puatanachokchai *et al.*, 2002).

3.2.5. Propriétés pharmacologiques

3.2.5.1. Propriété antimicrobienne

Différentes études ont investigué le potentiel antibactérien de la plante *C. citratus* aboutissant à conclure que l'effet antibactérien était plus remarqué contre les bactéries Gram positives (diamètre d'inhibition 29,66, 28 et 24,66 mm pour les Gram positive : *S. aureus*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* respectivement) que celle à Gram négative (22,33, 17 et 00 pour les Gram négatives : *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*) (Shah *et al.*, 2011; Kassahun *et al.*, 2020).

Hormis son pouvoir antibactérien, la citronnelle est connue, à travers plusieurs études, pour ses activités indiquant que l'huile est active contre les dermatophytes comme *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Epidermophyton floccosum* et *Microsporum gypseum* et fait partie des agents les plus actifs contre les dermatophytes humains (Shah *et al.*, 2011)

3.2.5.2. Propriété anti-inflammatoire

De par sa richesse en Citral, la plante est dotée d'un potentiel anti-inflammatoire avéré (l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire topique de l'infusion de citronnelle réalisée par le modèle d'œdème de la patte de rat induit par la carraghénane a révélé une réduction de l'œdème de 43,18%). Plusieurs études ont déterminé l'efficacité de la plante, *in Vitro*, pour conclure que

l'HE de *C. citratus* pouvait être associée à l'inhibition de la synthèse et la sécrétion de plusieurs médiateurs de l'inflammation nonobstant son effet antioxydant aussi (Costa *et al.*, 2016).

L'inflammation est la réponse du corps à une attaque pathogène du système immunitaire et parmi les effets de cette inflammation, l'activation du gène de la lipoxigénase (LOX), en effet, des études *in silico* ont conclu qu'il y avait une interaction entre plusieurs composés de l'HE de *Cymbopogon citratus* et l'activité du gène LOX par inhibition de ce dernier.

3.2.5.3. Toxicité

L'utilisation des HEs requiert une prise de précautions particulières notamment si ces dernières sont utilisées pour aromatiser des aliments destinés à l'alimentation humaine, à cause des risques de cancer, c'est dans cette optique que Fandohan *et al.* (2008) ont évalué, *in vivo*, la toxicité de *C. citratus* et n'ont observé aucun décès au jour 1 dans le groupe de rats ayant reçu l'HE de *C. citratus* des doses de 5 à 1500 mg/kg de poids corporel. Cependant la mortalité animale a été enregistrée à des doses létale médianes >3250 mg/kg de poids corporel.

3.3. *Aloysia citriodora* Palau

3.3.1. Origine et répartition géographique

Aloysia citriodora Palau est un arbuste originaire du sud Amérique et communément appelée verveine citronnée. Il est cultivé en Afrique du Nord, en Europe du Sud et Iran. C'est une plante aromatique utilisée partout dans le monde à des fins médicinales (Bensabah *et al.*, 2015) et comme additif culinaire ou comme boissons (Oukerrou *et al.*, 2017). L'infusion de verveine contient des quantités importantes de polyphénols, tels que sous forme de glycosides phénylpropanoïdes, en particulier le verbascoside et la flavone, les diglucuronides tels que la lutéoline-7-diglucuronide, qui a une activité antioxydante élevée (Afrasiabian *et al.*, 2019).

Noms vernaculaires : Verveine odorante, Verveine citronnelle, Verveine du Pérou, Verveine à trois feuilles, *Aloysia* à trois feuilles, *Aloysia* citronnée (Français), *Aloysia* à odeur de mélisse, Verveine citronnelle (Français), Lemon verbena, Lemon beebrush (Anglais) (Museum national d'Histoire, 2022). La littérature botanique révèle une variété de noms, y compris *Aloysia triphylla*.

En Amérique du sud, les botanistes lui donnèrent le nom du genre Lippi, en mémoire d'un naturaliste Italien d'origine Française, Augustin Lippi et puis un autre botaniste d'origine

Espagnol en 1785, la nomma *Aloysia* en l'honneur de Maria Luisa, princesse de Parme et épouse de Charles IV d'Espagne propriétaire du jardin Real Jardin de Madrid où la plante a été importée. Cette plante originaire des Andes pousse au Chili et au Pérou et est cultivée en Amérique du Sud (Bolivie, Brésil, Uruguay, Argentine) et aux Caraïbes (Ghédira, 2017).

3.2. Classification

D'après Ghédira et Goetz (2017), la classification de la verveine citronnelle est la suivante :

Règne : Plantae

Super-division : Embryophyta

Division : Tracheophyta

Classe : Magnoliopsida

Super-ordre : Asteranae

Ordre : Lamiales

Famille : *Verbenaceae*

Genre : *Aloysia* Juss

Espèce : *Aloysia citriodora* Palau

3.3. Description botanique

Le genre *Aloysia* appartient à la famille des *Verbénacées* et comprend environ 200 espèces d'herbes, d'arbustes et de petits arbres (Argyropoulou *et al.*, 2007). La verveine odorante est un arbrisseau ramifié pouvant atteindre 1 à 1,5 m dont les longues tiges anguleuses et cannelées portent des feuilles rudes courtement pétiolées, verticillées par trois (parfois par quatre) (figure 6). Les fleurs, de petites tailles, nombreuses disposées en épis, possèdent quatre pétales soudés à la base en un tube et étalés en quatre lobes. La nervation est pennée ; la nervure médiane est très proéminente sur la face inférieure, les nervures secondaires beaucoup plus fines mais nettement distinctes, les nervures tertiaires sont anastomosées en réseau. L'espèce peut être cultivée sur le pourtour méditerranéen (Ghédira, 2017; Teuscher *et al.*, 2005). Les pétales forment un entonnoir de 4-5 mm à la base qui recouvre 2 étamines longues et 2 courtes.

La floraison étant en été excrétant une senteur très forte sur les flancs des collines des montagnes (Elechosa *et al.*, 2017).



Figure 6. Photo d'*Aloysia citriodora*

(<https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=291522>)

3.4. Utilisation

La plante est largement utilisée à des fins médicinales et aromatiques en Amérique du Sud. Selon les données de la littérature, les rapports sur l'utilisation traditionnelle de cette espèce remontent au 17ème siècle, montrant son importance ethno pharmacologique en tant que plante médicinale utilisée par la culture Inca (Bahramsoltani *et al.*, 2018). La préparation la plus commune étant en infusion pour les adultes, elle est prescrite contre les vertiges, l'épilepsie, le ballonnement et les spasmes, utilisée aussi contre les douleurs abdominales et comme hypotenseur et rafraîchissant (Chaachouay *et al.*, 2021).

La plante est également utilisée pour la gestion de l'insomnie et l'anxiété dans les pays latino-américains, Dans la médecine traditionnelle mexicaine, la plante est utilisée pour les troubles gastriques, la tristesse et nervosité et son HE est utilisée comme bactéricide ainsi que pour des problèmes dermiques (Bahramsoltani *et al.*, 2018). Les feuilles de la plante sont aussi

utilisées pour l'aromatisation de quelques boissons, dans les assaisonnements dans les préparations alimentaires, comme stimulent de l'appétit (Pascual *et al.*, 2001).

3.5. Propriétés pharmacologiques

3.5.1. Propriétés thérapeutiques

Malgré les vastes activités biologiques de la verveine, il n'y a pas de revue actuelle résumant les propriétés médicinales de la plante (Bahramsoltani *et al.*, 2018). Cependant, plusieurs travaux, *in vitro*, ont eu pour objet l'étude des propriétés pharmacologiques de cette plante en prenant en compte les aspects toxicologiques de la verveine odorante qui ont été évalués, une dose de 0,5 mg/kg d'extrait de plante était sans danger chez les femelles gestantes sans aucune propriété tératogène (Bahramsoltani *et al.*, 2018).

Par ailleurs, Tandisehpanah *et al.* (2022) ont investigué l'effet protecteur des extraits aqueux et éthanoliques de *Lippia citriodora* Kunth sur la neurotoxicité induite par l'acrylamide, une dose de 12-120 µg/mL améliorait l'effet toxique de l'acrylamide sur les cellules PC12 en inhibant le stress oxydatif et l'apoptose.

La verveine est aussi connue pour ses propriétés sédatives et relaxantes, antiseptique intestinal, antispasmodique, antipyrétique, pour le traitement de l'hypertension artérielle (Pascual *et al.*, 2001).

3.5.2. Propriété anti-inflammatoire

Plusieurs études ont montré l'effet anti-inflammatoire et anti-nociceptif (inhiber ou atténuer la sensation de douleur dans l'organisme) de la plante. En effet, l'administration de l'extrait d'hexane et le citral, le principal composant chimique de la plante, ont montré une activité inhibitrice sur la sensation douloureuse et la contraction du muscle de l'utérus d'une manière dépendante de la concentration (l'écrit d'hexane de la plante a enregistré un effet inhibiteur intéressant sur la Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) responsable des contractions menstruelles douloureuses)(Ponce-Monter *et al.*, 2010).

4.1. Généralités sur le yaourt

A l'origine, la fonction première de la fermentation du lait était pour prolonger sa durée de conservation. Cela s'est accompagné de nombreux avantages, tels qu'un goût amélioré et une meilleure digestibilité du lait, ainsi que la fabrication d'une grande variété de produits. Historiquement la fermentation du lait remonte à environ 10 000 avant l'ère commune (Suroño et Hosono, 2011). Il est probable que la fermentation s'est d'abord produite spontanément par la microflore indigène présente dans le lait (Laithier, 2011).

En plus du yaourt, il y a de nombreux types de laits fermentés fabriqués dans différentes parties du monde. En effet, autour de 400 appellations s'appliquent aux métiers traditionnels et industriels produits à base de lait fermenté. En général, les différents types de laits fermentés tendent à être classés selon les méthodes de fermentation et/ou de transformation, qui sont liés aux micro-organismes impliqués (Suroño et Hosono, 2011).

Le mot yaourt (yoghourt ou yogourt) originaire d'Asie, vient de « yoghurmark », mot turc signifiant « épaissir ». En 1902, deux médecins français, Ris et Khoury, isolent les bactéries présentes dans un lait fermenté égyptien. Metchnikoff (1845-1916) isole ensuite la bactérie spécifique du yaourt « le bacille bulgare », analyse l'action acidifiante du lait caillé et suggère une méthode de production sûre et régulière. En effet, c'est en 1919 qu'Isaac Carasso commence à produire du yaourt à Barcelone selon des procédés industriels (Meghachou, 2013).

Selon le Codex alimentarius et la FAO (Food and Agriculture Organization, 1975), le yaourt est un « produit laitier coagulé obtenu par fermentation lactique grâce à l'action de *Lactobacillus delbrueckii sub sp bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* à partir du lait (pasteurisé, concentré, partiellement écrémé enrichi en extrait sec) ». Les bactéries dans le produit fini doivent être vivantes et présentes en abondance. Ces produits doivent notamment être maintenus jusqu'à leur consommation à une température comprise entre 0 et 6 °C pour que les bactéries lactiques restent vivantes.

Ces règles sont inscrites dans la norme AFNOR NF VO4-600 sur les produits fermentés. Selon la norme A-11a de 1975 du Codex Alimentarius, l'adjonction de substances comme la poudre de lait écrémé, les protéines lactosériques concentrées ou non, ou le lactosérum concentré ou non dans les yaourts, est facultative mais autorisée (Lesme, 2019).

Le yaourt et les produits similaires au yaourt sont largement fabriqués dans la région méditerranéenne, l'Asie, l'Afrique et l'Europe centrale. Les synonymes de yaourt ou de laits fermentés apparentés dans divers pays sont présentés dans le tableau 2. « Zabady » ou Le yaourt égyptien est traditionnellement fabriqué à partir de lait de brebis. « Dahi » et « dadih » sont des yaourts indiens et indonésiens, respectivement. Le lait de bufflonne est souvent utilisé dans la fabrication de ces produits, parfois en combinaison avec des bovins (Surono and Hosono, 2011).

La dénomination « laits fermentés » est réservée aux produits laitiers préparés avec des laits écrémés ou non sous forme liquide, concentrés ou en poudre. Ils pourront être enrichis avec des constituants du lait tels que la poudre de lait ou les protéines de lait.

Le lait subit un traitement thermique au moins équivalent à la pasteurisation et estensemencé avec des microorganismes caractéristiques de chaque produit (Frédot, 2005).

Tableau 2. Synonyme du yaourt dans différents pays (Tamime et Robinson, 2007)

Synonyme	Pays
Dahi	Inde
Dadih	Indonésie
Katyk	Kazakhstan
Laben, leben	Liban, Egypte
Laben, rayeb	Arabie saoudite
Mast	Iran, Iraq, Afghanistan
Matzoon, madzoon	Arménie
Roba, rob	Egypte, Soudan, Iraq
Tarho	Hongrie
Tiaourti	Grèce
Yaourt	Russie, Bulgarie
Zabady, zabade ,Zabade	Egypte, Sudan

4.2. Procédé de fabrication de yaourt

Le lait de vache représente la matière première indispensable pour la fabrication du yaourt. Les yaourts peuvent être fabriqués à partir de lait entier (3.9% de matière grasse), demi-écrémé (1.5% de matière grasse) ou écrémé (moins de 0.5% de matière grasse). L'appellation des yaourts selon la teneur en matière grasse est règlementée par le décret européen n°88-1203 (30/12/1988). Le diagramme de fabrication du yaourt en industrie est illustré dans la figure (Annexe 5). Le procédé de fabrication se découpe en plusieurs étapes :

a) La standardisation du mélange

La standardisation du lait se fait par l'ajustement de la matière grasse à 0,5-3,0 g /100 g ainsi que la fortification du lait avec de la poudre de lait afin d'ajuster l'extrait sec dégraissé (ESD) (Béal et Helinck, 2019). Il est à noter que le but de la standardisation par ajustement de la matière grasse a un effet sur l'onctuosité et la sensation de douceur en bouche, pour ce qui est de la standardisation des protéines, le but étant leur coagulation et leur capacité de liaison avec l'eau, agissent sur la texture, particulièrement sur la viscosité, la consistance, l'élasticité et la fermeté (Mihoubi, 2019)

b) L'homogénéisation

Le but de l'homogénéisation est principalement d'assurer une meilleure dispersion des globules gras en réduisant leur diamètre et empêchant leur migration en haut des cuves et ainsi donner une consistance plus uniforme (Mihoubi, 2019).

c) Le traitement thermique

Il vise à réduire la charge microbienne, à inactiver les peroxydases du lait, à produire des facteurs de stimulation des bactéries (acide formique et composés azotés assimilables) et à améliorer les propriétés physiques du yaourt (viscosité, capacité de rétention d'eau). Il contribue à dénaturer 80 % de la fraction protéique sérique, soit totalement l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline, ce qui assure une bonne texture du produit fini (Béal et Helinck, 2019).

Il y a deux types de traitements thermiques, par batch : 15-30 min à 85-90 °C et ou 3-7 min à 90-95 °C lors des traitements thermiques continus Le lait est ensuite refroidi à la température de fermentation (entre 37 °C et 45 °C) (Béal et Helinck, 2019).

d) La fermentation lactique

Le lait standardisé ou enrichi et traité thermiquement, subit un refroidissement à la température de fermentation qui oscille de 40 à 45°C ; température optimale de développement symbiotique des bactéries lactiques du yaourt. L'ensemencement varie de 1 à 7% suivant le type de l'inoculum et le type de yaourt à produire (Paci Kora, 2004). Néanmoins, la fermentation lente peut s'effectuer à 30°C pendant 16-18h ou bien jusqu'à atteindre le degré d'acidité voulu (Tamime et Marshall, 1997)

e) Le conditionnement et stockage

Les yaourts subissent une conservation frigorifique à des températures de 4 à 6°C. Le refroidissement est l'opération qui permet de stopper la fermentation. Il doit permettre de faire passer la « masse blanche » rapidement de 40-45 °C à 4 °C, afin de bloquer au plus vite les activités métaboliques et enzymatiques et de limiter les problèmes de post-acidification. Les laits fermentés sont conditionnés dans deux types de matériaux d'emballage : le verre, réservé aux produits de type haut de gamme, ou le plastique (Béal et Helinck, 2019).

4.3. Qualités des yaourts**4.3.1. Qualité nutritionnelle**

Le yaourt contient des vitamines et sels minéraux présents préalablement dans le lait. Il présente en moyenne des teneurs de 04 à 05 % de protéines, 05 à 20 % de glucides selon qu'il est nature ou sucré et 03 % de lipides. Au cours de la fermentation, la composition du lait subit un certain nombre de modifications. Certaines de ces modifications en font un produit de meilleure valeur nutritionnelle (Tamime et Robinson, 2007). L'analyse quantitative des valeurs nutritionnelles d'un yaourt de 100g sont mentionnés dans le tableau 3.

Tableau 3. Valeur nutritionnelle moyenne des yaourts (Frédot, 2005)

Type de yaourt	Protéines	Lipides	Glucides	Calcium	Valeur énergétique	
					KJ	Kcal
Yaourt nature	4	1	5	170	200	50
Yaourt nature au lait entier	4	3,5	5	150	300	70
Yaourt nature aux fruits	4	-	5	150	200	50
Yaourt nature maigre	4	Variable	18	130	500	100
Yaourt aux fruits	4	Variable	14	150	350	85
Yaourt aromatisé	3	1,5	14	150	350	85
Yaourt à boire sucré	3	1,5	14	110	320	75

- ne contient pas

Concernant les sucres disponibles, les yaourts naturels contiennent un nombre de mono et disaccharides en trace mais le lactose est dominant (Tamime et Robinson, 2007).

Les sucres non disponibles sont présents dans les stabilisateurs additionnés au yaourt afin de contourner la synérèse (par exemple, la gomme de guar, la gomme de caroube, ainsi que les carraghénanes et les dérivés cellulosiques). Ces sucres peuvent avoir de multiples fonctions comme la stimulation du péristaltisme des intestins évitant ainsi des maladies du colon ainsi que l'abaissement du taux de cholestérol dans le sang (Tamime et Robinson, 2007). Les exopolysaccharides (EPS) sont sécrétés par certains lactobacilles et bifidobactéries incluant *S. thermophilus* durant leur croissance, ce composé reste attaché à la surface des cellules bactériennes et contribue positivement aux propriétés des yaourts. Il a été noté que les EPS et certains types d'EPS peuvent agir comme prébiotiques, c'est-à-dire stimuler la croissance de certains groupes de bactéries souhaitables dans le côlon (Tamime et Robinson, 2007).

Il est connu que le yaourt contient une valeur supérieure de protéines que celle du lait du fait de l'ajout de la poudre de lait écrémé au cours de la fabrication, il est important que les protéines du yaourt soient totalement digestibles, une caractéristique renforcée par le fait qu'un certain degré de la protéolyse initiale est causée par les organismes starters eux-mêmes.

L'étendue de cette protéolyse dépendra des souches de bactéries employées mais, en général, une certaine libération d'acides aminés et de peptides peut être attendue pendant l'incubation et le stockage (Tamime et Robinson, 2007). Durant la digestion des protéines du

lait, les peptides sont libérés, ces derniers possèdent des rôles physiologiques importants dans le corps humain.

4.3.2. Qualité microbiologique

L'objectif de l'analyse microbiologique des yaourts est la recherche et quantification des germes indicateurs d'une contamination ou d'un problème lors du procédé de fabrication présentant un danger pour le consommateur. Selon l'Arrêté interministériel Algérien N°39 correspondants au 2 juillet 2017, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires, les critères microbiologiques du yaourt sont illustrés dans le tableau 4.

Tableau 4. Critères microbiologiques du yaourt à l'échelle industrielle

Yaourt	N	C	m	M
Coliformes totaux	5	2	10	10 ²
Coliformes fécaux	5	2	10	10 ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	2	10	10 ²
Salmonelles	5	0	Absence dans 25g	
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100	

N : Nombre d'unité composant l'échantillon.

C : Nombre d'unités de l'échantillon donnant des valeurs situées entre m et M.

m : le seuil au-dessous duquel le produit est considéré comme étant de qualité satisfaisante. Tous les résultats égaux ou inférieurs à ces critères ne sont pas considérés comme satisfaisants, sans autant que le produit soit considéré comme toxique.

M : seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants, sans pour autant que le produit soit considéré comme toxique ;

M : 10m : lors du dénombrement effectué en milieu solide.

M : 30m : lors de dénombrement effectué en milieu liquide.

4.3.3. Qualité organoleptique

La production des yaourts est régie par certaines conditions telles que le maintien de la texture ferme du produit au cours de la fermentation ainsi que durant le stockage (Muhammad *et al.*, 2012). Différents composés volatils et aromatiques interviennent dans la saveur et l'appétence du yaourt. C'est principalement le lactose qui joue un rôle dans la formation de ces composés.

Les composants aromatiques qui contribuent à l'arôme final du yaourt peuvent être divisés en quatre catégories : les acides non volatiles (lactique et pyruvique) ; les acides volatiles (butyrique et acétique) ; les composés carbonyliques (acétaldéhyde et diacétyl) et divers autres composés (acides aminés et produits formés par la dégradation thermique tel que l'acide formique) (Serra *et al.*, 2009).

Les saveurs sous-jacentes des produits laitiers, en général proviennent principalement des constituants volatils natifs du lait de vache, influencé par la pasteurisation, la fermentation, la transformation, et stockage. Un grand nombre de composés organiques volatils trouvés dans le yaourt ne sont pas produits par les bactéries starter mais proviennent du lait. Le yaourt est un aliment qui a sa propre saveur particulière et populaire, qui se manifeste par sa présence constante dans la liste des aliments préférés dans le monde (Routray et Mishra, 2011). Les plus importants composés aromatiques du yaourt sont illustrés dans la figure 7.

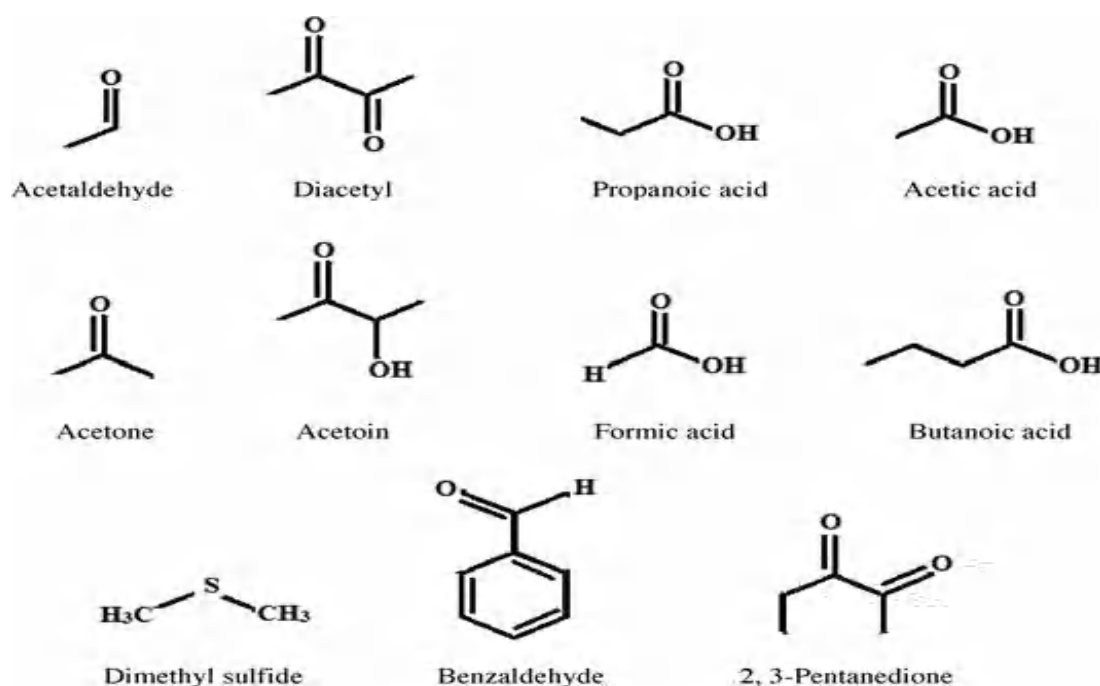


Figure 7. Composés aromatiques majoritaires dans le yaourt (Routray et Mishra, 2011)

Les propriétés texturales du yaourt comprennent la viscosité, la fermeté et la synérèse. Mesurer la viscosité du yaourt est difficile car il est non newtonien, c'est-à-dire que la viscosité change en fonction de la contrainte de cisaillement (Trachoo, 2002). La viscosité du yaourt est la résultante aussi de la formation d'exopolysaccharides par les bactéries starter du yaourt *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* (Tamime et Robinson, 2007).

Un autre facteur régit la texture des yaourts, c'est le traitement thermique, en effet, Labropoulos *et al.*, (1981) ont conclu que le yaourt préparé avec du lait UHT (149°C, 3sec) avait une faible viscosité par rapport à un yaourt préparé en cuve (63° C et 82° C, 30 min)

4.4. Généralités sur les bactéries lactiques

4.4.1. Ecologie

Elles forment un groupe hétérogène composé de coques et de bacilles, dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres (Mahi, 2010). Les bactéries lactiques (BL) sont d'une grande importance dans les industries laitières, elles sont utilisées sous forme de ferments mixtes qui demeurent les plus utilisés. Cette association complexe de microorganismes nécessite la maîtrise des facteurs qui peuvent influencer la dynamique et les activités métaboliques des populations bactériennes au sein du ferment. La connaissance des interactions de compétition ou de coopération possibles entre ces souches est fondamentale. Des interactions microbiennes négatives peuvent générer un déséquilibre et causer des changements indésirables dans les produits finaux (Belkheir, 2017). Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires, ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Regarded As Safe) (Belkheir, 2017).

Les BL sont très répandues dans la nature, elles peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physico-chimique et biologique. Dans certains écosystèmes comme le lait elles sont dominantes, dans d'autres elles sont minoritaires. Leurs grandes exigences nutritionnelles les associent à des environnements naturels particulièrement riches en nutriments ; plantes, animaux, produits laitiers et carnés. Grâce à des phénomènes de synergie ou de coopération, différentes espèces de bactéries lactiques sont très souvent associées dans un habitat donné (Marshall, 1987).

4.4.2. Caractéristiques biochimiques et physiologiques

Les BL sont caractérisées par un ensemble de traits biochimiques et physiologiques communs qui leur sont propres et permettent ainsi de les distinguer des autres groupes

bactériens. Ce sont des procaryotes à Gram positif, asporulées, immobiles, anaérobies mais aérotolérantes, ne possèdent ni nitrate-réductase, ni cytochrome oxydase ; elles sont aussi catalase négative (certaines souches possèdent une pseudocatalase). Ce sont des microorganismes anaérobies qui tolèrent l'oxygène dans une certaine mesure. L'oxygène affecte leur métabolisme mais aussi leur croissance, leur survie et l'intégrité de leur ADN. Elles possèdent deux types d'oxydases à NADH, ces enzymes catalysent la réduction d'O₂ en H₂O₂ ou d'O₂ en H₂O (Belkheir, 2017).

Les BL regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Gerevrs *et al.*, 2001 ; Hassaine, 2013).

Toutes les BL ont la capacité de fermenter certains sucres en acide lactique. Certaines sont dites homofermentaires, car elles produisent très majoritairement de l'acide lactique. Les hétérofermentaires produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés (généralement l'acétate et l'éthanol) (Belkheir, 2017).

4.4.3. Classification

La classification de Bergey (Bergey, 1994) sépare le monde bactérien en 35 groupes. Les BL, se retrouvent dans les groupes 17 (coques Gram positives), 19 (bâtonnets réguliers Gram positifs, nonsporulants) et 20 (bâtonnets irréguliers Gram positifs, nonsporulants) (Guétouache, 2021). Les BL comprennent plus de 60 genres, généralement retrouvés dans les aliments ou impliqués dans les fermentations des aliments appartiennent aux genres : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Weissella*, etc. (Wang *et al.*, 2021).

Selon les données de la classification courante, les BL appartiennent au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales*. Cet ordre est composé de six familles qui

sont *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae*, *Lactobacillaceae*, et *Streptococcaceae* (Annexe 6).

4.4.4. Métabolisme

4.4.4.1. Dégradation des polysaccharides indigestes

Les polysaccharides sont des polymères composés de plus de dix unités monosaccharidiques identiques ou différentes liées par liaisons glycosidiques α - ou β - (Gerwig, 2019). Chez les plantes, les polysaccharides comprennent l'amidon, la cellulose, le fructane, l'hémicellulose, etc. La dégradation des polysaccharides par les BL dépend des diverses hydrolases. Dans les aliments fermentés, la décomposition des polysaccharides peuvent fournir de l'énergie aux BL et fournir une variété de substances bénéfiques pour l'homme. Différents types de BL peuvent métaboliser différents polysaccharides, ce qui détermine les différentes perspectives d'application des souches apparentées dans l'industrie alimentaire (Wang *et al.*, 2021).

4.4.4.2. Dégradation des protéines

Au cours de la transformation des aliments, la dégradation des macromolécules comme les protéines est un processus important qui affecte la qualité des aliments nutritionnelle et sanitaire. Les fermentations laitières impliquent l'hydrolyse des protéines par les BL, cette hydrolyse peut être divisée en plusieurs étapes y compris la dégradation des protéines, le transport des peptides, la dégradation des peptides et le catabolisme des acides aminés (Wang *et al.*, 2021).

4.4.4.3. Catabolisme des acides aminés

Les BL peuvent dégrader les acides aminés dans les aliments pour produire des composés aromatiques par deux procédés : la décarboxylation et la désamination. A travers la désamination, de nouveaux composés apparaissent tels que les α -acide carboxylique impliqués dans plusieurs métabolismes des BL.

Par ailleurs, la décarboxylation génère une variété d'amines biogéniques sous l'intervention de décarboxylase, par exemple, après une décarboxylation, les acides aminés lysine, tryptophane,

tyrosine, histidine ou ornithine peuvent générer la cadavérine, tryptamine, tyramine, histamine, putrescine qui peuvent être importants pour le développement des BL pour leur adaptation dans des milieux acides mais toxiques pour l'homme. C'est dans cette optique que les chercheurs tentent de trouver des alternatives (Gardini *et al.*, 2016 ; Papadimitriou *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2021).

4.4.5. Potentiel antioxydant

Les souches de BL les plus importantes représentant des probiotiques, présentent des propriétés anti-âge et antioxydantes, elles fonctionnent grâce à leur réponse rapide et sensible au stress oxydatif (Hanchi *et al.*, 2022). Un récent intérêt de l'étude de l'activité antioxydante des BL a été observé, s'intéressant plus aux Lactobacilles faisant déjà partie du microbiote intestinal humain (Lin et Yen, 1999).

4.4.6. Action des bactéries lactiques dans le yaourt

Le yaourt est un aliment obtenu par fermentation lactique du lait. Ce dernier contient des glucides, en particulier du lactose (disaccharide composé d'un galactose et d'un glucose), qui va être utilisé par les BL qui, en retour, vont produire et libérer de l'acide lactique.

L'acidification qui en résulte va entraîner un changement de texture (coagulation des protéines du lait) et de saveur, ceci en association avec la libération de divers autres métabolites. *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* sp. *Bulgaricus* sont les deux bactéries responsables de la fermentation du lait dans la production de yaourt. Ce processus empêche le lait d'origine de la détérioration et lui procure de bonnes caractéristiques de texture visqueuse, goût doux, saveur unique et des caractéristiques probiotiques spécifiques (Yue *et al.*, 2022).

4.4.5. Principales caractéristiques morphologiques et culturelles des bactéries lactiques

4.4.5.1. *Streptococcus thermophilus*

C'est une BL de forme cocci à Gram positif, anaérobie facultative, non mobile, de forme sphérique ou ovoïde, <1 µm de diamètre et formant des chaînes ou apparaissant par paires. A 15 ° C, il y a absence de croissance, tandis à 45° C elle peut donner naissance à des cellules irrégulières et segmentées. La plupart des souches sont capables de croître à 50° C ou de survivre à un chauffage pendant 30 min à 60° C. Les BL produisent de l'acide lactique,

l'acétaldéhyde et le diacétyl à partir du lactose dans le lait. Certaines souches produisent des exopolysaccharides (EPS) et nécessitent des vitamines B et certains acides aminés pour des taux de croissance améliorés. Il y a absence de croissance dans le bleu de méthylène (0,1 g 100 ml/1) ou à pH 9,6.

Le type de peptidoglycane de la paroi cellulaire est Lys-Ala₂₋₃. Les données de séquence d'ARNr 16S ont démontré une association étroite entre *S. Thermophilus*, *S. Salivarius* et *S. vestibularis* (Tamime et Robinson, 2007). Vu que *S. salivarius* ne se développait pas dans le lait en présence de *Lactobacillus delbrueckii sub sp. Bulgaricus*, elle ne convient pas à la fabrication du yaourt car il présente une saveur, un arôme et une texture médiocres (Tamime and Robinson, 2007).

4.4.5.2. *Lactobacillus bulgaricus*

C'est un bacille Gram positif, immobile, asporulé, microaérophile. Il est isolé sous forme de bâtonnets ou de chaînettes. Il possède un métabolisme strictement fermentaire avec production exclusive d'acide lactique comme principal produit final à partir des hexoses de sucres par voie d'Embden Meyerhof. Incapable de fermenter les pentoses. *L. bulgaricus* est une bactérie thermophile, très exigeante en calcium et en magnésium et sa température optimale de croissance est d'environ de 42 °C. Cette bactérie a un rôle essentiel dans le développement des qualités organoleptiques et hygiéniques du yaourt (Belfoudil et Amar Aouchiche, 2018).

4.4.5.3. Interaction entre *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*

L'utilisation combinée de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* lors de la production de yaourt, permet de constater l'interaction indirecte positive existant entre ces deux espèces. En effet, cette interaction mutuellement favorable aux deux espèces est appelée proto-coopération. Elle se traduit par une augmentation de la vitesse d'acidification par rapport à celles observées en cultures pures accompagnée d'un accroissement des concentrations bactériennes, une protéolyse plus prononcée, une amélioration de la production des composés d'arômes (acétaldéhyde notamment) et de la stabilité physique du produit (réduction des problèmes de synérèse).

S. thermophilus, qui est connu de posséder une faible activité protéolytique, est stimulé par les petits peptides et acides aminés formés dans le lait grâce à l'activité protéolytique de *L.*

bulgaricus, permise par l'action de sa protéase de paroi PrtB. En retour, *S. thermophilus* fournit du CO₂ et de l'acide formique qui, tous deux, vont stimuler la croissance de *L. bulgaricus* (Béal et Helinck, 2019) (figure 8).

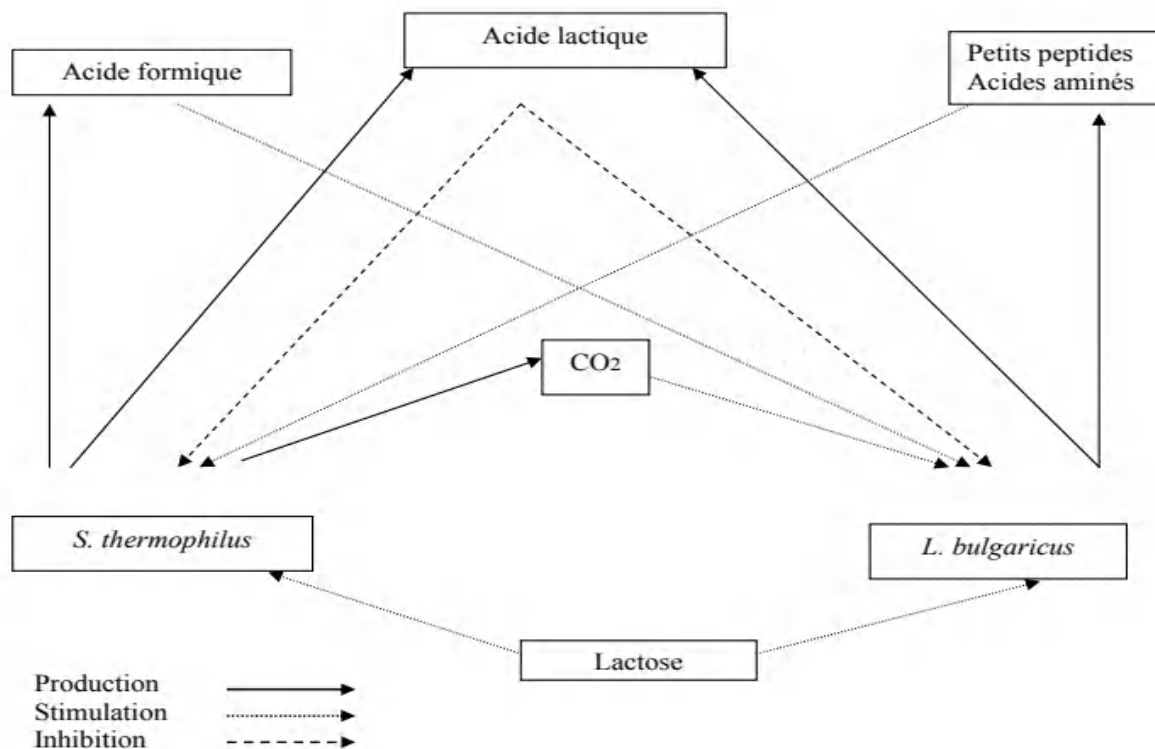


Figure 8. Aspect interactif entre *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* dans le yaourt (Béal et Helinck, 2019)

4.5. Potentiel antioxydant des yaourts

Dans le procédé yaourt, la fermentation du lait représente une méthode très bénéfique pour prolonger la durée de conservation et un excellent moyen d'obtenir des aliments dits fonctionnels avec une saveur acceptable recherchée.

La fermentation est importante dans la production de produits laitiers, car les différentes souches de cultures microbiologiques utilisées dégradent les composants primaires du lait tels que les protéines, les glucides et les lipides en diverses formes secondaires telles que les acides aminés libres, les peptides, les acides organiques, les acides gras libres, qui possèdent diverses fonctions bénéfiques pour la santé (Gjorgievski *et al.*, 2014). Les peptides issus de la protéolyse sont inertes dans la protéine initiale du lait (caséine, albumine) mais qui peuvent être sécrétés

dans le milieu par divers processus tels que l'hydrolyse enzymatique, la fermentation du lait par divers microorganismes, ces peptides ont un rôle dans l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, et l'activité antioxydante. Les vitamines du lait ont aussi leur rôle à jouer, par exemple, la Vitamine E et caroténoïdes sont localisés dans les membranes des globules gras du lait où ils préviennent l'auto oxydation du lait.

Le lait contient une variété de composés phénoliques (doués d'activité antioxydante), à des concentrations allant du microgramme au milligramme par litre. Ce sont des alcools aromatiques, majoritairement associés à la phase aqueuse du lait. L'origine principale des composés phénoliques du lait est l'alimentation des animaux. Les fourrages peuvent contenir une grande variété de métabolites secondaires phénoliques, qui sont en partie dégradés dans le rumen puis absorbés au niveau des cellules intestinales et transférés au lait via la circulation sanguine. En effet, les HEs et les extraits végétaux, riches en antioxydants (composés phénoliques notamment), sont de plus en plus utilisés en élevage de ruminants, comme traitements vétérinaires préventifs et comme additifs alimentaires (Sibra et Claire, 2014).

4.6. Aperçu sur quelques travaux d'incorporation des HEs dans le yaourt

Les consommateurs sont plus conscients de la relation entre leurs habitudes alimentaires et leur état nutritionnel. Par conséquent, ils recherchent des aliments qui sont supplémentés avec des produits naturels plutôt que des composés chimiques synthétiques. Dans ce scénario, certaines entreprises ont fabriqué des produits alimentaires en remplaçant partiellement ou totalement ces additifs synthétiques par des extraits naturels de plantes, non seulement en raison de leurs propriétés antioxydante et antimicrobienne, mais également en raison des aspects sensoriels qu'ils confèrent aux produits (Granato *et al.*, 2018) (Tableau 5).

Tableau 5. Liste de quelques travaux antérieurs d'incorporation des HEs dans le yaourt

Huile essentielle	Matrice	Références
Gingembre et camomille	Yaourt	(Yangilar et Yildiz, 2018)
<i>Ocimum sanctum</i>	Yaourt	(Anand <i>et al.</i> , 2018)
<i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Lavendula</i> , <i>chamaemelum</i> spp	Yaourt	(Ghalem et Zouaoui, 2013)
<i>Thymus vulgaris</i> , <i>Majorana hortensis</i> , <i>Salvia officinalis</i>	Labneh (Yaourt concentré)	(Otaibi et Demerdash, 2008)
<i>Citrus sinensis</i>	Yaourt	(Jimborean <i>et al.</i> , 2016)
<i>Thymus vulgaris</i>	Yaourt	(Ducková <i>et al.</i> , 2018)
<i>Mentha piperita</i> , <i>Ocimum basilicum</i> , <i>Zataria multiflora</i>	Yaourt	(Azizkhani et Parsaeimer, 2018)

A notre connaissance, et d'après une recherche dans la littérature disponible, nous n'avons pas trouvé de travaux antérieurs d'incorporation de l'HE de *T. willdenowii* ni d'*A. citriodora* dans un produit laitier de type yaourt.

Concernant l'espèce *C.citratus*, Abubakar *et al.* (2022) ont incorporé l'HE de cette plante aux doses de 0,5, 1 et 2µL/mL dans le yaourt et ont conclu que cet ajout pouvait préserver la qualité du yaourt au-delà de 7jours lorsqu'il est stocké à température ambiante.

Par ailleurs, Eldeeb *et al.* (2021) ont incorporé la poudre de plante et son extrait à 0,5% au yaourt glacé afin de préserver sa qualité et comme source de prébiotiques pour les bactéries starter choisies. Récemment, en Roumanie, Tița *et al.* (2020) ont tenté l'incorporation de l'HE de basilique, menthe, fenouil et lavande dans des yaourts à la dose de 25% afin de créer un aliment fonctionnel contenant des substances naturelles afin de diminuer les effets de stress causés par la pandémie de COVID 19.



MATERIEL ET METHODES

1. Rappel du contexte de l'étude et démarche expérimentale

L'innovation d'un produit déjà existant repose dans la majorité des cas sur la modification des formulations et parfois, sur l'invention d'un nouveau procédé. L'ajout d'additifs et d'auxiliaires technologiques est un passage quasiment obligé pour optimiser ces formulations. Les efforts d'innovation de l'industrie alimentaire doivent garantir la qualité sanitaire, améliorer l'impact positif des aliments sur la santé et minimiser les coûts de fabrication tout en répondant à l'attente des consommateurs pour des produits de bonne qualité gustative, bons marchés et faciles à conserver. Plus récemment, la prise en compte des impacts sur l'environnement des moyens de productions est apparue comme une nouvelle exigence (Feillet, 2013). C'est dans optique que s'inscrit cette étude, qui a pour principal objectif la formulation de yaourts incorporés d'huiles essentielles extraites de trois plantes aromatiques et médicinales : *Thymus willdenowii*, *Aloysia citriodora* et *Cymbopogon citratus* appelées plus communément le thym, la verveine et la citronnelle.

Pour atteindre cet objectif, nous avons jugé utile d'initier la partie pratique par une enquête sur l'utilisation de ces trois plantes en premier lieu. L'objectif étant de collecter le maximum d'informations sur le savoir-faire auprès d'un échantillon de la population locale ; en deuxième lieu, procéder à un screening phytochimique et à mettre en évidence leurs principales activités biologiques ; et en troisième lieu, analyser et suivre l'évolution des yaourts étuvés incorporés d'huiles essentielles, afin de justifier leur addition. La démarche expérimentale est récapitulée dans la figure 9.

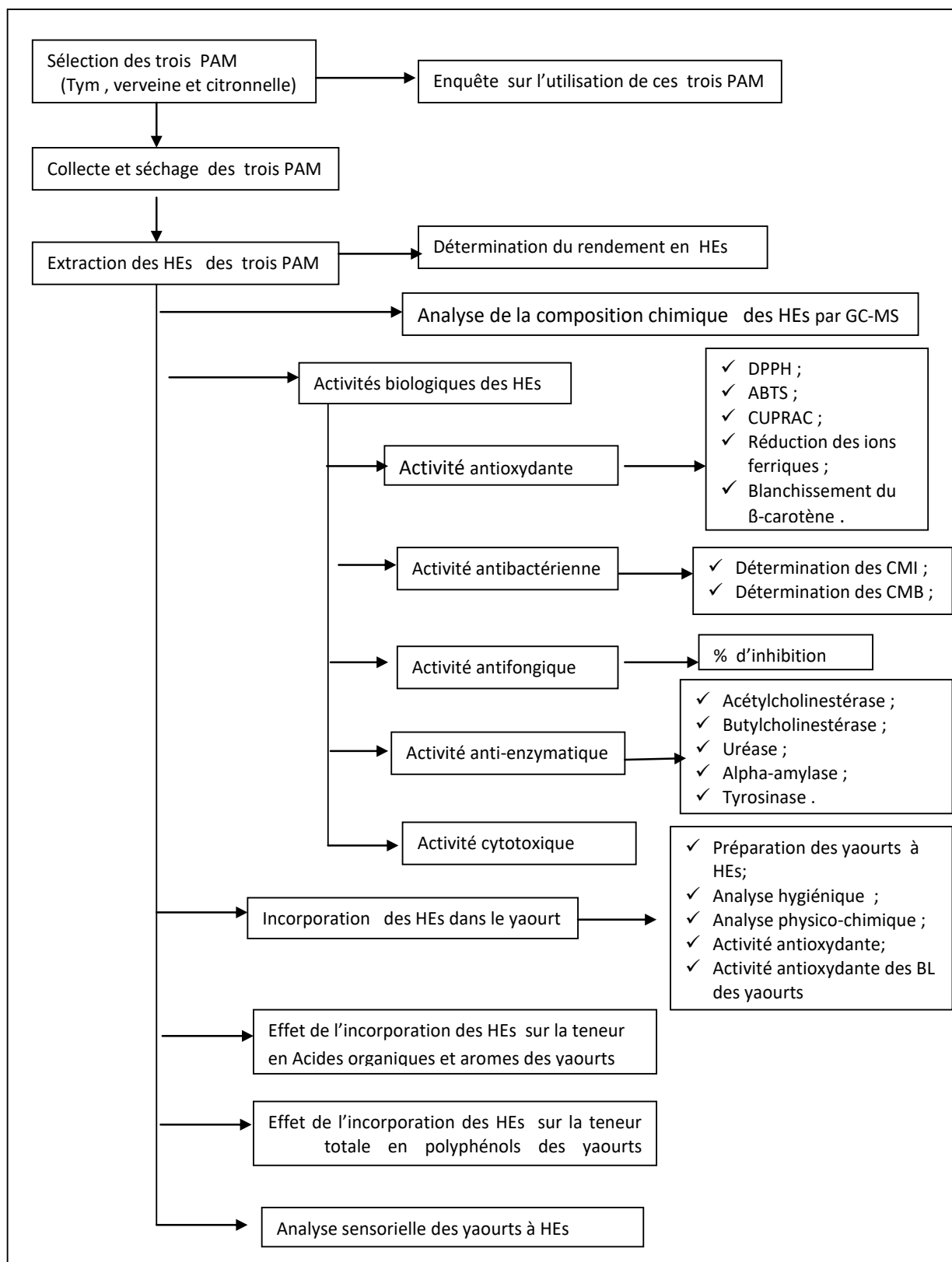


Figure 9. Récapitulation de la démarche expérimentale

2. Matériel végétal

Les espèces (thym, verveine et citronnelle) sont choisies selon les exigences du Codex Alimentarius et de la Food and Drug Administration (FDA), où il est préconisé d'utiliser dans la formulation alimentaire des types d'extraits végétaux classés GRAS. Ce classement qui les rend utiles en tant qu'additifs naturels dans les industries agroalimentaires d'une part. D'autre part, les études ethnobotaniques ont révélé leur utilisation par la population locale et dans divers mets pour leurs effets thérapeutiques et aromatisant (Hadjadj *et al.*, 2019 ; Nadaf *et al.*, 2019). Ces recherches démontrent que le thym est utilisé beaucoup plus dans les ménages du Nord Algérien comme condiment, arôme et tisane (Saidi et Khalla, 2023). Alors que la verveine est utilisée en tisane pour ses vertus calmante, relaxante et antigrippale marquée par sa senteur fraîche et citronnée (Taleb-Toudert, 2015). Quant à la citronnelle, peu de travaux locaux sont effectués sur cette plante. Il s'agit d'une plante endémique de l'Inde et de Sri Lanka, méconnue par les gens mais beaucoup plus connue par les herboristes et recommandée pour soigner les problèmes gastriques (Bayala, 2014).

Les plantes *Thymus willdenowii* (syn : *T.hirtus*), *Aloysia acitriodora* et *Cymbopogon citratus* (figure 10) sont choisies selon des critères spécifiques pour chaque plante.

Le thym (*Thymus willdenowii*) nous est fourni durant la période de floraison (Mai - Août 2018) par un marchand herboriste. Il est collecté de la Wilaya de Blida (figure 11). La quantité de plante achetée (5 kg), est séchée à l'air libre et à l'ombre pendant 15 jours en été.

La verveine (*Aloysia citriodora*), reconnue aussi sous *Lippia citriodora*, ou *Lemon-verbena* (FDA, 2023), nous est fournie par un herboriste qui a procédé à la cueillette durant le mois de Juin à Aout 2018. Elle est collectée de la région de Chekfa dans la Wilaya de Jijel (figure 11). 3 kg de la plante fraîche recueillie, est mise à sécher à l'ombre au fur et à mesure jusqu'à son utilisation.

La citronnelle (*Cymbopogon citratus*) nous est fournie par un herboriste de la wilaya d'Alger (figure 11). Elle est cultivée régulièrement dans sa pépinière. 2 kg de la plante fraîche sont séchés à l'air libre pendant plus de 15 jours.

L'identification botanique des trois plantes est réalisée par Docteur Mohamed Sebti, botaniste de l'Université de Jijel, Algérie. Elle sont répertoriées au niveau du laboratoire de Biotechnologie et qualité des aliments à l'Institut de la nutrition, de l'alimentation et des

Matériel et méthodes

technologies agroalimentaires INATAA, Université Frères Mentouri, Constantine 1, Algérie, aux vouchers suivants : N° : Tw-L1/18, N° : Cc-L2/18, N° : Ac-L3/18 (pour *T. willdenowii*, *C. citratus* et *A. citriodora* respectivement).

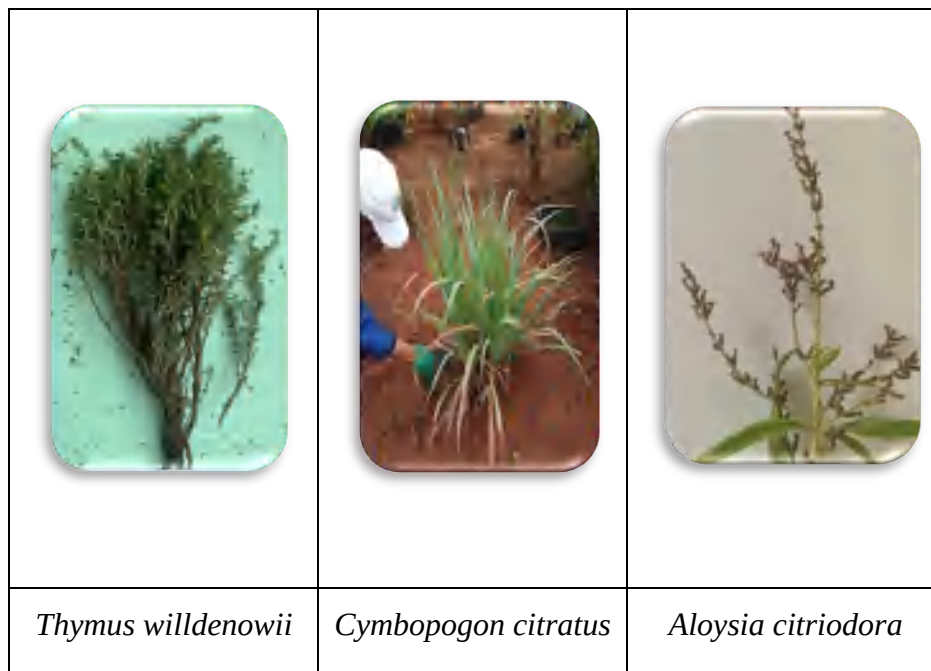


Figure 10. Photos des trois espèces de plantes sélectionnées



Figure 11. Sites de collecte (d'approvisionnement) des trois espèces de plantes sélectionnées

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/59/Algerie_administrative.svg

3. Méthodes

3.1. Enquête sur l'utilisation des espèces de plantes étudiées

Une enquête est menée en ligne sur les plantes sélectionnées (thym, verveine et citronnelle) grâce au formulaire Google forms correspondant au lien : (https://docs.google.com/forms/d/1zQaWVCZxWnSV4v0F3_L5yPNZ9Xt1xjviH9WCVLAIORo/edit) (Annexe 7). Le questionnaire est composé de deux parties : la première partie porte sur des informations concernant les participants (Genre, Age, Résidence et Niveau d'instruction) ; la deuxième recueille les informations sur les trois plantes étudiées. Chaque espèce a fait l'objet d'une série de questions telles que : sa connaissance, ses différentes appellations locales, moyens de son obtention, partie de la plante utilisée, extrait utilisé (extrait, huile essentielle), mode d'emplois, matrice alimentaire incorporée par ces extraits.

Le questionnaire est rédigé en langue française et il comporte plus de questions fermées où les sujets interrogés choisissent une seule réponse parmi plusieurs choix. Le choix de ce type de questions permet une simplicité des réponses d'une part et une facilité de leur traitement d'autre part. Très peu de questions ouvertes où les sujets interrogés proposent une ou plusieurs réponses, peuvent ajouter des remarques et même apporter des précisions quantitatives et qualitatives. Le choix de ce type de questions permet de donner plus de liberté aux sujets interrogés pour répondre aux questions.

3.2. Extraction et analyse des huiles essentielles

3.2.1. Procédés d'extraction et rendement

L'extraction des HEs des plantes s'est effectuée au laboratoire de Biotechnologie et qualité des aliments (BIOQUAL) au niveau de l'institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agroalimentaires (INATAA), Université Frères Mentouri Constantine, et au laboratoire des HEs, Institut national de la recherche forestière (INRF), Forêt Bainem, Alger, en utilisant un appareil de type Clevenger apparatus (figure 12). Pour cela, une quantité de 100 g de la matière sèche de chaque plante est immergée dans 1L d'eau distillée dans un ballon de 2L placé au-dessus d'un chauffe ballon et surmonté d'une colonne en verre reliée à un réfrigérant communiquant directement avec une ampoule à décanter afin de récupérer les distillats. Le rendement d'extraction est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{RendementHE \%} = \frac{\text{masse de l'huile essentielle (g)}}{\text{masse de la plante sèche (g)}} * 100$$

Après décantation et séparation des deux phases (hydrolat et HE), et afin d'éviter toute dégradation de ces dernières, les échantillons d'HEs sont additionnés de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) afin d'éliminer l'humidité résiduelle dans l'HE puis conservés à l'abri de la lumière dans des flacons ambrés au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation.



Figure 12. Dispositif Clevenger

3.2.2. Analyse de la composition chimique par Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse (GC/MS)

L'analyse qualitative et quantitative de l'huile est réalisée sur un GC associé à un Thermo Scientific Trace 1310ve ISQ LT Single Spectromètre de masse quadripolaire. Les séparations sont réalisées dans des colonnes capillaires DB-Wax (60 m 0,25 mm ID, 0,25 mm, TG-WAX-MS). L'hélium est utilisé comme gaz porteur (1,2 mL/min CF) et la température du four est programmée comme suit : la température initiale est fixée à 60 °C et maintenue pendant 6 min, puis augmentée à 230 °C avec une vitesse de chauffage de 3 °C/min et maintenue à cette température pendant 30 min. Les températures des sources d'ions sont réglées à 250 °C. Les spectres de masse sont enregistrés sur la masse, plage de 50 à 550 uma. Le volume d'échantillon était de 10 µL préparé dans du chloroforme (1:15, v/v) et injecté en mode fractionné (1:5). Les

composés sont identifiés en se référant aux bibliothèques Wiley 7, NIST DEMO, Win Main, Wiley 9, Replib, Mainlib et Winrep (Daferera *et al*, 2000 ; Safaei-Ghomi et Ahd, 2010). Cette analyse est réalisée au niveau du laboratoire de chimie, Université Gaziosmanpasa, Tokat et le Centre d'application et de recherche scientifique et technologique, Université de Siirt, (Turquie).

3.3. Activités biologiques des huiles essentielles

3.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Afin d'étudier le potentiel antioxydant des HEs de chaque plante, différents tests sont utilisés, *in vitro*. Les tests utilisés sont : piégeage du radical libre DPPH, piégeage des radicaux-cation ABTS, réduction de l'ion ferrique, blanchissement du bêta-carotène/acide linoléique et réduction du cuivre CUPRAC. Ces tests sont effectués au Laboratoire de biochimie, Centre de recherche en biotechnologie (CRBt), Constantine, Algérie.

Nous avons choisi plusieurs tests d'activité antioxydante car ils mesurent différentes propriétés antioxydantes. Certains tests peuvent mesurer l'activité antioxydante directe d'une HE en neutralisant les radicaux libres, tandis que d'autres tests mesurent la capacité d'une HE à inhiber l'oxydation des lipides, qui est une réaction chimique produisant des radicaux libres. Le but d'utiliser plusieurs tests d'activité antioxydante est donc d'obtenir une meilleure compréhension de la capacité antioxydante globale d'une HE ce qui peut aider à déterminer son utilisation potentielle dans diverses applications, telles que la prévention de l'oxydation des aliments ou la protection de la peau contre les dommages causés par les radicaux libres.

3.3.1.1. Activité anti radicalaire avec la méthode du DPPH

L'évaluation préliminaire de l'activité antioxydante des échantillons est réalisée en utilisant la méthode du radical stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), développée par Blois (1958). Le DPPH, de couleur violette en solution, présente un maximum d'absorption à 517 nm. Le pouvoir antioxydant des HEs testées est estimé par comparaison avec trois antioxydants naturels : butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT) et l' α -tocophérol. Pour cela, dans une microplaque à 96 puits, 160 μ L d'une solution méthanolique de DPPH (6mg dans 100mL méthanol, 1 mM) est mélangée avec 40 μ L de chaque huile à différentes concentrations allant de 25 μ g/mL à 1600 μ g/mL. La microplaque est maintenue

dans l'obscurité pendant 30 min et l'absorbance est mesurée à 517 nm. Les standards sont testés en parallèle comme contrôles positifs. Tous les tests sont réalisés avec trois répétitions pour chaque concentration. L'équation suivant est utilisée pour calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH :

$$\text{Inhibition DPPH (\%)} = \frac{(\text{absorbance controle} - \text{absorbance échantillon})}{\text{absorbance controle}} * 100$$

La IC50 est la concentration induisant une diminution de l'absorbance de la solution initiale de DPPH de 50 %, elle sera définie de la courbe.

3.3.1.2. Piégeage de l'ABTS (2,2'-azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid])

L'activité de piégeage des radicaux - cation ABTS^{•+} est déterminée selon la méthode de Re *et al*, (1999). Le radical ABTS^{•+} est généré par la réaction entre 7 mM d'ABTS dans l'eau et 2,45 mM de persulfate de potassium, le mélange est stocké dans l'obscurité à température ambiante pendant 12-16 h. La solution ABTS^{•+} est ensuite diluée avec de l'eau distillée pour obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,025$ à 734 nm. Dans une microplaque de 96 puits, 160 µL de la solution d'ABTS^{•+} sont ajoutés à 40 µL de chaque dilution d'HE préparée dans le méthanol à des concentrations finales allant de 25 à 1600 µg/mL et laisser réagir 10 min. L'absorbance est lue à 734 nm. Le BHA, BHT et α -tocophérol sont utilisés comme étalons d'antioxydants à des fins de comparaison. Le pourcentage de l'activité scavenger du radical d'ABTS^{•+} est exprimé en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$\text{Inhibition DPPH (\%)} = \frac{(\text{absorbance controle} - \text{absorbance échantillon})}{\text{absorbance controle}} * 100$$

Les résultats correspondent à une concentration d'inhibition à 50 % symbolisée IC50 (µg/mL).

3.3.1.3. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

L'HE est évaluée pour sa capacité à réduire les ions de cuivre tel que rapporté par Apak *et al*. (2004). Cette méthode est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe néocuproïne-cuivre Cu²⁺ (Nc2-Cu²⁺) qui sera réduit par un antioxydant testé, cette réaction est quantifiée par spectrophotomètre. Pour cela, dans une microplaque de 96 puits sont mélangés : 50 µL de solution de chlorure de cuivre (II) (0,01 M), 60 µL d'acétate d'ammonium (1 M) et 50 µL de néocuproïne (0,0075 M) à 40 µL des différentes concentrations (50 à 1600 µg/ mL) des HEs et des standards BHA et BHT. La microplaque est incubée 1 h à température

ambiante, et l'absorbance est enregistrée à 450 nm grâce à un lecteur de microplaque. Les résultats sont représentés par $A_{(\text{absorbance})0,5}$ ($\mu\text{g/mL}$), qui correspond à la concentration indiquant une absorbance de 0,50.

3.3.1.4. Méthode de réduction de l'ion ferrique

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure de la capacité d'un composé réducteur dans l'HE testée à réduire les ions ferriques (Fe^{+3}). Elle est réalisée selon la méthode décrite par Oyaizu *et al.* (1986), avec quelques modifications. Dans une microplaque à 96 puits, 10 μL de l'échantillon à différentes concentrations (12,5–800 $\mu\text{g/mL}$) sont additionnés de 40 μL de tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH 6,7) et 50 μL de solution de ferricyanure de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] (1%) et incubé pendant 20 min à 50 °C. Après refroidissement à température ambiante, 10 μL de chlorure ferrique (FeCl_3 , 0,1%), 50 μL d'acide trichloracétique TCA (10%), et 10 μL d'eau distillée sont ajoutés à la réaction. L'absorbance est immédiatement enregistrée à 700 nm. Le Trolox et l'acide ascorbique sont utilisés comme standards.

3.3.1.5. Test de blanchissement du β -carotène/acide linoléique

L'analyse du blanchissement du b β ta carotène par les HEs est basée sur la méthode rapportée par Marco *et al.*, (1968). Cette méthode repose sur la perte de la couleur jaune du β -carotène en raison de sa réaction avec les radicaux issus de l'oxydation de l'acide linoléique en émulsion. Une émulsion d'acide linoléique est préparée en dissolvant 0,5 mg de β -carotène dans 1 mL de chloroforme, auquel sont ajoutés 200 μL de Tween 40 et 25 μL d'acide linoléique. Le chloroforme est éliminé au rotavapeur. Le résidu est dissous dans du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour fournir une solution jaunâtre, l'absorbance est calibrée à 0,8 à 470 nm. Puis, dans une microplaque à 96 puits, on ajoute 160 μL de l'émulsion à 40 μL de l'HE et les antioxydants de référence (BHA et BHT) à différentes concentrations. L'absorbance (470 nm) est lue à 0 min et après 120 min d'incubation à 50° C. Le pourcentage d'inhibition est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'ihibition\%} = 1 - \frac{((\text{Absorbance échantillon}(t = 0) - \text{Absorbance échantillon}(t = 120)) - \text{Absorbance controle}(t = 0) - \text{Absorbance controle}(t = 120))}{\text{Absorbance controle}(t = 0) - \text{Absorbance controle}(t = 120)}$$

3.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

Elle est réalisée au laboratoire de Bactériologie, CRBt de Constantine. L'évaluation du pouvoir inhibiteur des bactéries pathogènes ainsi que les bactéries starter du yaourt est testée

Matériel et méthodes

par la méthode de diffusion sur milieu gélosé pour déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis des HEs. La détermination des concentrations minimales inhibitrices est estimée sur des microplaques à 96 puits. Les concentrations minimales bactéricides sont déterminées par la méthode de touche sur milieu gélosé, les expériences sont détaillées ci-dessous :

3.3.2.1. Souches bactériennes

Six souches bactériennes utilisées dans ce travail nous sont fournies par le CRBt de Constantine et deux souches par la laiterie GIPLAIT (*Groupe Industriel des Productions Laitières*) de Constantine (Annexe 8), elles correspondent aux souches citées dans le tableau 6. Le test des activités antibactériennes est effectué selon la disponibilité des souches pathogènes au CRBt pour évaluer l'effet des HEs étudiées sur certaines bactéries responsables d'intoxications alimentaires. Les bactéries lactiques quant à elles, doivent être soumises à ce test afin de déterminer les doses minimales efficaces d'HE à incorporer dans le yaourt.

Tableau 6. Souches bactériennes testées

Souche	Provenance	Gram	Pathogénicité
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	CRBt	-	Oui
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC13076	CRBt	-	Oui
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	CRBt	-	Oui
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC10876	CRBt	+	Oui
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	CRBt	+	Oui
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC53103	CRBt	+	Non
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Laiterie GIPLAIT Constantine	+	Non
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Laiterie GIPLAIT Constantine	+	Non

3.3.2.2. Préparation des suspensions bactériennes et activité antibactérienne

Les suspensions bactériennes (bactéries pathogènes et bactéries lactiques) sont préparées à partir des espèces conservées au laboratoire de bactériologie du CRBt, Constantine, et la laiterie GIPLAIT de Constantine respectivement. Les bactéries ainsi préparées dans un milieu nutritif à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries pathogènes et Bouillon MRS et M17 pour les bactéries lactiques (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*

respectivement) sont repiquées sur milieu gélosé préalablement coulé sur boîtes de pétri, suivi d'une incubation des boîtes à 37°C pendant 24 heure pour les bactéries pathogènes et à 37°C pendant 48 heures pour les bactéries du yaourt (Annexe 9).

A partir de ces cultures jeunes, 4 à 5 colonies sont prélevées et ensemencées dans une suspension saline type eau physiologique (0.85% Na Cl) et ajustée au standard Mac Farland 0,5 (DO comprise entre 0,08 et 0,10 lu à 625 nm équivalent à environ 10^5 UFC/ml pour les bactéries pathogènes et DO=0,9 pour les bactéries lactiques). Par la suite, 100 μ L des suspensions ajustées sont étalées sur de la gélose Mueller-Hinton et gélose MRS et M17 préalablement coulées dans des boîtes de pétri à l'aide d'un écouvillon stérile. Un disque de papier filtre stérile (Whattman N°1. 6 mm de diamètre) contenant 10 μ L de l'HE est déposé sur la gélose. Après incubation à 37 °C pendant 24 h pour les bactéries pathogènes ou 48h pour les bactéries lactiques, l'activité antibactérienne est exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition mesuré en mm (Rota *et al.*, 2008). L'opération est répétée en duplicata et les résultats seront expliqués d'après De Billerbeck, (2007), selon trois niveaux d'activité : résistant (-) ($\varnothing < 6$ mm), intermédiaire (+) ($6\text{mm} < \varnothing < 13\text{mm}$) et sensible (++) ($\varnothing > 13\text{mm}$).

3.3.2.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La méthode de dilution en milieu liquide en microplaque est utilisée pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) (Prabuseenivasan *et al.*, 2006). Des dilutions des HEs en série au 1/2 allant de 0,1 à 50 μ L/mL sont préparées dans une microplaque stérile à l'aide de diméthylsulfoxyde (DMSO) comme solvant. Ensuite, 160 μ L de MH liquide, MRS ou M17 liquide inoculés avec 20 μ L de suspension bactérienne standardisée sont ajoutés dans chaque puits. Les puits contrôles contiennent uniquement la suspension bactérienne dans le bouillon correspondant ou le milieu de culture. La microplaque est incubée à 37 °C pendant 24 h pour les bactéries pathogènes et à 37 °C pendant 48 h pour les bactéries lactiques. La CMI correspondant à la plus faible dilution à laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée, elle est déterminée visuellement.

3.3.2.4. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB)

La concentration minimale bactéricide (CMB) est déterminée en transférant 5 μ L de chaque puits ne montrant aucune croissance, sur milieu gélosé MH pour les souches pathogènes et gélose MRS ou M17 pour les bactéries lactiques comme mentionné précédemment, puis

incubé à 37 °C pendant 24 h ou 48 h. La CMB, correspond à la plus faible dilution sans aucune croissance bactérienne est déterminée visuellement par l'absence de colonies (Chebaibi et al., 2016).

3.3.3. Evaluation de l'activité antifongique des trois huiles essentielles

L'évaluation du potentiel antifongique de différentes HEs est réalisée au laboratoire de mycologie, CRBt de Constantine selon la disponibilité des souches fongiques. Elle est testée vis-à-vis du champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* F. sp. *licopersici*, et déterminée par la méthode de contact direct en mesurant la croissance mycélienne du champignon sur le milieu gélosé PDA contenant chaque HE testée (Song *et al.*, 2004). Pour cela trois dilutions finales des HE dans du DMSO sont retenues dans cette étude à savoir 10, 15 et 20 µL/mL. Le milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA) est préparé et laissé en surfusion à 60 °C avant d'être supplémenté de 1mL de chaque dilution dans 100 mL de gélose en surfusion. Le milieu est homogénéisé pour permettre une bonne dispersion de l'HE dans le milieu (Annexe 10). De même 1mL de DMSO est ajouté à 100 ml de PDA et considéré comme contrôle positif, la même opération est répétée avec le milieu de culture seulement pour préparer le contrôle négatif. Un disque de 5 mm de diamètre est prélevé d'une culture jeune de champignon, il est déposé aseptiquement au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA et l'extrait à tester. L'expérience est répétée 4 fois pour chaque extrait. Après 7 jours d'incubation à 28°C, la croissance mycélienne de l'agent phytopathogène est mesurée à l'échelle millimétrique. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance de champignon pour chaque HE. Ainsi, l'activité d'inhibition est exprimée en pourcentage et calculée selon la formule :

$$\text{Pourcentage d'inhibition\%} = \frac{\text{Diamètre Contrôle positif} - \text{Diamètre test}}{\text{Diamètre contrôle positif}} \times 100$$

3.3.4. Evaluation, *in vitro*, des activités anti enzymatiques des trois huiles essentielles

Les HEs ont des propriétés anti-enzymatiques intéressantes. Certaines enzymes peuvent être nocives pour la santé et certaines HEs peuvent être efficaces pour inhiber ou ralentir ces enzymes, contribuant ainsi à la prévention ou au traitement de diverses maladies. Cette activité est testée au niveau du CRBt de Constantine pour les enzymes suivantes :

3.3.4.1. Inhibition de l'acétylcholinestérase

La méthode d'Ellman *et al.* (1961) est réalisée pour l'évaluation de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase. L'iodure d'acétylthiocholine et l'iodure de butyrylthiocholine sont utilisés comme substrats de la réaction en plus du DTNB ([5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)]. Pour cela des dilutions des HEs sont préparées dans du méthanol (95°) en série de ½, à partir d'une solution mère de 4mg/mL ainsi que les solutions des enzymes acétylcholinestérase, butyrylcholinestérase, avec les substrats et les tampons. La technique consiste à mélanger dans les puits d'une microplaque, 150 µL de tampon phosphate de sodium (0,1 M, pH=8) à 10 µL d'une solution méthanolique d'HE à différentes concentrations et 20 µL de solution de l'enzyme acétylcholinestérase ($5,32 \times 10^{-3}$ UI) ou de l'enzyme butyrylcholinestérase ($6,85 \times 10^{-3}$ UI). Après une incubation de 15 minutes à 25°C, 10 µL de solution DTNB (0,5 mM) et 20 µL d'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou de chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM) sont ajoutées. La lecture s'effectue à 412 nm, à intervalle de 5 min pendant 20 min. Le galantamine est utilisé comme référence ou standard.

Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou de la BChE est évalué par comparaison des vitesses de réaction des extraits par rapport au témoin (méthanol au lieu de l'enzyme dans du tampon phosphate, pH 8) en utilisant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'ihibition}\% = \frac{\text{Activité de l'enzyme sans HE} - \text{Activité de l'enzyme avec HE}}{\text{Activité de l'enzyme sans HE}}$$

Les valeurs CI50 sont déterminées en utilisant les courbes de régression.

3.3.4.2. Activité inhibitrice de l'uréase

L'uréase catalyse la dégradation de l'urée en ammoniac qui est quantifié par le phénolhypochlorite en milieu alcalin (Cheribet et Arioua, 2021). La capacité des HEs étudiées, à inhiber l'uréase est évaluée par la méthode de Nabati *et al.* (2012) avec quelques modifications. Les HEs sont diluées dans du méthanol pour obtenir une gamme de concentration de 6,25 à 400 µg/mL. Un volume de 10 µL de ce mélange est additionné à 25 µL de l'uréase (1 mg/mL dans le tampon phosphate 100 mM, pH 8,2) et à 50 µL de l'urée (30 mM) comme substrat. Le mélange est incubé pendant 15 min à 37 °C et la quantité de l'ammoniac produite est déterminé par l'ajout de 45 µL du réactif phénol (0,4 g phénol et 2 mg nitroprusside de sodium dans 40 mL d'eau distillée) et 70 µL du réactif basique (0,3 g NaOH et 0,5 mL

d'hypochlorite dans 60 mL eau distillée). L'absorbance est mesurée à 630 nm. Les pourcentages d'inhibition de l'uréase sont déterminés par la formule suivante :

$$\%d'ihibition = \frac{Absorbance\ controle - absorbance\ test}{Absorbance\ controle}$$

Les IC50 sont relevés à partir des courbes de régression, le Thiouré est utilisé comme standard.

3.3.4.3. Activité inhibitrice de l'alpha amylase

L'activité inhibitrice de l' α -amylase est adaptée à la méthode iode/iodure de potassium (IKI) (Zengin *et al.*, 2014). Dans une microplaque à 96 puits, 25 μ L de l'échantillon (chaque HE est diluée dans du méthanol à partir d'une solution mère de 4mg/ml) sont ajoutés à 50 μ L de solution d' α -amylase (1U préparée dans du tampon phosphate avec 6 mM de NaCl) et incubés à 37°C. L'initiation de la réaction est favorisée par la présence d'une solution d'amidon (50 μ L, 0,1%). Le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 10 min et arrêté en ajoutant 25 μ L HCL (1 M), suivi de 100 μ L de la solution d'iodure-iodure de potassium. La mesure de l'absorbance est prise à 630 nm. L'acarbose est utilisé comme inhibiteur standard de l'enzyme α -amylase. L'activité d'inhibition est déterminée contre un blanc contenant un échantillon sans enzyme. Le résultat est exprimé en % d'inhibition de l'enzyme selon l'équation suivante :

$$\%Inhibition = 1 - \frac{(Ac - Ae) - (As - Ab)}{(Ac - Ae)}$$

A_c=Absorbance [Amidon+IKI+HCL+Vol de solvant d'extrait+Vol tampon Enzyme]

A_e=Absorbance [Enzyme+Amidon+IKI+HCL+Vol de solvant d'extrait]

A_s=Absorbance [Enzyme+HE+Amidon+IKI+HCL]

A_b=Absorbance [HE+IKI+125 μ L de tampon]

3.3.4.4. Activité inhibitrice de la tyrosinase

L'activité inhibitrice de l'enzyme est mesurée par la méthode spectrophotométrique décrite par Deveci *et al.* (2018) avec une légère modification. La tyrosinase de champignon est utilisée et la L-DOPA est utilisée comme substrat de la réaction. Pour se faire, 150 μ L de tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 6,8) sont additionnés à 10 μ L de solution d'HE dissous dans de l'éthanol à différentes concentrations et à 20 μ L de solution de tyrosinase dans

Matériel et méthodes

le tampon. Le mélange est incubé pendant 10 min à 37 ° C, et 20 µL de L-DOPA sont ajoutés. Les absorbances de l'échantillon et du blanc sont lues à 475 nm après 10 min d'incubation à 37°C dans une microplaque 96 puits. L'acide kojique est utilisé comme standard.

3.3.5. Evaluation de l'activité cytotoxique, *in vitro*, test Brine shrimp sur les larves d'*Artemia salina*

Le test de la cytotoxicité des HEs étudiées est effectué au niveau du CRBt de Constantine. L'Artémia (*Artemia salina*) est une espèce de crustacés vivant dans les lacs salés, les lagunes et les marais salants. Lorsque les conditions de vie du milieu ne sont plus favorables, l'artémia est capable de produire des cystes. Ils ont la faculté de pouvoir, après réhydratation, de donner naissance à des larves appelées nauplies (Annexe 11), qui résistent même après des années. Les essais de toxicité des larves d'*Artemia salina* sont effectués selon la méthode de Meyer *et al.*(1982). Pour cela, 1g d'œufs d'Artémia sont rajoutés à un litre d'eau de mer artificielle (3,6 % p/v de sel) en présence d'une source d'oxygène et de lumière et incubés pendant 48 h, à température ambiante comme le montre la figure 13.

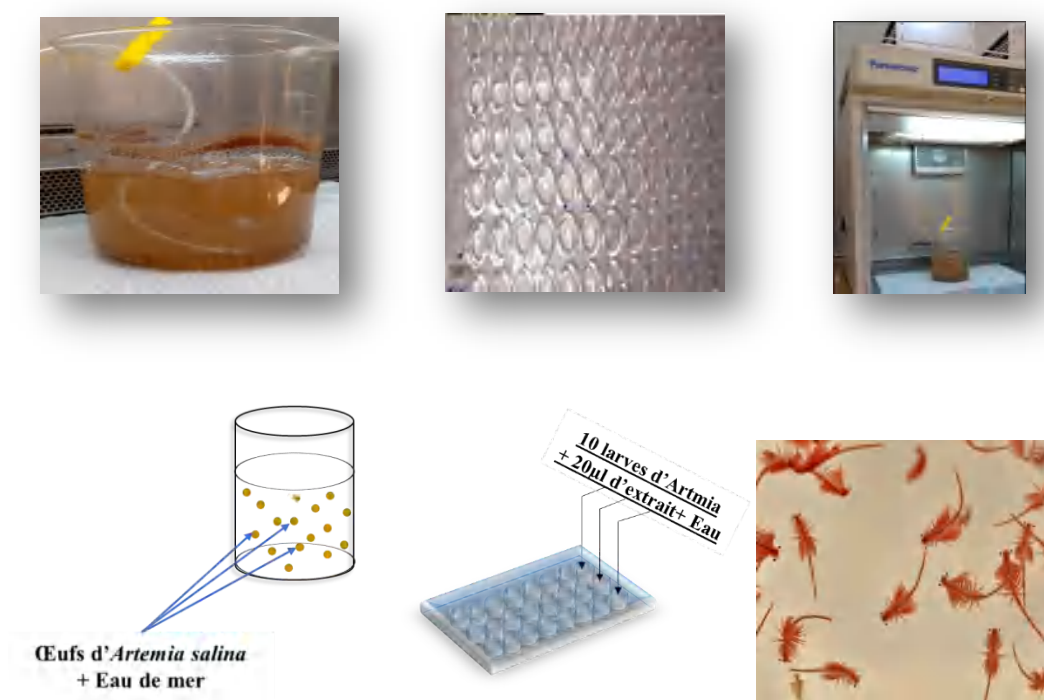


Figure 13. Dispositif du test de cytotoxicité sur larve d'*Artemia salina* (Brine Shrimp)

Les échantillons d'HEs sont dissouts dans du DMSO. Dix larves sont recueillies à l'aide d'une micropipette et placées dans une microplaque, 100µL d'une solution contenant 10 larves, 80

Matériel et méthodes

μL d'eau de mer artificielle et 20 μL de chaque concentration choisie de l'HE sont déposés dans les puits. Après 48 h, une loupe est utilisée pour compter le nombre de larves mortes et des larves vivantes et le pourcentage de mortalité est calculé selon l'équation :

$$\text{mortalité}\% = \frac{\% \text{morts observés} - \% \text{Morts témoin}}{100 - \% \text{Morts témoin}} * 100$$

Le DMSO est utilisé comme témoin positif.

La valeur CL50 est la concentration létale déterminée à partir de la courbe des pourcentages d'inhibition à différentes concentrations et interprétée selon le tableau 7.

Tableau 7. CL50 de référence du test de cytotoxicité (Meyer *et al.*, 1982).

CL ₅₀	Toxicity
CL ₅₀ ≥ 80 μg/ml	-
80 μg/ml > CL ₅₀ ≥ 40 μg/ml	+
40 μg/ml > CL ₅₀ ≥ 10 μg/ml	++
CL ₅₀ < 10 μg/ml	+++

- : non toxique, + : peu toxique, ++ : toxique, +++ : très toxique

3.4. Essai d'incorporation des huiles essentielles dans le yaourt

3.4.1. Préparation yaourt

Des échantillons de yaourt sont préparés au niveau du CRBt de Constantine. Le lait écrémé à 14 % (p/v) est fourni par la filière laitière locale GIPLAIT (Constantine, Algérie). 40 g/L de lait en poudre sont ajoutés au lait écrémé avec 40 g/L de sucre puis traité thermiquement à 95 °C pendant 15 min et refroidi à 45 °C (Michael *et al.*, 2010) (figure 14). Les bactéries starter (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) fournies par la même industrie sont utilisées pour inoculer le lait selon les recommandations du fabricant. À ce stade, l'HE est ajoutée au mélange à la concentration de 25 μL/L et mélangé afin de permettre une bonne homogénéisation du mix. La fermentation est effectuée à 45 °C pendant 4h. Le mélange est refroidi à 4 °C pendant la période de stockage au froid de 28 jours. Pour évaluer l'effet de l'incorporation de l'HE dans le yaourt, une comparaison avec le yaourt non incorporé est effectuée. Les analyses réalisées concernent :

- L'effet de l'incorporation sur la qualité hygiénique (recherche des germes pathogènes) et physicochimiques (pH, Acidité titrable) ;
- L'observation microscopique des bactéries lactiques du yaourt ;
- L'effet sur le dénombrement des bactéries lactiques ;
- L'analyse de l'activité antioxydante des yaourts incorporés d'HEs par la méthode ORAC, ABTS, CUPRAC.

Chaque méthode est basée sur des réactions d'oxydo-réduction différentes, ce qui donne des potentiels antioxydants hétérogènes. Le choix du test ORAC est justifiée par son adaptation parfaite aux aliments car ce test permet de mesurer cette capacité antioxydante en évaluant la quantité de radicaux libres neutralisés par une matrice alimentaire. Plus le résultat du test est élevé, plus l'aliment est considéré comme ayant une forte capacité antioxydante.

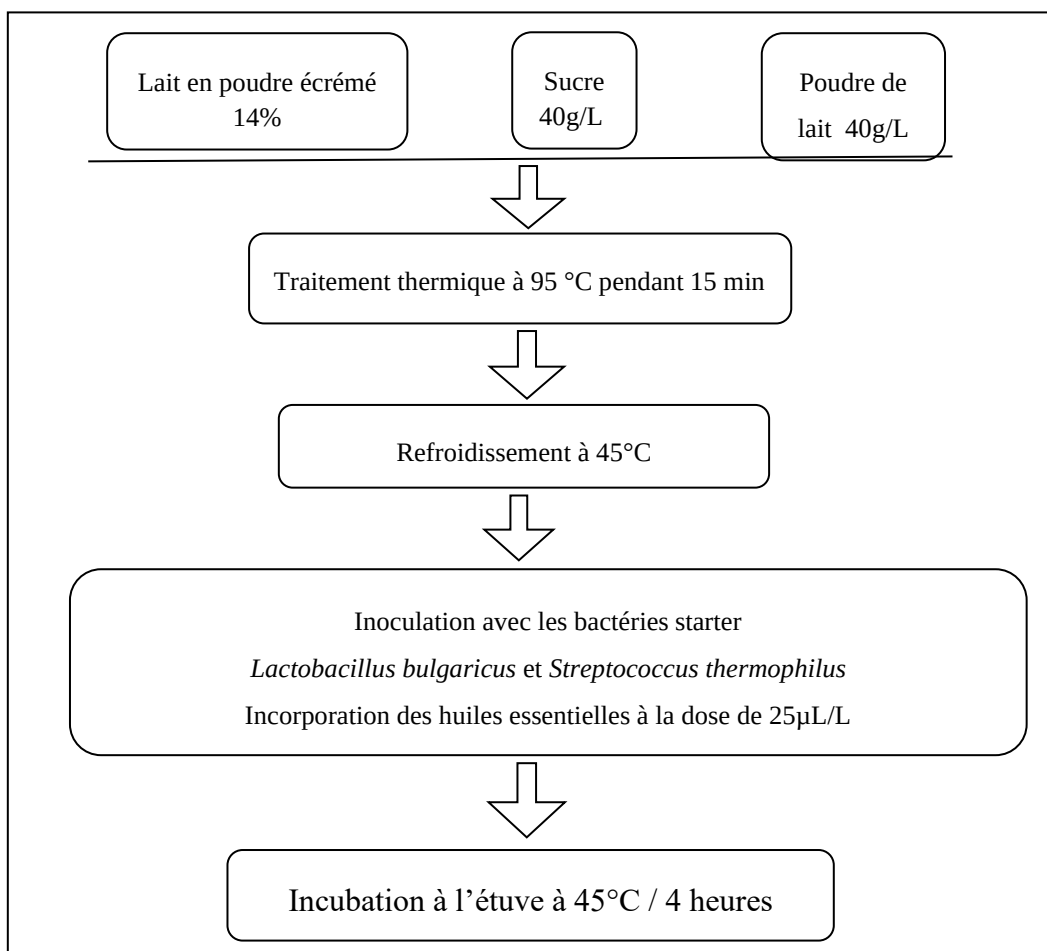


Figure 14. Diagramme de fabrication des yaourts

3.4.2. Analyse hygiénique des yaourts

Les analyses microbiologiques des yaourts formulés sont réalisées au laboratoire de microbiologie, division biotechnologie alimentaire, Centre de recherche en biotechnologie (CRBt) et au laboratoire BIOQUAL, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine1, Algérie.

a) Préparation des dilutions décimales

10 mL du yaourt à analyser (incorporé et non incorporé d'huile essentielle) sont prélevés aseptiquement du pot et introduits dans un flacon stérile contenant 90 ml d'eau physiologique stérile. L'homogénéisation est faite à l'aide d'un vortex. Cette solution constitue la solution mère 10^{-1} . 1mL de la suspension mère est prélevé aseptiquement à l'aide d'une pipette graduée stérile et introduit dans un tube à essai contenant 9 mL d'eau physiologique stérile. La procédure est de prélever 1 mL à partir de la dilution 10^{-2} et l'introduire aseptiquement dans un tube à essai contenant 9 mL du diluant et ainsi de suite jusqu'à la dilution 10^{-11} .

b) Recherche de la flore totale aérobie mésophile

Un prélèvement de 1 mL à partir de la dilution 10^{-1} et 10^{-3} à l'aide d'une pipette graduée stérile est déposé dans la boîte de Pétri vide. La gélose PCA (Plat Count Agar) est coulée (15 à 20) mL et homogénéisée grâce à des mouvements de rotation en forme de 8. L'incubation se fait à 30 °C pendant 48h suivie du dénombrement des bactéries. La lecture des boîtes se fait à l'aide d'un compteur de colonie. Le résultat positif est exprimé par la présence de colonies sphériques de couleur crème.

c) Recherche de Coliformes totaux et fécaux

La même opération précédente est effectuée avec la dilution 10^{-1} dans la gélose VRBL (Violet Red Bile Lactose Agar). Les boîtes sont incubées à 44°C pendant 24h pour la recherche des coliformes fécaux et les boîtes incubées à 37°C pendant 24h pour la recherche des coliformes totaux.

d) Recherche de Staphylocoques

Un prélèvement de 0,1 mL à partir de la dilution 10^{-1} à l'aide d'une micropipette est déposé dans la boîte de pétri coulée au préalable avec la gélose Chapman. L'incubation se fait à 37°C

pendant 24h. Le résultat positif est exprimé par la présence de colonies noires au centre avec un halo jaune autour.

e) Recherche de Salmonelles

Un pré-enrichissement dans l'eau peptonnée tamponnée et incubé à 37°C pendant 24 heures. Un prélèvement de 0,1 mL est déposé à partir de la dilution 10^{-1} à l'aide d'une micropipette dans la boîte de Pétri coulée au préalable avec la gélose SS (*Salmonella*, *Shigella*). Le résultat positif est exprimé par la présence de colonies à grand centre noir et à périmètre clair.

f) Recherche de levures et moisissures

Un prélèvement de 0,1 mL à partir de la dilution 10^{-1} à l'aide d'une micropipette est déposé sur la boîte de pétri coulée au préalable avec la gélose Sabouraud et séchée. Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 5 jours. Le résultat positif sera exprimé par la présence de colonies crémeuses pour les levures et de colonies filamenteuses pour les moisissures.

g) Dénombrement des bactéries lactiques du yaourt

Un prélèvement de 1mL des dilutions 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} est placé dans chaque boîte de Pétri correspondante puis coulée de la gélose MRS pour la recherche des bactéries *Lactobacillus bulgaricus* puis incubées à 37°C pendant 72h en anaérobiose. Pour les bactéries *Streptococcus thermophilus*, la gélose M17 estensemencée avec 1 mL des dilutions et incubée à 37°C pendant 48h. Les résultats positifs sont exprimés par l'observation de colonies lenticulaires de 1 à 3 mm de diamètre sur milieu MRS pour les lactobacilles, et de colonies lenticulaires de 1 à 2 mm de diamètre sur M17. Le dénombrement se fait selon les boîtes présentant un nombre significatif de colonies (entre 30 et 300 UFC unité formant colonie).

3.4.3. Analyse physicochimique des yaourts formulés

Les différentes analyses physicochimiques sur les échantillons de yaourts obtenus sont effectuées au niveau de la division de Biotechnologie alimentaire au niveau du CRBt de Constantine et le laboratoire BIOQUAL de l'Institut de la Nutrition, de l'alimentation et de Technologie Agro-Alimentaire de Constantine.

- **pH et acidité**

Le pH des échantillons de yaourt est déterminé selon Ani *et al.* (2018). 10 g d'échantillon de yaourt sont placés dans un bécher et mélangés à l'aide d'un barreau magnétique sur plaque d'agitation. Le pH des échantillons est déterminé par un pH-mètre (Mettler Toledo).

L'acidité titrable est évaluée en plaçant 10g de yaourt homogénéisé dans un bécher, 5 gouttes d'une solution de phénolphthaléine sont ajoutés avec une agitation en continue, la titration est réalisée à l'aide d'une burette remplie d'une solution de soude (NaOH) 1N graduellement jusqu'à ce que la couleur du yaourt vire vers le rose persistant. La quantité de soude utilisée exprime le degré d'acidité dans le yaourt par l'unité Dornic (°D) selon l'équation : $Acidité\ en^{\circ}D = Volume\ NaOH \times 10$

3.4.4. Observation microscopique de l'effet des HEs sur les bactéries *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* dans les yaourts formulés

Un ensemencement de 0,1 mL de la dilution 10^{-1} des différents yaourts obtenus à J1 et J28, est effectué par écouvillonnage sur une gélose MRS et M17 coulées dans des boîtes de Pétri et incubée à 37°C pendant 24h en anaérobiose pour *L. bulgaricus* et 37°C pendant 24h pour *S. thermophilus*. L'observation microscopique est réalisée à partir d'un frottis de colonies obtenues après coloration de Gram. Les frottis sont séchés par le papier buvard et examinés par microscope jusqu'à l'objectif à immersion (grossissement x100).

3.5. Evaluation de l'activité antioxydante des yaourts formulés

L'évaluation des capacités antioxydantes des yaourts est réalisée à partir de la préparation d'extraits hydrosolubles (WSE : Water Soluble Extracts) des yaourts : témoin et supplémentés en HE de chaque plante. Afin d'obtenir les extraits hydrosolubles, 10 mL des échantillons de yaourts (YN non supplémenté et yaourts supplémenté YST, YSC, YSV) sont centrifugés à $5\,000 \times g$ à 4 °C pendant 20 min, suivis d'une filtration à travers un disque à membrane filtre (0,45 nm) est utilisée pour mesurer l'activité antioxydante et quantifier les composés phénoliques totaux aux jours 1, 7, 21, 28 de stockage à froid à 4 °C.

Les yaourts sont soumis à trois tests antioxydants, le choix de ces trois tests est justifié par la spécificité du test ORAC adapté à la mesure de la capacité antioxydante totale de l'aliment. Le test ABTS est choisi pour sa rapidité, facilité d'utilisation et sa capacité à détecter des niveaux très faibles d'antioxydants dans les aliments. Le test de CUPRAC, est retenu pour

sa facilité d'exécution et sa sensibilité envers les antioxydants du yaourt ayant la capacité de réduire les ions cuivre tels que les polyphénols et les protéines laitières.

3.5.1. Test ABTS

L'activité de piégeage des radicaux - cation ABTS^{•+} est déterminée selon la méthode de Re *et al.* (1999) avec quelques modifications. Le radical ABTS^{•+} est généré par la réaction entre 7 mM d'ABTS dans l'eau et 2,45 mM de persulfate de potassium et le mélange est stocké dans l'obscurité à température ambiante pendant 12-16 h. La solution ABTS^{•+} est diluée avec de l'eau distillée pour obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,025$ à 734 nm. Dans une microplaque de 96 puits, 160 µL de la solution d'ABTS^{•+} sont ajoutés à 40 µL de chaque extrait hydrosoluble des différents yaourts et laissés réagir 10 min. Le Trolox est utilisé comme étalon pour exprimer les résultats en µM Trolox eq/ml Yaourt à partir de l'équation $y=0,0761x+0,365$ (Annexe 12.a). L'absorbance est lue à 734 nm à l'aide d'un lecteur à microplaque.

3.5.2. Test CUPRAC

L'activité de réduction des ions de cuivre est utilisée pour tester la capacité antioxydante des yaourts formulés. Pour cela le même protocole appliqué aux HEs est reproduit aux yaourts. Dans une microplaque de 96 puits, 50 µL de solution de chlorure de cuivre (II) (0,01 M), 60 µL d'acétate d'ammonium (1 M) et 50 µL de néocuproïne (0,0075 M) sont mélangés à 40 µL des extraits hydrosolubles des yaourts supplémentés et non supplémentés d'HEs. La microplaque est incubée 1 h à température ambiante, et l'absorbance est lue à 450 nm grâce au lecteur de microplaque. Le Trolox est utilisé comme étalon et les résultats sont exprimés en µM Trolox équivalent par mL de yaourt. L'équation de la courbe est comme suit : $y=0,0092x$ (Annexe 12.b)

3.5.3. Test ORAC

L'activité antioxydante des yaourts supplémentés et non supplémenté est examinée pour leur capacités de piégeage des radicaux peroxy et hydroxyle, en utilisant un test d'absorbance des radicaux oxygène à travers la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), telle que décrite par Alañón *et al.* (2011) avec quelques modifications. Pour cela, dans une microplaque noire à 96 puits, 25 µL de l'extrait hydrosoluble des différents types de yaourts est additionné de 25 µL de fluorescéine (44,782 µM) (3',6'-dihydroxy-3 H-spiro(2-benzofurane1,9'-xanthène)-3-un) (numéro CAS Sigma-Aldrich:518-47-8) (sonde fluorescente),

le mélange est incubé à 37 °C pendant 20 min avant d'ajouter 200 µL d'AAPH (122,499mM) (2,2'-azo-bis (2-méthylpropionamidedichlorhydrate)(numéro CAS Sigma-Aldrich : 2997-92-4) utilisé comme générateur de radical peroxy pour initier la réaction dans un volume final de 250µL. La fluorescence est enregistrée chaque minute pendant 90 min à l'aide d'un lecteur à microplaque (Perkin Elmer, Enspire). Une solution de Trolox (5–40 µM) est utilisée pour définir la courbe standard. La génération de radicaux par l'AAPH va entraîner la dégradation de la fluorescéine et par conséquent la diminution de la fluorescence. L'ajout d'un agent antioxydant va retarder le processus de dégradation.

Dans ce test, la capacité de yaourt à protéger la fluorescéine de l'oxydation est suivie grâce à la courbe de décroissance. Les valeurs ORAC sont calculées en utilisant les aires sous les courbes (AUC). Les résultats sont exprimés en micromoles d'équivalents Trolox (TE) par mL d'échantillon de yaourt tirés à partir de la courbe d'étalonnage du Trolox suivante : $y=0,0947x+41,9$ (Annexe 12.c).

3.6. Evaluation de l'activité antioxydante des bactéries lactiques du yaourt fermentées en présence et en absence des HES

Afin d'évaluer le potentiel antioxydant des bactéries lactiques du yaourt *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* ainsi que la bactérie utilisée comme contrôle *L. rhamnosus*, des extraits de cellules intactes des bactéries sont préparés comme suit :

Une culture de 18h à 37°C de *L. bulgaricus* et *L. rhamnosus* est réalisée en bouillon MRS, et en bouillon M17 pour *S. thermophilus*, ajustée à une $DO_{600nm}=0.9$, puis centrifugée à 12000xg pendant 10min à 4°C. Le culot est lavé trois fois avec une solution tampon phosphate de potassium (0,2 M ; pH 7) afin d'éliminer les traces du milieu (Saide et Gilliland, 2005). Les cellules lavées sont remises en suspension dans le même tampon et ajustées à une $DO_{600nm}=0,9$. Cette suspension est utilisée pour êtreensemencée avec 0,025µL/mL de la solution d'HE (préparée dans du DMSO). Après une incubation de 72h, à 37°C, une centrifugation est effectuée à 4000xg pendant 20min à 4°C et le surnageant est utilisé pour le test ORAC selon le même protocole cité ci-dessus.

3.7. Evaluation de l'effet des HEs sur la teneur en acides organiques et arôme des yaourts incorporés

Pour rappel, les échantillons de yaourts étuvés utilisés pour cette étude sont représentés par les extraits hydrosolubles (WSE) obtenus auparavant par centrifugation puis injecté dans une bouteille d'échantillon d'HPLC en tant qu'échantillon. Les acides organiques (acide lactique, acide formique, acide acétique, acide citrique et acétaldéhyde) sont analysés par HPLC-DAD (High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection) qui est une technique analytique largement utilisée en chimie et en biologie pour séparer, identifier et quantifier les composés présents dans un échantillon. Elle combine la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec une détection par réseau de diodes (DAD)(Batista *et al.*, 2017). L'HPLC utilisée (Agilent Technologies 1260 Infinity Series) (Annexe 13) est équipée d'un détecteur DAD (diode array diode), d'une pompe quaternaire, d'un injecteur automatique et d'une colonne Zorbax C18 (5 μ m, 4,6 $\times$ 250 mm). La température du four à colonne est de 35 °C. Le volume d'injection est de 20 μ L. La phase mobile est un mélange de tampon K₂HPO₄ (0,02 mol/L, pH 2,0) et de méthanol, et le rapport volumique est de 95:5 système isocratique pour un temps d'analyse de 30min. Le débit est de 0,7 mL/min et la longueur d'onde de détection est de 210 nm. En utilisant la série de concentrations de chaque acide organique comme coordonnée horizontale et les aires des pics correspondantes comme coordonnées verticales, les courbes standards des acides organiques et acétaldéhyde sont tracées et utilisées pour calculer la teneur en acide organique et acétaldéhyde en μ L/mL de yaourt.

3.8. Evaluation de l'effet des HEs sur la teneur en polyphénols dans les yaourts formulés

La teneur totale en composés phénoliques des HEs et échantillons de yaourt (NSY, YST, YSC et YSV) est déterminée à l'aide de la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965). Dans une microplaque à 96 puits, 20 μ L de l'extrait hydrosoluble du yaourt ou d'une dilution de l'HE dans le méthanol à 1 mg/mL sont ajoutés à 100 μ L de réactif de Folin Ciocalteu (1:10) et 75 μ L de Na₂CO₃. Les échantillons sont incubés à l'obscurité pendant 120 min à température ambiante. Un blanc est préparé avec du méthanol ou de l'eau distillée pour l'HE et l'extrait de yaourt respectivement. Enfin, l'absorbance est mesurée à 765 nm avec un lecteur de microplaques. La concentration des composés phénoliques totaux est calculée à partir de la courbe standard de l'acide gallique ($y = 0,0034x + 0,1044$) (Annexe 12.d). Les résultats sont exprimés en μ g d'équivalent acide gallique (GAE) par mL d'échantillon (μ g GAE/mL).

3.9. Analyse sensorielle

L'évaluation sensorielle est effectuée par un panel de jury composé de 10 personnes travaillant au niveau du CRBt de Constantine (Annexe 14). Tous les critères évalués (Gout, odeur, texture et acceptabilité générale) ont des scores de 1 à 5 (5=excellent, 4=bien, 3= normal, 2=n'aime pas, 1=n'aime pas du tout) (Karagl-Yceer et Drake, 2006 ; Popescu *et al.*, 2022).

3.10. Analyse statistique

Le logiciel GRAPHPAD Prism8 est utilisé pour la saisie et le traitement statistique des données de l'enquête. Les résultats sont exprimés en pourcentage lorsqu'il s'agit de variable qualitative (genre, profession, etc.) et en moyenne plus ou moins l'écart type lorsqu'il s'agit de variable quantitative. Le test d'ANOVA à un et deux facteurs est effectué par le même logiciel. Certains graphes sont réalisés directement sur Word 2021.



RESULTATS ET DISCUSSION

1.1. Profil des informateurs

Suivant le nombre d'informateurs (95) ayant participé au sondage en ligne en utilisant l'application « Google forms », 78,9% sont des femmes et 21,1% des hommes (figure 15.a). Cette catégorie n'est pas visée particulièrement, ce résultat est le fruit du hasard, il pourrait être expliqué, par l'intérêt que porte cette tranche (femmes) aux PAMs et leur utilisation en tant que condiment alimentaire ou en phytothérapie en Algérie. La tranche d'âge la plus fréquente étant celle entre 31 et 40 ans (figure 15.b). Parmi les informateurs, il ressort que la minorité (4,2%) a un niveau secondaire et la majorité a un niveau universitaire (95,8%) (figure 15.c). Pour ce qui est des wilayas ayant le plus grand taux de participation, figure en premier lieu Constantine (40%), suivie de la wilaya de Béjaia (17,89%) et Alger (16,84%) (figure 15.d).

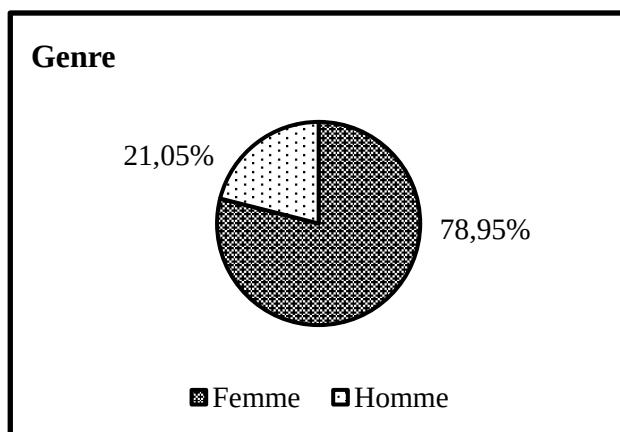


Figure 15. a. Profil des informateurs ayant participé au sondage selon le genre

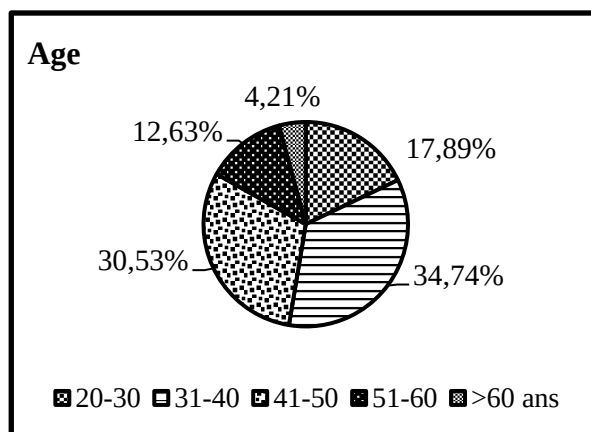


Figure 15. b. Profil des informateurs ayant participé au sondage selon l'âge

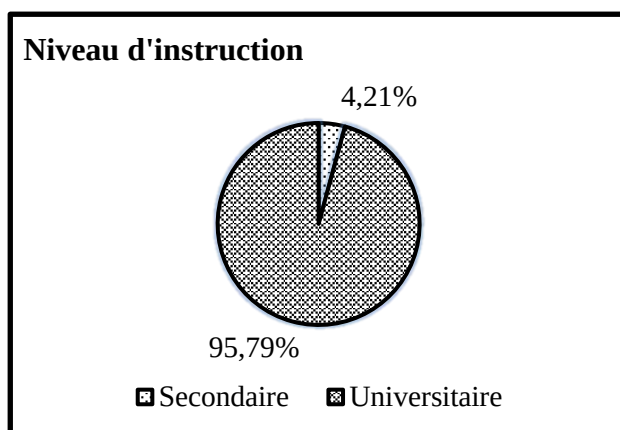


Figure 15. c. Profil des informateurs ayant participé au sondage selon le niveau d'instruction

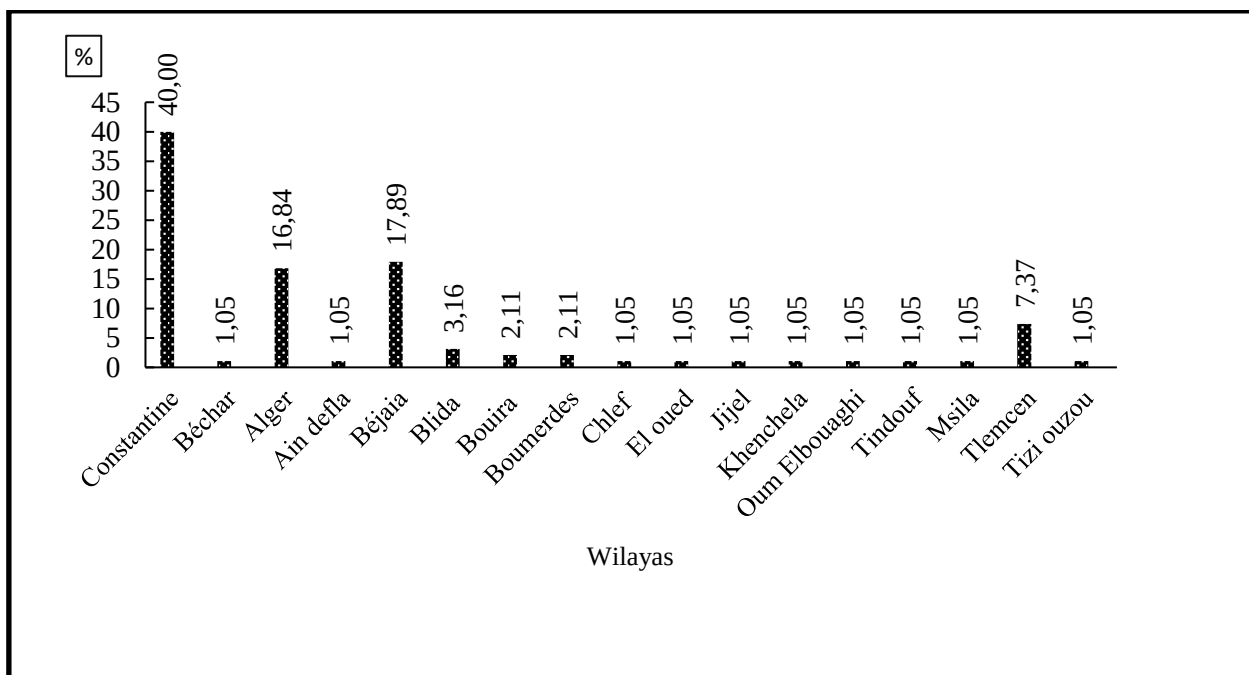


Figure 15.d. Répartition des informateurs selon les wilayas d'appartenance

1.2. Renseignements sur les trois espèces de plantes sélectionnées

1.2.1. Connaissance

Selon les résultats du sondage, les plantes aromatiques sont familières aux informateurs, avec un pourcentage de connaissance de 95,8% (figure 16.a). Il semble que la citronnelle soit une plante méconnue comparativement au thym et à la verveine. En effet, 35,79% des informateurs ne connaissent pas la citronnelle contre 61,05% qui la connaissent. Cette plante endémique de l'Inde et du Sri Lanka a été introduite récemment en Algérie (Goetz, 2020), donc ses effets thérapeutiques ne sont ni connus ni maîtrisés.

Concernant les deux plantes thym et verveine les informateurs ont une très bonne connaissance de ces plantes, équivalente à 98,95% et 96,84% respectivement (figure 16.b).

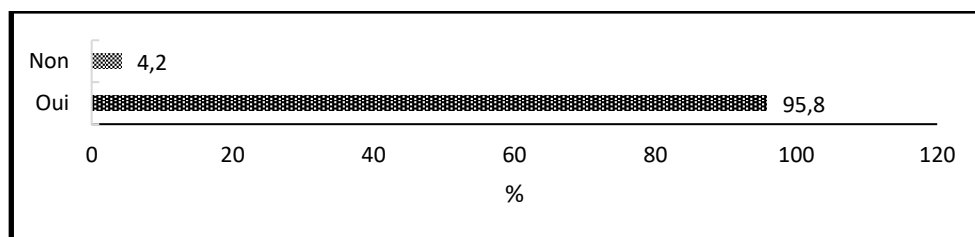


Figure 16. a. Degré de Connaissance des informateurs des plantes aromatiques

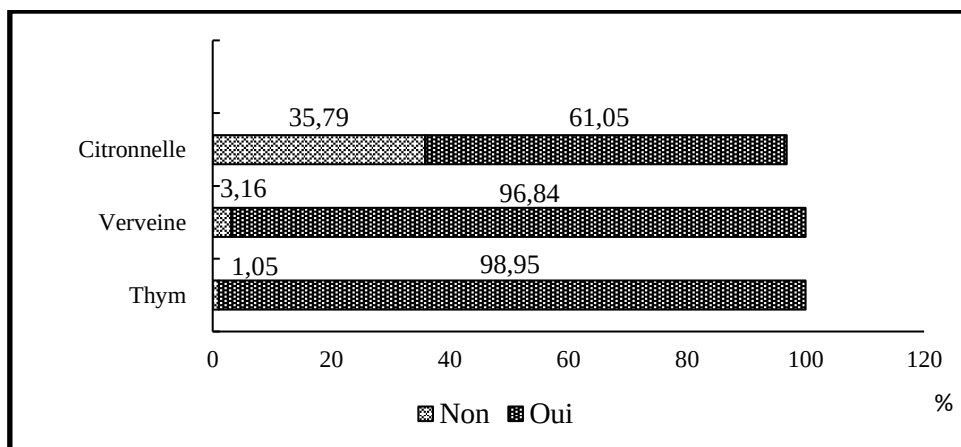


Figure 16. b. Degré de Connaissance des informateurs du thym, de la verveine et de la citronnelle

1.2.2. Appellations locales des trois plantes

Selon les personnes interrogées, le thym est dit : *Zaater* ou *Zaiitra* à 28,42 et 24,21 % respectivement. Les appellations : *Tizaatrine*, *Tizaatherth*, *Tamezirt* ou bien *Rande* et l'appellation *thym* ont été citées avec un faible pourcentage ne dépassant pas 3,16%. Par ailleurs, 37,89% des informateurs n'ont fourni aucune réponse.

Concernant la verveine, la majorité des personnes ayant répondu au questionnaire ont cité l'appellation *Louiza* et *Tisane* avec 31,58 et 20% respectivement. D'autres appellations, mais moins fréquentes telles que *Raii lehmeh*, *Talmest n imyan yettafaren* ou bien *tisane verveine* ont été citées (figure 17.b).

Contrairement aux deux autres plantes, la citronnelle a enregistré un grand pourcentage d'informateurs qui se sont abstenus (83,6%). Quelques appellations sont citées avec des pourcentages très faibles, telles que : *Karess*, *Louiza roumia*, *Merista*, *Nanaa enhal*, *Melissa* ou bien *Lfar zizwi* (figure 17.c).

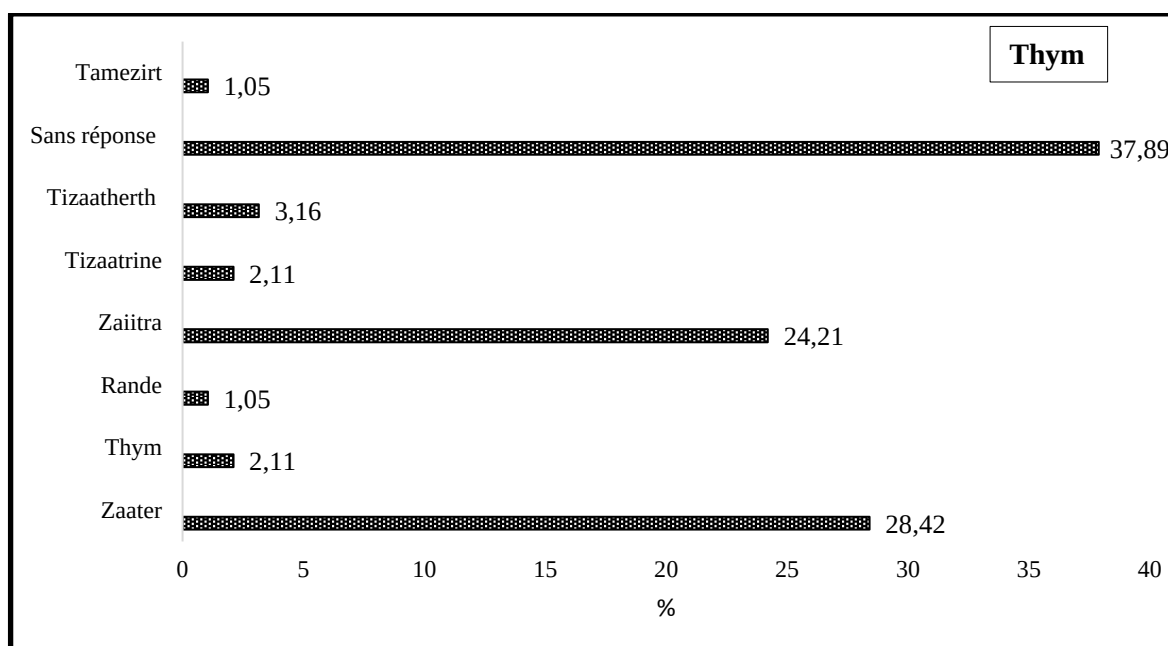


Figure 17. a. Différentes appellations attribuées au thym par les informateurs

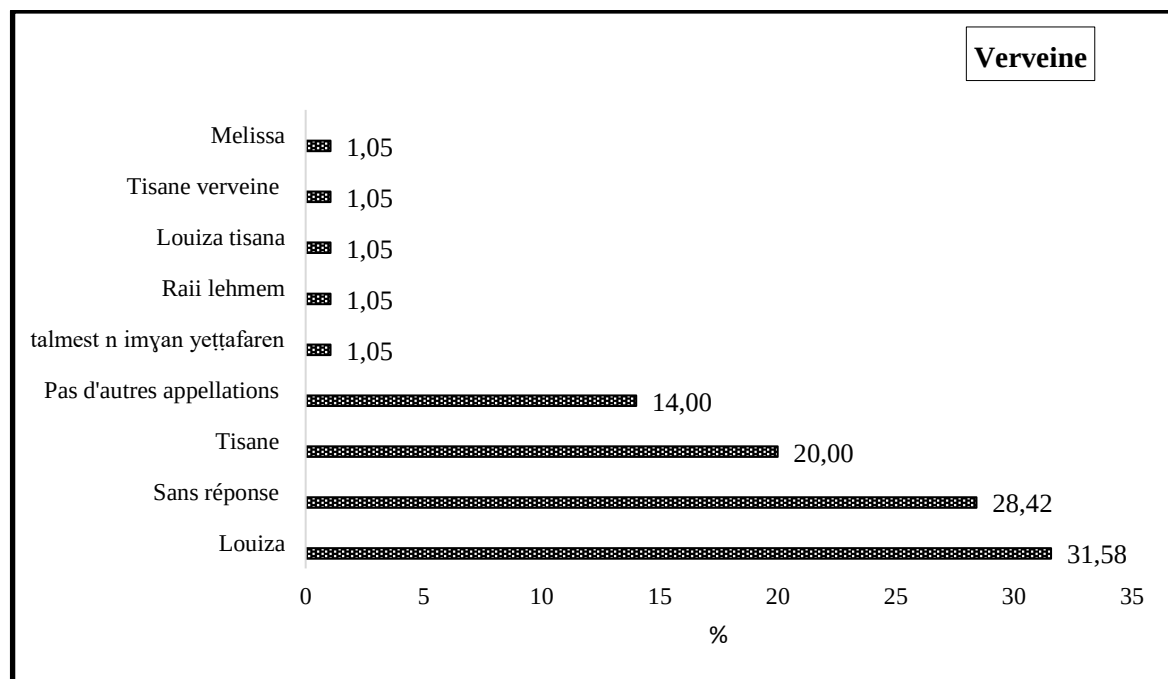


Figure 17. b. Différentes appellations attribuées à la verveine par les informateurs

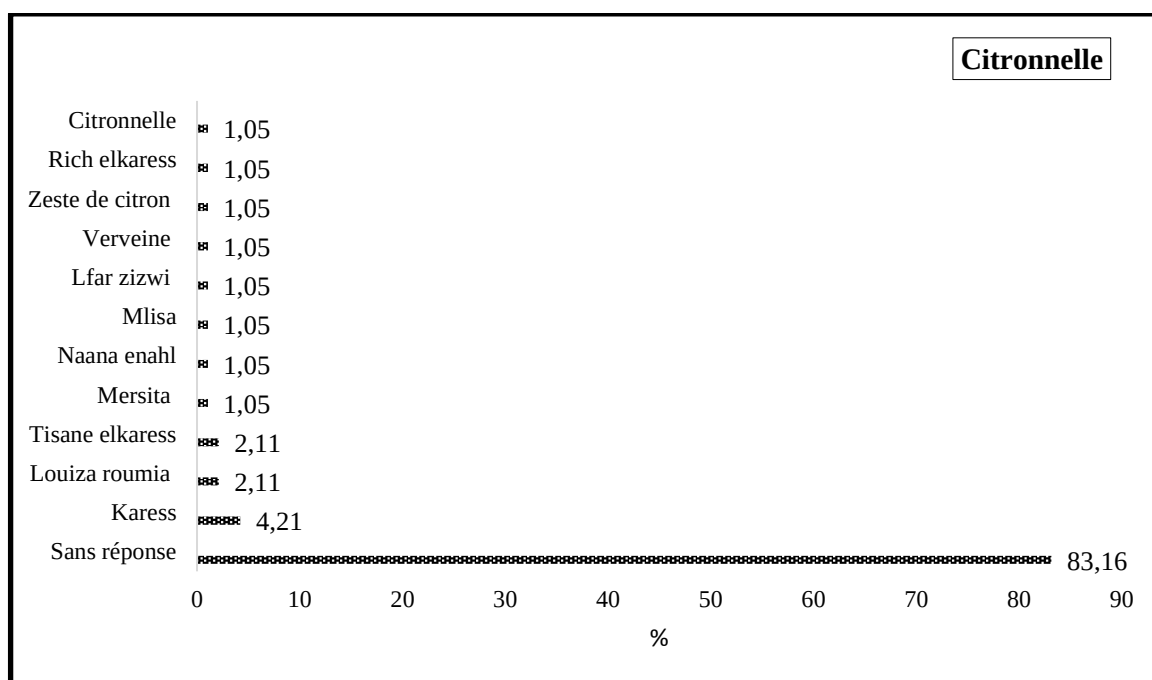


Figure 17. c. Différentes appellations attribuées à la citronnelle par les informateurs

1.2.3. Critères d'identification

D'après les résultats du sondage (figure 18), les informateurs reconnaissent le thym, la verveine et la citronnelle par leur morphologie et arôme (64,27%, 69,81% et 26,59% respectivement). Une importante catégorie d'informateurs reconnaît ces plantes par leur arôme seulement (19,94%, 17,73% et 23,27% pour le thym, la verveine et la citronnelle respectivement). Nous remarquons par ailleurs, qu'un faible pourcentage des informateurs reconnaît ces plantes par leur morphologie seulement, ou bien la saison de leur récolte seulement. Cependant certains auteurs affirment dans leur étude que la citronnelle est cultivée en Algérie pour être utilisée contre les affections de l'estomac et des gencives et également pour ses propriétés anti inflammatoires (Boukhatem *et al.*, 2014), elle enregistre le plus grand pourcentage de personnes n'ayant fournis aucune réponse concernant sa connaissance (61,05 %) et ses critères d'identification (26,59%).

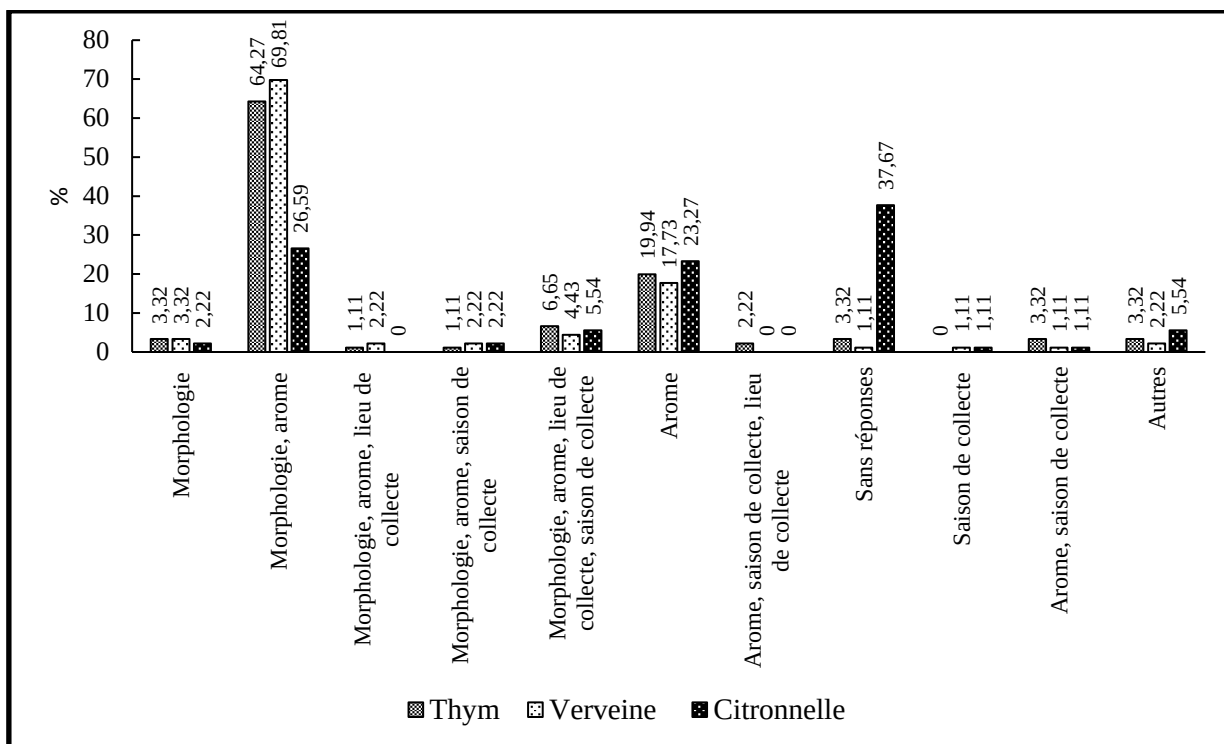


Figure 18. Critères d'identification du thym, de la verveine et de la citronnelle

1.2.4. Lieux d'achat

Il est à noter, d'après les résultats enregistrés (figure 19) que les lieux d'achat des plantes étudiées diffèrent d'une plante à une autre. Selon les informateurs, le thym est beaucoup plus acheté soit chez un herboriste (24,21%) soit au marché (18,95%) mais la majorité (31,58%) l'achète au niveau des deux fournisseurs. Un faible pourcentage d'informateurs (<10%) l'achète des supérettes.

Concernant la verveine, elle est achetée majoritairement chez l'herboriste (23,16%), mais aussi au marché (10,53%) et aux supérettes (4,21%). Nous constatons par ailleurs que 15,79% des informateurs l'achètent au niveau des marchés, des herboristes et des supérettes.

D'après le sondage, 36,84% des informateurs n'ont fourni aucune réponse à propos de la citronnelle. Néanmoins, un pourcentage des informateurs retrouve cette plante dans les différentes catégories avec : 9,47% pour herboriste, 17,89% pour le marché, 8,42% pour l'herboriste et un faible pourcentage <10% affirment acheter cette plante au niveau des supérettes.

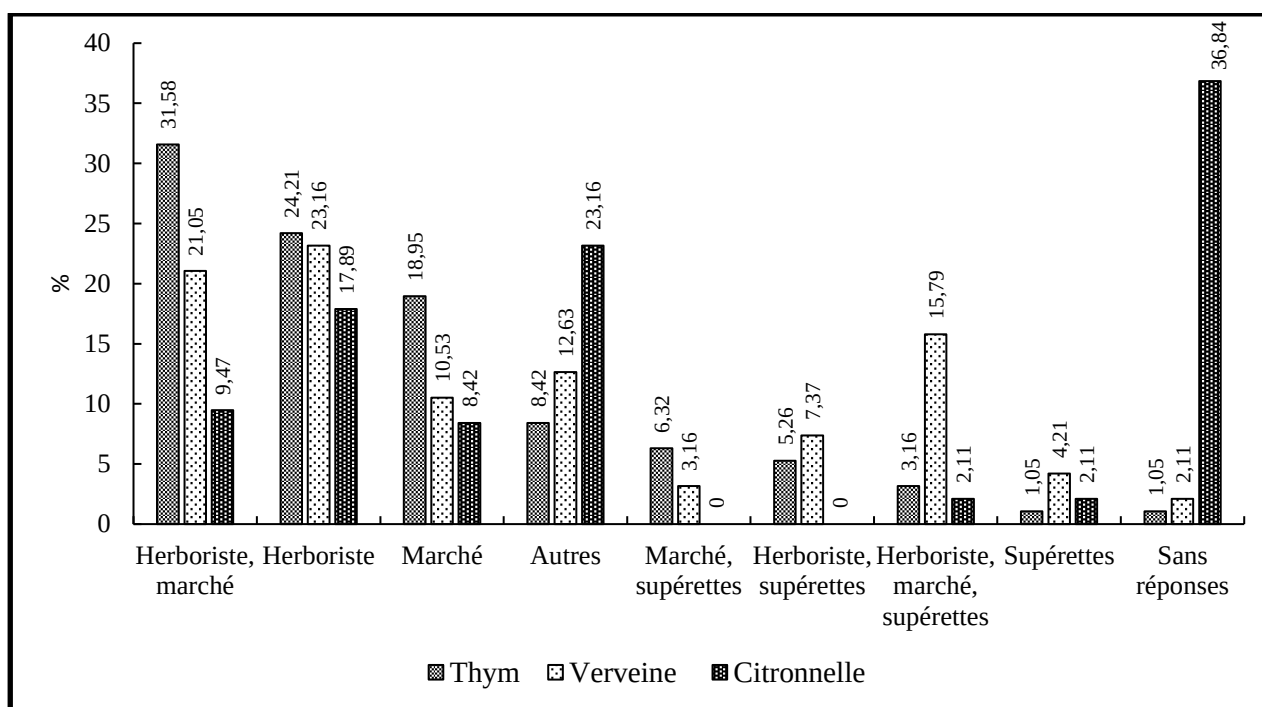


Figure 19. Lieux d'achat du thym, de la verveine et de la citronnelle

1.2.5. Utilisation dans le domaine alimentaire

D'après la figure 20, le sondage montre que les plus grands pourcentages d'utilisation des plantes sont pour des raisons de santé et d'aromatisation beaucoup plus que pour la conservation et la texturation. La verveine étant la plus utilisée pour son effet sur la santé (67,37%). Concernant l'aromatisation, le thym est beaucoup plus utilisé (17,89%) que la verveine et la citronnelle. Quant à la citronnelle, 42,11% des informateurs n'ont pas donné de réponses, seuls 22,11% ont opté pour l'effet santé et 7,37% pour l'effet aromatisant.

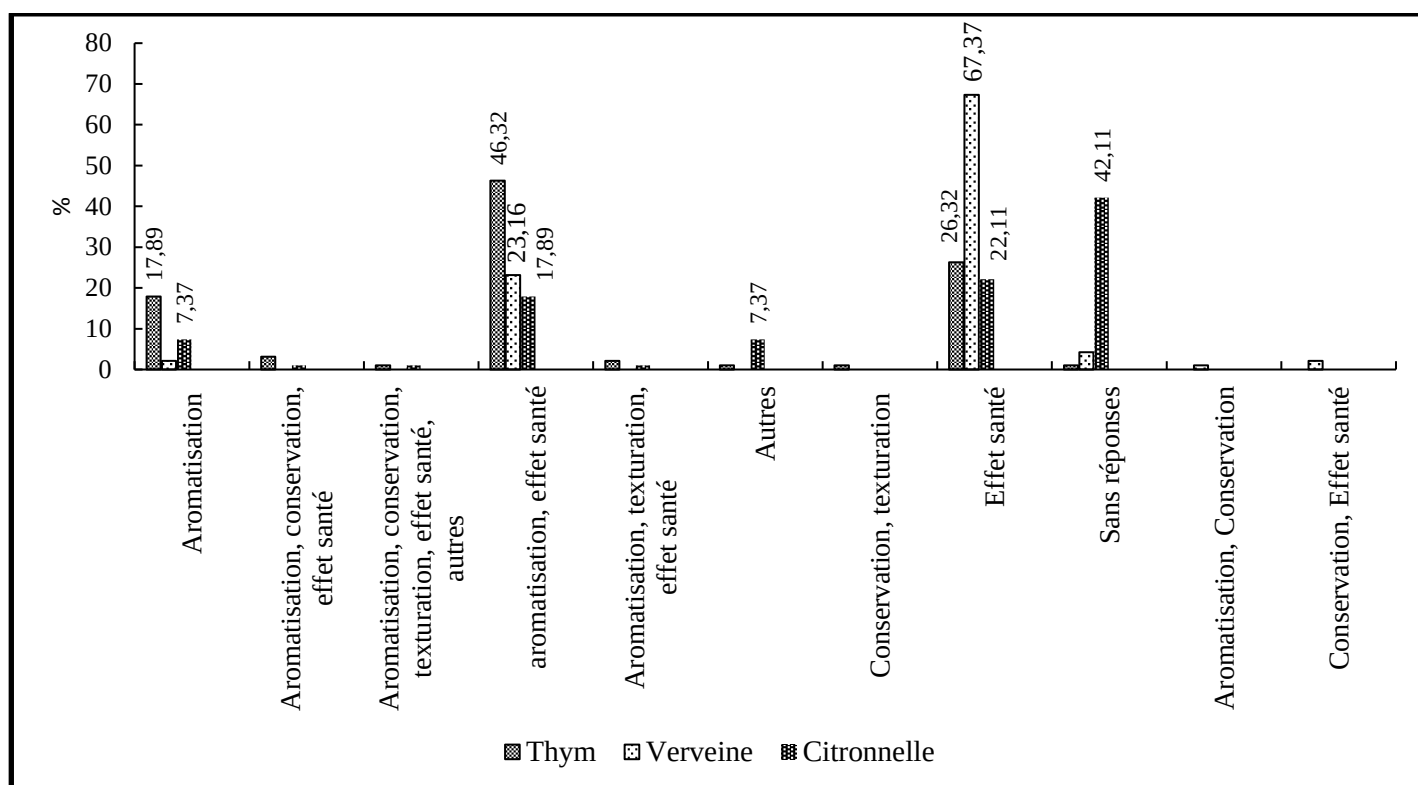


Figure 20. Raisons d'utilisation du thym, de la verveine et de la citronnelle

1.2.6. Parties des plantes utilisées

Les parties de plantes utilisées par les informateurs varient d'une plante à une autre (figure 21), 66,32% des informateurs préfèrent l'utilisation des feuilles de la verveine, tandis que le thym est utilisé le plus avec ses feuilles et tiges. La citronnelle n'a pas enregistré un grand pourcentage dans toutes les combinaisons du fait qu'il n'y a pas beaucoup d'informateurs qui connaissent cette plante.

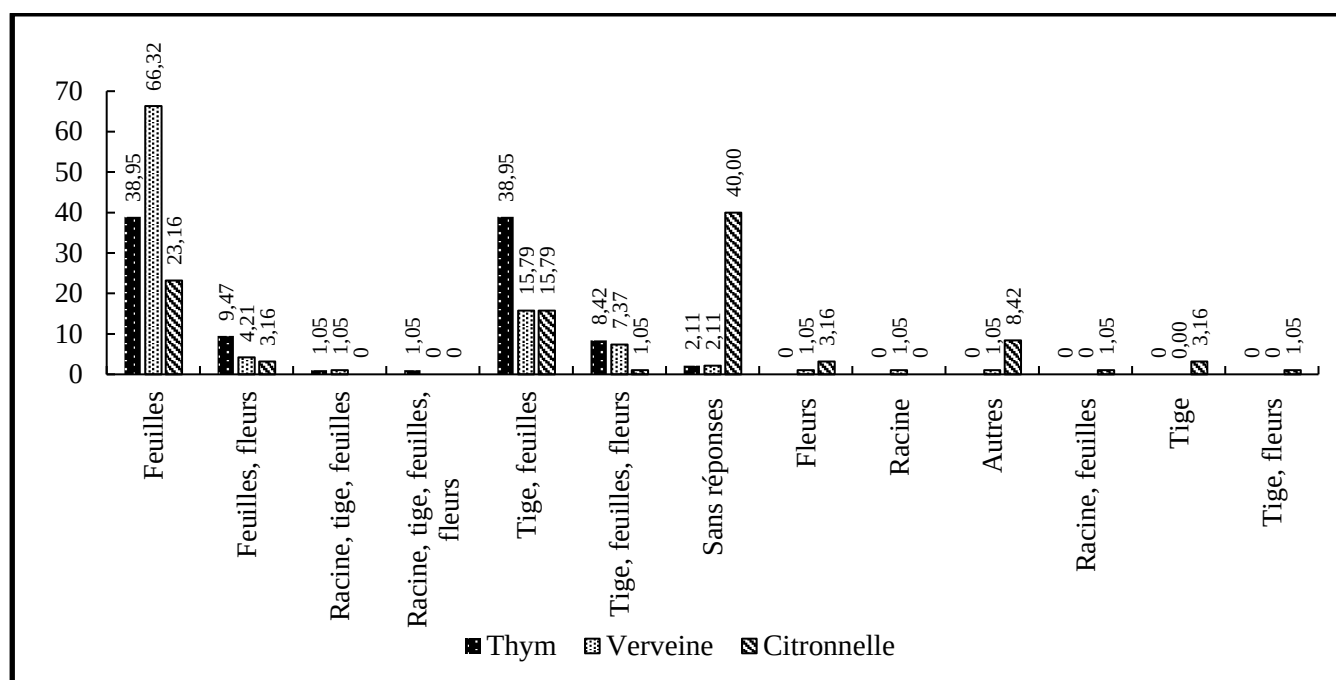


Figure 21. Parties végétales utilisées du thym, de la verveine et de la citronnelle.

1.2.7. Initiation à l'utilisation des plantes étudiées

L'initiation à l'utilisation des plantes étudiées est représentée dans la figure 22. Nous remarquons que les trois plantes présentent des pourcentages élevés dans la catégorie initiation par tradition avec une prédominance pour la plante verveine 89,47%.

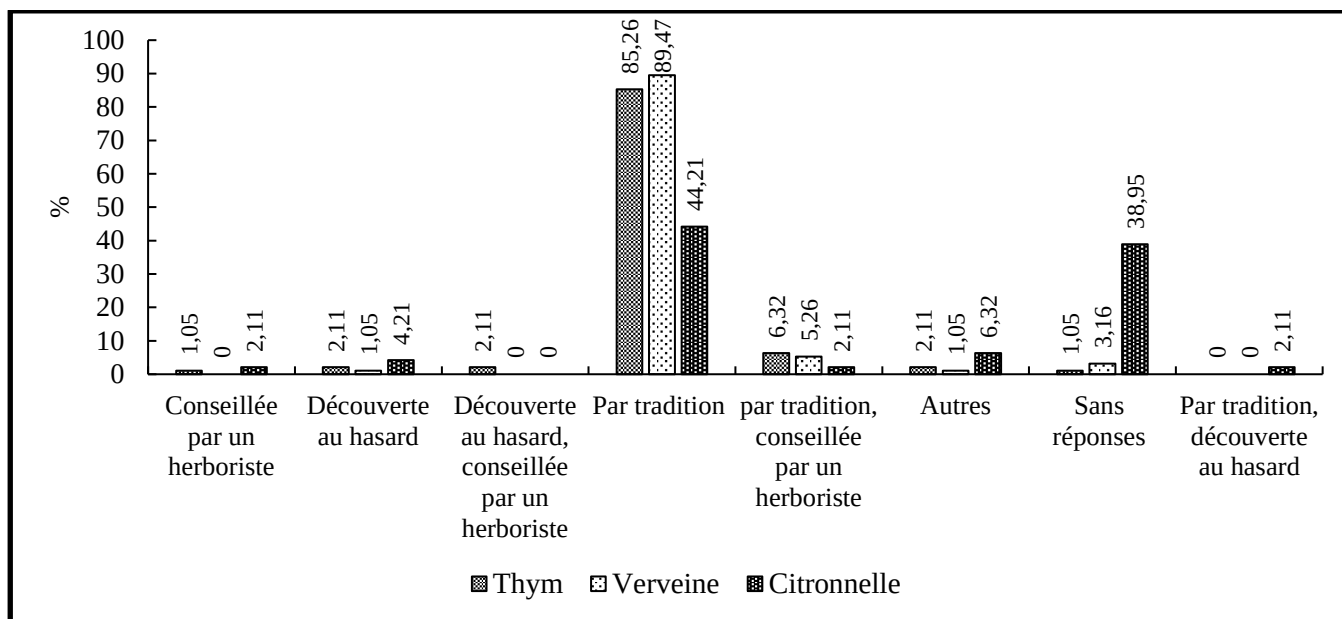


Figure 22. Initiations à l'utilisation du thym, de la verveine et de la citronnelle

1.2.8. Utilisation des huiles essentielles des plantes étudiées

D'après la figure 23, il semble que les informateurs n'utilisent pas vraiment les HEs dans leurs préparations culinaires. En effet, 97,89% d'entre eux n'utilisent pas l'HE du thym, ceux qui l'utilisent l'emploient sous forme de branches pour soigner certaines maladies ou bien quelques gouttes en cas de maux de tête. 66,32% des informateurs n'utilisent pas l'HE de verveine et ceux qui l'utilisent indiquent l'emploi culinaire et avec du citron. Concernant la citronnelle, 63,16% des informateurs n'ont pas répondu, seulement 6,32% ont confirmé l'utiliser et certaines réponses indiquent son utilisation dans les boissons, en plats traditionnels non précisés.

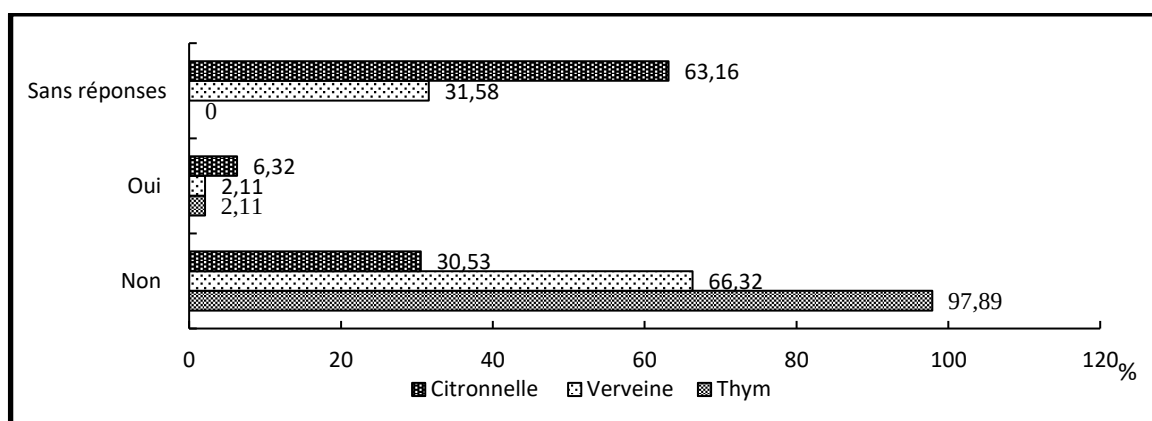


Figure 23. Utilisation des huiles essentielles du thym, de la verveine et de la citronnelle

A l'issu de cette enquête, il ressort que majoritairement les informateurs n'utilisent pas vraiment les HEs, notamment celles du thym, de la verveine et de la citronnelle, dans leurs préparations culinaires. La citronnelle est une plante qui est méconnue par la majorité des informateurs.

2.1. Rendement et caractéristiques organoleptiques des HEs extraites

Les rendements d'extraction des HEs du thym (*T. wilddenowii*), de la verveine (*A. citriodora*) et de la citronnelle (*C. citratus*) sont représentés dans la figure 24.

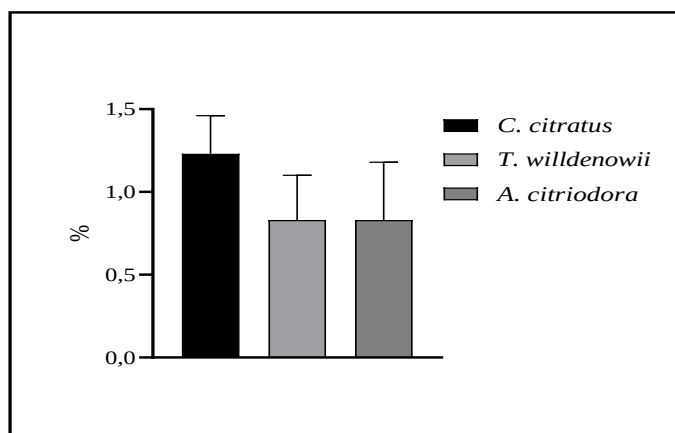


Figure 24. Rendements d'extraction en huiles essentielles du thym, de la verveine et de la citronnelle

Concernant la citronnelle et en comparaison avec les résultats rapportés dans la littérature, il ressort que *C. citratus* donne un plus grand rendement ($1,23 \pm 0,23\%$), par rapport aux résultats de Madi *et al.* (2021). Ces derniers ont étudié l'effet de la saison sur le rendement en HEs, les valeurs obtenues sont de 0,15% et 0,46% au printemps et en hiver respectivement. En effet, la collecte de notre plante s'est effectuée en été ce qui expliquerait probablement cette différence. En cette période les plantes connaissent une réduction significative de la quantité d'eau dans les feuilles ce qui facilite l'extraction et réduit la dissolution des composés dans la phase aqueuse végétale. A l'inverse, notre résultat s'avère inférieur à celui obtenu par Likibi *et al.* (2019) dont le rendement de la même espèce cueillie à Brazzaville est de 1,54%. En effet, la grande taille des feuilles de *C. citratus* offre une surface plus importante remplie de poils sécréteurs produisant des gouttelettes d'HEs.

Par ailleurs le thym (*T. wilddenowii*) fournit un rendement en HE de $0,83 \pm 0,27\%$. ce taux est plus important que celui cité dans les travaux de Belmalha *et al.*, (2015), où le rendement de la même espèce cultivée au Maroc, plus précisément la région d'Annzala, est estimé à 0,28% et de celui de Bnina *et al.* (2009) estimé à 0,35%. Cependant, le rendement obtenu par Radi *et al.* (2021) estimé à 3%, est remarquablement plus élevé que celui enregistré dans la présente étude.

Quant à *A. citriodora*, elle a totalisé un rendement d'extraction en HEs de $0,83\% \pm 0,35$. Ce rendement est supérieur à celui enregistré par Oukerrou *et al.* (2017), ayant étudié la même espèce mais cultivée au Maroc (0,1 à 0,2%).

En effet, les familles botaniques *Lamiaceae*, *Poaceae* et *Verbenaceae* auxquelles appartiennent le thym, la citronnelle et la verveine respectivement sont connues par leur richesse en HEs (Marin *et al.*, 2008 ; Ekpenyong *et al.*, 2015 ; Elechosa *et al.*, 2017).

La différence entre les résultats, pour la même espèce, est probablement due aux variétés locales, au stade végétatif, la région de la collecte, la saison mais aussi les conditions d'extraction et l'appareillage (Toure, 2015).

L'observation microscopique des poils sécréteurs des huiles essentielles des trois plantes étudiées est présentée dans la figure 25.

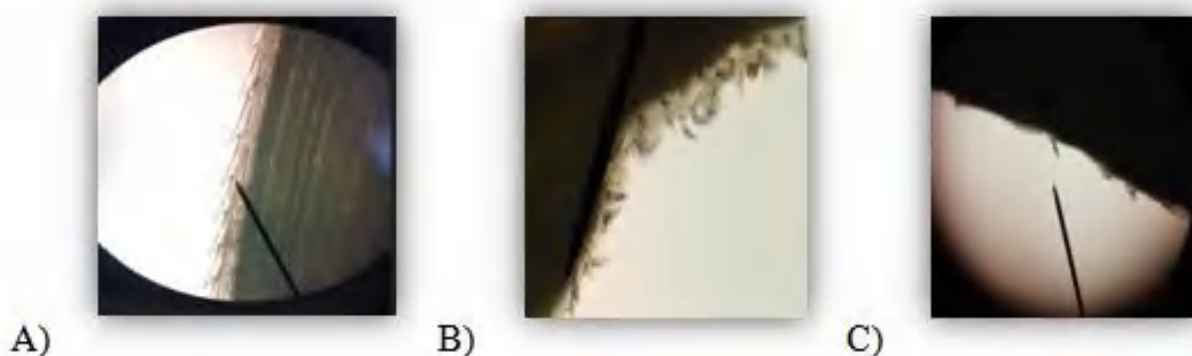


Figure 25. Observations microscopiques des poils sécréteurs (au grossissement 2,5 X 40).

A) Citronnelle (*Cymbopogon citratus*), B) Thym (*Thymus willdenowii*), C) Verveine (*Aloysia citriodora*)

Les principales caractéristiques organoleptiques des HEs extraites sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 8. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraites

HE	<i>Thymus willdenowii</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Aloysia citriodora</i>
Couleur	Jaune très clair	Jaune	Jaune foncé
Odeur	Douce et agréable	Citronnée	Citronnée
Aspect	Liquide et Limpide	Liquide et Limpide	Liquide et limpide

D'après Benoudjit *et al.* (2022), l'aspect de l'HE de la plante *C. citratus* est liquide et limpide et de couleur jaune pâle ce qui concorde avec notre résultat. La senteur citronnée a aussi été notée dans cette étude et également signalée par Boukhatem *et al.* (2014).

Concernant l'espèce *A. citriodora*, la couleur jaune foncé a été observée dans une espèce de verveine cultivée dans différents endroits au Maroc, l'auteur rapporte l'observation d'une couleur jaune à jaune foncé avec un aspect liquide et clair et une senteur fraîche et citronnée (Oukerrou *et al.*, 2017).

2.2. Composition chimique des HEs extraites

Nous rappelons que l'analyse de la composition chimique des HEs est réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS), dont le seuil de détection est de 0,1%.

2.2.1. Huile essentielle de *Thymus wilddenowii*

L'analyse de la composition chimique de l'HE de *T. wilddenowii* a permis d'identifier 6 composés dont le pourcentage est supérieur ou égale à 0,1%. Ces composés ont une aire cumulée qui correspond à 99,99% (Tableau 9).

Tableau 9. Composition chimique de l'huile essentielle de *T. wilddenowii*

	Composé	RT	RI _{exp}	RI _{lit}	Aire%
1	Linalool L	15,55	1080	1082	89,55
2	Endo-Bornéol	17,25	1145	1148	0,49
3	α- Terpinéol	19,55	1170	1172	0,6
4	Linalyl acétate	22,73	1230	1232	1,74
5	Carvacrol	24,43	1268	1275	5,6
6	Caryophyllène	29,85	1422	1424	2,01
Total					99,99
Monoterpènes oxygénés : (N° : 1, 2, 3, 5)					96,24
Sesquiterpènes : (N° : 6)					2,01
Autres : (N° : 4)					1,74

RI_{exp}= Indices de rétention calculés à partir de la série d'alcane en C8-C20 dans une colonne capillaire HP-5. RI_{lit} = Indices de rétention de la littérature, RT = Temps de rétention.

L'analyse de la composition chimique de l'HE de *T. wilddenowii* a montré une prédominance en linalool (89,55%). Les sesquiterpènes représentent un faible pourcentage (2,01%) comparés aux monoterpènes oxygénés (96,24%) (Annexe 15.a). La figure 26 illustre les spectres obtenus.

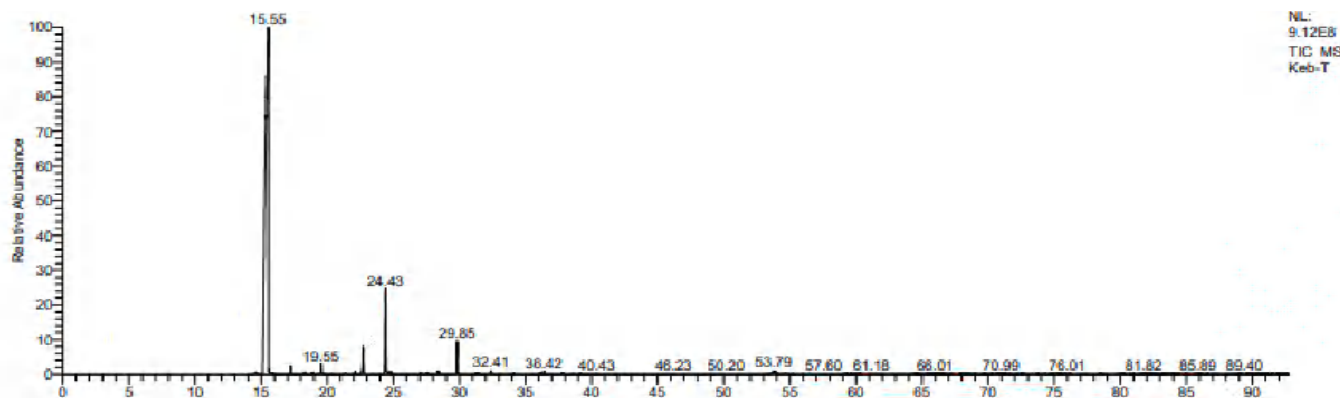


Figure 26. Spectres des composés révélés dans l'HE de *T. wilddenowii* par GC/MS

Notre résultat est en accord avec une étude précédente rapportée par Miguel *et al.* (2015) qui ont constaté que le linalool (66%) était le principal composé du thym portugais. Bnina *et al.* (2009) ont trouvé que l' α -pinène, le camphre et le 1,8-cinéole sont les composés dominants de l'HE de *T. hirtus* récoltée à Monastir (Tunisie). Par ailleurs, les résultats évoqués par Guesmi *et al.* (2018) sont en concordance avec les nôtres ; ils ont rapporté l'absence de thymol chez *Thymus hirtus* sp. *algeriensis* poussant en Tunisie. Par contre, Radi *et al.* (2021) ont trouvé des monoterpènes oxygénés (32,81%) avec une dominance de carvacrol (16,19%), d'acétate de géranyle (8,35%), d'oxyde de caryophyllène (6,90%), de camphre (5,99%), et du (E)-caryophyllène (5,59%) chez *T. wilddenowii* du Maroc.

Récemment, Zeghib *et al.* (2021) ont constaté que la même espèce, poussant à Bekira (Constantine, Nord-Est, Algérie), contient du 1,8-cinéole (34,62%), du camphre (18,55%), de l' α -pinène (9,46%) et de la camphène (5,38%) comme composants majoritaires parmi 44 composés représentant 97,3% du total de composés.

La variabilité des résultats de la composition de l'HE peut être attribuée à de nombreux facteurs notamment, le stade de développement de la plante, la partie de la plante utilisée, les facteurs géographiques à travers les conditions telles que le climat, l'altitude, le type de sol et l'environnement dans lequel la plante pousse ; les facteurs saisonniers comme la période de récolte de la plante, la température, l'humidité et la durée d'exposition à la lumière (Deschepper, 2017); les facteurs génétiques où on retrouve des différences dans les variétés *via* leur chémotype ou profils chimiques distincts en raison de leur patrimoine génétique unique. Des variations génétiques naturelles ou des différences cultivars également (Djibo et al., 2004).

Ajouté à cela les méthodes d'extraction de l'HE, chaque méthode peut entraîner des différences dans sa composition, sans oublier les conditions de stockage (lumière, chaleur, humidité et durée de stockage). Nous pouvons noter que l'HE étudiée ici est marquée par la présence d'une grande fraction de monoterpènes oxygénés (96,24%). La fraction sesquiterpénique est dominée par le caryophyllène (2,04%). Il s'agit d'un composé responsable de l'arôme épice de certaines plantes qui est un composé connu pour son activité anti inflammatoire, anti cancéreuse, affectant la croissance et la prolifération de nombreuses lignées de cellules cancéreuses (Fidyt *et al.*, 2016).

2.2.2. Huile essentielle de *C. citratus*

L'analyse de la composition chimique de l'HE de *C. citratus* a permis d'identifier 12 composés dont la teneur est supérieure ou égale à 0,1%. Ces composés ont une aire cumulée qui correspond à 98,48% (tableau 10).

Tableau 10. Composition chimique de l'HE de *C. citratus*

	Compound	RT	RI _{exp}	RI _{lit}	Aire(%)
1	Cis epoxyocimene	14,9	1015	1017	0,32
2	Linalool L	15,3	1080	1082	18,45
3	Verbénol	19,28	1130	1132	2,37
4	Terpinéol	19,59	1205	1210	0,22
5	Nérol	21,44	1230	1232	0,61
6	Z-Citral (Néral)	22,09	1242	1245	29,89
7	Géraniol	22,7	1243	1246	3,76
8	E-Citral (Géranial)	23,51	1248	1249	38,6
9	Carvacrol (Phenol.2methyl5(1methylethyl)	24,42	1273	1275	1,38
10	Geranylacétate	28,42	1350	1352	0,32
11	Caryophyllène	29,85	1422	1424	0,4
12	Tridécanone	33,05	1473	1476	0,32
Total				98,48	
Monoterpènes oxygénés (No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10)				95,28	
Sesquiterpène (No: 11)				0,4	
Autres (No: 12)				0,64	

RI_{exp}= Indices de rétention calculés à partir de la série d'alcane en C8-C20 dans une colonne capillaire HP-5. RI_{lit} = Indices de rétention de la littérature, RT = Temps de rétention.

L'analyse de la composition chimique de l'HE de *C. citratus* a montré une prédominance de trois composés : E-citral (38,6%), Z-citral (29,89%) et linalool (18,45%) (Annexe 15.b). Le E-citral est communément appelé néral ou citral cis et le Z-citral est appelé

géranial ou citral trans. Le citral est l'un des composés aromatiques les plus importants, largement utilisé dans les boissons, les aliments et les parfums en raison de son profil à saveur caractéristique (Maswal et Dar, 2014).

Les sesquiterpènes représentent un faible pourcentage (0,4%) comparés aux monoterpènes oxygénés (95,28%). Les spectres des différents composés est représenté dans la figure 27..

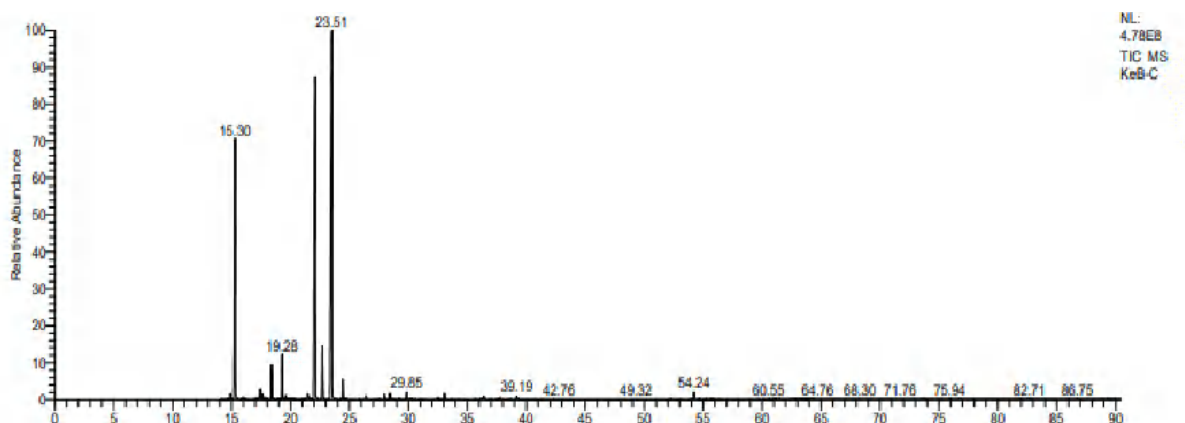


Figure 27. Spectres des composés révélés dans l'HE de *C. citratus* par GC/MS

Dans l'étude d'Ajayi *et al.* (2016), les résultats d'une GC/MS portant sur la même espèce, ont révélé la présence de citral comme composé majoritaire ce qui est en total accord avec nos résultats. Par ailleurs l'HE extraite de l'espèce *C. citratus* cueillie dans la région de Chiffa, wilaya de Blida en Algérie, a montré deux isomères du citral comme composés majoritaires qui sont respectivement l'isog  ranial à 41,77% et le néral    43,75% (Benoudjit *et al.*, 2022). Ce résultat diffère des composés révélés dans la présente étude.

Les spectres GC/MS ont révélé le géraniol, un composé monoterpénique acyclique avec une valeur de 3,76%. Ce composé possède diverses propriétés pharmacologiques : propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et activités antitumorales (Lei *et al.*, 2019).

2.2.3 Huile essentielle d'*A. citriodora*

L'analyse de la composition chimique de l'HE d'*A. citriodora* a permis d'identifier 17 composés dont la teneur est supérieure ou égale à 0,01%. Ces composés ont une aire cumulée qui correspond à 98,18% (tableau 11).

L'HE a montré une prédominance de deux composés : E-Citral (34,43%), Z-Citral (27,85%). On note aussi la présence de spathulenol (7,82%), curcumène (6,76%) et caryophyllène (3,89%). Les sesquiterpènes représentent (13,73%) suivis par les sesquiterpènes oxygénés (10,35%) comparés aux monoterpènes oxygénés (72,61%) (Annexe 15.c). Les spectres des composés sont représentés dans la figure 28.

Tableau 11. Composition chimique de l'HE d'*A. citriodora*

	Composé	RT	RI _{exp}	RI _{lit}	Area%
1	Linalool L	15,23	1080	1082	2,6
2	2,2Dimethylocta3,4dienal	17,59	1095	1098	1,00
3	Verbénol	19,27	1130	1132	2,36
4	ATerpinéol	19,58	1168	1172	2,26
5	Nérol	21,42	1230	1232	1,11
6	Z-Citral (Néral)	22,07	1242	1245	27,85
7	Géraniol	22,68	1243	1246	1,00
8	E-Citral (Géranial)	23,48	1250	1249	34,43
9	Nérol acétate	28,42	1355	1358	1,49
10	Caryophyllène	29,86	1422	1424	3,89
11	Curcumène	32,52	1469	1472	6,76
12	Bicyclogermacrène	33,05	1491	1493	1,7
13	Zingibérène	33,7	1492	1492	1,38
14	Nérolidol	35,73	1545	1547	0,94
15	Spathulénol	36,22	1575	1577	7,82
16	T-Cadinol	38,62	1634	1637	1,59
Total %					98,18
Monoterpènes oxygénés : (No : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)					72,61
Sesquiterpènes : (No : 10, 11, 12, 13)					13,73
Sesquiterpènes oxygénés : (No : 14, 15, 16)					10,35
Autres : (No :9)					1,49

RI_{exp}= Indices de rétention calculés à partir de la série d'alcane en C8-C20 dans une colonne capillaire HP-5. RI_{lit} = Indices de rétention de la littérature, RT = Temps de rétention.

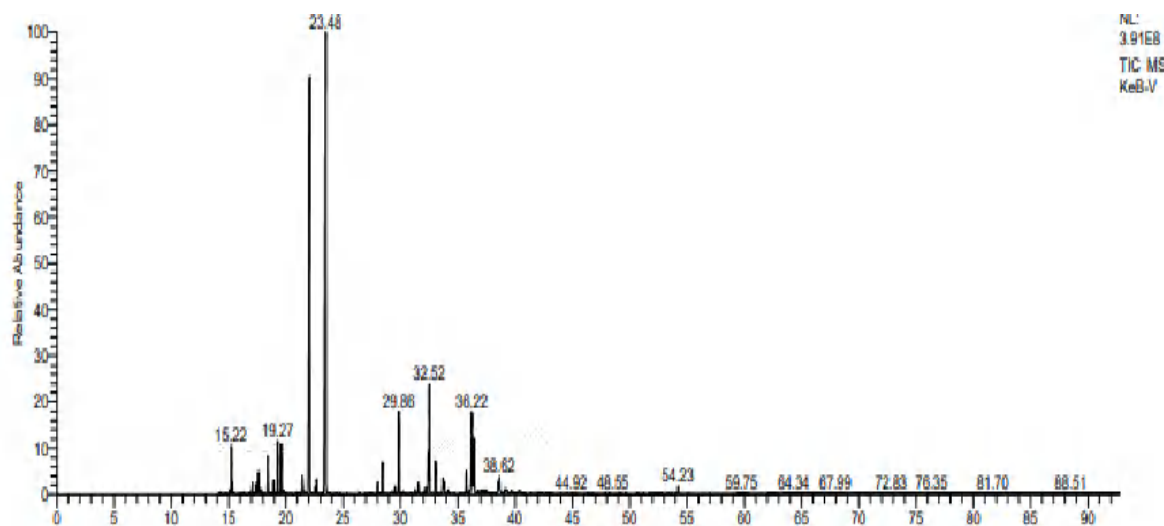


Figure 28. Spectres des composés révélés dans l'HE d'A. *citriodora* par GC/MS

L'analyse de la composition chimique de l'HE d'A. *citriodora* a permis d'identifier le chémotype citral. D'après l'étude d'Elechosa *et al.* (2017), trois autres chémotypes sont identifiés : le citronellal, le thujone et le linalool, tous révélés dans des échantillons récoltés au Nord-Ouest de l'Argentine, en soulignant que le chémotype Linalool est apparu comme nouveau chémotype.

Nos résultats sont en accord avec ceux d'Azarmi *et al.* (2012) qui ont révélé une HE riche en citral sous ses deux formes isomériques : E-citral et Z-citral (géraniol 36,32% et néral 27,88% respectivement). Ces composés sont également présents dans notre espèce : le néral ou Z-citral et le géraniol ou E-citral (34,45% et 27,85% respectivement).

Les recherches menées par Abuhamdah *et al.* (2015) ont signalé que l'HE d'A. *citriodora* cueillie en Jordanie contient également le curcumène (3,5–6,3%), le spathulenol (3,1–5,0%) et la caryophyllène oxyde (2,2–8,4%) une autre concordance avec nos résultats.

A l'issue de l'identification de la composition chimique des trois espèces étudiées, une dominance ressort pour le citral dans les deux espèces *C. citratus* et *A. citriodora*, autrement l'espèce *T. willdenowii* est riche en linalool.

2.3. Activité antioxydante

Nous rappelons que l'activité antioxydante est réalisée avec plusieurs tests, afin d'atteindre les différentes populations chimiques d'antioxydants présentes dans les échantillons à tester notamment les HEs et les yaourts incorporés d'HE. Certains tests peuvent mesurer

l'activité antioxydante directe d'une HE en neutralisant les radicaux libres, elles contiennent des composés antioxydants, tels que les phénols et les terpènes, qui leur permettent de piéger les radicaux libres et les neutraliser. D'autres tests mesurent leur capacité à inhiber l'oxydation des lipides en neutralisant les radicaux libres et en empêchant la formation de nouveaux radicaux libres. Le but de l'ensemble des tests antioxydants réalisés, est d'obtenir une meilleure compréhension de la capacité antioxydante globale d'une HE ceci permettra de déterminer son utilisation potentielle dans la prévention de l'oxydation des aliments dans diverses applications.

2.3.1 Test de DPPH

La méthode du DPPH n'a pas révélé d'activité antioxydante pour les trois HEs testées. L'IC₅₀ de chacune d'elles, étant >1600µg/mL est largement supérieur aux standards BHA, BHT et α-Tocopherol avec 6,14±0,41µg/mL, 12,99±0,41µg/mL et 13,02±5,17 µg/mL respectivement (tableau12).

Tableau 12. Activité antiradicalaire des huiles essentielles de *T. willdenowii*, *C. citratus* et *A. citriodora* (révélée par le test DPPH)

HEs (µg/mL)	% Inhibition DPPH							
	25	50	100	200	400	800	1600	IC ₅₀
<i>T. willdenowii</i>	Aa	aa	Aa	0,30±0,92	5,47±1,53	12,00±1,08	20,56±0,53	>1600
<i>C. citratus</i>	Aa	aa	Aa	Aa	Aa	Aa	aa	>1600
<i>A. citriodora</i>	Aa	aa	Aa	Aa	3,29±0,46	6,13±0,70	12,81±0,70	>1600
Standards (µg/mL)	12,5	25	50	100	200	400	800	IC ₅₀
BHA	76,55± 0,48	79,89± 0,26	81,73±0,10	84,18±0,10	87,13±0,17	89,36±0,19	90,14±0,00	6,14±0,41
BHT	49,09± 0,76	72,63± 2,06	88,73±0,89	94,00±0,31	94,97±0,08	95,38±0,41	95,02±0,23	12,99±0,41
α-Tocopherol	37,21±1,82	81,53±1,51	89,23±0,12	89,38±0,19	89,45±0,22	89,99±0,23	89,52±0,33	13,02±5,17

aa : absence d'activité

2.3.2. Test de l'ABTS

Le test ABTS a révélé une activité antioxydante modérée (IC₅₀=38,06±0,30µg/mL) pour l'HE de *T. willdenowii* tandis que les HEs de *C. citratus* et d'*A. citriodora* ont enregistré des IC₅₀ >1600µg/mL ce qui constitue une faible activité antioxydante par rapport aux standards BHA et BHT avec 1,81±0,10µg/mL, 129,99±0,30 µg/mL respectivement, (tableau 13).

Tableau 13. Activité antioxydante des huiles essentielles de *T. willdenowii*,
C. citratus et *A. citriodora* (révélée par le test ABTS)

HEs (µg/mL)	% Inhibition ABTS							
	25	50	100	200	400	800	1600	IC ₅₀
<i>T. willdenowii</i>	37,12±1,43	62,69±0,83	88,26±0,19	91,44±0,44	91,88±0,25	87,65±0,00	81,89±1,43	38,06±0,30
<i>C. citratus</i>	aa	aa	aa	Aa	Aa	aa	aa	>1600
<i>A. citriodora</i>	2,33±2,09	2,72±2,33	6,78±1,10	9,74±0,74	15,12±1,69	15,17±1,49	aa	>1600
Standards (µg/mL)	12,5	25	50	100	200	400	800	IC ₅₀
BHA	92,83±1,42	94,68±0,42	94,95±0,90	95,32±0,25	95,59±0,47	95,83±0,15	95,86±0,10	1,81±0,10
BHT	69,21±0,40	78,23±1,34	88,12±1,28	88,76±3,07	90,85±1,74	90,95±0,51	96,68±0,39	1,29±0,30

aa : absence d'activité

2.3.3 Test CUPRAC

Le test CUPRAC a révélé une activité antioxydante modérée ($A_{0,5}=56,15\pm1,07$ µg/mL) pour l'HE de *T. willdenowii* tandis que l'HE de *C. citratus* a montré une faible activité antioxydante ($257,44\pm27,13$ µg/mL), de même pour l'HE d'*A. citriodora* qui a enregistré une $A_{0,5} = 199,34$ µg/mL ce qui est faible par rapport aux standards Trolox et acide ascorbique ($1,81\pm0,10$ et $1,29\pm0,30$ µg/mL respectivement) (tableau14).

Tableau 14. Activité antioxydante des Huiles essentielles de *T. willdenowii*,
C. citratus et *A. citriodora* (révélée par le test CUPRAC)

HE µg/mL	% Inhibition Test CUPRAC							
	25	50	100	200	400	800	1600	A _{0,50} (µg/mL)
<i>T.hirtus</i>	0,32±0,01	0,38±0,11	0,46±0,03	0,76±0,02	1,22±0,06	1,91±0,15	2,64±0,10	56,15±1,07
<i>C.citratus</i>	0,14±0,01	0,18±0,00	0,27±0,02	0,47±0,07	0,66±0,03	1,10±0,08	1,49±0,04	257,44±27,13
<i>A.citriodora</i>	0,13±0,00	0,31±0,03	0,31±0,03	0,53±0,01	0,78±0,01	1,22±0,08	1,85±0,19	199,34±14,53
Standards	12,5	25	50	100	200	400	800	A _{0,50} (µg/mL)
BHA	1,12±0,05	1,95±0,31	3,14±0,46	3,58±0,42	3,35±0,20	3,77±0,19	3,92±0,13	5,35±0,71
BHT	1,41±0,03	2,22±0,05	2,42±0,02	2,50±0,01	2,56±0,05	2,86±0,07	3,38±0,13	8,97±3,94

2.3.4. Méthode de réduction de l'ion ferrique

La méthode de la réduction du fer a révélé une activité antioxydante très faible ($A_{0,5}>800$ µg/mL) pour les trois HEs par rapport aux standards Trolox et acide ascorbique ($5,25\pm0,20$ µg/mL et $3,62\pm0,29$ µg/mL respectivement) (tableau 15).

Tableau 15. Activité antioxydante des Huiles essentielles de *T. willdenowii*, *C. citratus* et *A. citriodora* (révélée par le test de réduction de fer)

HEs (µg/mL)	% Inhibition Test de réduction du fer							
	12,5	25	50	100	200	400	800	A _{0,5}
<i>T. willdenowii</i>	0,08±0,00	0,09±0,00	0,1±0,01	0,13±0,01	0,19±0,03	0,22±0,01	0,30±0,01	>800
<i>C. citratus</i>	0,08±0,02	0,09±0,00	0,09±0,00	0,11±0,01	0,12±0,01	0,14±0,00	0,16±0,02	>800
<i>A. citriodora</i>	0,08±0,00	0,09±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01	0,15±0,01	0,19±0,01	0,28±0,05	>800
Standards (µg/mL)	12,5	25	50	100	200	400	800	A _{0,5}
Trolox	0,07±0,00	0,08±0,00	0,09±0,01	0,13±0,00	0,19±0,02	0,28±0,05	0,60±0,04	5,25±0,20
Acide Ascorbique	0,07±0,00	0,09±0,01	0,12±0,01	0,17±0,01	0,25±0,02	0,47±0,03	0,79±0,09	3,62±0,29

2.3.5. Test de blanchissement du β-carotène/acide linoléique

La méthode du blanchissement du bêta-carotène a révélé une activité antioxydante très faible (IC₅₀>800µg/mL) pour les trois HEs par rapport aux standards BHA et BHT (1,05±0,03 et 0,91±0,01 respectivement). Le principe du test antioxydant de blanchissement du bêta-carotène par l'HE est de mesurer la capacité de l'HE à prévenir l'oxydation des aliments en utilisant la décoloration du bêta-carotène comme indicateur. Nous remarquons par ailleurs que seul le test avec l'HE de *T. willdenowii* a gardé la couleur orange du bêta carotène et a protégé sa décoloration par l'oxydation mais à de forte concentration (%d'inhibition = 49,31% à 800µg/mL) (tableau 16).

Tableau 16. Activité antioxydante des huiles essentielles de *T. willdenowii*, *C. citratus* et *A. citriodora* (révélée par le test de blanchissement du β-carotène/acide linoléique)

HEs (µg/mL)	% Inhibition – test β-carotène / acide linoléique							
	12,5	25	50	100	200	400	800	IC ₅₀
<i>T. willdenowii</i>	43,31±6,96	43,04±7,63	44,04±6,78	41,46±11,03	37,75±1,84	44,96±4,23	49,31±8,35	>800
<i>C. citratus</i>	aa	Aa	aa	Aa	Aa	aa	aa	>800
<i>A. citriodora</i>	aa	Aa	aa	Aa	Aa	aa	aa	>800
Standards (µg/mL)	12,5	25	50	100	200	400	800	IC ₅₀
BHT	88,29±0,10	91,70±0,36	93,65±0,30	93,68±0,46	94,49±0,07	94,88±0,10	95,58±0,19	0,91±0,01
BHA	93,48±0,44	95,52±0,33	96,34±0,55	97,56±0,19	97,64±2,22	97,85±0,32	99,66±0,52	1,05±0,03

Concernant l'HE de *T. willdenowii*, elle a enregistré aux tests DPPH, ABTS et CUPRAC un IC₅₀>1600µg /mL, 38,06±0,30 et 56,15±1,07 respectivement. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Zeghib *et al.* (2021) dont l'HE de l'espèce a présenté une activité à effet antioxydant, cela est confirmé par les études effectuées sur le pouvoir antioxydant du Linalool (composé majoritaire de notre espèce *T. willdenowii*) qui s'est avéré modéré (50% d'inhibition contre 86% de l'acide ascorbique) ce qui pourrait expliquer nos résultats.

En comparant nos résultats à ceux de Radi *et al.* (2022), nous constatons qu'ils ne s'accordent pas. L'HE extraite de la même espèce collectée au Maroc a montré une activité antioxydante élevée avec le test DPPH avec une IC₅₀ à 6,13±0,11 µg /mL. Par ailleurs le chemotype de l'HE testée est composé de germacrène D (16,51%), de carvacrol (16,19%) et de geranyl acetate (8,35%). Cette combinaison chimique pourrait justifier l'activité antioxydante élevée par la synergie de ces composés.

De même pour *C. citratus* qui a enregistré des IC₅₀>1600µg /mL au test DPPH, ces résultats concordent avec une étude similaire de l'HE sur *C. citratus* qui a enregistré une faible activité antioxydante et dont l'auteur confirme que la plante est beaucoup plus utilisée pour son arôme et son odeur citronnée et rafraichissante (Lu *et al.*, 2014).

Concernant *A. citriodora*, les résultats sont en accord avec ceux de Rashid *et al.* (2022) qui n'ont enregistré aucune activité antioxydante pour cette HE.

Il existe plusieurs d'études sur les activités biologiques des HEs, de nombreux travaux rapportent que les valeurs de l'activité anti radicalaire sont en relation avec les composés majoritaires de ces HEs, néanmoins l'effet synergique est également cité. En général, les HEs riches en composés oxygénées présentent une activité anti radicalaire plus marquée que celles à terpènes hydrocarbonés (Toure, 2015).

D'après les résultats obtenus, il semble que les HEs des trois plantes possèdent des activités antioxydantes faibles à modérées, leur effet dépend de leurs concentrations. Le comportement des HEs vis-à-vis des radicaux DPPH et ABTS peut être expliqué par le fait que la réaction des antioxydants avec le radical DPPH est lente et se produit au fil du temps contrairement au radical ABTS qui est rapidement réduit (Shalaby et Shanab, 2013). De manière générale, l'HE de *T. wilddenowii* possède la meilleure activité antioxydante entre les trois plantes et l'HE d'*A. citriodora* en possède la plus faible.

2.4. Activité antibactérienne

2.4.1. Sensibilité aux huiles essentielles

Nous rappelons que l'activité antibactérienne des HEs des trois plantes aromatiques est évaluée sur 8 souches bactériennes par la méthode de diffusion sur gélose. Les figures 27.a et

27.b représentent le résultat de ce test et les diamètres d'inhibition des bactéries sont exprimés en mm.

L'aromatogramme est un test utilisé pour évaluer l'activité antibactérienne d'une substance, en général une HE, contre différentes souches bactériennes pathogènes. Dans cette étude, le test d'aromatogramme réalisé avec l'HE de *T. wilddenowii* a révélé une activité antibactérienne élevée. Les diamètres d'inhibition obtenus atteignent 31,75 mm, ce qui indique que l'HE de *T. wilddenowii* est capable d'inhiber la croissance des souches pathogènes testées. Les souches bactériennes spécifiques qui ont montré une sensibilité très élevée sont *B. cereus*, *S. enteritidis*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. Leurs diamètres d'inhibition sont respectivement de $31,75 \pm 1,50$ mm, $27,75 \pm 0,5$ mm, $27,5 \pm 0,58$ mm et $26,5 \pm 0,58$ mm.

Cependant, les huiles essentielles des espèces d'*A. citriodora* et *C. citratus* ont montré des activités antibactériennes plus faibles que celle de *T. wilddenowii*. Les diamètres d'inhibition obtenus avec ces huiles essentielles n'ont pas dépassé $16,5 \pm 0,58$ mm. Ces résultats suggèrent que l'HE de *T. wilddenowii* possède un fort potentiel antibactérien contre les souches pathogènes testées, tandis que les huiles essentielles d'*A. citriodora* et *C. citratus* ont montré une activité antibactérienne moins marquée.

Le mécanisme d'action des HE peut varier en fonction de leur composition chimique, qui est souvent complexe et comprend plusieurs composés actifs. Chaque HE peut avoir un profil de composés chimiques unique, ce qui peut influencer son activité antibactérienne. Ces mécanismes peuvent inclure : la perturbation de la membrane cellulaire en interagissant avec les lipides présents dans la membrane cellulaire des bactéries, provoquant ainsi leur perturbation et la fuite des composants intracellulaires. Une inhibition de la synthèse des protéines en interférant avec la synthèse des protéines bactériennes, entraînant un arrêt de la croissance et de la prolifération des bactéries et enfin une inhibition des enzymes bactériennes en inhibant spécifiquement les enzymes essentielles au métabolisme bactérien, perturbant leur fonctionnement et leur survie (Reis *et al.*, 2019).

Pour l'HE de *T. wilddenowii*, l'analyse de la composition chimique, a révélé la présence de monoterpènes oxygénés, représentés par le linalool, l'endo-borneol, l' α -terpineol et le carvacrol, comme constituants la majoritaires, avec un pourcentage total de 96,24%. Les monoterpènes oxygénés peuvent avoir des propriétés antibactériennes. Le carvacrol, en particulier, est un composé intéressant trouvé dans l'HE de *T. wilddenowii*. Il est connu pour ses

propriétés antimicrobiennes et peut avoir un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. Le caryophyllène est le seul sesquiterpène identifié dans cette HE, représentant 2,01% de la composition totale. Les sesquiterpènes peuvent également contribuer à l'activité antimicrobienne des HEs bien que leur concentration dans cette HE spécifique soit relativement faible.

Pour l'HE de *C. citrus*, la faible activité antibactérienne peut être attribuée à sa composition chimique. En revenant à sa composition chimique citée plus haut, on peut observer que la plupart des composés présents sont des monoterpènes oxygénés, avec une proportion élevée d'aldéhydes citraux (Z-Citral et E-Citral) qui représentent 38,6% de la composition totale. Bien que les aldéhydes citraux présents aient montré des propriétés antimicrobiennes, dans certaines études (Burt, 2004), leur efficacité peut être limitée par plusieurs facteurs. Tout d'abord, la susceptibilité des différentes souches bactériennes peut varier et certaines bactéries peuvent être moins sensibles aux composés présents dans l'HE. De plus, la concentration des aldéhydes citraux dans l'HE de *C. citratus* peut être relativement faible par rapport à d'autres qui ont montré une plus grande activité antibactérienne (Nascimento Silva *et al.*, 2019). Il est également important de noter que d'autres composés présents en faible quantité, tels que le verbénol, le terpinéol, le nérol et le géraniol, peuvent contribuer à l'activité antibactérienne, bien que leur concentration soit relativement faible.

Enfin pour l'HE d'*A. citriodora*, nos résultats obtenus indiquent qu'elle est principalement composée de monoterpènes oxygénés (72,61%) tels que le linalool, le verbénol, le α -terpinéol, le nérol, le Z-citral (Néral), l'E-citral (Géranial) et le géraniol. Les monoterpènes oxygénés sont connus pour avoir des propriétés antimicrobiennes, mais l'activité peut varier en fonction de la concentration et de la synergie avec d'autres composés présents dans l'huile essentielle. Cependant, la concentration des monoterpènes oxygénés dans notre HE, peut ne pas être suffisamment élevée pour obtenir une activité antibactérienne significative. De plus, il est important de noter que d'autres composés présents en plus faible quantité dans l'HE, tels que les sesquiterpènes (caryophyllène, curcumène, bicyclogermacrène) et les sesquiterpènes oxygénés (nérolidol, spathulénol, T-cadinol), peuvent également contribuer à l'activité antimicrobienne, mais leur concentration peut ne pas être assez élevée pour produire un effet antibactérien puissant (Duarte Martínez *et al.*, 2019).

Concernant les bactéries lactiques, l'HE de *C. citratus* est la plus inhibitrice avec $21,5 \pm 1,09$, $23,66 \pm 1,15$ et $13,75 \pm 0,95$ mm pour *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* et *L. rhamnosus* respectivement.

L'activité antibactérienne des HEs vis-à-vis des bactéries lactiques s'avère relativement faibles. Certains composés peuvent présenter une activité antibactérienne contre les bactéries lactiques, par contre d'autres peuvent être moins efficaces ou même favoriser leur croissance, notamment les HEs d'origan et de thym, inhibent la croissance de certaines souches de bactéries lactiques. D'autres HEs comme celle de la menthe poivrée n'ont pas eu d'effet inhibiteur significatif (Siroli *et al.*, 2008). Des études ont montré que certaines HEs peuvent inhiber la croissance des bactéries lactiques, tandis que d'autres ont révélé des effets négligeables ou même des effets stimulants telles que l'étude menée par Garcia *et al.* (2012) qui a révélé que certaines HEs, notamment l'HE de cannelle, exercent un effet stimulant sur la croissance des bactéries lactiques, favorisant ainsi leur prolifération. Il est essentiel de prendre en compte la concentration et la composition spécifique, et les souches spécifiques de bactéries lactiques étudiées, cela peut influencer l'efficacité de l'activité antibactérienne.

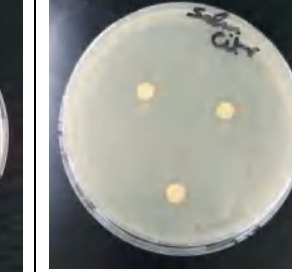
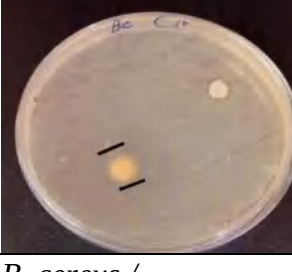
						
<i>S. enteritidis</i> / <i>T. wilddenowii</i> D=27,75±0,5mm	<i>P. aeruginosa</i> / <i>T. wilddenowii</i> D=26,5±0,58 mm	<i>B. cereus</i> / <i>T. wilddenowii</i> D=31,75±1,50 mm	<i>E. coli</i> / <i>T. wilddenowii</i> D=27,5±0,58 mm	<i>S. aureus</i> / <i>A. citriodora</i> D=14,33±0,58 mm	<i>B. cereus</i> / <i>A. citriodora</i> D=7±00 mm	<i>S. aureus</i> / <i>C. citratus</i> D=16,5±0,58 mm
						
<i>S. aureus</i> / <i>T. wilddenowii</i> D=13,5±0,58 mm	<i>S. enteritidis</i> / <i>A. citriodora</i> D=8±0,82 mm	<i>P. aeruginosa</i> / <i>A. citriodora</i> D=8,67±0,58 mm	<i>E. coli</i> / <i>A. citriodora</i> D=9,75±0,5 mm	<i>P. aeruginosa</i> / <i>C. citratus</i> D=13,5±1,73 mm	<i>E. coli</i> / <i>C. citratus</i> D=11,5±1,29 mm	<i>S. enteritidis</i> / <i>C. citratus</i> D=10,5±0,58 mm
						
<i>B. cereus</i> / <i>C. citratus</i> D=13,5±0,58 mm						

Figure 29. a. Observations macroscopique de l'effet antibactérien des HEs de thym, de la verveine et de la citronnelle sur les bactéries pathogènes sélectionnées

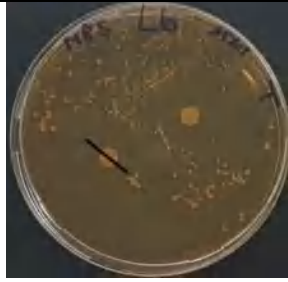
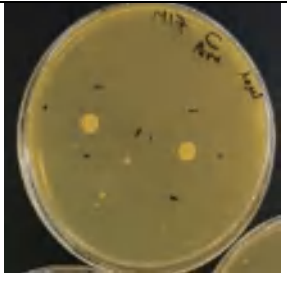
		
<i>L. bulgaricus</i> / <i>T. willdenowii</i> $D=13,5\pm0,58$ mm	<i>S. thermophilus</i> / <i>T. willdenowii</i> $D=11,25\pm0,5$ mm	<i>L. rhamnosus</i> / <i>T. willdenowii</i> $D=17,5\pm0,58$ mm
		
<i>L. bulgaricus</i> / <i>C. citratus</i> $D=21,5\pm1,09$ mm	<i>S. thermophilus</i> / <i>C. citratus</i> $D=23,66\pm1,15$ mm	<i>L. rhamnosus</i> / <i>C. citratus</i> $D=13,75\pm0,95$ mm
		
<i>L. bulgaricus</i> / <i>A. citriodora</i> $D=12,5\pm1,29$ mm	<i>S. thermophilus</i> / <i>A. citriodora</i> $D=10,5\pm0,57$ mm	<i>L. rhamnosus</i> / <i>A. citriodora</i> $D=14,25\pm1,5$ mm

Figure 29. b. Observation macroscopique de l'effet des
HES du thym, de la verveine et de la citronnelle sur les bactéries lactiques étudiées

2.4.2. Détermination des CMI et CMB des huiles essentielles

La détermination des concentrations minimales inhibitrices est effectuée par la méthode de microdillution sur microplaque 96 puits. Les concentrations définies citées dans le tableau 17 nous renseignent sur l'effet des HEs afin de croiser les valeurs de plusieurs paramètres notamment la CMI, la CMB, la CL et l'IC50%, pour fixer des doses efficaces pour l'incorporation des différentes HEs dans le yaourt.

Tableau 17. Récapitulation des différents paramètres de l'activité antibactérienne (CMI, CMB) des huiles essentielles de *T. wilddenowii*, *C. citratus*, et *A. citriodora*

HE	<i>T. wilddenowii</i>		<i>C. citratus</i>		<i>A. citriodora</i>	
Activité	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>E. coli</i> ATCC25922	1,56	1,56	3,125	3,125	3,125	6,25
<i>S. enteritidis</i> ATCC13076	>0,1	0,1	3,125	3,125	3,125	3,125
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	>0,1	1,56	0,4	1,56	1,56	3,125
<i>S. aureus</i> ATCC10876	0,8	12,5	25	25	1,56	6,25
<i>B. cereus</i> ATCC10876	>0,1	25	1,56	>0,1	>0,1	>0,1
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 530103*	>50	>50	12,5	>50	25	>50
<i>L. bulgaricus</i> *	12,5	50	12,5	25	25	25
<i>S. thermophilus</i> *	6,25	12,5	>50	>50	50	>50

* Bactéries lactiques

D'après les zones d'inhibition générées par les HEs étudiées, l'HE de *T. wilddenowii* a présenté la meilleure activité sur l'ensemble des souches testées. Nos résultats sont en concordance avec les études de Guesmi *et al.* (2016) où l'activité antibactérienne de l'HE de la même espèce récoltée en Tunisie a révélé une forte activité inhibitrice sur la bactérie pathogène *E. coli* (35–44 mm). L'effet de l'HE sur les bactéries lactiques s'est révélé plus faible avec des zones d'inhibition allant de $11,25 \pm 0,5$ à $17,5 \pm 0,58$ mm comparés aux bactéries pathogènes.

En se référant à la littérature, Bakirci (1999) a évalué certaines herbes (*Allium sp.*, *Thymus sp.*, *Anhriscus sp.* et *Ferule sp.*) sur la croissance et la production d'acide lactique des cultures thermophiles (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) et a conclu qu'il n'y avait aucun effet sur le nombre de bactéries. Ils ont conclu que les facteurs déterminant l'activité antibactérienne sont la composition et les groupes fonctionnels présents dans les composants actifs et leur effet synergie.

L'effet inhibiteur de *T. wilddenowii* sur les bactéries pathogènes *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* est étudié aussi par Zeghib *et al.* (2021) dont les diamètres d'inhibition étaient de 13,0 et 13mm respectivement.

Nous constatons par ailleurs que les trois HEs ont des CMI et CMB plus élevées pour les bactéries lactiques que celles des bactéries pathogènes les rendant plus résistantes aux HEs (Annexe 15). Les bactéries lactiques ont enregistré des CMI de 6,25 à >50 $\mu\text{L}/\text{Ml}$. Ce constat signifie que l'utilisation des HEs étudiées devrait être largement inférieure de la dose de 6,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ et qui représente la plus petite concentration tolérée. Il a été rapporté par Shipradeep *et al.* (2012) que les HEs enregistraient des CMI élevées ce qui est un atout pour les chercheurs afin de pouvoir combiner les HEs aux bactéries lactiques probiotiques dans les produits alimentaires afin de pallier aux problèmes gastro-intestinaux. Notre étude est en concordance avec une étude effectuée par Abdalli et Malek (2017) dont les résultats ont permis de fixer la dose de l'extrait à incorporer dans le yaourt selon les résultats des CMI et CMB de l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* de la région de Naama (Algérie).

Concernant l'espèce *A. citriodora* récoltée à Agadir au Maroc, l'étude de Oukerrou *et al.* (2017) a révélé une CMI= $8.37 \pm 1.27 \text{ mg/mL}$ pour *E. coli* et 5,84 mg/mL pour *S. aureus*. Dans la présente étude, les CMI sont égales à 1,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour *E. coli* et *S. enteritidis* et 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour *P. aeruginosa*, *B. cereus* et *S. aureus*.

L'HE de *C. citratus* a été testée contre *S. aureus* avec obtention des CMI de 24 $\mu\text{L}/\text{mL}$; Ce résultat est en accord avec celui de la présente étude où la bactérie *S. aureus* a présenté une CMI élevée de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Yala *et al.*, 2017).

En somme, chaque bactérie possède une réponse différente face aux composés actifs des HEs, ceci est dû probablement aux modes d'action de ceux-ci qui diffèrent. On pourrait expliquer ce phénomène par la nature chimique de la paroi cellulaire des bactéries Gram positif qui contient un peptidoglycane, permettant aux molécules de pénétrer et d'atteindre l'environnement interne de la bactérie ainsi qu'à l'absence de la membrane externe comme celle des bactéries Gram négatif. Le lipopolysaccharide, qui fait partie de la couche externe de bactéries Gram-négatif, laisse passer principalement de petites molécules hydrophiles et est seulement partiellement perméable pour les molécules hydrophobes. L'hydrophobicité des HEs est responsable de la perturbation des structures bactériennes. Le mécanisme d'action des HEs

sur les bactéries est illustré dans la figure 30. Il débute par la dégradation de la paroi cellulaire et de la membrane cytoplasmique ; puis la coagulation et la diffusion du cytoplasme à travers la double couche lipidique de la membrane et à la fin l'altération de sa perméabilité et de sa fonction (Man *et al.*, 2019)

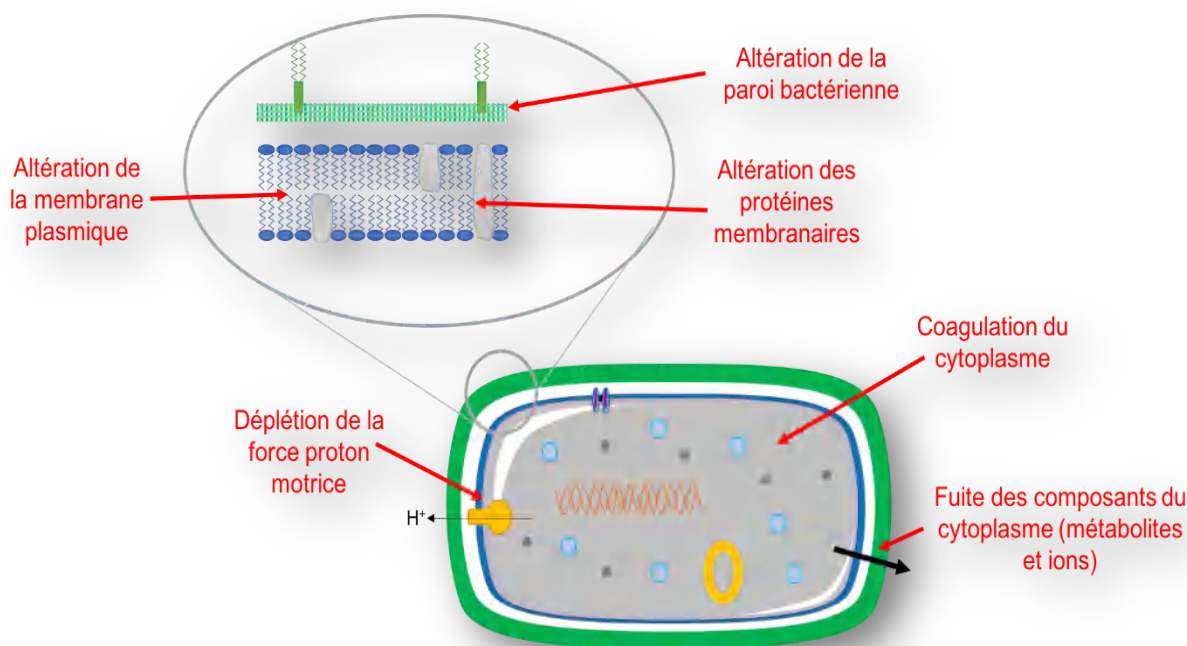


Figure 30. Modes d'action des HEs sur les bactéries (Man *et al.*, 2019)

(<https://laboratoiredumani.fr/le-mode-daction-des-huiles-essentielles-sur-les-bacteries/>)

Selon Oussalah (2004), la mesure de l'ATP intra et extra cellulaire est un indicateur de l'effet antibactérien des HEs. En effet, l'endommagement de la membrane par l'action des HEs provoquerait la libération de l'ATP intracellulaire à l'extérieur de la cellule. Il se pourrait que certaines HEs n'induisent pas la libération de l'ATP vers l'extérieur mais seulement son hydrolyse interne par l'enzyme ATPase.

Un autre paramètre permet aussi d'identifier l'effet des HEs sur les bactéries est le pH. En effet, la diminution du pH intracellulaire est remarquée avec l'HE de cannelle testée à une concentration de 0,025% (v/v) sur les bactéries (*L. monocytogenes* et *E. coli* O157 :H7). Cet effet est également observé avec certains conservateurs alimentaires comme l'acide benzoïque et cinnamique (Oussalah, 2004).

D'autres paramètres peuvent être étudiés pour mesurer l'effet des HEs sur les bactéries, telle que la mesure de l'absorbance des constituants intracellulaires. Selon Koga *et al.* (1996), la mise en évidence de l'effet du plaunotol (alcool di terpénique un anti ulcère) sur la bactérie redoutable *Helicobacter pylori*, induirait une perméabilité de la membrane et par conséquent un relargage des constituants intracellulaires mesurables à 260 nm. En plus de leur nature lipophile, il est généralement reconnu que les composés phénoliques, aldéhydes et alcool des HEs jouent un rôle important dans la rupture des membranes bactériennes (Slaughter, 2013).

En somme, la présente étude a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des trois HEs étudiées et les a classées selon l'ordre suivant : *T. wilddenowii*>*C. citratus*>*A. citriodora*.

2.5. Evaluation de l'activité antifongique des trois HEs

Les pourcentages d'inhibition indiquent l'efficacité de chaque HE à inhiber la croissance du champignon. En fonction de leur composition chimique, les résultats pour chaque HE diffèrent. Les résultats des trois HEs étudiées sont rapportés dans le tableau 18. Pour la même dose (20 µL/mL), l'HE de citronnelle a révélé un effet inhibiteur élevé, arrivant à 100%, suivie de l'HE d'*A. citriodora* qui a enregistré un effet inhibiteur élevé atteignant 76%, par contre l'HE de *T. wilddenowii* a montré une activité antifongique modérée, la plus élevée étant de 27,99%. L'HE de *T. wilddenowii* présente une inhibition relativement faible de la croissance de *Fusarium oxysporum* F. sp. *lycopersici* avec l'augmentation de la concentration. Cela peut être dû à la faible concentration de composés actifs tels que le thymol, le carvacrol et d'autres monoterpènes oxygénés qui sont connus pour leurs propriétés antifongiques. Il est possible que leur concentration dans cette HE ne soit pas suffisamment élevée pour inhiber efficacement le champignon (Soković *et al.*, 2006).

L'HE de *C. citratus* montre une forte inhibition de la croissance du champignon, même à des concentrations plus faibles. Cela peut être attribué à sa composition chimique, qui est principalement dominée par le citral (Z-citral et E-citral) qui a des propriétés antimicrobiennes (Tyagi *et al.*, 2017).

L'HE d'*A. citriodora* présente une forte inhibition de la croissance de *Fusarium oxysporum* F. sp. *lycopersici*, même à des concentrations plus faibles. Cela peut être attribué à sa composition chimique, qui est riche en monoterpènes oxygénés tels que le citral (Z-citral et

E-citral), le linalool et le terpinéol. Ces composés ont démontré des propriétés antimicrobiennes et antifongiques dans des études précédentes.

Tableau 18. Pourcentages d'inhibitions des huiles essentielles de *T. willdenowii*, *C. citratus* et *A. citriodora* vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* F. sp *lycopersici*

HEs	<i>T. willdenowii</i>	<i>C. citratus</i>	<i>A. citriodora</i>
Concentration (µL/mL)	% d'inhibition		
10	24,12±1,89	12,26±2,97	51,07±3,84
15	25,00±3,88	24,71±4,25	67,49±0,54
20	27,99±2,14	100±00	76,99±1,44

Les résultats cités ci-dessus montrent que les trois HEs ont un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL).

Les valeurs de l'activité antifongique classe les HEs étudiées en fonction du pourcentage d'inhibition. L'HE de *C. citratus* empêche la croissance mycélienne complètement à la dose de 20µL/mL. Notre résultat est en parfait accord avec l'étude menée sur le même champignon et la même HE et qui a inhibé la croissance mycélienne à 100% aux doses de 80, 60, 40 et 20µL/mL (Mekonnen *et al.*, 2019). La présence du citral comme composé majoritaire pourrait être un facteur très important régissant cette activité antifongique (De Bona De silva et Guteres, 2008). De même, l'HE d'*A. citriodora* a présenté aussi des pourcentages d'inhibition très élevés allant jusqu'à 76,99%, il a été rapporté que le citral avec ses deux isomères E et Z présentait des propriétés antifongiques importantes (Kumar *et al.*, 2016).

2.6. Evaluation, *in vitro*, de l'activité anti- enzymatique des huiles essentielles

2.6.1. Inhibition de l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase

L'inhibition de l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase par les trois HEs a été évaluée *in vitro*. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 19 :

Tableau 19. Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase (IC₅₀ (µg/mL))

HEs	Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase IC ₅₀ (µg/mL)	Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase IC ₅₀ (µg/mL)
<i>T. willdenowii</i>	>400	353,91±33,16
<i>C. citratus</i>	313,93±9,47	47,89±1,06
<i>A. Citriodora</i>	127,02±0,2	80,47±2,86
Galantamine *	6,27±1,15	34,75±1,99

*standards de référence

D'après les résultats obtenus, il semble que les HEs de l'espèce citronnelle et de verveine possèdent une activité inhibitrice élevées, *in vitro*, de l'enzyme butyrylcholinestérase ; les valeurs de l'IC₅₀ sont équivalentes à 47,89 ±1,06 µg/mL et 80,47±2,86 µg/mL respectivement, comparées à l'IC₅₀ du standard Galantamine (34,75±1,99µg/mL). En effet, la butyrylcholinestérase (BChE, EC 3.1.1.8) ou pseudo cholinestérase est une enzyme incriminée dans la genèse de différentes affections neurodégénératives et probablement neuropsychiatriques (Mabrouk *et al.*, 2011). Cependant, les trois HEs ont révélé une faible activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase que celle de la galantamine.

Plus récemment, et pour la première fois, Mata *et al.* (2007) ont démontré la capacité des HEs de thym Portugais sauvage (*T. serpyllum*) à inhiber l'acétylcholinestérase (AChE) (E.C. 3.1.1.7.), avec la possibilité conséquente de son application dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Le carvacrol est utilisé seul contre l'acétylcholinestérase et a enregistré une IC₅₀=115±0,1 µg/mL. Dans le même contexte, ces auteurs ont expliqué que le carvacrol à lui seul ne peut avoir cette activité et que la synergie avec les autres composés du thym qui est responsable de cet effet. Madi *et al.* (2021) ont investigué l'HE de *C. citratus* obtenue en hiver, celle-ci a montré une activité inhibitrice modérée vis-à-vis de l'acétylcholinestérase (IC₅₀ 2,86 ± 0,17 mg/mL), par comparaison au standard la physostigmine (IC₅₀=0,012 mg/mL). Ces

mêmes auteurs ont conclu par conséquent, que les HEs extraites de feuilles fraîches de *C. citratus* récoltées en hiver pourraient être recommandées pour la prise en charge des troubles neurodégénératifs et ont proposé des études nécessaires pour comprendre l'interaction possible entre les constituants de l'HE affectant l'inhibition de l'AChE.

Pour la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'AChE, Abuhamdah *et al.* (2020) ont impliqué la prédiction des interactions qui se produisent entre le ligand et les résidus du site actif de l'enzyme, et l'optimisation de chaque composant de l'HE à l'aide d'un algorithme pour choisir celle qui est la plus susceptible d'être active avec une activité inhibitrice potentielle de l'AChE.

Par ailleurs, l'effet antibutyrylcholinestérase de la citronnelle enregistrée dans cette étude est très proche de celui de la galantamine ce qui est très intéressant. Une étude du même genre a été effectuée sur *Cymbopogon flexuosus* dont l'activité a présenté des IC₅₀ comprises entre 11,92 et 28,18 µg/mL. Les résultats obtenus dans les microplaques sont schématisés dans la figure 31.

En somme, nous pouvons conclure que les HEs étudiées ont un potentiel inhibiteur de l'acétyl et butyrylcholinestérase selon l'ordre suivant : *C. citratus* > *A. citriodora* > *T. willdenowii*.

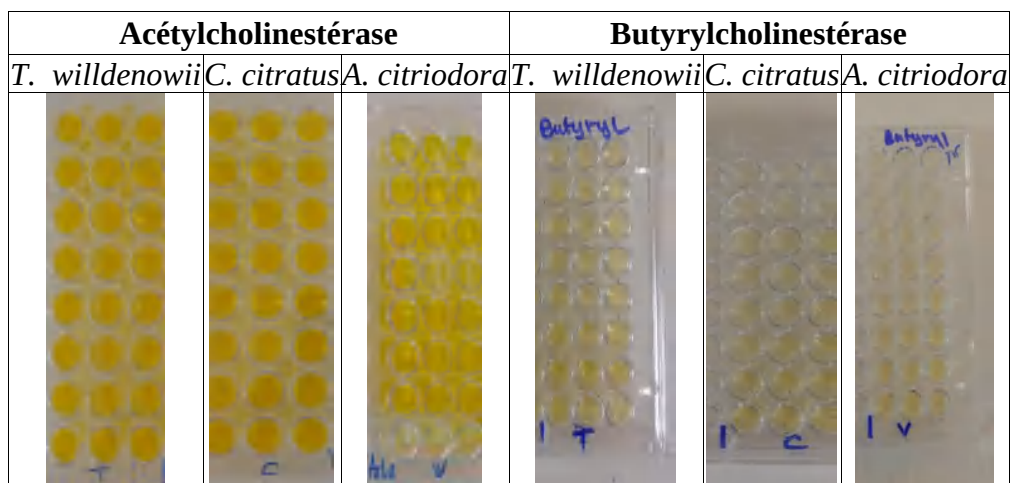


Figure 31. Résultats des activités anti acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase sur microplaque

2.6.2. Inhibition de l'activité de l'uréase

Dans la présente étude, l'activité anti-uréase des trois HEs a été testée, *in vitro*. Les résultats sont rapportés dans le tableau 20 et les résultats des microplaques dans la figure 32.

Tableau 20. Activité inhibitrice de l'uréase des huiles essentielles du thym, de la verveine et de la citronnelle

HEs	Activité inhibitrice de l'uréase IC50 (µg/mL)
<i>T. willdenowii</i>	>400µg/mL
<i>C. citratus</i>	207,10±22,77
<i>A. citriodora</i>	196,48±4,36
Thiouré	11,57±0,68

Les résultats obtenus expriment une faible activité des trois HEs (>400µg/mL; 207,10±22,77 et 196,48±4,36 pour *T. willdenowii*, *C. citratus*, *A. citriodora* respectivement), comparée au standard thiouré (IC50=11,57±0,68 µg/mL). La figure 32 montre le résultat obtenu sur microplaque montrant un virage de couleur pour les HEs de verveine et citronnelle mais à des concentrations très élevées.

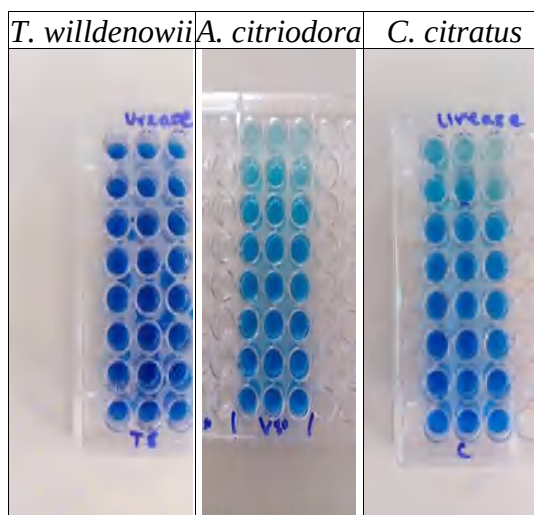


Figure 32. Résultats de l'activité anti uréase sur microplaque

Plusieurs études ont été focalisées sur l'effet inhibiteur des HEs contre la bactérie redoutable *Helicobacter pylori* responsable de l'ulcère gastrique (Nabati *et al.*, 2012 ; Korona-Glowniak *et al.*, 2020). L'uréase est une enzyme clé qui permet la survie et la colonisation de *H. pylori* en initiant l'hydrolyse de l'urée générant de l'ammoniac pour neutraliser l'acide gastrique afin de créer un environnement de pH approprié. Par conséquent, l'uréase est considérée comme une cible critique dans la recherche et l'exploitation d'agents antibactériens (Korona-Glowniak *et al.*, 2020). Ces mêmes auteurs ont investigué l'effet inhibiteur de l'uréase de 26 huiles essentielles de PAM, tout en signalant une faible activité anti uréase du thym et de la citronnelle. Il existe plusieurs espèces dotées d'activité inhibitrice de l'uréase (*Acacia nilotica*, l'ail (*Allium sativum*), l'oignon (*Allium cepa*), le poireau (*Allium porrum*), lechoux de bruxelle (*Brassica oleracea var. gemmifera*) (Olech *et al.*, 2014). Cette activité est due à la présence du composé cepaenes (composé organique retrouvé dans l'oignon) qui possède une activité anti uréase. Korona-Glowniak *et al.* (2020) ont testé l'activité inhibitrice de l'uréase de 26 huiles essentielles parmi elles figurent la citronnelle et le thym dont l'effet observé était faible (IC₅₀= 67,1 et 248,7 mg/L respectivement). Selon Ledezma *et al.* (2022), la citronnelle est efficace sous forme de thé concentré prise trois fois par jour avant chaque repas pendant 14 jours et après interruption pendant 7 jours, une reprise de 14 autres jours, cette méthode serait efficace pour éradiquer cette bactérie redoutable.

2.6.3. Inhibition de l'activité de l' α -amylase

Les résultats de l'activité inhibitrice de l' α -amylase, *in vitro*, sont mentionnés dans le tableau 21.

Tableau 21. Activité inhibitrice de l' α -amylase

HES	Activité inhibitrice de l' α -amylase IC ₅₀ (μ g/mL)
<i>T. willdenowii</i>	>4000
<i>C. citratus</i>	>4000
<i>A. citriodora</i>	>4000
Acarbose	3650,93$\pm$10,70

Il est à noter que les trois HEs ont révélé une activité inhibitrice de l'enzyme α -amylase mais très modérée par rapport au standard utilisé (acarbose) (IC₅₀=3650,93 $\pm$ 10,70 μ g/ml). Plusieurs études ont évalué l'effet inhibiteur de certaines espèces végétales sur l'enzyme l' α -amylase, par exemple les extraits de myrte, le fenugrec, les feuilles d'olivier et les fleurs d'hibiscus (Goetz, 2007). Parmi les travaux rapportés sur l'effet antidiabétique des HEs, Subash Babu *et al.* (2007) ont confirmé que le cinnamaldéhyde, composé majoritaire de la cannelle, a diminué significativement ($p < 0,05$) de manière dose-dépendante la concentration de glucose dans le plasma (63%). Par ailleurs, dans notre étude, notons que le plus grand pourcentage d'inhibition a été enregistré pour l'HE de *C. citratus* (14,38 $\pm$ 0,53 μ g/ml). Cette espèce a déjà été testée dans d'autres études pour son effet antidiabétique avéré à la dose de 500 mg/kg/jour (rat wistar males) (Adeneye et Agbaje, 2007). Les espèces *T. schimperi* et *T. vulagaris* ont fait l'objet d'une étude sur l'effet hypoglycémiant *in vitro*. Leurs extraits aqueux et méthanoliques ont montré une inhibition intéressante de l' α -amylase et l' α -glucosidase ; cette inhibition est corrélée avec la teneur en composés phénoliques de chaque espèce. L'auteur a ainsi suggéré que la forte activité inhibitrice de l' α -amylase est étroitement liée à la présence de composés phénoliques (Dessalegn et Bultosa, 2019).

2.6.4. Inhibition de l'activité de la tyrosinase

Au cours des dernières années, les inhibiteurs de la tyrosinase ont gagné une grande importance en raison de l'impact de la tyrosinase sur la mélanogénèse humaine et le brunissement des plantes et des champignons. Dans la méthode utilisée, l'activité inhibitrice de

l'enzyme tyrosinase est basée sur la mesure du dopachrome formé en présence de tyrosinase. Comme on le voit dans le tableau 22, les trois HEs ont révélé une activité anti tyrosinase mais qui reste faible ($IC_{50} > 200 \mu g/mL$) par comparaison au standard : acide kojique ($25,23 \pm 0,78 \mu g/mL$).

Tableau 22. Activité inhibitrice de la tyrosinase

HE	Activité inhibitrice de la tyrosinase $IC_{50} (\mu g/mL)$
<i>T. wilddenowii</i>	>200
<i>C. citratus</i>	>200
<i>A. citriodora</i>	>200
Acide kojique	$25,23 \pm 0,78$

La faible activité de l'HE de *T. wilddenowii* est probablement liée à l'absence de certains composés tels que le thymol. Dans la même optique, Satooka et Kubo (2011) rapportent que le thymol présente une inhibition effective de l'oxydation de la L-DOPA à dopaquinone.

Certaines espèces du genre *Thymus* sont aussi évaluées pour leur effet anti tyrosinase, il en découle un IC_{50} équivalent à $11,03 \pm 2,82 \text{ mg/mL}$ comparé au standard acide kojique $0,14 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$ (Ceylan *et al.*, 2016).

Dans la présente étude, l'activité inhibitrice de l'HE de *C. citratus* a présenté un $IC_{50} > 200 \mu g/mL$ relativement supérieur au standard acide kojique ($25,23 \pm 0,78 \mu g/mL$), donc une faible activité anti tyrosinase. En se référant à la littérature, nos résultats ne concordent pas parfaitement avec ceux de Saeio *et al.* (2011) qui ont tenté de développer une microémulsion d'HEs de 6 espèces et les ont testées pour leur pouvoir inhibiteur de la tyrosinase. Parmi ces HEs, celle de *C. citratus* était la plus forte avec un IC_{50} de $0,5 \text{ mg/mL}$. Il a été noté aussi que le citral, composé présent dans l'HE de citron possédait une activité anti tyrosinase intéressante (constante d'inhibition $0,32 \text{ mM}$ comparé au standard acide kojique $7,75 \text{ mM}$ (Matsuura *et al.*, 2006).

De même pour l'HE d'*A. citriodora*, elle a présenté une faible activité anti tyrosinase ($IC_{50} > 200 \mu g/mL$), due à l'absence probable de certains composés tels que le β -myrcene et le citronellal. En effet, Capetti *et al.* (2021) ont rapporté que pour l'HE de *Verbena officinalis*

(Verveine officinale), le composé β -myrcene contribuerait à l'effet inhibiteur de la tyrosinase et le citronellal augmenterait l'action inhibitrice du citral sur la tyrosinase du champignon (*Agaricus bisporus*) potentiellement via l'effet synergique car aucun effet n'est observé à lui seul.

À notre connaissance, cette étude est la première sur l'activité anti tyrosinase de l'HE de *T. willdenowii*. En somme, les trois HEs ont révélé une activité anti tyrosinase faible par comparaison au standard (acide kojique). Des études plus approfondies sont nécessaires afin de définir le type d'interaction entre les composés des HEs et de les tester sur les tyrosinases.

2.7. Evaluation de l'activité cytotoxique, *in vitro*, sur les larves d'*Artemia salina*

Pour évaluer, *in vitro*, la cytotoxicité des trois HEs, le bio essai rapide sur les larves de crevettes ou Brine shrimp a été appliqué. Il a révélé les résultats exprimés dans tableau 23. L'HE de *T. willdenowii* a enregistré une $LC_{50}=80,77\mu g/mL$, suivie de *C. citratus* avec une $LC_{50}=1027,71\mu g/mL$ et d'*A. citriodora* avec une $LC_{50} = 2226,78 \mu g/mL$. Il est à remarquer que tous les résultats obtenus sont supérieurs à 80 ($\mu g/mL$), ce qui les rend non toxiques (Meyer *et al.*, 1982)

Tableau 23. Valeurs de CL_{50} des trois huiles essentielles testées

% Mortalité		
Concentrations ($\mu g/mL$)	LC_{50}	Toxicité
<i>A. citriodora</i>	2226,78	-
<i>C. citratus</i>	1027,71	-
<i>T. willdenowii</i>	80,77	-

- : Pas d'effet cytotoxique

En comparant la CL_{50} de l'HE de *T. willdenowii* à celle de l'HE de *T. vulgaris* étudiée préalablement par Niksic *et al.* (2021), nous constatons que la CL_{50} ($60,38 \mu g/mL$) de cette dernière correspond à un effet très toxique contrairement à notre espèce. De même l'étude réalisée par Kaska (2019) est en désaccord avec le nôtre concernant l'espèce *T. zygoides* dont l'extrait méthanolique a enregistré une $CL_{50}=34,46 \mu g/mL$.

Concernant l'HE de *C. citratus*, Mathialaghan *et al.* (2014) ont investigué son potentiel cytotoxique, ils ont obtenu une $CL_{50}=0,35 \mu g/mL$ avec l'HE extraite par hydrodistillation assistée par microonde et une $CL_{50}= 0,29 \mu g/mL$ de l'HE extraite par hydrodistillation, les

auteurs suggèrent par conséquent que l'utilisation de la première technique pour l'obtention de cette HE susceptible d'être utilisée dans le domaine pharmaceutique et culinaire sans danger.

Quant à l'HE d'*A. citriodora*, en comparant nos résultats à ceux d'une étude préalable de l'HE d'*A. polystachia*, (CL50= 6459 mg/mL) et *Aloysia triphylla* (CL50=1279 mg/mL) on peut conclure que cette plante ne possède pas d'effet cytotoxique sur les larves d'*Artemia salina* (Werdin González *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus des trois HEs ont des IC50>80µg/mL ce qui indique qu'elles n'ont pas d'effet cytotoxique sur les larves d'*Artemia salina*. Néanmoins des études plus approfondies sont nécessaires pour confirmer la cytotoxicité de ces HEs.

3.1. Essai d'incorporation des HEs dans le yaourt

Cette partie de l'étude a concerné l'incorporation des HEs des trois espèces sélectionnées, séparément, dans une matrice alimentaire de type « yaourt étuvé ». Les résultats obtenus sont comparés à ceux d'un yaourt témoin (sans HEs). La comparaison a pour objectif d'analyser l'impact de cette incorporation sur quelques paramètres physicochimiques et organoleptiques des yaourts formulés et d'évaluer leur potentiel antioxydant. Dans cette étude, nous avons fixé une dose des HEs à incorporer dans les yaourts (25µL/L) en partant des résultats de la concentration minimale inhibitrice CMI ainsi que des tests sensoriels préliminaires.

YN : yaourt nature sans HEs

YST : yaourt supplémenté de 25µL/L de l'HE de *T. willdenowii*

YSC : yaourt supplémenté de 25µL/L de l'HE de *C. citratus*

YSV : yaourt supplémenté de 25µL/L de l'HE d'*A. citriodora*

3.1.1 Observation microscopique des bactéries lactiques des différents yaourts

La coloration de Gram effectuée à partir des colonies des bactéries du yaourt obtenues au J1 et J28 du stockage au froid (figure 33.a et 33.b) a révélé l'aspect et forme des bactéries lactiques *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* retrouvées dans tous les échantillons de yaourts YN, YST, YSC et YSV. Les bactéries *L. bulgaricus* apparaissent à l'observation microscopique au J1 comme de courts bacilles Gram (+) de petite taille regroupés le plus souvent en diplobacille, et ce dans tous les lots de yaourts observés. Les bactéries *S. thermophilus* apparaissent sous forme de coques Gram positif (+) groupés en paires ou en chainettes. Ce constat confirme que l'incorporation des HEs au yaourt n'affecte pas la forme des cellules bactérienne. Par ailleurs, l'observation microscopique des *L. bulgaricus* obtenue des colonies des BL au J28 des différents yaourts a présenté des bacilles Gram (+) plus long et ce dans les yaourts incorporés d'huiles essentielles (thym, verveine et citronnelle).

Peu d'études ont pris en compte les effets des huiles essentielles sur les microorganismes bénéfiques reconnus comme des outils technologiques dans la transformation et la conservation des aliments, ainsi que sur les microorganismes probiotiques bien connus pour leurs propriétés bénéfiques sur la santé des consommateurs (Leite De Souza, 2021), de ce fait, nos résultats contribuent à la compréhension de l'effet des huiles essentielles sur la croissance des bactéries lactiques du yaourt. Cependant des observations au MEB (microscopie électronique à balayage)

sont nécessaires afin de voir en profondeur l'effet des HEs sur la structure et forme des bactéries (Bajpai *et al.*, 2016).

Il est important de noter que la présence des BL dans les yaourts formulés au début et à la fin du stockage prouve que les HEs n'ont pas eu un effet inhibiteur à la dose incorporée 25µL/L, ce résultat est également observé dans l'étude de Jimborean *et al.*, (2016) utilisant l'HE de *Citrus sinensis* et qui n'a exercé aucun effet inhibiteur sur les bactéries du yaourt.

En somme, des observations au MEB (microscopie électronique à balayage) sont nécessaires afin de voir en profondeur l'effet des HEs sur la structure et forme des bactéries (Bajpai *et al.*, 2016).

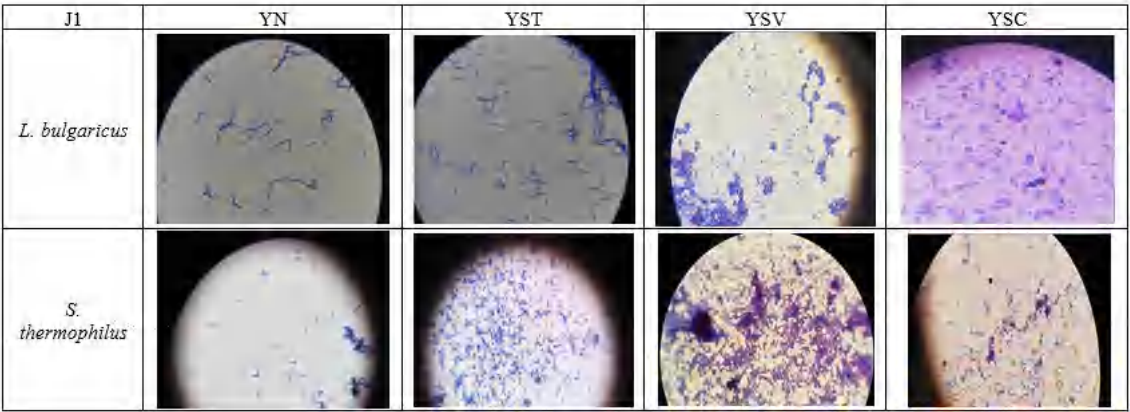


Figure 33.a. Aspect microscopique des bactéries lactiques *L. bulgaricus* et *S.thermophilus* dans les différents yaourts formulés à **J1** du stockage observées au microscope optique au grossissement x100

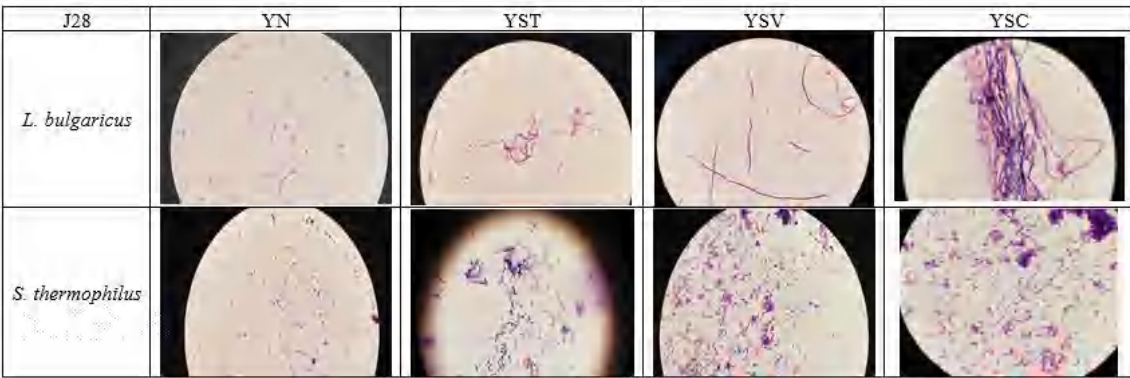


Figure 33.b. Aspect microscopique des bactéries lactiques *L. bulgaricus* et *S.thermophilus* dans les différents yaourts formulés à **J28** du stockage observées au microscope optique au grossissement x100

3.1.2. Analyse hygiénique des yaourts formulés

Les résultats de l'analyse hygiénique des différents yaourts formulés sont mentionnés dans le tableau 24.

Tableau 24. Analyse microbiologique des yaourts préparés

Germes recherchés	Jour	FTAM	Coliformes totaux	Coliformes fécaux	Salmonelle	Staphylocoque	Levures et moisissures	L. bulgaricus 10 ¹¹	S. thermophilus 10 ¹¹
YN	1	Nc	ab	ab	ab	ab	ab	1,91	<30
	7	Nc	ab	ab	ab	ab	ab	56	<30
	21	Nc	ab	ab	ab	ab	66	<30	<30
	28	ab	ab	ab	ab	ab	43	<30	<30
YST	1	ab	ab	ab	ab	ab	ab	>300	>300
	7	ab	ab	ab	ab	ab	ab	>300	>300
	21	ab	ab	ab	ab	ab	ab	>300	>300
	28	ab	ab	ab	ab	ab	Nc	>300	>300
YSC	1	ab	ab	ab	ab	ab	ab	>300	>300
	7	ab	ab	ab	ab	ab	ab	>300	>300
	21	ab	ab	ab	ab	ab	ab	>300	>300
	28	ab	ab	ab	ab	ab	Nc	>300	>300
YSV	1	ab	ab	ab	ab	ab	ab	>300	>300
	7	ab	ab	ab	ab	ab	ab	>300	>300
	21	ab	ab	ab	ab	ab	Nc	>300	>300
	28	ab	ab	ab	ab	ab	74	>300	>300

AB : absence, Nc : non compté (trop peu pour être comptés), FTAM : flore totale aérobie mésophile

Le dénombrement de la FTAM reflète la qualité microbiologique générale d'un produit naturel et permet d'en suivre son évolution. Le nombre des germes totaux pourra donner une indication de l'état de fraîcheur ou de décomposition (altération) du produit. Selon la norme nationale de 2004, N°43 parue au Journal Officiel. Le traitement thermique appliqué sur le lait avant fabrication du yaourt est suffisant pour détruire les micro-organismes non sporulés pathogènes ou non. Leur présence dans le yaourt ne peut être que de manière accidentelle. Nos résultats sont satisfaisants car nous n'avons enregistré aucune présence des germes pathogènes et même la flore totale aérobie mésophile était inférieure aux limites, de même pour les Staphylocoques. Otaibi *et al.* (2008) ont évalué la qualité microbiologique d'un yaourt additionné d'HEs de thym et de sauge et leurs constatations concordent parfaitement avec nos résultats.

Concernant les bactéries lactiques (*L.bulgaricus* et *S. thermophilus*), leur présence dans les yaourts YST, YSC et YSV est supérieure à 300×10^{10} et ce du début du stockage jusqu'à la fin. Par contre le yaourt formulé témoin YN a enregistré un taux de bactéries très faible durant toute la période de stockage, ceci nous amène à supposer que les HEs ont stimulé la croissance des deux bactéries du yaourt. Nous confirmons par ailleurs que la concentration choisie a bien été tolérée par ces bactéries lactiques et n'a pas affecté leur quantité dans le produit qui était supérieur à la norme de 10^8 qui est recommandé pour qualifier le produit comme yaourt probiotique (Moritz *et al.*, 2012).

3.1.3. Effet de l'incorporation des HEs sur les paramètres physicochimiques des yaourts

3.1.3.1. Acidité titrable des yaourts

Les valeurs moyennes de l'acidité sont mentionnées dans le tableau 25. Les différences enregistrées entre les jours de stockage sont schématisées dans la figure 34. D'après ces résultats, il existe une variation de l'acidité titrable durant les jours de stockage pour tous les types de yaourt. En effet au J1, le plus grand taux d'acidité titrable étant enregistré pour le YST ($93 \pm 0,05^\circ\text{D}$) significativement différent ($p < 0,05$) avec le yaourt contrôle YN.

Au J7, le taux le plus élevé étant celui du YN ($92 \pm 01^\circ\text{Dornic}$) enregistrant une différence significative ($p < 0,05$) avec les yaourts YSC et YSV. Au J21, le plus grand taux d'acidité est attribué au YST ($96 \pm 0,11^\circ\text{D}$) significativement différent ($p < 0,05$) avec le YN. Concernant le dernier jour de stockage, nous constatons que le YSV a enregistré le plus grand taux d'acidité ($94 \pm 0,77^\circ\text{D}$) significativement différent ($p < 0,001$) avec le yaourt YN.

Tableau 25. Acidité titrable des yaourts formulés durant le stockage

Durée de stockage (en jours)	Type de yaourt			
	YN	YST	YSC	YSV
1	$87 \pm 0,11$	$93 \pm 0,05$	$86 \pm 0,32$	$79 \pm 0,1$
7	$92 \pm 0,1$	$85 \pm 0,5$	$86 \pm 0,15$	$84 \pm 0,05$
21	$90 \pm 0,11$	$96 \pm 0,11$	$92 \pm 0,17$	$87 \pm 0,32$
28	$76 \pm 0,05$	$83 \pm 0,15$	$91 \pm 0,20$	$94 \pm 0,77$

YN : yaourt non incorporé d'HE (témoin)

YST : yaourt incorporé de l'HE de *T. willdenowii*

YSC : yaourt incorporé de l'HE de *C. citratus*

YSV : yaourt incorporé de l'HE d'*A. citriodora*

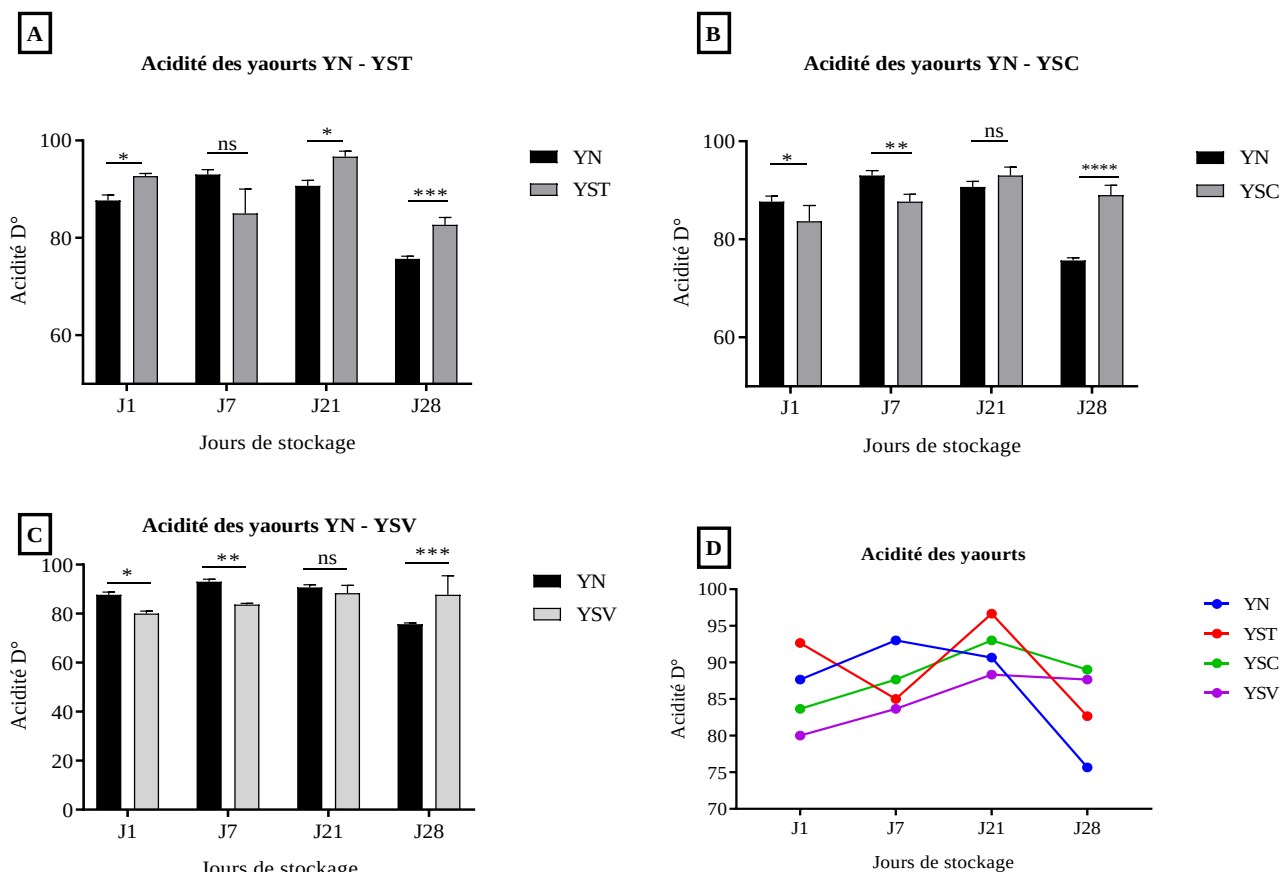


Figure 34. Variation de l'acidité titrable des yaourts formulés durant le stockage

A) comparaison YN-YST, B) comparaison YN-YSC

C) comparaison YN-YSV, D) Evolution de l'acidité pour chaque yaourt

YST : yaourt incorporé avec l'HE de *T. willdenowii*, YSC : yaourt incorporé avec l'HE de *C. citratus*,

YSV : yaourt incorporé avec l'HE de *A. citriodora*, YN : yaourt non incorporé d'HE.

3.1.3.2. pH des yaourts

Les valeurs moyennes du pH sont mentionnées dans le tableau 26. Les différences enregistrées entre les jours de stockage sont illustrées dans la figure 35.

Tableau 26. pH des yaourts formulés durant le stockage

Jour de stockage	Type de yaourt			
	YN	YST	YSC	YSV
1	4,713±0,015	4,685±0,005	4,85±0,01	4,806±0,005
7	4,614±0,004	4,615±0,02	4,739±0,002	4,683±0,003
21	4,498±0,008	4,469±0,008	4,552±0,018	4,54±0,005
28	4,499±0,008	4,448±0,004	4,536±0,009	4,452±0,0005

YN : Yaourt non incorporé ; YST : yaourt incorporé de l'HE de *T. willdenowii*

YSC : yaourt incorporé de l'HE de *C. citratus* YSV : yaourt incorporé de l'HE d'*A. citriodora*

Les résultats obtenus expriment une variation du pH dans chaque lot de yaourt, dépendant des jours de stockage. Une diminution hautement significative ($p < 0,0001$) du pH a été constatée entre le premier jour et le dernier jour de stockage (J1-J28) pour le YN. Cette diminution ($p < 0,0001$) est observée aussi du J7 au J28. Les valeurs de pH pour le YN varient entre $4,713 \pm 0,01$ et $4,499 \pm 0,008$ du J1 au J28.

Concernant le YST, le pH a tendance à diminuer de manière hautement significative ($p < 0,0001$) et ce du J1 au J21, par la suite une stabilité du pH est observée entre le J21 et le J28. Ce même résultat est observé pour le YSC où la diminution du pH était hautement significative ($p < 0,0001$) du J1 au J21 avec une stabilité du pH entre le J21 et J28. Il n'en n'est pas de même pour le YSV où le pH a tendance à baisser de manière très hautement significative ($p < 0,0001$) et ce du J1 au J28 (figure 35). Les comparaisons des valeurs des pH des yaourts incorporés avec celles du yaourt non incorporé sont représentées dans la figure 36 :

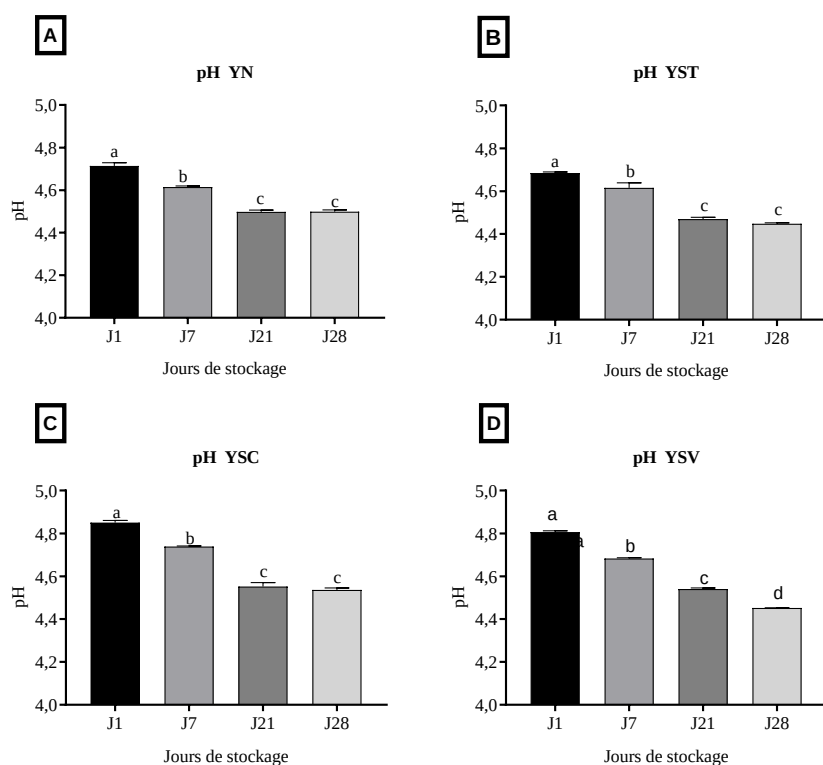


Figure 35. Evolution des pH des yaourts formulés durant le stockage

- A) Evolution du pH dans le yaourt témoin YN
- B) Evolution du pH dans le yaourt incorporé de l'HE de *T. wilddenowii* YST
- C) Evolution du pH dans le yaourt incorporé de l'HE de *C. citratus* YSC
- D) Evolution du pH dans le yaourt incorporé de l'HE d'*A. citriodora* YSV

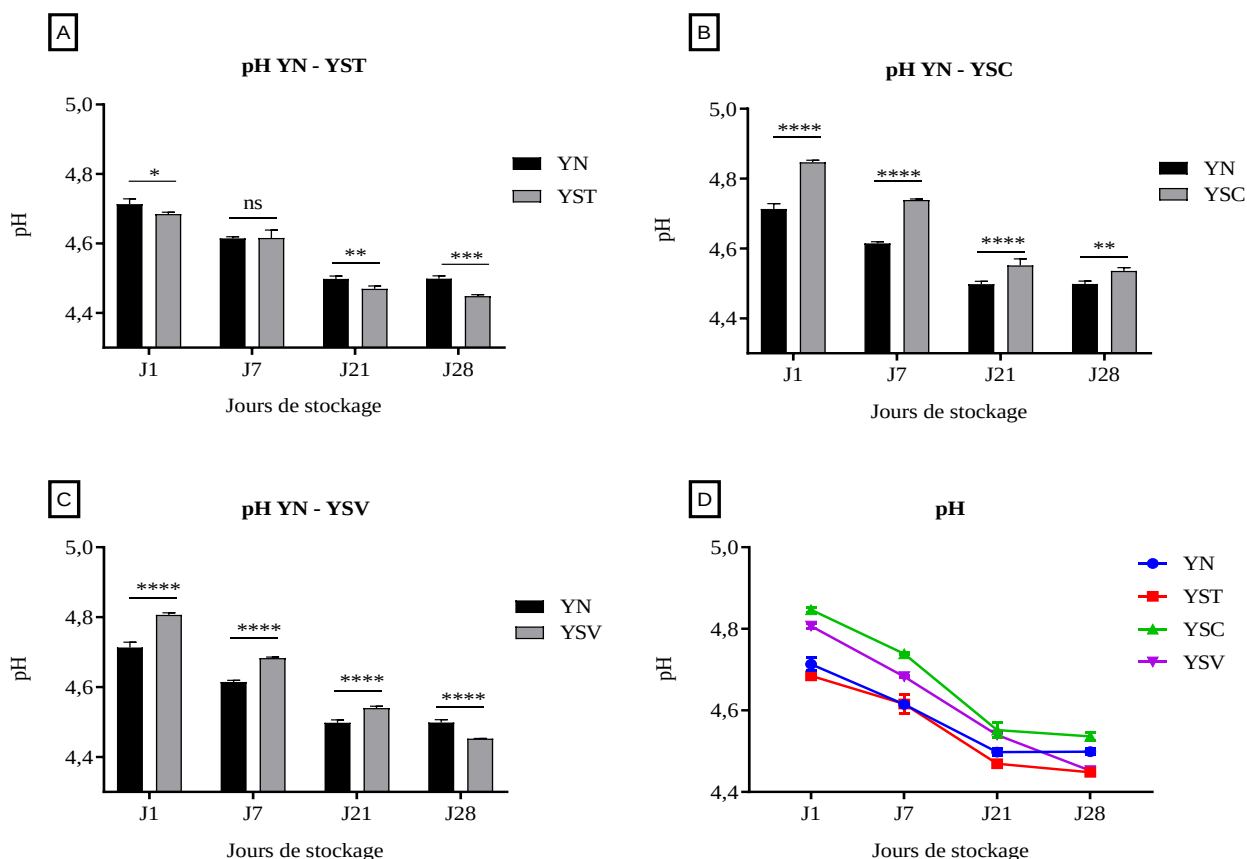


Figure 36. Comparaison des pH des yaourts formulés durant le stockage

A) comparaison YN-YST ; B) comparaison YN-YSC
 C) comparaison YN-YSV ; D) Evolution du pH pour chaque yaourt
 YST : yaourt incorporé avec l'HE de *T. willdenowii*, YSC : yaourt incorporé avec l'HE de *C. citratus*
 YSV : yaourt incorporé avec l'HE de *A. citriodora*, YN : yaourt non incorporé d'HE.

En prenant en compte les corrélations entre les valeurs de pH et d'acidité des différents yaourts formulés du même type, nous constatons des corrélations négatives ce qui signifie que les pH évoluent de manière opposée aux taux d'acidité ce qui est observé aussi par Dave et Shah (1998).

Les propriétés fermentaires des différents yaourts ont été déterminées par la mesure du pH et de l'acidité titrable. En effet, l'acidité des yaourts est la résultante de la fermentation des sucres du lait par les bactéries du yaourt (*L. bulgaricus* et *S. thermophilus*), c'est un critère crucial de qualité pour la saveur, la texture, le goût acidulé ainsi que la durée de conservation des yaourts (Tamime et Robinson, 2007). Les résultats Singh *et al.* (2011) sont en concordance avec les nôtres, ils ont rapporté l'effet de l'huile volatile et de l'oléorésine d'anis sur la durée de conservation du yaourt et ont remarqué une diminution de pH durant les jours de stockage.

Le premier jour de stockage à froid, le pH et l'acidité sont affectés. Ce résultat diffère de celui observé par Joung *et al.* (2016), en étudiant les effets de l'addition de plantes traditionnelles de la Corée sur la fermentation du yaourt. La baisse du pH est relative à la production des acides organiques par les bactéries du yaourt et dépend étroitement de la composition de ces bactéries starters, du temps de stockage, de la température de la fermentation et des contaminations. D'après les résultats obtenus, il semble que l'incorporation des HEs augmenterait de manière significative le pH des yaourts par rapport au témoin, ceci est enregistré dans les yaourts YSC et YSV plus que dans le yaourt YST.

Les différences entre les taux d'acidité titrable entre les lots de yaourts incorporés d'HEs et le contrôle peuvent être expliquées par l'effet fermentaire des HEs de plantes aromatiques qui augmente l'activité métabolique des bactéries du yaourt et l'acidité, due à la production d'acides organiques par les bactéries lactiques. D'après Fessard (2017), l'augmentation du temps de stockage conduit à la poursuite du processus de fermentation du lactose par les bactéries starter en augmentant l'acidité, suite à l'accumulation d'acides tels que l'acide lactique et l'acide formique.

3.2. Effet de l'incorporation des HEs sur l'activité antioxydante des yaourts

3.2.1. Test ABTS

Le test ABTS est utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des différents yaourts, les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 27 et schématisés dans la figure 37.

Tableau 27. Activité antioxydante des yaourts formulés évaluée par le test ABTS

Jour de stockage	YN	YST	YSC	YSV
	ABTS ($\mu\text{M TroloxEq/mL yaourt}$)			
1	2,93 $\pm$ 0,85	2,04 $\pm$ 0,11	2,07 $\pm$ 0,37	2,22 $\pm$ 0,13
7	2,43 $\pm$ 0,01	2,34 $\pm$ 0,32	3,86 $\pm$ 0,35	2,12 $\pm$ 0,34
21	2,54 $\pm$ 0,01	1,47 $\pm$ 0,24	2,10 $\pm$ 0,22	2,02 $\pm$ 0,08
28	2,66 $\pm$ 0,01	1,95 $\pm$ 0,09	1,66 $\pm$ 0,04	1,98 $\pm$ 0,09

YN : yaourt non incorporé d'HE ; YST : yaourt incorporé avec l'HE de *T. willdenowii*

YSC : yaourt incorporé avec l'HE de *C. citratus* ; YSV : yaourt incorporé avec l'HE de *A. citriodora*

Une activité antioxydante est enregistrée pour tous les types de yaourts. Il à noter que l'activité antioxydante dans le yaourt YN est maximale au J1 (2,93 $\pm$ 0,85 $\mu\text{M Trolox Eq/mL}$

yaourt), cette valeur tend à baisser durant J7, J21, J28 mais de manière non significative du J7 au J28.

Le yaourt YST a enregistré une augmentation significative de l'activité antioxydante de J1 au J7 par la suite, une diminution est observée entre J7 et J21, puis une augmentation est observée jusqu'au J28 où la valeur du test atteint $1,95 \pm 0,09$ μM Trolox Eq/mL yaourt.

De même pour le yaourt YSC, la plus grande valeur est enregistrée au J7 ($3,86 \pm 0,35$ μM Trolox Eq/mL yaourt) et connaît une diminution par la suite jusqu'au J28.

Pour le yaourt YSV, les valeurs du test sont stables du J1 au J28 sans connaître de fluctuations ni de différence significative.

Il est à signaler que le yaourt incorporé de l'HE de *T. wilddenowii* YST a une activité antioxydante plus faible que celle du yaourt non incorporé YN ($p < 0,001$) pour les jours de stockage J21 ($2,54 \pm 0,01$; $1,48 \pm 0,24$ μM Trolox Eq/mL yaourt respectivement) et J28 ($2,66 \pm 0,01$; $1,94 \pm 1,66$ μM Trolox Eq/mL yaourt respectivement) (figure 5).

Le yaourt incorporé d'HE de citronnelle a montré une augmentation au J7 dépassant très significativement ($p < 0,001$) l'activité antioxydante du yaourt contrôle. Néanmoins, l'activité tend à baisser significativement ($p < 0,001$) au J21 et J28.

L'incorporation de l'HE d'*A. citriodora* a montré une activité antioxydante plutôt stable tout long des jours de stockage sans aucune différence significative ($p < 0,05$).

Par ailleurs, il est à noter que la comparaison des valeurs des activités antioxydantes des différents yaourts formulés pour chaque jour de stockage révèle pour la majorité l'existence d'une différence significative au moins pour une période de stockage (figure 38). Le résultat le plus remarquable est celui du yaourt YSC au J7 qui dépasse largement les autres yaourts.

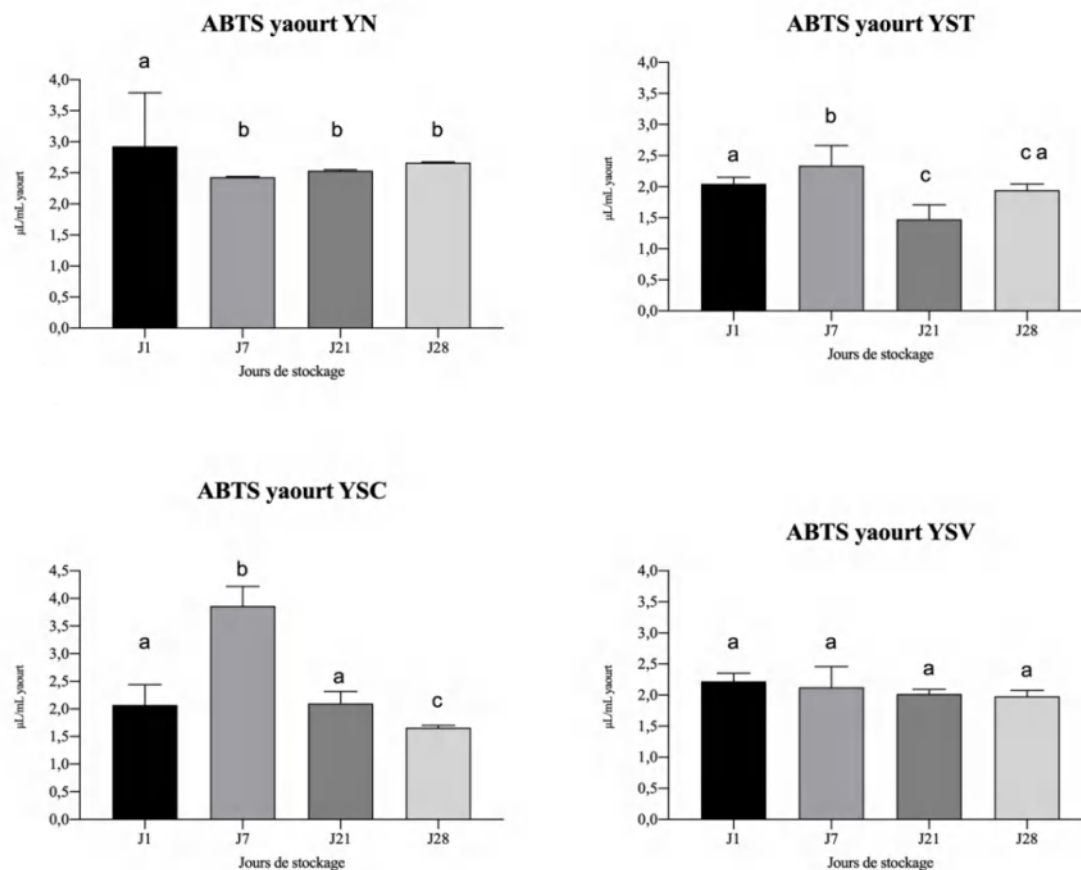


Figure 37. Activité antioxydante des yaourts formulés évaluée par le test ABTS

YST : yaourt incorporé avec l'HE de *T. wilddenowii*, YSC : yaourt incorporé avec l'HE de *C. citratus*

YSV : yaourt incorporé avec l'HE de *A. citriodora*, YN : yaourt non incorporé d'HE.

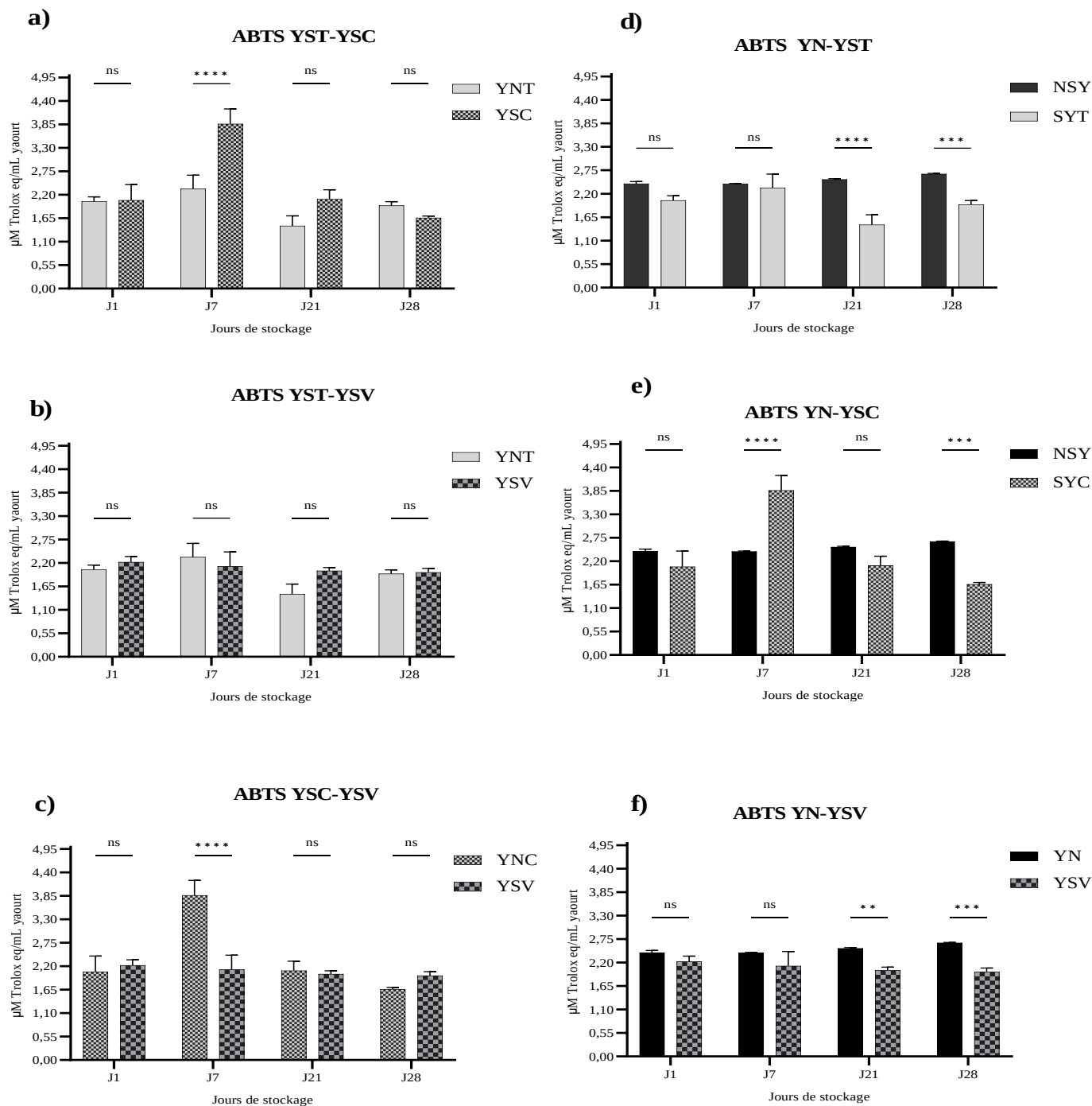


Figure 38. Comparaison de l'activité antioxydante des Yaourts YST, YSC et YSV au contrôle YN (évaluée par le test ABTS)

- a) Yaourt à l'HE de *C. citratus*/ Yaourt à l'HE d'*A. citriodora*
- b) Yaourt à l'HE de *T. willdenowii* / contrôle
- c) Yaourt à l'HE de *C. citratus*/ contrôle
- d) Yaourt à l'HE d'*A. citriodora* / contrôle

3.4.2. Test CUPRAC

L'activité antioxydante des différents types de yaourts évaluée par le test CUPRAC a permis de récolter les résultats cités dans le tableau 28.

Tableau 28. Activité antioxydante des yaourts formulés (évaluée par le test CUPRAC)

Type yaourt	YN	YST	YSC	YSV
Jours de stockage	CUPRAC (μM Trolox Eq/mL yaourt)			
J1	37,93 $\pm$ 1,42	40,33 $\pm$ 1,92	44,12 $\pm$ 0,19	46,78 $\pm$ 3,29
J7	36,23 $\pm$ 3,36	54,14 $\pm$ 4,83	34,75 $\pm$ 0,82	65,83 $\pm$ 1,13
J21	35,98 $\pm$ 3,11	37,93 $\pm$ 0,33	35,72 $\pm$ 1,34	40,51 $\pm$ 0,35
J28	33,30 $\pm$ 1,09	46,63 $\pm$ 3,97	36,96 $\pm$ 4,68	32,07 $\pm$ 3,19

CUPRAC: Cupric ion reducing antioxidant capacity,

YST : yaourt incorporé avec l'HE de *T. willdenowii*,

YSC : yaourt incorporé avec l'HE de *C. citratus*

YSV : yaourt incorporé avec l'HE de *A. citriodora*,

YN : yaourt non incorporé d'HE.

D'après les résultats obtenus (figure 39), il y a une activité anti oxydante dans tous les produits et pour tous les jours de stockage a des différences près ; exemple pour le yaourt incorporé d'HE de *T. willdenowii* YST, une augmentation significative est observée entre le J1 et J7 atteignant un maximum d'activité de 54,14 $\pm$ 4,83 μM Trolox Eq/mL yaourt, cette valeur tend par la suite à diminuer significativement jusqu'au J21 (37,93 $\pm$ 0,33 μM Trolox Eq /mL yaourt) pour se stabiliser jusqu'au J28.

Le Yaourt contrôle YN n'a enregistré aucune différence significative entre les jours de stockage avec des valeurs allant de 33,30 $\pm$ 1,09 à 37,93 $\pm$ 1,42 μM Trolox Eq/mL yaourt. Concernant le yaourt incorporé de l'huile essentielle de *C. citratus* (YSC), la plus grande activité antioxydante a été enregistrée le J1 de stockage (44,12 $\pm$ 0,19 μM Trolox Eq/mL yaourt), par la suite cette activité antioxydante tend à diminuer de manière significative jusqu'au J21 où une stabilité est observée jusqu'au J28.

Par ailleurs, le yaourt incorporé de l'HE d'*A. citriodora* YSV a enregistré un maximum d'activité au J7 (65,83 $\pm$ 1,13 μM TroloxEq/mL yaourt) avec une augmentation significative du J1 au J7, l'activité antioxydante tend à diminuer de manière très significative à partir du J7 jusqu'au J28.

En prenant en compte la comparaison de chaque type de yaourt avec le contrôle (figure 40), nous pouvons constater que les yaourts incorporés d'HEs ont pour la plupart une activité

antioxydante supérieure à celle du contrôle ($p < 0,0001$) surtout en J7 pour le YST et le J1 et J7 pour le YSV, en revanche, le YSC possède une activité supérieure à celle du contrôle en J1 ($p < 0,05$).

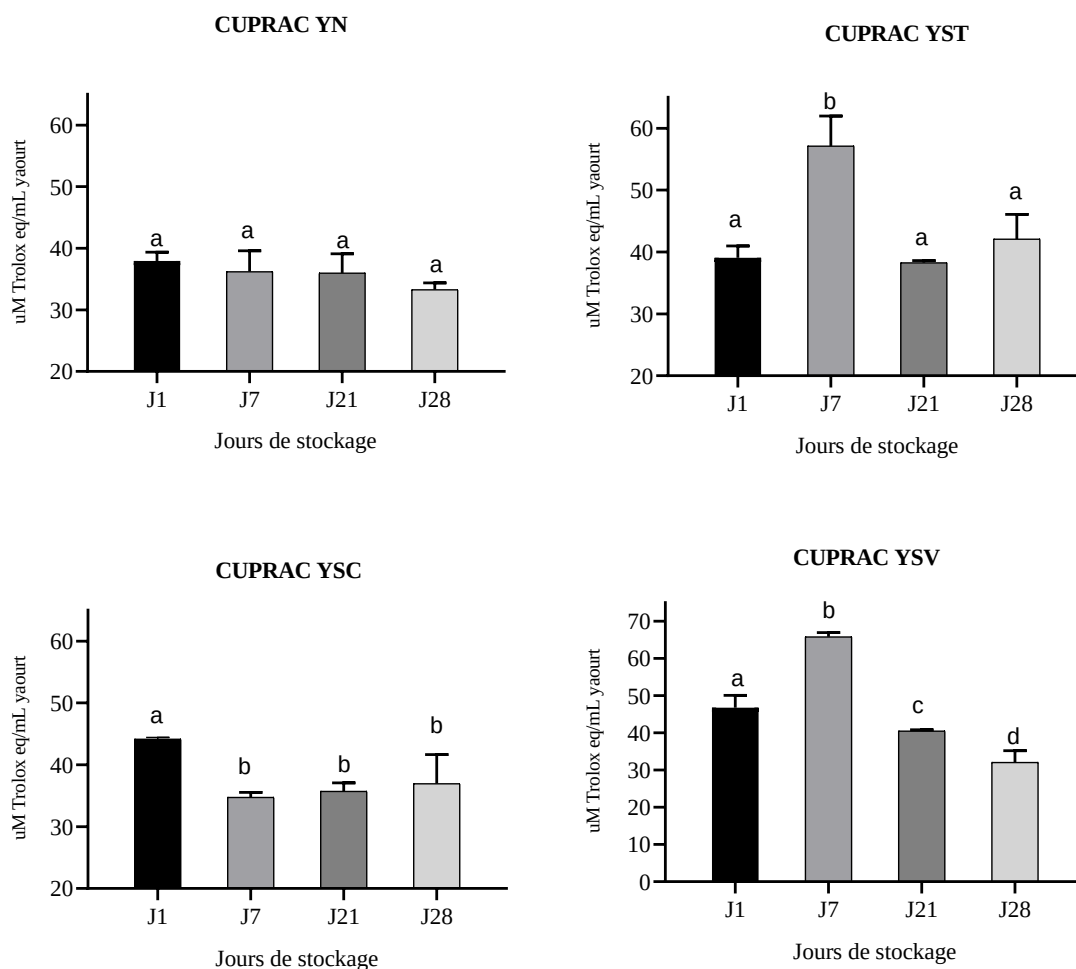


Figure 39. Effet de l'incorporation des HEs sur l'activité antioxydante des yaourts formulés (évaluée par le test CUPRAC)

YST : yaourt incorporé avec l'HE de *T. willdenowii*,

YSC : yaourt incorporé avec l'HE de *C. citratus*

YSV : yaourt incorporé avec l'HE de *A. citriodora*,

YN : yaourt non incorporé d'HE.

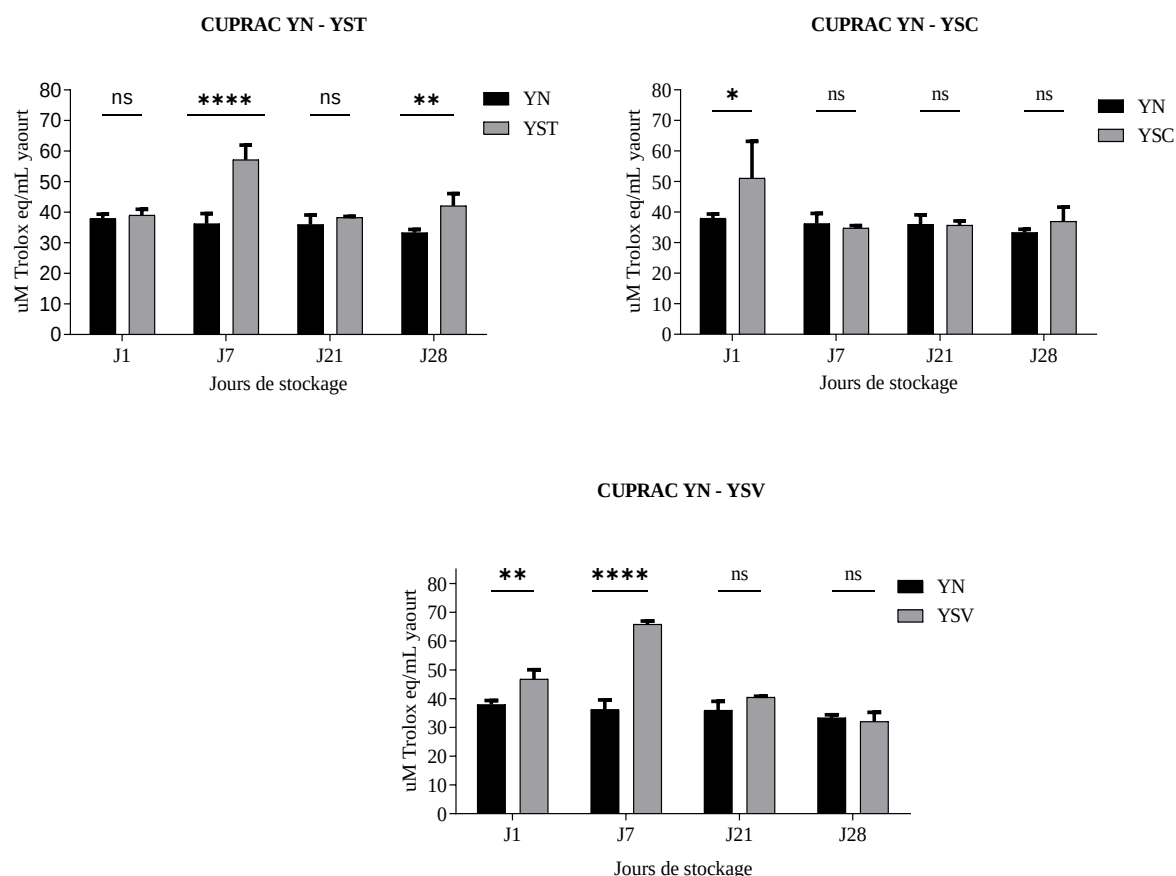


Figure 40. Comparaison de l'activité antioxydante des yaourts formulés YST, YSC et YSV au contrôle YN (  valu  e par le test CUPRAC)

YST : yaourt incorporé avec l'HE de *T.willdenowii*,

YSC : yaourt incorporé avec l'HE de *C. citratus*

YSV : yaourt incorporé avec l'HE de *A. citriodora*,

YN : yaourt non incorporé d'HE.

3.4.3. Test ORAC

L'analyse de l'activité antioxydante des différents yaourts formulés par le test ORAC est mentionnée dans le tableau 29. La méthode ORAC est basée sur la décroissance de la fluorescéine en présence d'un oxydant chimique : l'AAPH (radical peroxy  le très stable).

Tableau 29. Activité antioxydante des yaourts formulés évaluée par le test ORAC

Jours de stockage	YN	YST	YSC	YSV
	ORAC (μM Trolox équivalent /mL Yaourt)			
J1	221,10 $\pm$ 6,50	195,48 $\pm$ 18,51	191,45 $\pm$ 27,42	203,49 $\pm$ 18,59
J7	160,52 $\pm$ 10,49	162,34 $\pm$ 22,63	197,22 $\pm$ 8,04	175,39 $\pm$ 29,53
J21	157,66 $\pm$ 15,41	188,79 $\pm$ 12,99	184,61 $\pm$ 19,39	189,32 $\pm$ 25,12
J28	193,67 $\pm$ 1,48	197,11 $\pm$ 5,78	202,19 $\pm$ 11,60	185,91 $\pm$ 18,76

ORAC : oxygen radical absorbance capacity

YST : yaourt incorporé avec l'HE de *T. wilddenowii*

YSC : yaourt incorporé avec l'HE de *C. citratus*

YSV : yaourt incorporé avec l'HE d'*A. citriodora*,

YN : yaourt non incorporé.

L'activité antioxydante évaluée par le test ORAC révèle une diminution hautement significative ($p < 0,0001$) des valeurs ORAC pour le yaourt contrôle YN entre le J1 et J28. Cette activité antioxydante restera stable avec aucune différence significative ($p < 0,05$) entre le J7 et le J21. Par la suite, une augmentation significative ($p < 0,05$) est enregistrée entre le J21 et le J28. La plus grande et la plus faible valeur d'ORAC pour le yaourt contrôle YN est de 221,10 $\pm$ 6,49 et 157,66 $\pm$ 15,41 $\mu\text{MTrolox}$ Eq/mL yaourt respectivement (figure 41).

Concernant le yaourt YST, aucune différence significative ($p < 0,05$) n'est été soulevée entre les jours de stockage. Les valeurs d'ORAC enregistrées varient de 162,34 $\pm$ 22,63 jusqu'à 197,10 $\pm$ 5,78 $\mu\text{MTrolox}$ Eq/mL yaourt. Il semble que l'activité antioxydante du yaourt est maintenue stable tout au long de la durée du stockage. De même pour le yaourt YSC où les valeurs ORAC varient entre 188,79 $\pm$ 12,99 et 197,21 $\pm$ 8,03 $\mu\text{MTrolox}$ Eq/mL yaourt sans différence significative ($p < 0,05$) entre les jours de stockage.

L'absence de différence significative ($p < 0,05$) est observée également par le yaourt incorporé de l'HE d'*A. citriodora* YSV. Le maximum d'activité étant de 197,10 $\pm$ 5,78 $\mu\text{MTrolox}$ Eq/mL yaourt, néanmoins cette activité est maintenue stable tout au long de la durée du stockage à froid.

La figure 42 illustre les comparaisons entre les différents yaourts incorporés d'HEs et entre ces derniers et le yaourt contrôle durant la période de stockage. Il est à remarquer que l'activité antioxydante du le yaourt YST est significativement plus élevée ($p < 0,05$) que celle du

yaourt YN dans le jour 21 ($191,45 \pm 27,41$; $157,66 \pm 15,4103$ $\mu\text{MTrolox Eq/mL}$ yaourt, respectivement) ainsi qu'entre les yaourts YSC et YN au jour 7 au profit du yaourt YSC.

Pour le yaourt YSV, les jours de stockage n'ont enregistré aucune différence significative ($p < 0,05$) avec le contrôle.

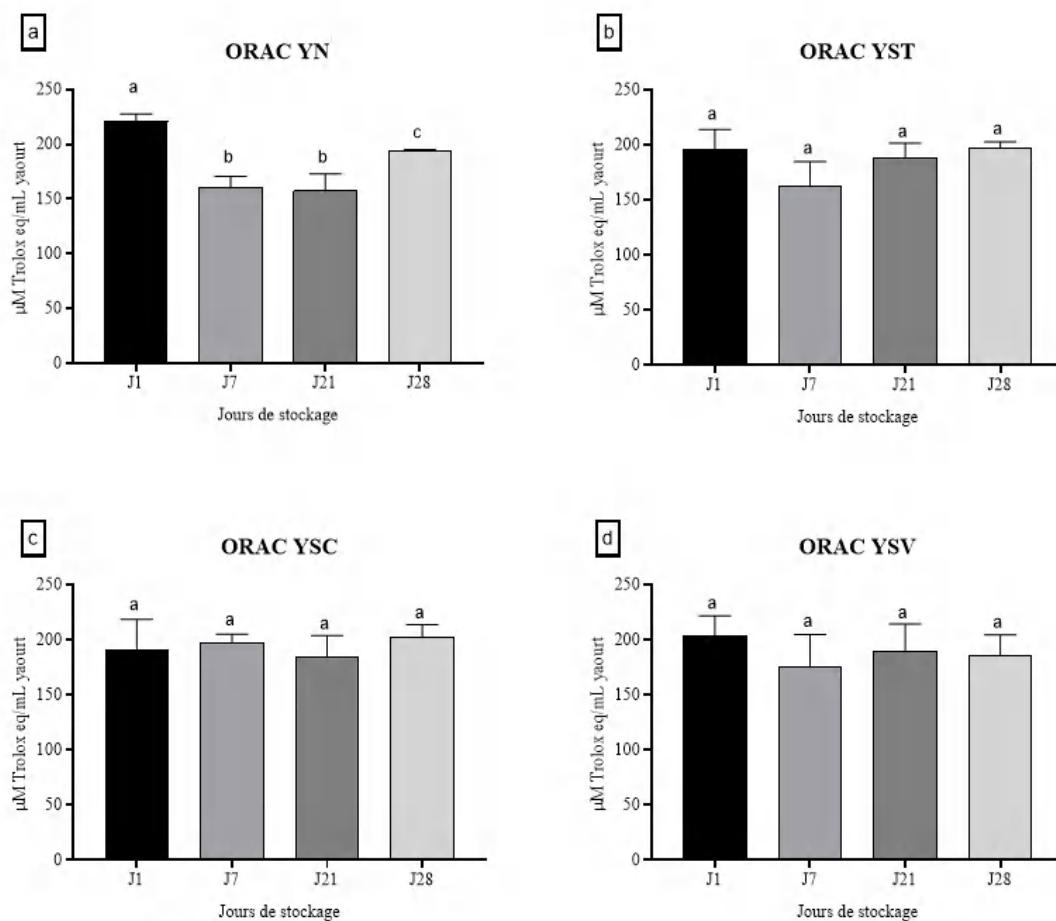


Figure 41. Effet de l'incorporation des HEs sur les valeurs de l'activité antioxydante des yaourts (évalués par le test ORAC)

YST : yaourt incorporé avec l'HE de *T. willdenowii*, YSC : yaourt incorporé avec l'HE de *C. citratus*
YSV : yaourt incorporé avec l'HE d'*A. citriodora*, YN : yaourt non incorporé.

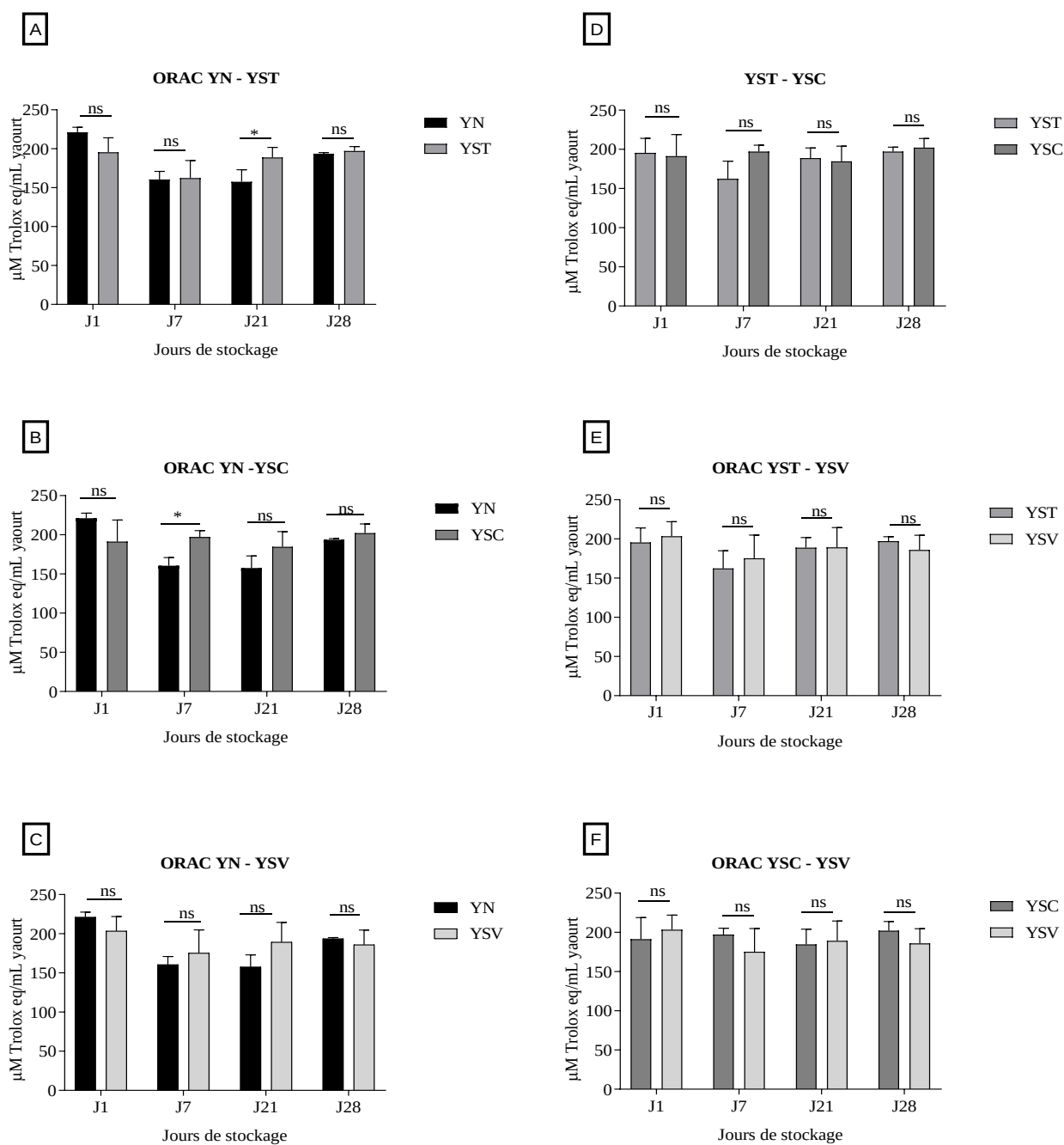


Figure 42. Comparaison de l'activité antioxydante des yaourts formulés (évaluée par le test ORAC)

- A) Yaourt à l'HE de *T. wilddenowii* / contrôle
- B) Yaourt à l'HE de *C. citratus*/contrôle
- C) Yaourt à l'HE d'*A. citriodora* /contrôle
- D) Yaourt à l'HE de *T. wilddenowii* / yaourt à l'HE de *C. citratus*
- E) Yaourt à l'HE de *T. wilddenowii* /yaourt à l'HE d'*A. citriodora*
- F) Yaourt à l'HE de *C. citratus* /yaourt à l'HE à d'*A. citriodora*

L'activité antioxydante des différents yaourts a révélé des résultats différents d'un test à l'autre (ABTS, CUPRAC et ORAC). Il est à noter que tous les produits laitiers contiennent des composés antioxydants avec des proportions variées, dépendant des matrices et des procédés technologiques appliqués. Ces composés incluent la fraction protéique (plus spécifiquement la caséine), des enzymes antioxydantes (la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase), la lactoferrine, les vitamines C, E, A et D3, l'acide linoléique conjugué ; le coenzyme Q, l'équol, l'acide urique, certains caroténoïdes, de l'acide linoléique conjugué (CLA), des vitamines A, C, D3 et E et des peptides bioactifs. Les protéines lactières contiennent également des antioxydants tels que le glutathion, qui est un tripeptide composé de trois acides aminés (cystéine, glycine et acide glutamique) et qui est un puissant antioxydant intracellulaire (Fardet et Rock, 2018). Le glutathion protège les cellules contre les dommages oxydatifs en neutralisant les radicaux libres et en régénérant d'autres antioxydants tels que la vitamine C et la vitamine E.

L'idée de compléter les yaourts d'extraits végétaux et d'HEs a fait l'objet de plusieurs études (Singh *et al.*, 2011 ; Anand *et al.*, 2018 ; Yangilar et Yildiz, 2018 ; Mehdizadeh *et al.*, 2019 ; Nazari *et al.*, 2019 ; Mahmmodi *et al.*, 2021). Ces dernières visent à améliorer la qualité non seulement organoleptique mais aussi fonctionnelle des yaourts. Certains auteurs défendent le concept de yaourt possédant un pouvoir antioxydant après son incorporation d'HEs et d'extraits de plantes médicinales (Amirdivani et Baba, 2011 ; Azizkhani et Parsaeimehr, 2018a, 2018b ; Tizghadam *et al.*, 2021 ; Shori, 2022).

Le test ABTS a révélé un potentiel antioxydant du yaourt incorporé de l'HE de *C. citratus* supérieur à celui du contrôle et d'*A. citriodora* au 7^{ème} jour de stockage, cela peut être expliqué par la teneur élevée de ce yaourt en polyphénols. En effet, la dégradation des protéines du lait par les bactéries lactiques du yaourt favorise la libération de composés phénoliques (Fessard, 2017).

Il est possible aussi que les composés antioxydants des HEs puissent se mélanger avec les protéines et les lipides du yaourt, augmentant ainsi la teneur en antioxydants du produit final. De plus, les HEs peuvent également améliorer la stabilité des antioxydants naturels présents dans le yaourt, en les protégeant contre la dégradation due à la chaleur, la lumière et l'oxygène (Kanatt et Sharma 2007). Une autre hypothèse suggérée par Lee *et al.* (2021)

expliquant qu'il y a une dégradation ultérieure des peptides obtenus lors de la protéolyse au cours de la fermentation, ces peptides sont à leur tour dégradés en peptides bioactifs et dotés d'activité antioxydante, c'est pour cette raison que nous observons l'augmentation de l'activité antioxydante après une période de diminution. C'est le cas des yaourts formulés YST et YN analysés par CUPRAC (figure 38).

3.5. Effet des HEs sur l'activité antioxydante des bactéries lactiques du yaourt

Les bactéries lactiques du yaourt (*L. bulgaricus* et *S. thermophilus*) ainsi que la bactérie contrôle (*L. rhamnosus*) fermentées en présence des HEs étudiées, ont été soumises au test antioxydant ORAC à travers leurs extraits extracellulaires. L'activité antioxydante des cultures de bactéries a été quantifiée par la protection de la fluorescéine (sonde fluorescente) contre l'attaque de l'AAPH (générateur de radicaux libres) dans le milieu réactionnel. Cette méthode nous informe sur l'activité antioxydante totale, les résultats du test ORAC obtenus sont mentionnés dans le tableau 30 pour les valeurs ORAC des bactéries lactiques fermentées sans HEs et dans le tableau 31 pour les bactéries lactiques fermentées avec les HEs.

Tableau 30. Activité antioxydante des bactéries lactiques fermentées sans HEs (évaluée par le test ORAC)

Bactéries lactiques	Nombre de cellules viables	ORAC : μM Trolox eq/ 10^9 cellules
<i>L. bulgaricus</i>	$2,9 \times 10^9$	0,88
<i>S. thermophilus</i>	$0,68 \times 10^9$	4,13
<i>L. rhamnosus</i> (contrôle)	$0,15 \times 10^9$	17,36

Tableau 31. Activité antioxydante des bactéries lactiques fermentées en présence des HEs (évaluée par le test ORAC)

	Bactéries	μM Trolox eq/ 10^9 Cellules
Bactéries lactiques fermentées en présence de l'HE de <i>T. willdenowii</i>	<i>L. bulgaricus</i>	6,74 $\pm$ 0,13
	<i>S. thermophilus</i>	31,80 $\pm$ 0,86
	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103 (contrôle)	137,58 $\pm$ 4,27
Bactéries lactiques fermentées en présence l'HE de <i>C. citratus</i>	<i>L. bulgaricus</i>	6,69 $\pm$ 0,47
	<i>S. thermophilus</i>	29,02 $\pm$ 0,32
	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103(contrôle)	141,43 $\pm$ 3,29
Bactéries lactiques fermentées en présence l'HE d' <i>A. citriodora</i>	<i>L. bulgaricus</i>	3,82 $\pm$ 0,46
	<i>S. thermophilus</i>	15,55 $\pm$ 1,72
	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103(contrôle)	96,77 $\pm$ 8,82

D'après la figure 43, toutes les bactéries étudiées ont révélé une activité antioxydante exprimée en μM Trolox eq/ 10^9 cellules. La bactérie *L. bulgaricus* a montré la plus faible activité, tandis que la bactérie contrôle *L. rhamnosus* ATCC 53103 a enregistré la plus forte activité ($6,74 \pm 0,13$; $137,58 \pm 4,27 \mu\text{M}$ Trolox eq/ 10^9 respectivement). Ce résultat est comparable à celui de Xing *et al.* (2015) où la bactérie contrôle *L. rhamnosus* ATCC 53103 a présenté une très forte activité antioxydante au test DPPH.

Dans un autre contexte, l'étude réalisée par Kim *et al.* (2022) confirme aussi que les bactéries lactiques lorsqu'elles sont attachées à la lumière intestinale, ainsi que leurs métabolites augmentent pour éliminer les radicaux libres, maintenant ainsi l'équilibre oxydo-réducteur intestinal.

ORAC Bactéries lactiques sans huiles essentielles

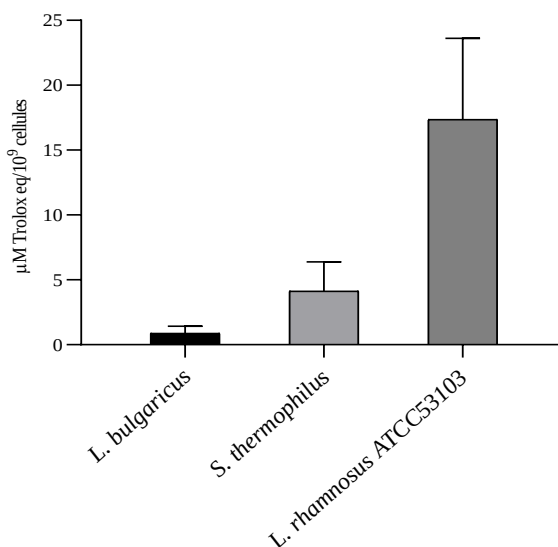


Figure 43. Activité antioxydante des bactéries lactiques fermentées en absence des HEs (évaluée par le test ORAC)

Dans le cas des bactéries fermentées en présence des HEs (figure 44), la bactérie contrôle a présenté la plus grande valeur de l'ORAC dans les différentes HEs. Néanmoins, nous remarquons une différence très significative ($p < 0,001$) observée entre les bactéries fermentées en présence des HEs et celles fermentées en leur absence pour chaque souche. Ce résultat très encourageant nous amène à conclure qu'il y a probablement un effet important des HEs sur l'activité antioxydante des bactéries lactiques.

La majorité des bactéries lactiques peuvent neutraliser les radicaux libres par la production de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD), ou par l'utilisation de l'oxygène moléculaire ou le peroxyde d'hydrogène pour générer le NAD⁺, par l'action de la NADH oxydase et la NADH peroxydase. Pour d'autres bactéries, la détoxification des radicaux libres et de l'H₂O₂ peut être effectuée aussi par la glutathione (Stecchini *et al.*, 2001).

Certains auteurs attribuent l'augmentation de l'activité antioxydante des bactéries lactiques pendant la fermentation à la dépolymérisation des composés phénoliques en hydrolysant ces composés présents dans les végétaux sous forme conjuguées et libérant d'autres formes pouvant améliorer leur fonctionnalités (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Torino *et al.*, 2013). Pour obtenir les propriétés souhaitables dans les aliments fermentés d'origine végétale, les bactéries lactiques doivent être adaptées aux caractéristiques des matières premières végétales où les composés phénoliques sont abondants. Cependant, des résultats obtenus chez *Lactobacillus plantarum* ont montré qu'elle était capable de dégrader certains composés phénoliques alimentaires donnant des composés influençant l'arôme des aliments ainsi que les composés présentant une activité antioxydante accrue (Rodríguez *et al.*, 2009). Les acides organiques produits par les bactéries lactiques tels que l'acide lactique et l'acide acétique peuvent également agir comme des antioxydants en neutralisant les radicaux libres.

L'effet des HEs à travers leurs composants doit faire objet d'une investigation plus approfondie afin de comprendre les mécanismes qui interviennent dans l'augmentation de l'activité antioxydante des bactéries lactiques sous l'effet des HEs.

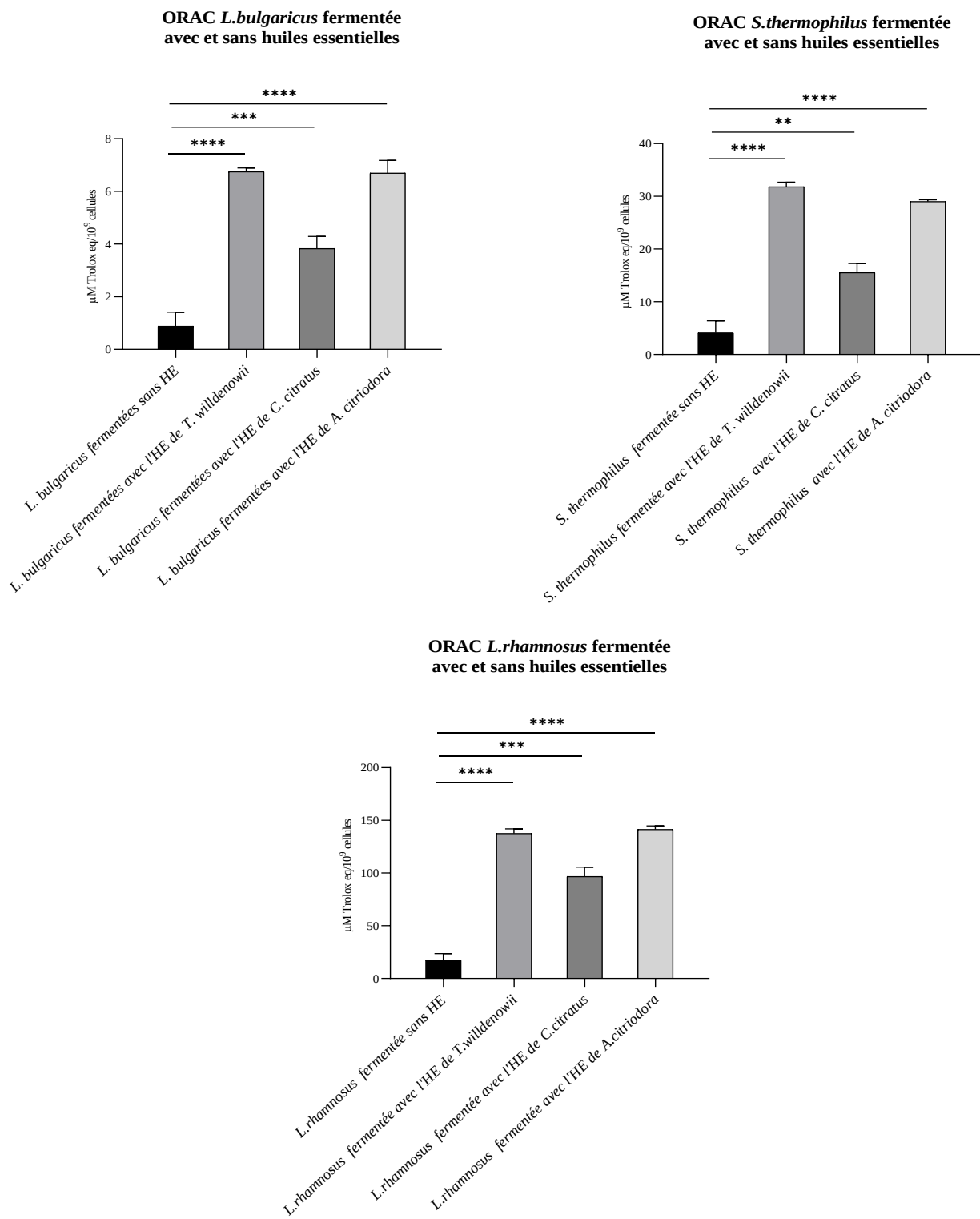


Figure 44. Activité antioxydante des bactéries lactiques fermentées en présence et en absence des HEs (évaluée par le test ORAC)

3.6. Effet de l'incorporation des HEs sur la production d'acides organiques et d'arôme par les bactéries lactiques dans les yaourts étudiés formulés

La présence des acides organiques et arômes produits dans le yaourt par les bactéries lactiques est évaluée par HPLC, utilisant comme standards les acides organiques : lactique, formique, acétique et citrique pour les acides organiques et l'acétaldéhyde pour les arômes. Les résultats de cette analyse sont mentionnés dans le tableau 32. Les spectres obtenus sont représentés dans les Annexes de 16 à 23 pour les yaourts YN, YST, YSV et YSC.

Tableau 32. Effet de l'incorporation des HEs sur la teneur en acides organiques et arôme

Acide organique	Jours de stockage	YN	YST	YSC	YSV
Acide lactique	J1	1,047±0,003	0,9785±0,0445	0,6935±0,145	0,8955±0,0985
	J7	0,927±0,012	0,8645±0,0045	0,887±0,001	0,849±0,027
	J21	1,4±0,04	1,335±0,125	1,2955±0,134	1,1495±0,005
	J28	0,1625±0,0005	0,1515±0,0175	0,738±0,036	0,9805±0,0005
Acide Formique	J1	0,2055±0,0005	0,112±0,006	0,1155±0,0095	0,8955±0,0985
	J7	0,2285±0,0005	0,191	0,1245±0,0015	0,849±0,027
	J21	0,399	0,3665±0,0025	0,2755±0,1235	0,2495±0,0015
	J28	0,0265±0,0005	0,029	0,0935±0,0155	0,9805±0,0005
Acide acétique	J1	0,198±0,004	0,2	0,189	0,213
	J7	0	0	0	0
	J21	0	0,309	0,317	0
	J28	0	0,038	0	0
Acide Citrique	J1	0,209±0,005	0,323±0,115	0,3715±0,1845	0,1595±0,0005
	J7	0,2675±0,0195	0,2895±0,0084	0,3055±0,0055	0,3795±0,0725
	J21	0,3265±0,0385	0,28±0,084	0,318±0,062	0,3885±0,0065
	J28	0,0645±0,0005	0,0285±0,0235	0,2415±0,0835	0,3835±0,0045

YN : yaourt non incorporé,

YST : yaourt incorporé de l'HE de *T. willdenowii*

YSC : yaourt incorporé de l'HE de *C. citratus*

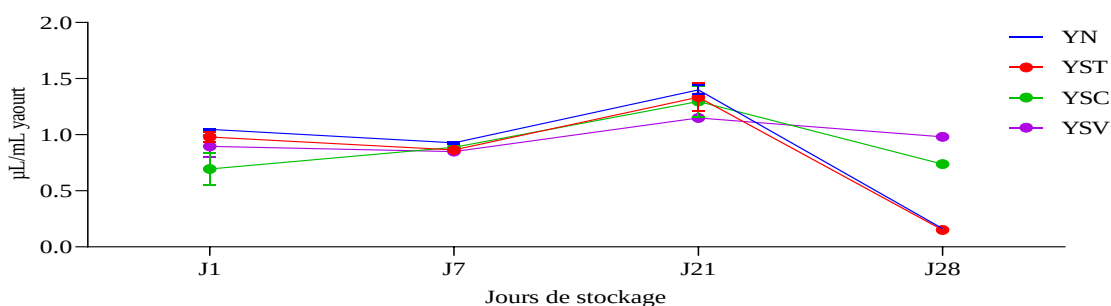
YSV : yaourt incorporé de l'HE d'*A. citriodora*

3.6.1. Production de l'acide lactique

A l'issu des résultats obtenus, l'acide lactique s'est révélé l'acide organique majoritaire produit au cours du stockage et ce dans tous les types de yaourts. Sa quantité varie d'un produit à l'autre (figure 45). La plus grande quantité en acide lactique pour les quatre produits est obtenue au J21 du stockage à froid (1,400±0,057, 1,335±0,177, 1,296±0,190, 1,150±0,008 pour les yaourts : YN, YST, YSC et YSV respectivement). Ce constat est observé aussi dans l'étude

de Zheng *et al.* (2022) sur l'influence de l'addition d'huile de pépins de périlla (plante aromatique cultivée en Chine et consommée comme légume-feuille) sur la qualité du yaourt pendant le stockage à 4°C. En prenant en considération les résultats de la comparaison entre le yaourt contrôle YN et les autres yaourts (YST, YSC, YSV), l'ANOVA à deux facteurs, nous a permis d'obtenir le graphique B) de la figure 45, exprimant que pour le J1. La quantité de l'acide lactique produite dans le contrôle YN est significativement plus élevée que celle des yaourts formulés (YSC et YSV ; $p < 0,0001$ et $p < 0,05$ respectivement). Par ailleurs, il n'y a aucune différence significative entre le contrôle et le yaourt YST. A la fin de la période du stockage, la quantité d'acide lactique tend à diminuer pour les yaourts YN et YST, par contre elle est maintenue pour les yaourts YSC et YSV, enregistrant une différence très hautement significative avec le contrôle ($p < 0,0001$).

A



B

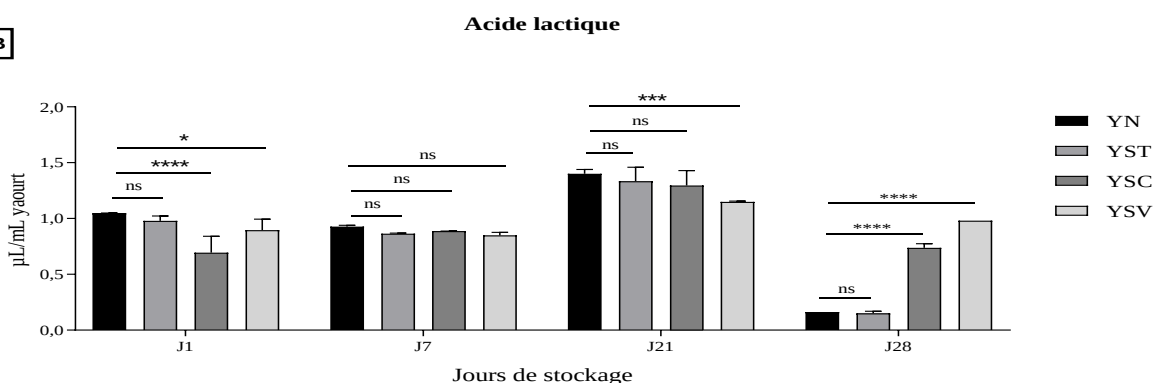


Figure 45. Evolution et comparaison de la production de l'acide lactique au cours du stockage des yaourts formulés

A) Evolution de la production de l'acide lactique au cours du stockage pour chaque yaourt

B) Comparaison de la quantité de l'acide lactique au contrôle pour chaque yaourt au cours du stockage

YST : yaourt incorporé avec l'HE de *T. wilddenowii*, YSC : yaourt incorporé avec l'HE de *C. citratus*
YSV : yaourt incorporé avec l'HE d'*A. citriodora*, YN : yaourt non incorporé.

Ces résultats nous amènent à établir l'hypothèse que ces HEs agissent sur le métabolisme des bactéries du yaourt pour produire de l'acide lactique à la fin de la période de stockage ce qui prouve le maintien de la viabilité des bactéries lactiques jusqu'à cette période. Ceci représente un grand avantage pour le consommateur qui bénéficiera des bienfaits des bactéries du yaourt même en période de fin de stockage.

3.6.2. Production de l'acide formique

Il a été vraisemblablement prouvé que le chauffage du lait provoquerait la formation d'acide formique qui représenterait 80% des acides volatils formés au cours du chauffage à l'autoclave (Auclair et Portmann, 1959 ; Béal et Helinck, 2019). Par ailleurs, il a été noté aussi que la bactérie starter du yaourt *S. thermophilus* stimule l'autre bactérie *L. bulgaricus* par la formation d'acide formique (Béal et Helinck, 2019). D'après les résultats représentés dans la figure 46, il est clair que la formation de ce composé connaît une augmentation du J1 au J21 avec un maximum de production au J21 pour tous les types de yaourts élaborés, par la suite une diminution est perçue entre le J21 et le J28 de stockage à froid.

Concernant le J28, la diminution de la quantité d'acide formique dans les yaourts YN et YST est significativement remarquable ($p < 0,05$) par rapport aux yaourts YSC et YSV d'où le maintien de ce composé dans ces deux yaourts en fin de stockage.

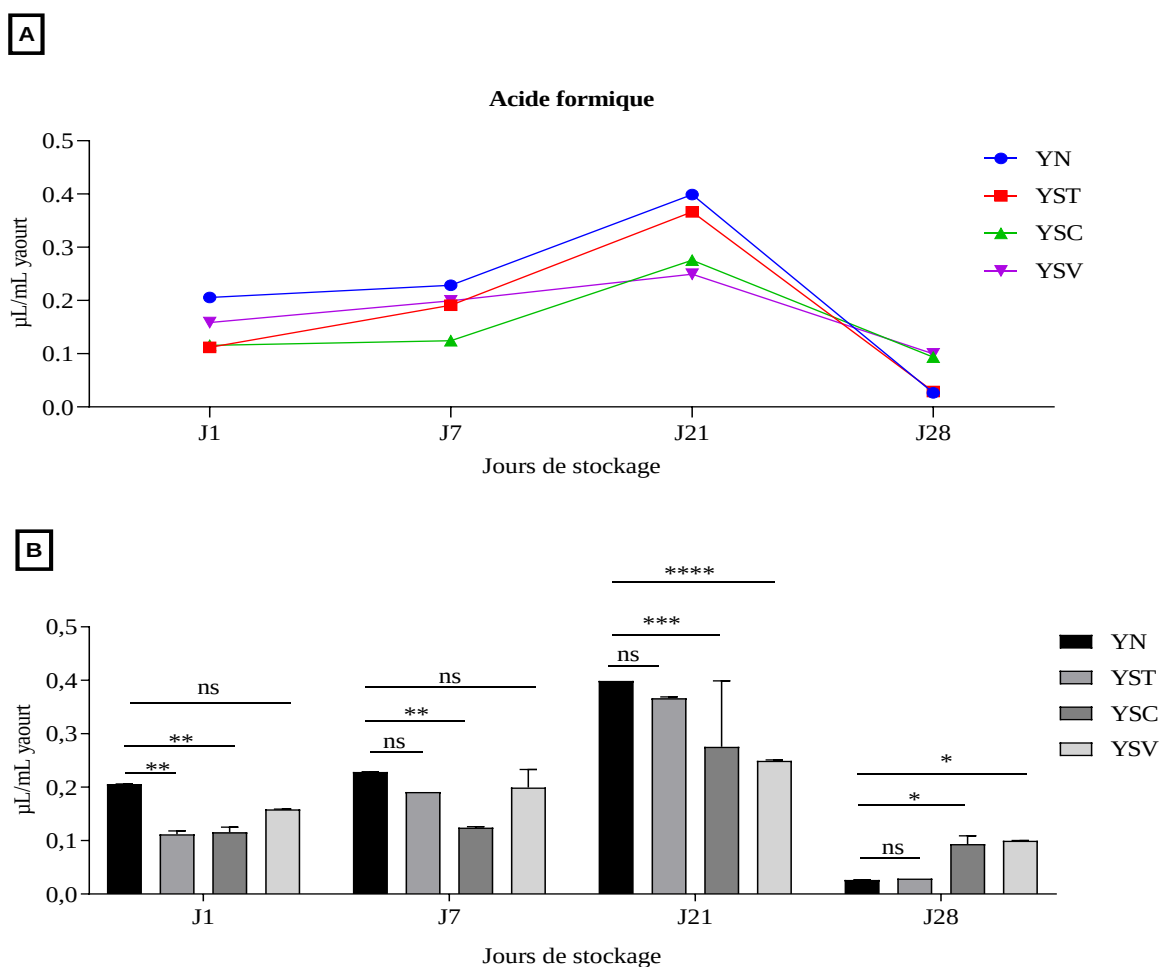


Figure 46. Evolution et comparaison de la production de l'acide formique au cours du stockage des yaourts formulés

A) Evolution de la production de l'acide formique au cours du stockage pour chaque yaourt

B) Comparaison de la quantité de l'acide formique au contrôle pour chaque yaourt au cours du stockage

YST : yaourt incorporé avec l'HE de *T. willdenowii*, YSC : yaourt incorporé avec l'HE de *C. citratus*

YSV : yaourt incorporé avec l'HE d'*A. citriodora*, YN : yaourt non incorporé

3.6.3. Production de l'acide acétique

Les quantités d'acide acétique présentes dans les différents yaourts, révélées par HPLC, sont mentionnées dans le tableau 32 et illustrées dans la figure 47. Il est à remarquer la présence de l'acide acétique au J1 du stockage pour les quatre types de yaourt, par la suite aucune trace n'est décelée au J7 pour qu'il réapparaisse au J21 pour les yaourts YST et YSC et diminuer par la suite au J28 pour le YST.

Durant la fermentation du yaourt, l'activité métabolique des bactéries starter sur le lactose du lait conduit à la formation de plusieurs acides organiques (citrique, acétique, oxalique, malique, fumarique, tartarique, succinique, butyrique, pyruvique, formique et lactique) (Kang *et al.*, 2019). Nos résultats indiquent la présence de l'acide acétique au début du stockage produit par les bactéries lactiques du yaourt lors de leur fermentation, par la suite cette quantité tend à diminuer jusqu'à disparaître au J7 et puis réapparaître à nouveau au J21. Notre étude présente des résultats similaires à ceux de Joung *et al.* (2016), qui ont aussi observé une diminution de la quantité de l'acide acétique au début du stockage pour qu'il puisse apparaître à la fin du stockage sous l'effet d'extraits d'herbes. Cela est expliqué par le fait que les bactéries lactiques utilisent le lactose résiduel qui n'est pas métabolisé lors de la fermentation à 45°C lors de la fabrication du yaourt, et ce suivant la voie intermédiaire du Fructose-6- Phosphate (Zheng *et al.*, 2022). Ce constat est valable pour les yaourts YST et YSC, cela peut être expliqué aussi par le fait que l'acide acétique soit produit par la métabolisation d'autres acides organiques produits par les bactéries lactiques tels que l'acide citrique et par d'autres mécanismes plus compliqués.

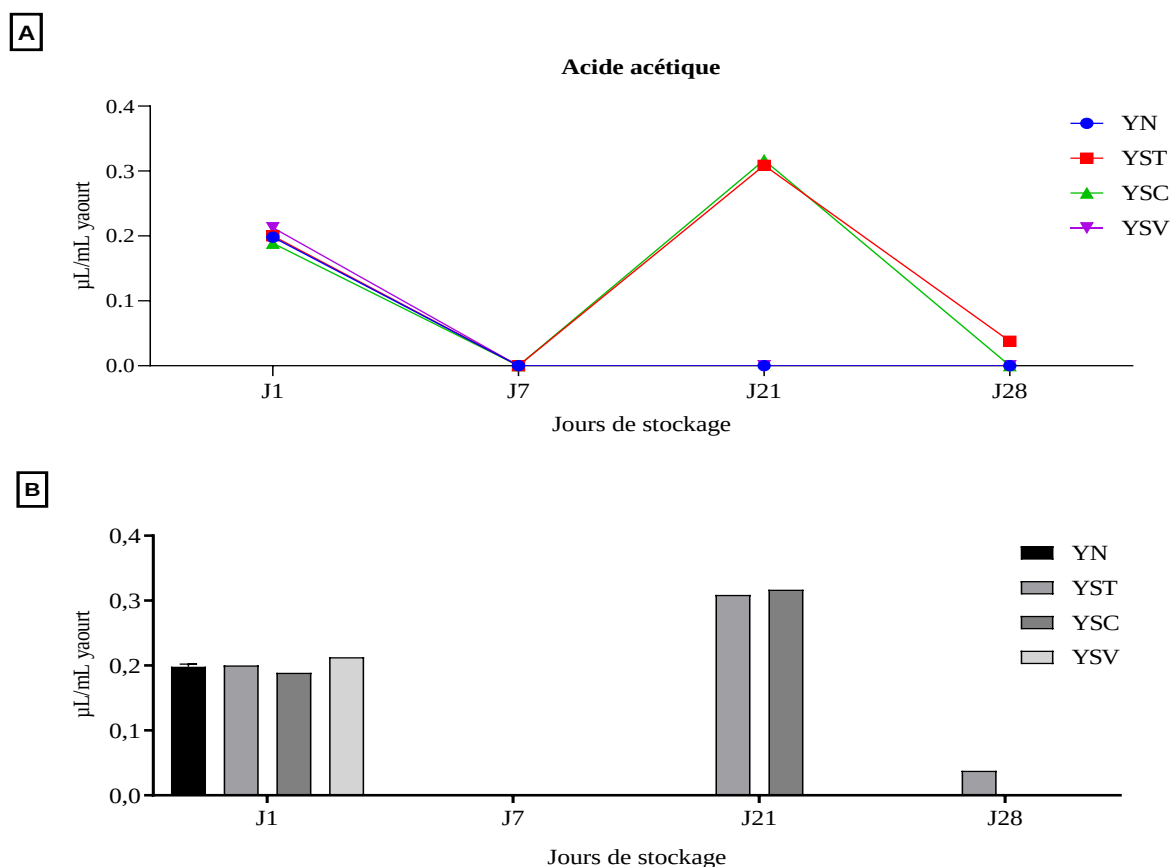


Figure 47. Evolution et comparaison de la production de l'acide acétique au cours du stockage des yaourts formulés

A) Evolution de la production de l'acide acétique au cours du stockage pour chaque yaourt

B) Comparaison de la quantité de l'acide acétique au contrôle pour chaque yaourt au cours du stockage

YST : yaourt incorporé avec l'HE de *T. wilddenowii*, YSC : yaourt incorporé avec l'HE de *C. citratus*

YSV : yaourt incorporé avec l'HE d'*A. citriodora*, YN : yaourt non incorporé

3.6.4. Production de l'acide citrique

Les résultats obtenus de l'analyse par HPLC des quantités d'acide citrique présentes dans les différents yaourts sont mentionnés dans le tableau 32 et illustrés dans la figure 48.

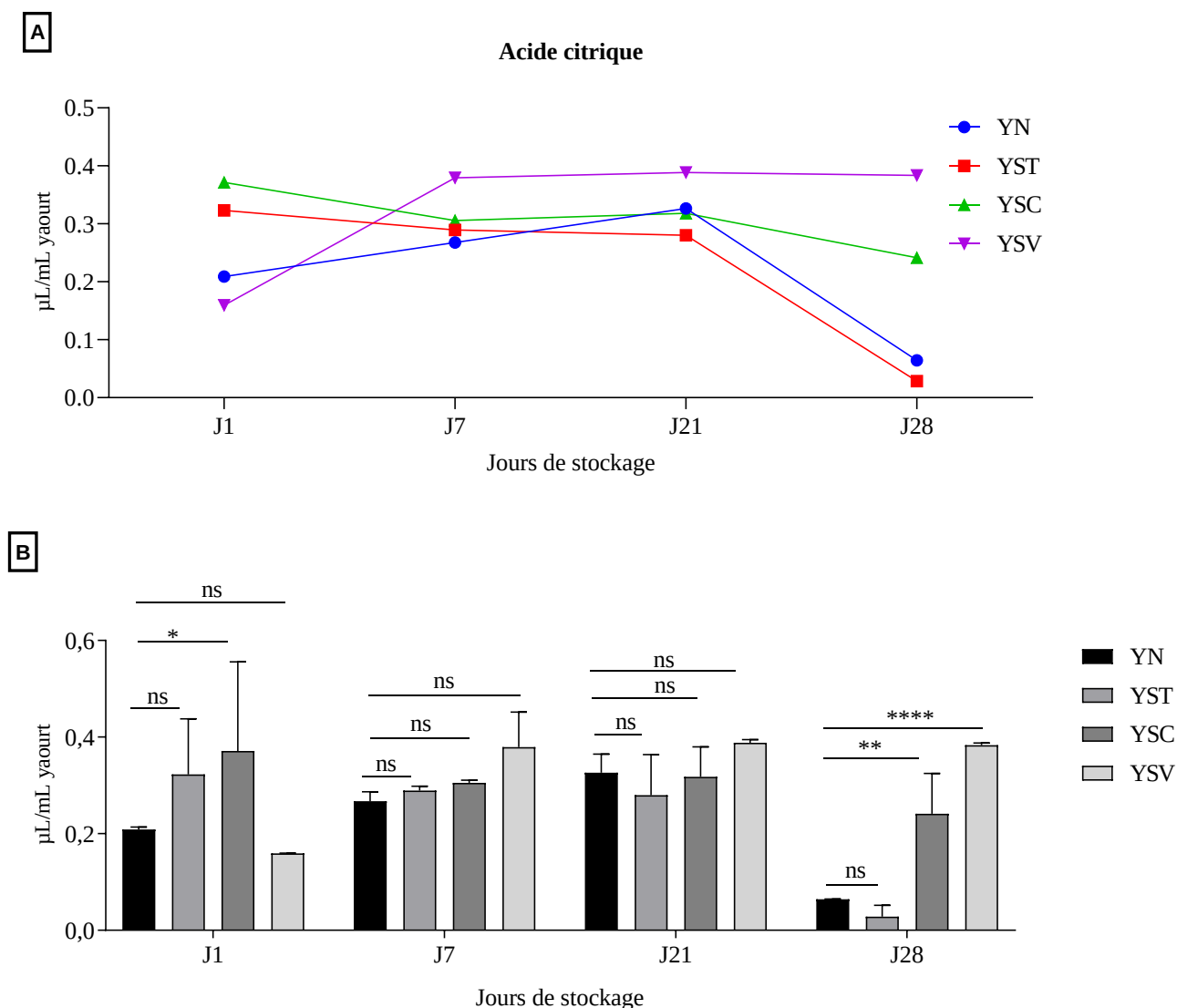


Figure 48. Evolution et comparaison de la production de l'acide citrique au cours du stockage des yaourts formulés

A Evolution de la production de l'acide formique au cours du stockage pour chaque yaourt

B) Comparaison de la quantité de l'acide formique au contrôle pour chaque yaourt au cours du stockage

YST : yaourt incorporé avec l'HE de *T. willdenowii*, YSC : yaourt incorporé avec l'HE de *C. citratus*

YSV : yaourt incorporé avec l'HE d'*A. citriodora*, YN : yaourt non incorporé

Suivant les résultats, l'évolution de l'acide citrique diffère d'un yaourt à un autre, en effet, au J1 la plus grande quantité observée dans le YSC est significativement supérieure à celle du contrôle YN ($p < 0,05$). L'augmentation de la production d'acide citrique est remarquablement observée pour le YSV qui passe de $0,160 \pm 0,001$ à $0,384 \pm 0,005$ $\mu\text{L/mL}$ du J1 au J28. A la fin du stockage, la quantité d'acide citrique pour les yaourts YN et YST diminuent considérablement par rapport aux deux autres yaourts YSC et YSV. En effet, la quantité de cet

acide organique est significativement plus élevée dans le YSC et YSV par rapport au YN au J28 ($p < 0,01$ et $0,0001$ respectivement). Ceci est probablement dû au métabolisme des bactéries lactiques du yaourt qui dégradent l'acide pyruvique en acide citrique (Zheng *et al.*, 2022).

3.6.5. Production de l'acétaldéhyde

Dans cette étude, seul l'acétaldéhyde a été suivi, et ce à cause de la non disponibilité des autres standards aromatiques, les résultats sont mentionnés dans le tableau 32 et représentés dans la figure 49.

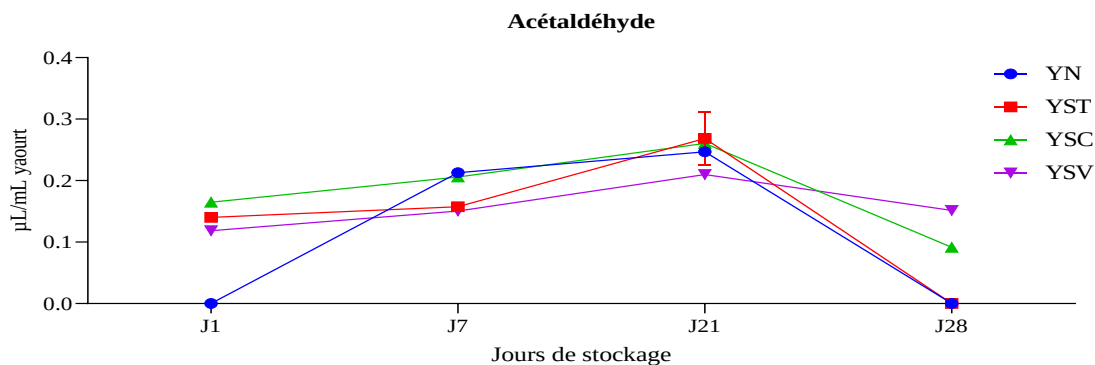
Rappelons que l'acétaldéhyde est un composé organique qui se forme naturellement dans les produits laitiers fermentés tels que le yaourt, le kéfir et le fromage. L'acétaldéhyde est produit lors de la fermentation lactique qui se produit lors de la transformation du lactose, en acide lactique par les bactéries lactiques présentes dans le yaourt du pyruvate, soit par action de la pyruvate décarboxylase ou par action de la pyruvate déshydrogénase (appelée aussi pyruvate formate lyase), soit de l'acide aminé thréonine par l'action de la thréonine aldolase.

D'après les résultats, nous remarquons l'absence de production d'acétaldéhyde au J1 et J28 pour le YN, par contre au J7 et J21 les valeurs sont de $0,213 \pm 0,007$ et $0,247 \pm 0,008$ $\mu\text{L/mL}$ respectivement. Aussi nous constatons une augmentation de l'acétaldéhyde au J1 au J21 dans le YST avec sa disparition totale au J28. En revanche nous constatons une augmentation du J1 au J21 dans les yaourts YSC et YSV suivi d'une diminution de sa quantité au J28 pour ces mêmes yaourts.

Par ailleurs, la quantité d'acétaldéhyde du YN au J7 est significativement plus élevée ($p < 0,0001$) que celles des YSC et YSV, néanmoins, cette différence significative reste observée pour le YSC au J28. Les plus grandes valeurs d'acétaldéhyde sont remarquées dans le YSC. Il semble que l'addition de l'HE de citronnelle a un impact sur la production d'arôme représenté dans notre étude par l'acétaldéhyde. Ce constat est également rapporté par Otaibi *et Al dameerdash*, (2008) qui ont essayé d'incorporer les HEs de thym, marjoram et sauge dans le yaourt et dont les résultats obtenus exprimaient une augmentation des valeurs d'acétaldéhyde durant les 7 premiers jours de stockage et par la suite une diminution a été observée jusqu'à la fin de période de stockage. Nous pouvons conclure que nos résultats sont meilleurs vu que le maximum de production dans nos produits a été observé au J21 pour tous les produits ce qui

est très avantageux car les yaourts gardent leur gout et arôme procuré par l'acétaldéhyde pendant toute cette période.

A



B

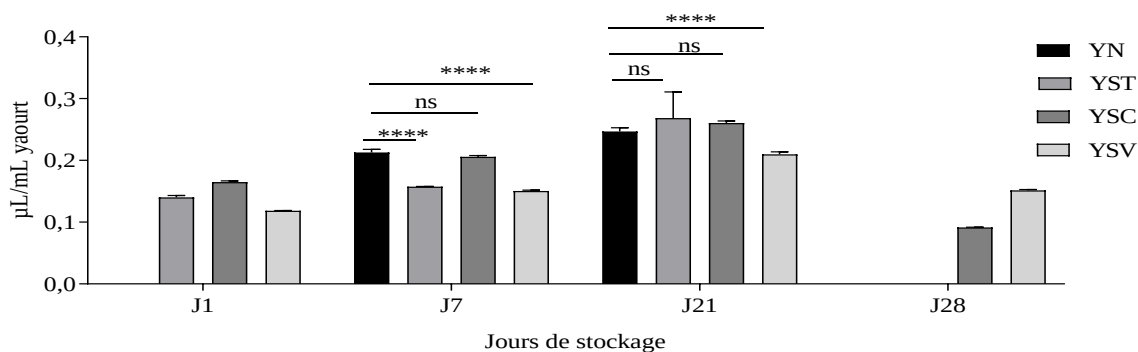


Figure 49. Evolution et comparaison de la production de l'acétaldéhyde au cours du stockage des yaourts formulés

A) Evolution de la production de l'acétaldéhyde au cours du stockage pour chaque yaourt

B) Comparaison de la quantité de l'acétaldéhyde au contrôle pour chaque yaourt au cours du stockage

YST : yaourt incorporé avec l'HE de *T.willdenowii*, YSC : yaourt incorporé avec l'HE de *C. citratus*

YSV : yaourt incorporé avec l'HE d'*A. citriodora*, YN : yaourt non incorporé

Les cultures starters du yaourt sont principalement responsables de la production des composés aromatiques qui contribuent à l'arôme du yaourt. Ces composés peuvent être divisés en trois catégories principales (Tamime et Robinson, 2007) :

- Acides non volatils (lactique, pyruvique, oxalique ou succinique).
- Acides volatils (formique, acétique, propionique ou butyrique).
- Composés carbonylés (acétaldéhyde, acétone, acétoïne ou diacétyle).

Toutes les bactéries lactiques possèdent un métabolisme fermentaire leur permettant, en utilisant des sucres fermentescibles, de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques (Raynaud, 2006). Plus de 90 substances volatiles différentes ont été préalablement identifiées dans les yaourts, y compris glucides, alcools, aldéhydes, cétones, acides, esters, lactones, composés soufrés, pyrazines, et dérivés furaniques (Cheng, 2010). Quantitativement, l'acétaldéhyde représente le composé volatil aromatique majeur retrouvé dans le yaourt comme rapporté par certains auteurs (Güler et Gürsoy-Balcı, 2011).

3.7. Effet de l'incorporation des HEs sur la teneur totale en composés phénoliques dans les yaourts.

Afin de déterminer l'impact de l'incorporation des HEs dans le yaourt sur la teneur totale en composés phénoliques, nous avons évalué cette teneur en l'exprimant en μg équivalent Acide Gallique / mL de Yaourt (μg EAG/ mL de Yaourt). Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux 33 et 34.

Tableau 33. Teneur moyenne en composés phénoliques totaux des HEs

HE	<i>T. willdenowii</i>	<i>C. citratus</i>	<i>A. citriodora</i>
Teneur totale en composés phénolique (μg EAG/ mL d'huile essentielle)	405,67 $\pm$ 13,08	173,31 $\pm$ 3,23	203,02 $\pm$ 5,94

Tableau 34. Teneur moyenne en composés phénoliques totaux des yaourts formulés

Yaourt	YN	YST	YSC	YSV
Jours de stockage	μg Equivalent Acide Gallique/mL yaourt			
J1	169,49 $\pm$ 6,40	121,26 $\pm$ 7,96	237,53 $\pm$ 14,77	156,16 $\pm$ 6,61
J7	162,14 $\pm$ 1,86	158,90 $\pm$ 15,27	157,92 $\pm$ 4,95	190,67 $\pm$ 9,38
J21	179,39 $\pm$ 13,41	252,92 $\pm$ 3,01	100,37 $\pm$ 12,40	201,84 $\pm$ 3,69
J28	148,56 $\pm$ 8,38	156,74 $\pm$ 5,77	128,61 $\pm$ 4,78	161,75 $\pm$ 0,167

La teneur totale en composés phénoliques des trois HEs est résumée dans la figure 50, nous remarquons que l'HE de *Thymus willdenowii* contient la plus grande quantité de composés phénoliques (405,67 $\pm$ 13,08 μg EAG/ mL d'HE) par rapport aux deux autres HEs, en effet, certains auteurs ont rapporté la présence de composés phénoliques dans les HEs de thym, tel que le thymol, le carvacrol, le caryophyllène (Mata *et al.*, 2007 ; Zeghib *et al.*, 2021 ; Moukhles *et al.*, 2022).

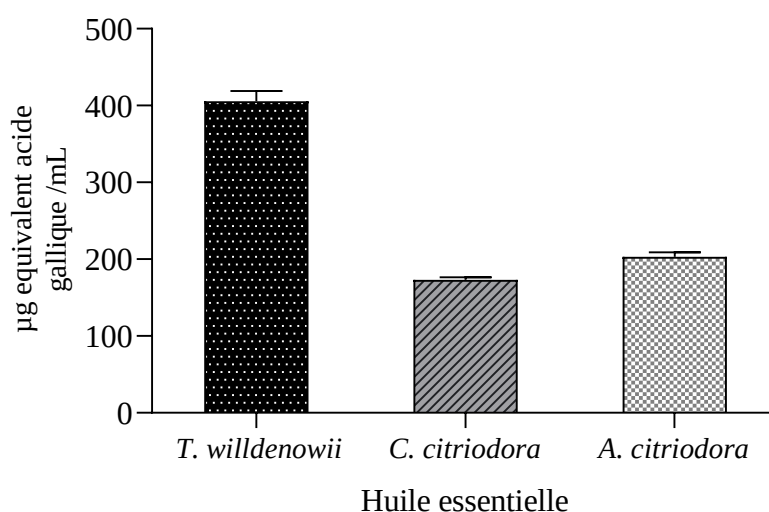


Figure 50. Teneur moyennes en composés phénoliques totaux des HEs du thym, de la verveine et de la citronnelle

L'analyse de la variance a permis de constater une différence significative ($p < 0,05$) pour YN, $p < 0,0001$ pour les yaourts YST, YSC et YSV entre les différents jours de stockage dans presque tous les yaourts (figure 51).

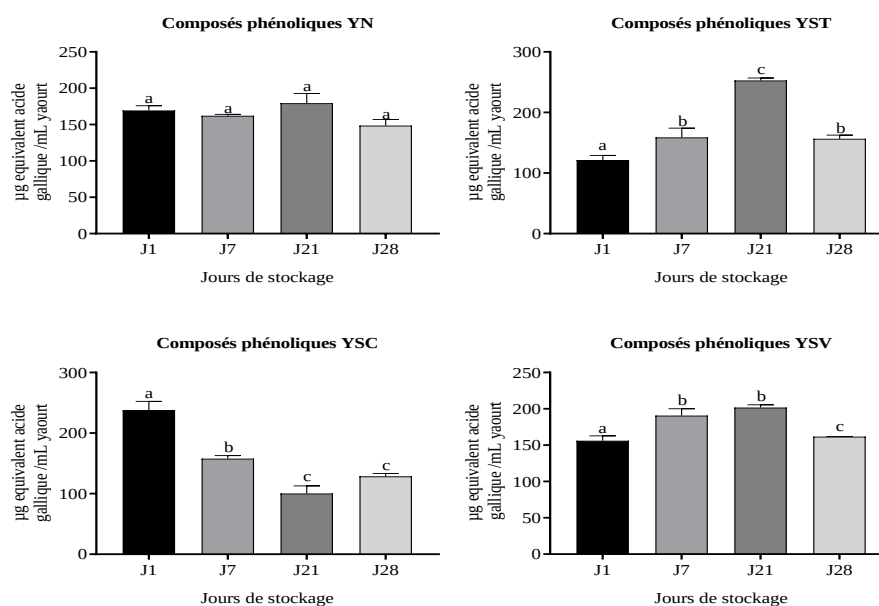


Figure 51. Teneurs moyennes en composés phénoliques totaux des yaourts formulés

YST : yaourt incorporé avec l'HE de *T.wilddenowii*, YSC : yaourt incorporé avec l'HE de *C. citratus*
 YSV : yaourt incorporé avec l'HE d'*A. citriodora*, YN : yaourt non incorporé

La figure 52 exprime la comparaison des teneurs en composés phénoliques entre les yaourts incorporés d'HE et le contrôle. En effet, nous constatons qu'il n'y a aucune différence significative ($p < 0,05$) entre le yaourt contrôle et le yaourt YST et ce au J7 et J28. Par contre la teneur en composés phénoliques du yaourt YN est significativement plus élevée ($p < 0,05$) que celle du yaourt YST au J1, le contraire est observé au J21 où le yaourt YST enregistre une valeur de $252,92 \pm 3,01$ significativement plus élevée que celle du contrôle ($p < 0,0001$).

Concernant le yaourt YSC la plus grande valeur est enregistrée au J1 ($237,53 \pm 14,77$ μg Equivalent Acide Gallique/mL yaourt), tandis que pour les autres jours de stockage cette quantité tend à diminuer. En revanche, le yaourt YSV enregistre une quantité plus élevée significativement au J7 et J21 ($p < 0,001$ et $p < 0,01$ respectivement) mais sans différence significative ($p < 0,05$) au J1 et J28.

Le résultat obtenu avec le yaourt YSV exprime une quantité significativement plus élevée de la teneur totale en composés phénoliques dans ce yaourt et ce au J7 ($p < 0,001$) et au J21 ($p < 0,01$). Pour les jours J1 et J28, aucune différence significative n'est observée.

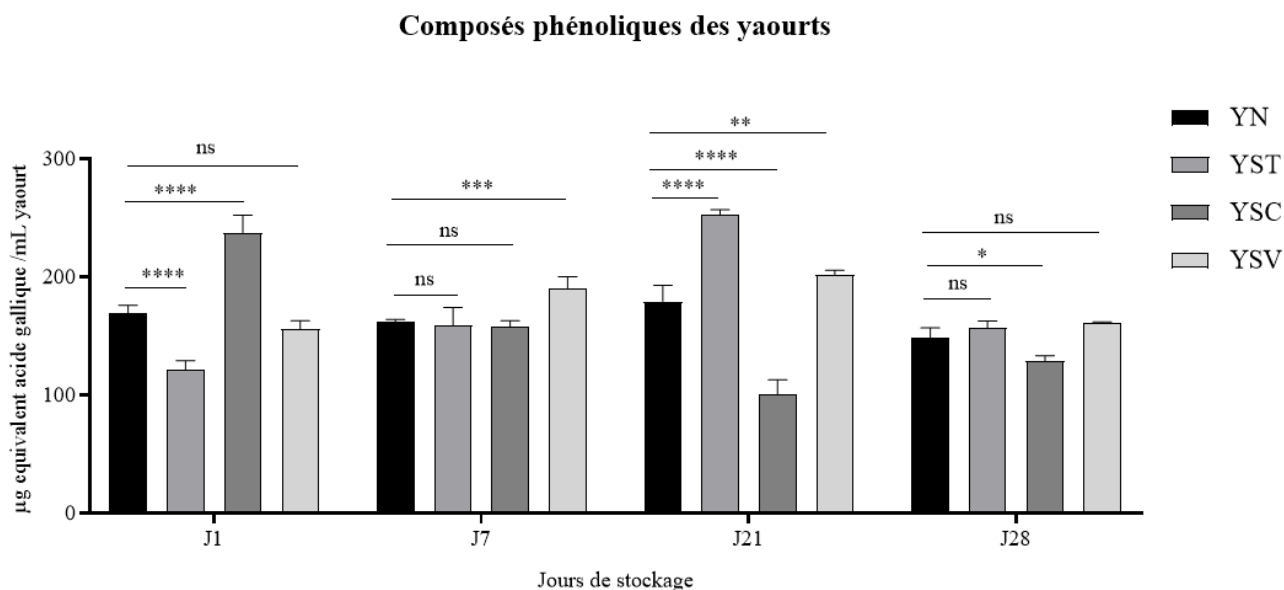


Figure 52. Comparaison des teneurs en composés phénoliques totaux des yaourts formulés

La teneur totale élevée en composés phénoliques de l'HE de *T. wilddenowii* est attribuée probablement à la présence de carvacrol (5,56%), ce composé phénolique monoterpénique présent dans les HEs de la famille des Lamiacées, doté de propriétés anti cancéreuse, anti inflammatoire et antibactérienne, est utilisé en industrie pharmaceutique et agroalimentaire

(Souza *et al.*, 2022). La diminution des composés phénoliques dans tous les yaourts incorporés d'HE au J28, c'est-à-dire à la fin de la période de stockage, peut être expliquée par leur métabolisation par les bactéries lactiques du yaourt en d'autres formes (Shori, 2020), la fermentation peut avoir aussi plusieurs effets conduisant à la modification de différents niveaux ainsi que la formation de monomères ou polymères, cela est rapporté par Adebo et Gabriela Medina-Meza (2020).

En effet, des travaux antérieurs ont rapporté que la bactérie *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* possédait l'équipement enzymatique pour hydrolyser des composés phénoliques tels que l'acide chlorogénique en acide caféique (Fritsch *et al.*, 2016). Des études plus approfondies sont nécessaires afin de comprendre au mieux les réactions enzymatiques des bactéries du yaourt *L. bulgaricus* et *S. thermophilus*.

3.8. Analyse sensorielle

L'analyse sensorielle des produits testés est la clé pour répondre aux attentes des consommateurs. Elle complète parfaitement les mesures physico-chimiques couramment utilisées pour identifier les caractéristiques intrinsèques des produits. Elle permet aussi d'évaluer les caractéristiques organoleptiques telles que l'apparence, l'odeur, la texture et le goût du yaourt.

L'analyse sensorielle effectuée au J7, a permis d'évaluer la qualité organoleptique des différents produits préparés. La dégustation est effectuée dans de bonnes conditions et les résultats de l'analyse sont schématisés dans la figure 53. En effet, les résultats rapportent que le yaourt additionné de verveine est le plus apprécié par les dégustateurs puisqu'il a obtenu le plus grand score global, suivi par les deux yaourts nature et à l'HE de citronnelle ayant obtenus des scores similaires, par contre le yaourt à l'HE du thym a enregistré le score le plus bas et est le moins apprécié.

Il y a eu un intérêt croissant ces dernières années sur l'amélioration des qualités organoleptiques des produits laitiers entre autres le yaourt, par l'addition de fruits, d'extraits de plantes ou d'huiles essentielles, citons l'étude de Arslan et Bayrakçi (2016) qui a conclu que l'addition de la marmelade du fruit du kaki influençait l'odeur, le goût, la couleur, la texture et l'acceptabilité générale. D'autres études se sont focalisées sur l'effet de l'addition de l'HE sous forme d'émulsion de Citronnelle, de clou de girofle, de carvi et de menthe au yaourt arrivant à

la conclusion que chaque HE influençait de manière particulière sur les paramètres sensoriels des yaourts comme la texture, l'apparence et l'odeur, après quinze jours de stockage à froid, seul le yaourt additionné de l'HE de Citronnelle a gardé la mention hautement préférée.

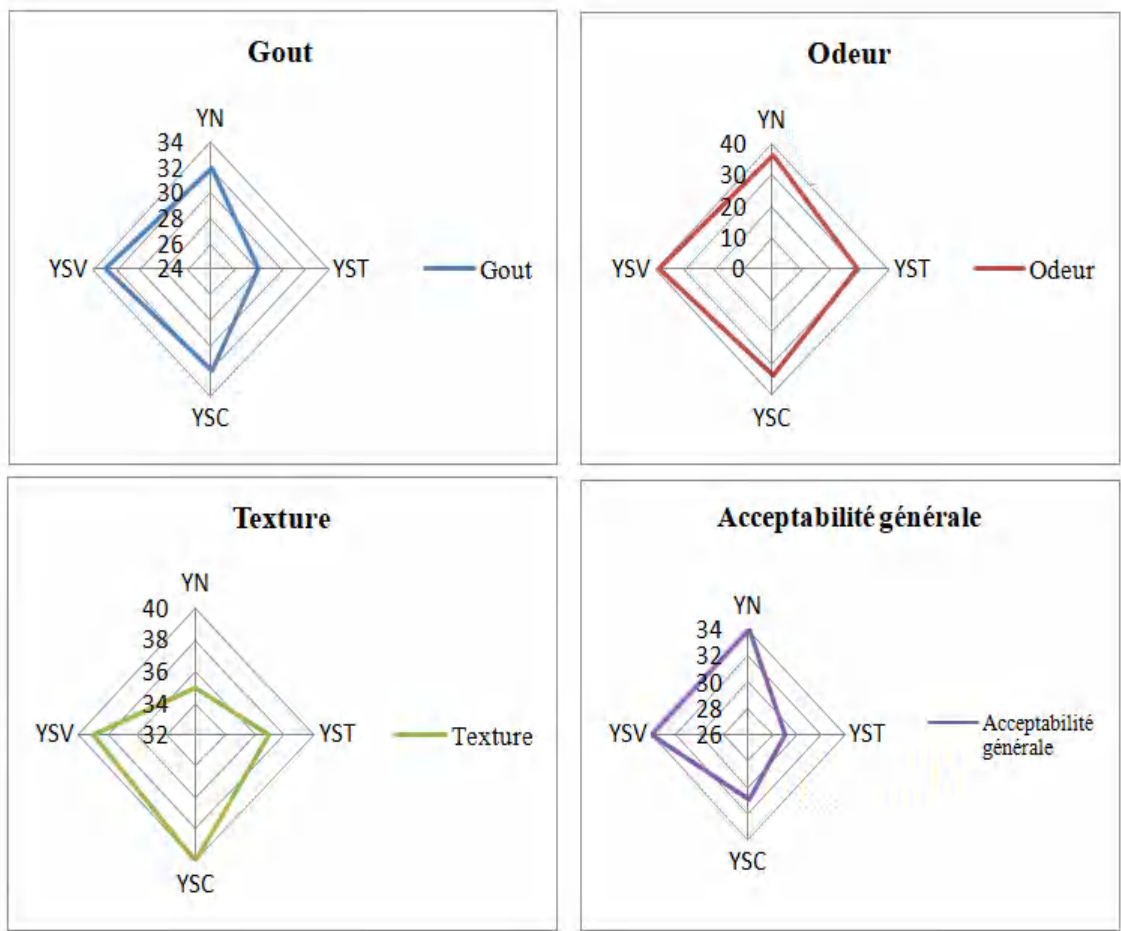


Figure 53. Analyse sensorielle des yaourts formulés

The image features a central white rectangular area with a soft, light green watercolor wash background. The text "CONCLUSION ET PERSPECTIVES" is centered within this white area in a dark green, serif, all-caps font. The text is arranged in three lines: "CONCLUSION" on the top line, "ET" on the middle line, and "PERSPECTIVES" on the bottom line. The font is bold and clear. On the left and right sides of the white area, there are watercolor illustrations of green leaves and branches, extending from the edges towards the center. The leaves are detailed with visible veins and a slightly textured appearance. The overall composition is clean and professional, with a natural, organic feel due to the watercolor elements.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'innovation d'un produit alimentaire repose dans la majorité des cas sur la modification des formulations. L'ajout d'additifs et d'auxiliaires technologiques est un passage quasiment obligé pour optimiser ces formulations. Les efforts d'innovation de l'industrie alimentaire doivent garantir la qualité sanitaire, améliorer l'impact positif sur la santé et minimiser les coûts de fabrication tout en répondant à l'attente des consommateurs pour des produits de bonne qualité gustative, bons marchés et faciles à conserver. C'est dans cet optique que s'inscrit cette étude, ayant pour principal objectif la formulation de yaourts étuvés incorporés d'huiles essentielles extraites de trois plantes aromatiques et médicinales : *Thymus willdenowii*, *Aloysia citriodora* et *Cymbopogon citratus* appelées plus communément le thym, la verveine et la citronnelle.

La partie pratique de cette étude est initiée par une enquête en ligne sur l'utilisation de ces trois plantes. L'objectif est de collecter le maximum d'informations sur l'utilisation de ces plantes auprès d'un échantillon de la population locale. Les principaux constats révélés sont :

- Une très bonne connaissance du thym et de la verveine par les informateurs en se basant sur leur morphologie et arôme ;
- Une méconnaissance de la citronnelle et de ce fait, elle est très peu utilisée ;
- Les huiles essentielles ne sont pas vraiment utilisées dans leurs préparations culinaires.

La composition de l'huile essentielle peut présenter des spécificités biochimiques très différentes sous l'influence de facteurs extérieurs. Un changement important de son profil chimique permet d'anticiper les variations de son activité. Dans cette optique, les trois huiles essentielles ont été analysées par CG/SM. Les principaux résultats révèlent une richesse de la citronnelle et de verveine en citral avec ses deux isomères E-citral et Z-citral et une richesse du thym en linalool. Ces composés bioactifs sont réputés pour leurs propriétés antioxydantes et leurs bienfaits pour la santé.

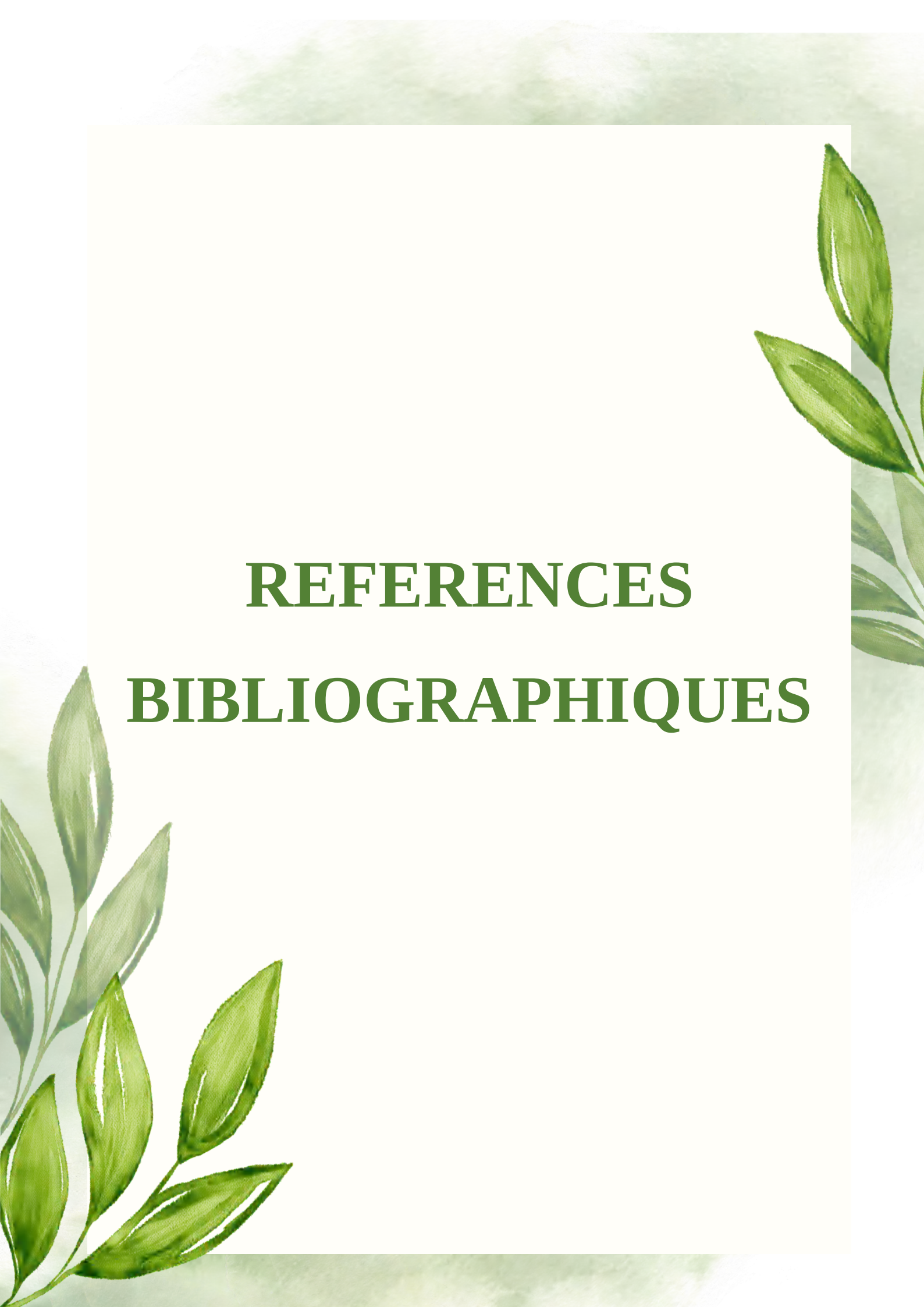
En ce qui concerne les activités biologiques, les principaux résultats enregistrés dévoilent :

- Une activité antiradicalaire supérieure de l'huile essentielle du thym par comparaison à celle de la verveine et de la citronnelle, en termes d'inhibition du radical ABTS, due probablement à sa teneur importante en composés phénoliques et une efficacité dans l'inhibition de certaines bactéries pathogènes :

- Une activité inhibitrice intéressante de l'enzyme butyrylcholinestérase de l'huile essentielle de verveine ;
- Une activité inhibitrice intéressante de l'enzyme butyrylcholinestérase et une activité antifongique intéressante mais une activité inhibitrice significative contre les bactéries lactiques du yaourt de l'huile essentielle de citronnelle ;
- Un faible potentiel inhibiteur des enzymes α -amylase, uréase des huiles essentielles des trois espèces.

L'incorporation des huiles essentielles a permis d'améliorer le potentiel antioxydant des yaourts incorporés indiquant un effet synergique avec les bactéries lactiques, d'augmenter la production d'acide lactique et d'acide citrique, ainsi que de l'arôme acétaldéhyde, contribuant ainsi à la qualité organoleptique des yaourts formulés. Les trois yaourts formulés sont de bonne qualité hygiénique et une teneur totale en composés phénoliques remarquable, apportée par les huiles essentielles. Le yaourt additionné d'huile essentielle d'*A.citriodora* est le plus apprécié par le panel de dégustateurs. Il est à signaler que l'huile essentielle de *C. citratus*, a été introduite pour la première fois, dans une matrice alimentaire. Selon l'enquête menée, elle n'est pas vraiment connue, ni utilisée en Algérie.

En somme, cette thèse a apporté de nouvelles connaissances sur les huiles essentielles de thym, de verveine et de citronnelle, relatives à leur composition chimique, leurs activités biologiques et leur impact sur la qualité fonctionnelle du yaourt. Ces résultats offrent des perspectives intéressantes pour l'industrie alimentaire. Des études supplémentaires sur les mécanismes d'action des huiles essentielles et la mesure de leur effet sur l'expression de certains gènes des bactéries lactiques *L.bulgaricus* et *S.thermophilus* permettent d'explorer davantage leur potentiel dans diverses applications. Il serait souhaitable d'établir également la relation entre les composés majoritaires des huiles essentielles et les enzymes étudiées par docking moléculaire, évaluer l'effet des huiles essentielles sur le potentiel probiotique des bactéries lactiques fermentées en présence de ces huiles essentielles. Par ailleurs, les paramètres rhéologiques des yaourts formulés devraient être suivis avec des investigations approfondies, en essayant de diminuer la quantité des bactéries starter du yaourt de départ ce qui représente un atout sur le plan économique vu que ces huiles essentielles ont montré un effet stimulant de la croissance de ces bactéries jusqu'à la fin de la période de stockage.



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Béal, C., Helinck, S., 2019. Fabrication des yaourts et des laits fermentés, in: Fabrication Des Yaourts et Des Laits Fermentés, Techniques de l'Ingénieur.
2. Caleja, C., Barros, L., Antonio, A.L., Carochio, M., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, I.C.F.R., 2016. Fortification of yogurts with different antioxidant preservatives: A comparative study between natural and synthetic additives. Food Chemistry 210, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.114>
3. Ekpenyong, C.E., Akpan, E., Nyoh, A., 2015. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. Chin J Nat Med 13, 321–337. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30023-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30023-6)
4. Irkin, R., Korukluoglu, M., 2009. Growth Inhibition of Pathogenic Bacteria and Some Yeasts by Selected Essential Oils and Survival of *L. monocytogenes* and *C. albicans* in Apple–Carrot Juice. Foodborne Pathogens and Disease 6, 387–394. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0195>
5. Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., Szumny, A., 2019. Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? Molecules 24, 2130. <https://doi.org/10.3390/molecules24112130>
6. Deschepper, R. Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. 173.
7. Deschepper, R., 2017. Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie (Thèse). Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie, Marseille.
8. Clémens, S., 1955. Les additifs alimentaires : législation et problèmes liés à leur utilisation (Thèse). Université Joseph Fourie - Grenoble, France.
9. Kumar, P., Mishra, S., Kumar, A., Sharma, A.K., 2016. Antifungal efficacy of plant essential oils against stored grain fungi of *Fusarium* spp. J Food Sci Technol 53, 3725–3734. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2347-0>
10. Fernandes, C.F., Chandan, R.C., Shahani, K.M., 1992. Fermented Dairy Products and Health, in: Wood, B.J.B. (Ed.), The Lactic Acid Bacteria Volume 1: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Springer US, Boston, MA, pp. 297–339. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3522-5_12
11. Neffati, M., Sghaier, M., 2014. Développement et valorisation des plantes aromatiques et médicinales (PAM) au niveau des zones désertiques de la région MENA (Algérie, Egypte, Jordanie, Maroc et Tunisie).
12. Abayomi, S., 2010. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique [WWW Document]. URL <http://library.lol/main/33E62BFE98790DCCD3188314EB8194A3> (consulté le 3/13/22).
13. Badiaga, M., 2011. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali (phdthesis). Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II.
14. Zouaoui, N., Chenchouni, H., Bouguerra, A., Barkat, M., 2020. (PDF) Characterization of volatile organic compounds from six aromatic and medicinal plant species growing wild in North African drylands. NFS journal 18, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2019.12.001>
15. Tabuti, J.R.S., Lye, K.A., Dhillon, S.S., 2003. Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. Journal of Ethnopharmacology 88, 19–44. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00161-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00161-2)
16. Bouzabata, A., 2015. Contribution à l'étude d'une plante médicinale et aromatique *Myrtus communis* L. Université Badji Mokhtar Annaba.
17. Hadjadj, K., Benaissa, M., Mahammed, M., Ouragh, A., Rahmoune, A., 2019. Importance Des Plantes Médicinales Pour La Population Rurale Du Parc National De Djebel Aissa (Sud Ouest Algerien). lejeunia. <https://doi.org/10.25518/0457-4184.1864>

Références bibliographiques

18. Sahi, L., 2016. La dynamique des plantes aromatiques et médicinales en Algérie [Troisième partie]. In : Ilbert H. (ed.), Hoxha V. (ed.), Sahi L. (ed.), Courivaud A. (ed.), Chailan C. (ed.). Le marché des plantes aromatiques et médicinales : analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en Albanie et en Algérie. Montpellier : CIHEAM / France Agri Mer, 2016. p. 101-140 (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 73°
19. Tarek, H., Nina, S., Seridi, R., Sameh, B., Boulemtafes, A., 2018. Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales dans la population de la péninsule de l'Edough (nord-est algérien). *Ethnopharmacologia* 59, 65–70.
20. Hadjadj Hadjadj, W.N., Meribai, H., 2019. Valorisation des plantes aromatiques et médicinales(PAM)dans la wilaya de Constantine (Master). Constantine Université frères Mentouri Constantine, Constantine.
21. Omari, F.Z., 2018. Ghardaia : les plantes aromatiques et médicinales ouvrent des perspectives prometteuses [WWW Document]. URL <https://www.aps.dz/regions/82705-ghardaia-les-plantes-aromatiques-et-medicinales-ouvrent-des-perspectives-prometteuses> (accessed 8.30.22).
22. Fernandez, X., Chemat, F., 2012. La chimie des huiles essentielles, Tradition et innovation, ed. Vuibert.
23. Hüsnü Can, K., Gerhard, B., 2010. Hand book of esssential oils Science, Technology, and Applications, CRC Press. ed. CRC Press, London.
24. Sebti, M., 2019. Etude des Effets Toxiques de Plantes Aromatiques Spontanées de la Région de Jijel, en vue d'une meilleure valorisation Pharmaceutique et phytopharmaceutique (Thèse). aaaaaaMohamed Seddik Benyahia, Jijel.
25. Tongnuanchan, P., Benjakul, S., 2014. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation: Bioactivities and applications of essential oils.... *Journal of Food Science* 79, R1231–R1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
26. Masango, P., 2005. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production* 13, 833–839. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.02.039>
27. Bouadjemi, K., 2018. Etude comparative des différents parties de la plante romarin «Rosmarinus officinalis» par rapport aux pouvoirs antibiotiquessur le yaourt (Master). Université Abdelhamid BenBadis, Mostaganem.
28. Clevenger, J., 2006. Apparatus for the determination of volatile oil. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 17, 345–349. <https://doi.org/10.1002/jps.3080170407>
29. Boukhatem, M.N., 2019. Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles : revue de littérature. *Revue Agrobiologica* 1653–1659.
30. Lucchesi, M.-E., n.d. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondesConception et Application à l'extraction des huiles essentielles 147.
31. Farhat, A., 2010. Vapo-diffusion assistée par micro-ondes : conception, optimisation et application (Thèse). Université d'Avignon, France.
32. Raut, J.S., Karuppayil, S.M., 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 62, 250–264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
33. Bensouici, C., 2015. Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de deux plantes du genre Sedum (Crassulaceae) (Thèse). Université Frères Mentouri Constantine, Constantine.
34. Kalinowska, M., Płońska, A., Trusiak, M., Gołębiewska, E., Gorlewska-Pietluszenko, A., 2022. Comparing the extraction methods, chemical composition, phenolic contents and antioxidant activity of edible oils from Cannabis sativa and Silybum marianu seeds. *Sci Rep* 12, 20609. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25030-7>

Références bibliographiques

35. Chouhan, S., Sharma, K., Guleria, S., 2017. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines* 4, 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
36. Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86, 985–990. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>
37. Djermane, N., 2021. Evaluation des activités biologiques d'huiles essentielles et d'extraits de végétaux de plantes médicinales et fouragères (Thèse). Université d'Oum el Bouaghi.
38. Benzeggouta, N., 2005. Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments (Magister). Université Frères mentouri Constantine.
39. Toure, D., 2015. Etudes chimique et biologique des huiles Essentielles de quatre plantes Aromatiques medicinales de côte d'ivoire (Thèse). Université Felix Houphouët-Boignyfelix Houphouët-Boigny, Cote d'ivoire.
40. Soares, A., 2015. Sensibilité de 291 souches de *Escherichia coli* urinaires à l'amoxicilline-acide clavulanique : quels résultats pour quelles méthodes ? (Thèse). UFR de Médecine et de Pharmacie Rouen, France.
41. Mayer, F., 2012. Utilisations Therapeutiques Des Huiles Essentielles : Etude De Cas En Maison De Retraite (Thèse). Université de Lorraine, Phaculté de Pharmacie.
42. Kathiravan, M.K., Salake, A.B., Chothe, A.S., Dudhe, P.B., Watode, R.P., Mukta, M.S., Gadhwe, S., 2012. The biology and chemistry of antifungal agents : A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20, 5678–5698. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.045>
43. Bayala, B., 2014. Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes (Thèse). Université Blaise Pascal, Clairmont Ferrand.
44. Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J., Mira, L., Corvo, M., 2008. Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Activity Mediated by Flavonoids. *CMC* 15, 1586–1605. <https://doi.org/10.2174/092986708784911579>
45. Miguel, M.G., 2010. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules* 15, 9252–9287. <https://doi.org/10.3390/molecules15129252>
46. Kamatou, G.P.P., Viljoen, A.M., 2010. A Review of the Application and Pharmacological Properties of α -Bisabolol and α -Bisabolol-Rich Oils. *J Am Oil Chem Soc* 87, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1483-3>
47. Raut, J.S., Karuppayil, S.M., 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 62, 250–264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
48. Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., Romagnoli, C., Sacchetti, G., 2004. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry* 85, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.019>
49. Kaefer, C.M., Milner, J.A., 2008. The role of herbs and spices in cancer prevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 19, 347–361. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.11.003>
50. Devenci, E., Tel-Çayan, G., Duru, M.E., 2018. Phenolic profile, antioxidant, anticholinesterase, and anti-tyrosinase activities of the various extracts of *Ferula elaeochytris* and *Sideritis stricta*. *International Journal of Food Properties* 21, 771–783. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1431660>

Références bibliographiques

51. Albano, S.M., Lima, A.S., Miguel, M.G., Pedro, L.G., Barroso, G., Figueiredo, A.C., 2012. Antioxidant, Anti-5-lipoxygenase and Antiacetylcholinesterase Activities of Essential Oils and Decoction Waters of Some Aromatic Plants. *Rec. Nat. Prod.* 14.
52. Sharma, K., 2019. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics. *Mol Med Rep* 20, 1479–1487. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10374>
53. Pohanka, M., Hrabínova, M., Kuca, K., Simonato, J.-P., 2011. Assessment of Acetylcholinesterase Activity Using Indoxylacetate and Comparison with the Standard Ellman's Method. *International journal of molecular sciences* 12, 2631–40. <https://doi.org/10.3390/ijms12042631>
54. Korona-Glowniak, I., Glowniak-Lipa, A., Ludwiczuk, A., Baj, T., Malm, A., 2020. The In Vitro Activity of Essential Oils against *Helicobacter Pylori* Growth and Urease Activity. *Molecules* 25, 586. <https://doi.org/10.3390/molecules25030586>
55. Goetz, P., 2007. Phytothérapie du diabète. *Phytothérapie* 5, 212–217. <https://doi.org/10.1007/s10298-007-0255-1>
56. Bandara, T., Uluwaduge, I., Jansz, E.R., 2012. Bioactivity of cinnamon with special emphasis on diabetes mellitus: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 63, 380–386. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.627849>
57. Mozaffari-Khosravi, H., Talaei, B., Jalali, B.-A., Najarzadeh, A., Mozayan, M.R., 2014. The effect of ginger powder supplementation on insulin resistance and glycemic indices in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Complementary Therapies in Medicine* 22, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2013.12.017>
58. Abdollahi, F., Mobadery, T., 2020. The effect of aromatherapy with bitter orange (*Citrus aurantium*) extract on anxiety and fatigue in type 2 diabetic patients. *Advances in Integrative Medicine* 7, 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.aimed.2019.01.002>
59. Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Melo, N.R. de, Sanches-Silva, A., 2017. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends in Food Science & Technology* 61, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.021>
60. Vergis, J., Gokulakrishnan, P., Agarwal, R.K., Kumar, A., 2015. Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55, 1320–1323. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.692127>
61. Macwan, S.R., Dabhi, B.K., Aparnathi, K.D., Prajapati, J.B., 2016. Essential Oils of Herbs and Spices: Their Antimicrobial Activity and Application in Preservation of Food. *Int.J.Curr.Res.Aca.Rev.* 5, 885–901. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.505.092>
62. Figueiredo, G., 2007. Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'organes (*Lamiaceae*) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne (Thèse). Institut de chimie Clairmont Ferrand.
63. Teisseire, P.J., 1991. *Chimie des substances odorantes, TEC&DOC.* ed. Lavoisier.
64. Habtemariam, S., 2019. Introduction to plant secondary metabolites—From biosynthesis to chemistry and antidiabetic action, in: *Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases.* Elsevier, pp. 109–132. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102922-0.00006-7>
65. Tranchant, J., 1995. *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*, 4th ed. Masson, Paris.
66. Zeghib, A., Calliste, C.-A., Simon, A., Charfeddine, R., Aouni, M., Duroux, J.-L., Kabouche, A., Kabouche, Z., 2019. Chemical composition and biological potential of *Thymus Willdenowii* Boiss. & Reut. essential oil. *Natural Product Research* 1–4. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1602830>
67. Li, Z., Cai, M., Yang, K., Sun, P., 2019. Kinetic study of d-limonene release from finger citron essential oil loaded nanoemulsions during simulated digestion in vitro. *Journal of Functional Foods* 58, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.056>

Références bibliographiques

68. Stahl-Biskup, E., Saez, F., 2002. Thyme, Taylor and Francis. ed, medicinal and aromatic plants - industrial profiles. London and New York.
69. Nouioua, F.E., Gherabi, S., 2021. Screening biologique et phytochimique du genre *Thymus* (Thèse). Mohamed Boudiaf, M'Sila.
70. Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertique méridionales, Edition du centre national de la recherche scientifique. ed. Paris.
71. Yousfi, K., 2020. Enquête ethnobotanique, étude phytochimique, et activités biologiques de cinq plantes médicinales (Thèse). Université Sidi Mohamed Benabdallah, Fes Maroc.
72. Laredj, H., 2016. Les thymus d'Algérie : étude botanique, analyse chimique et activité anti microbienne des huiles essentielles. *FacMed* 4, 6–8.
73. Daoudi, C., 2020. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux variétés d'agrumes Présenté.
74. Bnina, E.B., Hammami, S., Daami-Remadi, M., Cheraif, I., Hajjlaoui, H., Jannet, H.B., Said, M.B., Mighri, Z., 2009. Composition and antimicrobial activities of essential oils from the aerial parts and flowers of *Thymus hirtus* W. growing in Tunisia. *Journal of Essential Oil Research* 21, 567–572.
75. Kassahun, T., Girma, B., Sisay, B., Teka, F., Taye, S., 2020. Ethnobotany, traditional use, phytochemistry and pharmacology of *Cymbopogon citratus*: Review article.
76. Abida, A., 2014. hysiological Responses of Field Grown Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) to Seasonal Changes (Thèse). Université d'agriculture, Faislabad Pakistan.
77. Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., Mann, A.S., 2011. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *Journal of advanced pharmaceutical technology & research* 2, 3.
78. E Ekpenyong, C., Akpan, E., Nyoh, A., 2015. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. *Chinese Journal of Natural Medicines* 0321–0337.
79. Puatanachokchai, R., Kishida, H., Denda, A., Murata, N., Konishi, Y., Vinitketkumnien, U., Nakae, D., 2002. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. *Cancer letters* 183, 9–15. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00111-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00111-8)
80. Costa, G., Ferreira, J.P., Vitorino, C., Pina, M.E., Sousa, J.J., Figueiredo, I.V., Batista, M.T., 2016. Polyphenols from *Cymbopogon citratus* leaves as topical anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology* 178, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.016>
81. Fandohan, P., Gnonlonfin, B., Laleye, A., Gbenou, J.D., Darboux, R., Moudachirou, M., 2008. Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 46, 2493–2497. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.04.006>
82. Bensabah, F., Lamiri, A., Naja, J., 2015. Effect of purified wastewater from the city of Settat (Morocco) on the quality of *Lippia citriodora* essential oil and infusion. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 14, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.03.001>
83. Oukerrou, M.A., Tilaoui, M., Mouse, H.A., Leouifoudi, I., Jaafari, A., Zyad, A., 2017. Chemical Composition and Cytotoxic and Antibacterial Activities of the Essential Oil of *Aloysia citriodora* Palau Grown in Morocco. *Advances in Pharmacological Sciences* 2017, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/7801924>
84. Afrasiabian, F., Mirabzadeh Ardakani, M., Rahmani, K., Azadi, N.A., Alemohammad, Z.B., Bidaki, R., Karimi, M., Emtiazy, M., Hashempur, M.H., 2019. *Aloysia citriodora* Palau (lemon verbena) for insomnia patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of efficacy and

Références bibliographiques

- safety: Aloysia citriodora for insomnia patients: A clinical trial. *Phytotherapy Research* 33, 350–359. <https://doi.org/10.1002/ptr.6228>
85. Museum national d'Histoire, 2022. Aloysia citrodora Paláu, 1784 - Verveine odorante, Verveine citronnelle, Verveine du Pérou, Verveine à trois feuilles, Aloysie à trois feuilles, Aloysie citronnée [WWW Document]. Inventaire National du Patrimoine Naturel. URL https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/639101 (accessed 8.31.22).
86. Ghédira, K., Goetz, P., 2017. Verveine odorante Aloysia citriodora Paláu (Lippia citriodora). *Phytothérapie* 15, 33–37. <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1098-z>
87. Argyropoulou, C., Daferera, D., Tarantilis, P.A., Fasseas, C., Polissiou, M., 2007. Chemical composition of the essential oil from leaves of Lippia citriodora HBK (Verbenaceae) at two developmental stages. *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 831–837.
88. Teuscher, E., Anton, R., Lobstein, A., 2005. Plantes aromatiques, épices, arômes, condiments et huiles essentielles, TEC&DOC. ed. Lavoisier.
89. Elechosa, M.A., Di Leo Lira, P., Juárez, M.A., Viturro, C.I., Heit, C.I., Molina, A.C., Martínez, A.J., López, S., Molina, A.M., van Baren, C.M., Bandoni, A.L., 2017. Essential oil chemotypes of Aloysia citrodora (Verbenaceae) in Northwestern Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology* 74, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2017.07.003>
90. Bahramsoltani, R., Rostamiasrabadi, P., Shahpiri, Z., Marques, A.M., Rahimi, R., Farzaei, M.H., 2018. Aloysia citrodora Paláu (Lemon verbena): A review of phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol* 222, 34–51. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.021>
91. Chaachouay, N., Douira, A., Hassikou, R., Brhadda, N., Dahmani, J., Belahbib, N., Ziri, R., Zidane, L., 2021. Etude Floristique et Ethnomédicinale des Plantes Aromatiques et Médicinales dans le Rif (Nord du Maroc).
92. Chaachouay, N., Douira, A., Hassikou, R., Brhadda, N., Dahmani, J., Belahbib, N., Ziri, R., Zidane, L., 2021. Etude Floristique et Ethnomédicinale des Plantes Aromatiques et Médicinales dans le Rif (Nord du Maroc) (Thèse). Université Ibn Tofail.
93. Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., Villar, A., 2001. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 76, 201–214. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00234-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00234-3)
94. Ponce-Monter, H., Fernández-Martínez, E., Ortiz, M.I., Ramírez-Montiel, M.L., Cruz-Elizalde, D., Pérez-Hernández, N., Cariño-Cortés, R., 2010. Spasmolytic and anti-inflammatory effects of Aloysia triphylla and citral, in vitro and in vivo studies. *J Smooth Muscle Res* 46, 309–319. <https://doi.org/10.1540/jsmr.46.309>
95. Surono, I.S., Hosono, A., 2011. Fermented milks : Types and Standards of Identity, in: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, pp. 470–476. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00180-1>
96. Laithier, C., 2011. Microflore du lait cru, Vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens du lait et de leurs facteurs de variation.
97. Meghachou, W., 2013. Approche méthodologique à la modélisation par les plans d'expériences pour l'élaboration d'un yaourt (Magister). Université d'Oran, Oran.
98. Lesme, H., Rannou, C., Famelart, M.-H., Bouhallab, S., Prost, C., 2020. Yogurts enriched with milk proteins: Texture properties, aroma release and sensory perception. *Trends in Food Science & Technology* 98, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.006>
99. Routray, W., Mishra, H.N., 2011. Scientific and Technical Aspects of Yogurt Aroma and Taste: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10, 208–220. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00151.x>

Références bibliographiques

100. Serra, M., Trujillo, A.J., Guamis, B., Ferragut, V., 2009. Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yogurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk. *Food Hydrocolloids* 23, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.11.015>
101. Routray, W., Mishra, H.N., 2011. Scientific and Technical Aspects of Yogurt Aroma and Taste: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10, 208–220. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00151.x>
102. Trachoo, N., 2002. Yogurt: The fermented milk. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 24, 11.
103. Labropoulos, A.E., Lopez, A., Palmer, J.K., 1981. Apparent Viscosity of Milk and Cultured Yogurt Thermally Treated by UHT and Vat Systems. *Journal of Food Protection* 44, 874–876. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-44.11.874>
104. Mahi, M., 2010. Etude Technologique Des Bactéries Lactiques isolées à Partir Du Lait De Brebis (Thèse). Université Ahmed Ben Bella Oran, Oran.
105. Belkheir, K., 2017. Caractérisation technologique de nouvelles souches de bactéries lactiques isolées du lait de chamelle d'Algérie. Réalisation de ferments lactiques (Thèse). Université Ahmed Ben Bella Oran, Oran.
106. Marshall, V.M., 1987. Lactic acid bacteria: starters for flavour. *FEMS Microbiology Letters* 46, 327–336. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02469.x>
107. Gerevrs, D., Huys, G., Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species - PubMed. *FEMS Microbiology Letters* 31–36.
108. Hassaine, O., 2013. Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien (Thèse). Université d'Oran Es Senia, Oran.
109. Wang, Yaqi, Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Yanping, Geng, W., 2021. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front Bioeng Biotechnol* 9, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
110. Gerwig, G.J., 2019. Structural Analysis of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Methods Mol Biol* 1887, 67–84. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8907-2_7
111. Gardini, F., Özogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G., Özogul, F., 2016. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Front Microbiol* 7, 1218. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01218>
112. Hanchi, H., Sebei, K., Mottawea, W., Al Kasaa, I., Hammami, R., 2022. An agar-based bioassay for accurate screening of the total antioxidant capacity of lactic acid bacteria cell-free supernatants. *Journal of Microbiological Methods* 195, 106437. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106437>
113. Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P.A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J.A., Linares, D.M., Ross, P., Stanton, C., Turroni, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., Kok, J., 2016. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80, 837–890. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00076-15>
114. Lin, M.-Y., Yen, C.-L., 1999. Antioxidative Ability of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1460–1466. <https://doi.org/10.1021/jf981149l>
115. Yue, Y., Wang, S., Lv, X., Wang, C., Xu, B., Ping, L., Guo, J., Li, X., Evvie, S.E., Liu, F., Li, B., Huo, G., 2022. Analysis of the complete genome sequence of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* with post-acidification capacity and its influence on yogurt in storage. *Journal of Dairy Science* 105, 1058–1071. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20999>
116. Tamime, A.Y., Robinson, R.K., 2007. *Tamime and Robinson's Yoghurt*, Woodhead Publishing Limited. ed. Cambridge.

Références bibliographiques

117. Belfoudil, A., Aouchiche, A., 2018. Caractérisation physico- chimique et microbiologique des yaourts industriels collectés dans la willaya de Bordj Bou Arreridj : Evaluation In vitro des effets relatifs aux levains thermophiles (Master). Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.
118. Gjorgievski, N., Tomovska, J., Dimitrovska, G., Makarijoski, B., Shariati, M.A., 2014. Determination of the antioxidant activity in yogurt. *Journal of Hygienic Engineering and Design* 8, 88–92.
119. Sibra, C., Claire, A., 2014. Composés d'intérêt nutritionnel du lait et des fromages de terroir.
120. Granato, D., Santos, J.S., Salem, R.D., Mortazavian, A.M., Rocha, R.S., Cruz, A.G., 2018. Effects of herbal extracts on quality traits of yogurts, cheeses, fermented milks, and ice creams: a technological perspective. *Current Opinion in Food Science, Food Chemistry and Biochemistry * Food Bioprocessing* 19, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.013>
121. Abubakar, S.M., Tijjani Ab, M., Adekale, I., 2022. The Effect of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Essential Oil on Shelf-Life of Yoghurt. *Biotechnology* 21, 71–79. <https://doi.org/10.3923/biotech.2022.71.79>
122. Eldeeb, G.S.S., Abouelnaga, M., Mosilhey, S.H., 2021. Improving Quality Properties of Frozen Yogurt by Fortification with Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) as Prebiotic. *SCUJ* 8, 1–9. <https://doi.org/10.21608/scuj.2021.178514>
123. Tița, O., Constantinescu, M.A., Tița, M.A., Georgescu, C., 2020. Use of Yoghurt Enhanced with Volatile Plant Oils Encapsulated in Sodium Alginate to Increase the Human Body's Immunity in the Present Fight Against Stress. *IJERPH* 17, 7588. <https://doi.org/10.3390/ijerph17207588>
124. CFR - Code of Federal Regulations Title 21 [WWW Document], n.d. URL <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=182&showF=R=1> (accessed 11.12.20).
125. Saidi, M., Khalla, A., 2023. Contribution à l'étude ethnobotanique des Plantes Médicinales utilisées de la région de Guelma (Est Algérien). (Thèse). Université 8 mai 1945 Guelma, Guelma, Algérie.
126. Taleb-Toudert, K., 2015. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien) : évaluation de leurs effets sur la bruche de niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae) (Thesis). Université Mouloud MAMMERI.
127. Bayala, B., 2014. Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes (phdthesis). Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II ; Université Joseph Ki-Zerbo (Ouagadougou, Burkina Faso).
128. Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., 2000. GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2576–2581. <https://doi.org/10.1021/jf990835x>
129. Safaei-Ghomi, J., Ebrahimabadi, A.H., Djafari-Bidgoli, Z., Batooli, H., 2009. GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chemistry* 115, 1524–1528. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.051>
130. Blois, M.S., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181, 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
131. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Références bibliographiques

132. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7970–7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
133. Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn.J.Nutr.Diet.* 44, 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
134. Marco, G.J., 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 45, 594–598. <https://doi.org/10.1007/BF02668958>
135. Rota, M.C., Herrera, A., Martínez, R.M., Sotomayor, J.A., Jordán, M.J., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food control* 19, 681–687.
136. de Billerbeck, V.-G., 2007. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie* 5, 249–253. <https://doi.org/10.1007/s10298-007-0265-z>
137. Song, W., Zhou, L., Yang, C., Cao, X., Zhang, L., Liu, X., 2004. Tomato Fusarium wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. *Crop Protection* 23, 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.08.007>
138. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
139. Cheribet, A., Arioua, M., 2021. Evaluation In vitro de certaines activités biologiques des extraits bruts de la plante Polycarpon polycarpoïdes. (Master). Université frères Mentouri Constantine.
140. Nabati, F., Mojab, F., Habibi-Rezaei, M., Bagherzadeh, K., Amanlou, M., Yousefi, B., 2012. Large scale screening of commonly used Iranian traditional medicinal plants against urease activity. *Daru* 20, 72. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-72>
141. Zengin, G., Sarikurcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., Ceylan, O., 2014. A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products* 53, 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.043>
142. Aumeeruddy-Elalfi, Z., Gurib-Fakim, A., Mahomoodally, M.F., 2016. Kinetic studies of tyrosinase inhibitory activity of 19 essential oils extracted from endemic and exotic medicinal plants. *South African Journal of Botany* 103, 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.09.010>
143. Deveci, E., Tel-Çayan, G., Duru, M.E., 2018. Phenolic profile, antioxidant, anticholinesterase, and anti-tyrosinase activities of the various extracts of *Ferula elaeochytris* and *Sideritis stricta*. *International Journal of Food Properties* 21, 771–783. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1431660>
144. Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., McLaughlin, J., 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Med* 45, 31–34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
145. Michael, M., Phebus, R.K., Schmidt, K.A., 2010. Impact of a plant extract on the viability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in nonfat yogurt. *International Dairy Journal* 20, 665–672. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.03.005>
146. Ani, E., Amove, J., Igbabul, B., 2018. Physicochemical, Microbiological, Sensory Properties and Storage Stability of Plant-based Yoghurt Produced from Bambaranut, Soybean and Moringa oleifera Seed Milks. *American Journal of Food and Nutrition*.

Références bibliographiques

147. Alañón, M.E., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., Gordon, M.H., Pérez-Coello, M.S., 2011. A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. *Food Chemistry* 128, 997–1002. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.005>
148. Baptista-Silva, S., Borges, S., Ramos, O.L., Pintado, M., Sarmento, B., 2020. The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review. *Journal of Essential Oil Research* 32, 279–295. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1746698>
149. Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* 16, 144–158.
150. Popescu, L., Ceşco, T., Gurev, A., Ghendov-Mosanu, A., Sturza, R., Tarna, R., 2022. Impact of Apple Pomace Powder on the Bioactivity, and the Sensory and Textural Characteristics of Yogurt. *Foods* 11, 3565. <https://doi.org/10.3390/foods11223565>
151. Goetz, P., 2020. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf Citronnelle, verveine des Indes (Ouest). *Phytothérapie* 18, 349–352. <https://doi.org/10.3166/phyto-2020-0238>
152. Boukhatem, M.N., Ferhat, M.A., Kameli, A., Saidi, F., Kebir, H.T., 2014. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan J Med* 9, 25431. <https://doi.org/10.3402/ljm.v9.25431>
153. Madi, Y.F., Choucry, M.A., Meselhy, M.R., El-Kashoury, E.-S.A., 2021. Essential oil of *Cymbopogon citratus* cultivated in Egypt: seasonal variation in chemical composition and anticholinesterase activity. *Natural Product Research* 35, 4063–4067. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1713125>
154. Likibi, B.N., Gouollaly, T., Mabika, A.B.M., 2019. Composés carbonylés majeurs et indices physico chimiques des huiles essentielles de deux espèces du genre *Cymbopogon* (Poaceae) du CongoBrazzaville. *International Journal of Engineering and Applied Sciences (IJEAS)*.
155. Belmalha, S., Elidrissi, M., Amechrouq, A., Echchgadda, G., 2015. Caractérisation Chimique De Certaines Espèces De Thym Marocain Du Moyen Atlas (Région De Midelt) Chemical Characterization Of Some Species Of Moroccan Middle Atlas Thyme (Region Of Midelt). *Global Journal of Pure and Applied Chemistry Research* 43–52.
156. Bnina, E.B., Hammami, S., Daami-Remadi, M., Cheraif, I., Hajjlaoui, H., Jannet, H.B., Said, M.B., Mighri, Z., 2009. Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils From the Aerial Parts and Flowers of *Thymus hirtus* W. Growing in Tunisia. *Journal of Essential Oil Research* 21, 567–572. <https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700247>
157. Oukerrou, M.A., Tilaoui, M., Mouse, H.A., Leouifoudi, I., Jaafari, A., Zyad, A., 2017. Chemical composition and cytotoxic and antibacterial activities of the essential oil of *Aloysia citriodora* palau grown in Morocco. *Advances in pharmacological sciences* 2017.
158. Marin, M., Budimir, S., Janošević, D., Marin, P., Duletic, S., Grbić, M., 2008. Morphology, distribution, and histochemistry of trichomes of *Thymus lykæ* Degen & Jav. (Lamiaceae). *Archives of Biological Sciences* 60. <https://doi.org/10.2298/ABS0804667M>
159. Ekpenyong, C.E., Akpan, E., Nyoh, A., 2015. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. *Chinese journal of natural medicines* 13, 321–337.
160. Elechosa, M.A., Di Leo Lira, P., Juárez, M.A., Viturro, C.I., Heit, C.I., Molina, A.C., Martínez, A.J., López, S., Molina, A.M., van Baren, C.M., Bandoni, A.L., 2017. Essential oil chemotypes of *Aloysia citriodora* (Verbenaceae) in Northwestern Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology* 74, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2017.07.003>

Références bibliographiques

161. Toure, D., 2015. Etudes chimique et biologique des huiles Essentielles de quatre plantes Aromatiques medicinales de côte d'ivoire (Thèse). Université Felix Houphouët-Boigny, Cote d'Ivoire.
162. Benoudjit, F., Hamoudi, I., Aboulouz, A., 2022. Extraction and characterization of Essential Oil and Hydrolate obtained from an Algerian Lemongrass (*Cymbopogon citratus*). Algerian Journal of Environmental Science and Technology 8.
163. Miguel, M.G., Gago, C., Antunes, M.D., Megías, C., Cortés-Giraldo, I., Vioque, J., Lima, A.S., Figueiredo, A.C., 2015. Antioxidant and Antiproliferative Activities of the Essential Oils from *Thymbra capitata* and *Thymus* Species Grown in Portugal. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/851721>
164. Guesmi, F., Issam, S., Landoulsi, A., 2018. Scientific Studies on the Variability of Phytochemical, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils of *Thymus hirtus* sp. algeriensis. Annual Research & Review in Biology 29, 1–9. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2018/43583>
165. Radi, F., Bouhrim, M., Mechchate, H., Al-zahrani, M., Qurtam, A., Aleissa, A., Aziz, D., Hadaq, N., Touria, Z., 2021. Phytochemical Analysis, Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Thymus zygis* L. and *Thymus willdenowii* Boiss. Essential Oils. Plants 11, 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants11010015>
166. Zeghib, A., Calliste, C.-A., Simon, A., Charfeddine, R., Aouni, M., Duroux, J.-L., Kabouche, A., Kabouche, Z., 2021. Chemical composition and biological potential of *Thymus Willdenowii* Boiss. & Reut. essential oil. Nat Prod Res 35, 845–848. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1602830>
167. Fidy, K., Fiedorowicz, A., Strzdała, L., Szumny, A., 2016. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. Cancer Med 5, 3007–3017. <https://doi.org/10.1002/cam4.816>
168. Maswal, M., Dar, A.A., 2014. Formulation challenges in encapsulation and delivery of citral for improved food quality. Food Hydrocolloids 37, 182–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.035>
169. Ajayi, E.O., Sadimenko, A.P., Afolayan, A.J., 2016. Data showing chemical compositions of the essential oils of the leaves of *Cymbopogon citratus* obtained by varying pH of the extraction medium. Data in Brief 8, 599–604. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.06.019>
170. Lei, Y., Fu, P., Jun, X., Cheng, P., 2019. Pharmacological Properties of Geraniol – A Review. Planta Med 85, 48–55. <https://doi.org/10.1055/a-0750-6907>
171. Azarmi, F., Nazmieh, H., Dadpour, 2012. Growth and essential oil production of *Aloysia citriodora* L. grown in Greenhouse using soil and floating system. Journal of biological sciences.
172. Tchinda Sonwa, E., Jazet Dongmo, P.M., Tatsadjieu, N.L., Ndongson, B.D., Amvam Zollo, P.-H., Menut, C., 2009. Antifungal activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) against *Phaeoramularia angolensis*. Journal of Essential Oil Bearing Plants 12, 218–224.
173. Dongmo, P.M.J., Kuate, J., Boyom, F.F., Ducleier, D., Damesse, F., Paul Henri Amvam Zollo, Menut, C., Bessiere, J.M., 2002. Composition chimique et activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles de *Citrus* sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis*. Fruits 57, 95–104. <https://doi.org/10.1051/fruits:2002009>
174. Zeghib, A., Calliste, C.-A., Simon, A., Charfeddine, R., Aouni, M., Duroux, J.-L., Kabouche, A., Kabouche, Z., 2021. Chemical composition and biological potential of *Thymus willdenowii* Boiss. & Reut. essential oil. Natural product research 35, 845–848.
175. Radi, F.Z., Bouhrim, M., Mechchate, H., Al-Zahrani, M., Qurtam, A.A., Aleissa, A.M., Drioiche, A., Handaq, N., Zair, T., 2021. Phytochemical Analysis, Antimicrobial and Antioxidant

Références bibliographiques

- Properties of *Thymus zygis* L. and *Thymus wilddenowii* Boiss. *Essential Oils. Plants* (Basel) 11, 15. <https://doi.org/10.3390/plants11010015>
176. Lu, C., Li, H., Li, C., Chen, B., Shen, Y., 2018. Chemical composition and radical scavenging activity of *Amygdalus pedunculata* Pall leaves' essential oil. *Food and Chemical Toxicology* 119, 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.012>
177. Rashid, H.M., Mahmood, A.I., Afifi, F.U., Talib, W.H., 2022. Antioxidant and Antiproliferation Activities of Lemon Verbena (*Aloysia citrodora*): An In Vitro and In Vivo Study. *Plants* (Basel) 11, 785. <https://doi.org/10.3390/plants11060785>
178. Shalaby, E.A., Shanab, S.M.M., 2013. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *NISCAIR-CSIR, India* 556–564.
179. Bakirci, I., 1999. The effects of some herbs on the activities of thermophilic dairy cultures. *Nahrung* 43, 333–335. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3803\(19991001\)43:5<333::AID-FOOD333>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3803(19991001)43:5<333::AID-FOOD333>3.0.CO;2-T)
180. Shipradeep, U., Karmakar, S., Sahay Khare, R., Ojha, S., Kundu, S., Kundu, K., 2012. Development of Probiotic Candidate in Combination with Essential Oils from Medicinal Plant and Their Effect on Enteric Pathogens: A Review. *Gastroenterology Research and Practice* 2012, e457150. <https://doi.org/10.1155/2012/457150>
181. Shipradeep, U., Karmakar, S., Sahay Khare, R., Ojha, S., Kundu, S., Kundu, K., 2012. Development of Probiotic Candidate in Combination with Essential Oils from Medicinal Plant and Their Effect on Enteric Pathogens: A Review. *Gastroenterology Research and Practice* 2012, e457150. <https://doi.org/10.1155/2012/457150>
182. Man, A., Santacroce, L., Jacob, R., Mare, A., Man, L., 2019. Antimicrobial Activity of Six Essential Oils Against a Group of Human Pathogens: A Comparative Study. *Pathogens* 8, 15. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010015>
183. Oussalah, M., 2004. L'effet antimicrobien des films biodégradables à base d'huiles essentielles et le mécanisme d'action de trois huiles essentielles sur les bactéries Gram positifs et Gram négatifs (Thèse). Université du Québec.
184. Koga, T., Kawada, H., Utsui, Y., Domon, H., Ishii, C., Yasuda, H., 1996. Bactericidal effect of plaunotol, a cytoprotective antiulcer agent, against *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 38, 387–397. <https://doi.org/10.1093/jac/38.3.387>
185. Slaughter, L.L., 2013. Antilisterial Characteristics of Volatile Essential Oils (Thèse). University of Kentucky.
186. Mekonnen, M., Wariyo, A., Hilu, G., 2019. Antifungal Activities of Some Essential Oils Against *Fusarium oxysporum* of Rosemary and Sage Plants. *Adv Crop Sci Tech* 07. <https://doi.org/10.4172/2329-8863.1000419>
187. Silva, C., Guterres, S., Weisheimer, V., Schapoval, E., 2008. Antifungal activity of the Lemon grass oil and citral against *Candida* spp. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 12, 63–6. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702008000100014>
188. Mabrouk, H., Mechria, H., Mechri, A., Rahali, H., Douki, W., Gaha, L., Fadhel Najjar, M., 2011. Butyrylcholinesterase activity in schizophrenic patients. *Annales de biologie clinique* 69, 647–652. <https://doi.org/10.1684/abc.2011.0634>
189. Mata, A.T., Proença, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Araújo, M.E.M., 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry* 103, 778–786. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.017>

Références bibliographiques

190. Abuhamdah, S., Abuhamdah, R., Howes, M.-J.R., Al-Olimat, S., Ennaceur, A., Chazot, P.L., 2015. Pharmacological and neuroprotective profile of an essential oil derived from leaves of *Aloysia citrodora* Palau. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 67, 1306–1315. <https://doi.org/10.1111/jphp.12424>
191. Olech, Z., Zaborska, W., Kot, M., 2014. Jack bean urease inhibition by crude juices of *Allium* and *Brassica* plants. Determination of thiosulfates. *Food Chemistry* 145, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.044>
192. Ledezma, J.C.R., Vázquez, J.R., Hernández, E.G.O., Rembao, L.O.A., Islas, J.A.P., García, E.A.B., Cruz, Y.J.G., 2022. Effect of Lemon Oil Concentrate *Cymbopogon citratus* ERILIM® towards the *Helicobacter pylori* Bacteria: A Case Report. *EJMP* 10–15. <https://doi.org/10.9734/ejmp/2022/v33i730477>
193. Goetz, P., 2007. Phytothérapie du diabète. *Phytothérapie* 5, 212–217. <https://doi.org/10.1007/s10298-007-0255-1>
194. Adeneye, A.A., Agbaje, E.O., 2007. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.034>
195. Dessalegn, E., Bultosa, G., 2019. Evaluation of In vitro Antidiabetic Potential of *Thymus schimperii* R. and *Thymus vulgaris* L. *Journal of Health, Medicine and Nursing*.
196. Satooka, H., Kubo, I., 2011. Effects of Thymol on Mushroom Tyrosinase-Catalyzed Melanin Formation [WWW Document]. ACS Publications. <https://doi.org/10.1021/jf2014149>
197. Ceylan, R., Zengin, G., Uysal, S., Ilhan, V., Aktumsek, A., Kandemir, A., Anwar, F., 2016. GC-MS analysis and *in vitro* antioxidant and enzyme inhibitory activities of essential oil from aerial parts of endemic *Thymus spathulifolius* Hausskn. et Velen. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31, 983–990. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1077822>
198. Saeio, K., Yotsawimonwat, S., Anuchapreeda, S., Okonogi, S., 2011. Development of microemulsion of a potent anti-tyrosinase essential oil of an edible plant. *DD&T* 5, 246–252. <https://doi.org/10.5582/ddt.2011.v5.5.246>
199. Matsuura, R., Ukeda, H., Sawamura, M., 2006. Tyrosinase Inhibitory Activity of Citrus Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2309–2313. <https://doi.org/10.1021/jf051682i>
200. Capetti, F., Tacchini, M., Marengo, A., Cagliero, C., Bicchi, C., Rubiolo, P., Sgorbini, B., 2021. Citral-Containing Essential Oils as Potential Tyrosinase Inhibitors: A Bio-Guided Fractionation Approach. *Plants (Basel)* 10, 969. <https://doi.org/10.3390/plants10050969>
201. Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., McLaughlin, J., 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Med* 45, 31–34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
202. Niksic, H., Becic, F., Koric, E., Gusic, I., Omeragic, E., Muratovic, S., Miladinovic, B., Duric, K., 2021. Cytotoxicity screening of *Thymus vulgaris* L. essential oil in brine shrimp nauplii and cancer cell lines. *Sci Rep* 11, 13178. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92679-x>
203. Kaska, A., 2019. Cytotoxic Activities on Selected Lamiaceae Species from Turkey by Brine Shrimp Lethality Bioassay. *Ordu University Journal of Science and Technology*.
204. Mendes Hacke, A.C., Miyoshi, E., Marques, J.A., Pereira, R.P., 2020. Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Ethnopharmacology* 260, 113036. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113036>
205. Werdin González, J.O., Gutiérrez, M.M., Murray, A.P., Ferrero, A.A., 2010. Biological activity of essential oils from *Aloysia polystachya* and *Aloysia citrodora* (Verbenaceae) against the soybean pest *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Nat Prod Commun* 5, 301–306.

Références bibliographiques

206. Otaibi, M., Al dameerdash, H., 2008. Improvement of the quality and shelf concentrated yoghurt (labneh) by the addition essential oils. *African Journal of Microbiology Research*.
207. Moritz, C.M.F., Rall, V.L.M., Saeki, M.J., 2012. Inhibitory effect of essential oils against *Lactobacillus rhamnosus* and starter culture in fermented milk during its shelf-life period. *Brazilian Journal of Microbiology*.
208. Dave, R.I., Shah, N.P., 1998. Ingredient Supplementation Effects on Viability of Probiotic Bacteria in Yogurt. *Journal of Dairy Science* 81, 2804–2816. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75839-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75839-4)
209. Singh, G., Kapoor, I.P.S., Singh, P., 2011. Effect of volatile oil and oleoresin of anise on the shelf life of yogurt. *Journal of Food Processing and Preservation* 35, 778–783.
210. Joung, J.Y., Lee, J.Y., Ha, Y.S., Shin, Y.K., Kim, Y., Kim, S.H., Oh, N.S., 2016. Enhanced Microbial, Functional and Sensory Properties of Herbal Yogurt Fermented with Korean Traditional Plant Extracts. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 36, 90–99. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.1.90>
211. Fessard, A., 2017. Recherche de bactéries lactiques autochtones capables de mener la fermentation de fruits tropicaux avec une augmentation de l'activité antioxydante (Thèse). Université de la Réunion.
212. Fardet, A., Rock, E., 2018. *In vitro* and *in vivo* antioxidant potential of milks, yoghurts, fermented milks and cheeses: a narrative review of evidence. *Nutr. Res. Rev.* 31, 52–70. <https://doi.org/10.1017/S0954422417000191>
213. Anand, S., Gaare, M., Saini, P., Beniwal, A., Ram Grover, C., 2018. Synbiotic Yogurt Supplemented with *Ocimum sanctum* Essential Oil. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 7, 1250–1262. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.703.148>
214. Yangilar, F., Yildiz, P.O., 2018. Effects of using combined essential oils on quality parameters of bio-yogurt. *J Food Process Preserv* 42, e13332. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13332>
215. Mehdizadeh, T., Mojaddar Langroodi, A., Shakouri, R., Khorshidi, S., 2019. Physicochemical, microbiological, and sensory characteristics of probiotic yogurt enhanced with *Anethum graveolens* essential oil. *Journal of food safety* 39, e12683.
216. Nazari, M., Ghanbarzadeh, B., Samadi Kafil, H., Zeinali, M., Hamishehkar, H., 2019. Garlic essential oil nanophytosomes as a natural food preservative: Its application in yogurt as food model. *Colloid and Interface Science Communications* 30, 100176. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2019.100176>
217. Mahmmodi, P., Khoshkhoo, Z., Basti, A.A., Shotorbani, P.M., Khanjari, A., 2021. Effect of *Bunium persicum* essential oil, NaCl, Bile Salts, and their combinations on the viability of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic yogurt. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* 13, 37–48.
218. Amirdivani, S., Baba, A.S., 2011. Changes in yogurt fermentation characteristics, and antioxidant potential and *in vitro* inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. *LWT - Food Science and Technology* 44, 1458–1464. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.01.019>
219. Azizkhani, M., Parsaeimehr, M., 2018. Probiotics survival, antioxidant activity and sensory properties of yogurt flavored with herbal essential oils. *International Food Research Journal* 25.
220. Azizkhani, M., Parsaeimer, M., 2018. Azizkhani. *International Food Research Journal* 921–927.
221. Tizghadam, P., Roufegari-nejad, L., Asefi, N., Jafarian Asl, P., 2021. Physicochemical characteristics and antioxidant capacity of set yogurt fortified with dill (*Anethume graveolens*) extract. *Journal of Food Measurement and Characterization* 15, 3088–3095.

Références bibliographiques

222. Fessard, A., 2017. Recherche de bactéries lactiques autochtones capables de mener la fermentation de fruits tropicaux avec une augmentation de l'activité antioxydante (Thèse). Université de la Réunion.
223. Kanatt, S.R., Chander, R., Sharma, A., 2007. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb mea. *Food Chem* 100, 451–458.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.066>
224. Lee, W.J., Lucey, J.A., 2010. Formation and Physical Properties of Yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 23, 1127–1136. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.r.05>
225. Xing, J., Wang, G., Zhang, Q., Liu, X., Gu, Z., Zhang, H., Chen, Y.Q., Chen, W., 2015. Determining Antioxidant Activities of Lactobacilli Cell-Free Supernatants by Cellular Antioxidant Assay: A Comparison with Traditional Methods. *PLoS ONE* 10, e0119058.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119058>
226. Kim, S., Lee, J.Y., Jeong, Y., Kang, C.-H., 2022. Antioxidant Activity and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria. *Fermentation* 8, 29. <https://doi.org/10.3390/fermentation8010029>
227. Stecchini, M.L., Del Torre, M., Munari, M., 2001. Determination of peroxy radical-scavenging of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 64, 183–188.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00456-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00456-6)
228. Leroy, F., De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15, 67–78.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
229. Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., de las Rivas, B., de Felipe, F.L., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J.M., Muñoz, R., 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 132, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.025>
230. Zheng, S., He, Z., He, L., Li, C., Tao, H., Wang, X., Zeng, X., 2022. Influence of adding Perilla seed oil on potato blueberry yogurt quality during storage at 4 °C. *LWT* 168, 113921.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113921>
231. Auclair, J.E., Portmann, A., 1959. Influence du chauffage du lait sur le développement des bactéries. Effet stimulant du lait autoclavé sur la croissance de *Lactobacillus lactis*. Role de l'acide formique. *Le Lait* 39, 496–519.
232. Kang, S.-S., Kim, M.K., Kim, Y.-J., 2019. Comprehensive Evaluation of Microbiological and Physicochemical Properties of Commercial Drinking Yogurts in Korea. *Food Sci Anim Resour* 39, 820–830. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e72>
233. Raynaud, S., 2006. Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. (Thèse). L'institut national des sciences appliquées de toulouse, Toulouse.
234. Adebo, O.A., Medina-Meza, G., 2020. Impact of Fermentation on the Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Whole Cereal Grains: A Mini Review. *Molecules* 25, 927.
<https://doi.org/10.3390/molecules25040927>
235. Souza, R.L. de, Dantas, A.G.B., Melo, C. de O., Felício, I.M., Oliveira, E.E., 2022. Nanotechnology as a tool to improve the biological activity of carvacrol: A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 76, 103834. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103834>
236. Fritsch, C., Heinrich, V., Vogel, R.F., Toelstede, S., 2016. Phenolic acid degradation potential and growth behavior of lactic acid bacteria in sunflower substrates. *Food Microbiology* 57, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.03.003>
237. Arslan, S., Bayrakçı, S., 2016. Physicochemical, functional, and sensory properties of yogurts containing persimmon. *Turk J Agric For* 40, 68–74. <https://doi.org/10.3906/tar-1406-150>

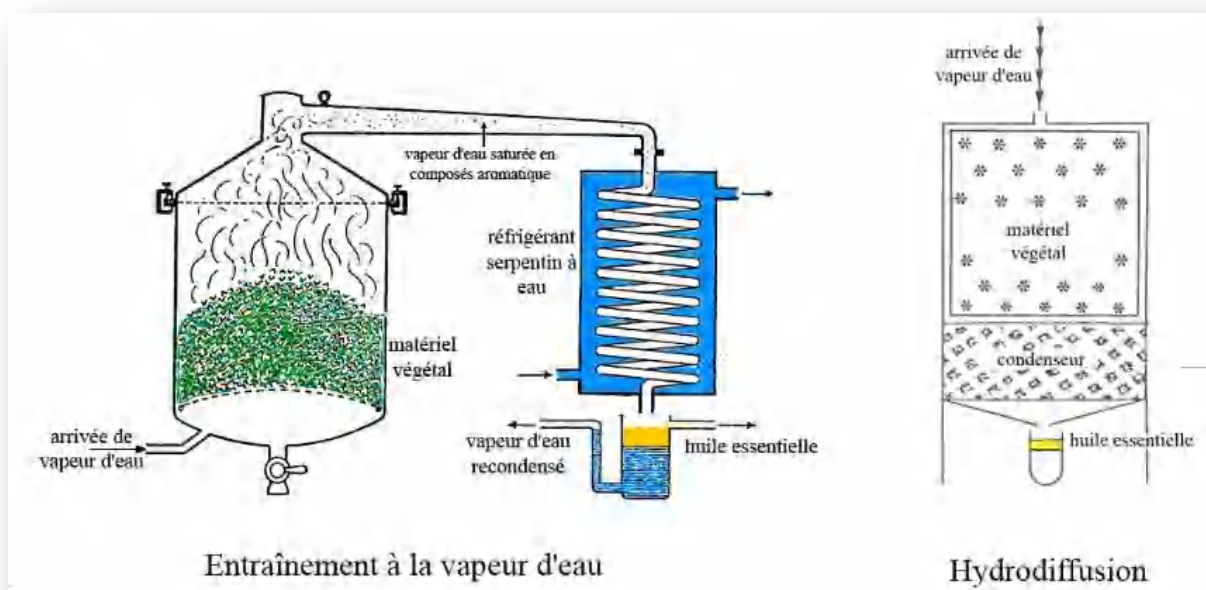
Références bibliographiques

238. Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Kataranovski, D., Marin, P.D., Vukojević, J., Brkić, D., 2008. Antifungal Activity of the Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and Thymol on Experimentally Induced Dermatomycoses. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 34, 1388–1393. <https://doi.org/10.1080/03639040802130053>
239. Biesiekierski, J.R., Jalanka, J., Staudacher, H.M., 2019. Can Gut Microbiota Composition Predict Response to Dietary Treatments? *Nutrients* 11, 1134. <https://doi.org/10.3390/nu11051134>
240. Yala, J.-F., Mabika, R.M., Camara, B., Tuo, S., Souza, A., Lepengue, A.N., Koné, D., M'batchi, B., 2017. Assessment of the antibacterial activity of four essential oils and the biobactericide Neco. *ijpm* 9, 443. <https://doi.org/10.5138/09750185.2106>
241. M, Ranitha., H. Nour, Dr.A., Sulaiman, Z.A., H. Nour, A., Raj. S, T., 2014. Comparison of Chemical Composition and Toxicity of Essential Oils from Lemongrass (*Cymbopogon Citratus*) Extracted with Microwave-Assisted Hydrodistillation (MAH) and Conventional Hydrodistillation (HD) Methods. *JNS* 1, 10–15. <https://doi.org/10.24297/jns.v1i1.380>
242. Guinoiseau, E., 2011. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action (Thèse). Université de Corse, 2010.
243. Chebaibi, A., Marouf, Z., Rhazi-Filali, F., Fahim, M., Ed-Dra, A., 2016. Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytothérapie* 14, 355–362. <https://doi.org/10.1007/s10298-015-0996-1>
244. Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S., 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med* 6, 39. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-39>
245. <http://www.homejardin.com/citronnelle/cymbopogon-citratus.html>. Consultée le 11/06/2023
246. <https://www.teline.fr/en/photos/lamiaceae/thymus-willdenowii>. Consulté le 11/06/2023
247. <https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=291522>. Consulté le 11/06/2023.
248. <https://www.pranarom.be/fr/content/15-la-distillation-des-huiles-essentielles>. Consulté le 16/04/2022.

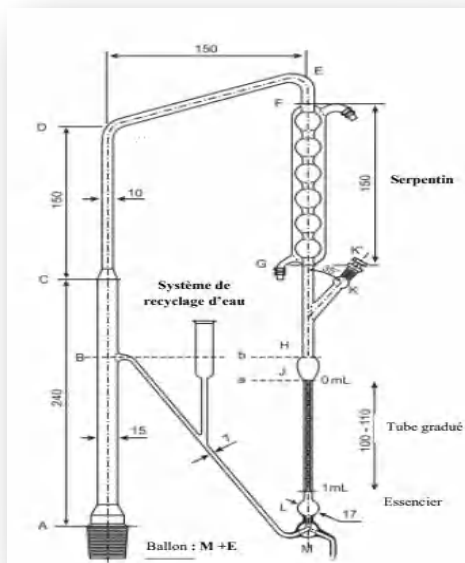
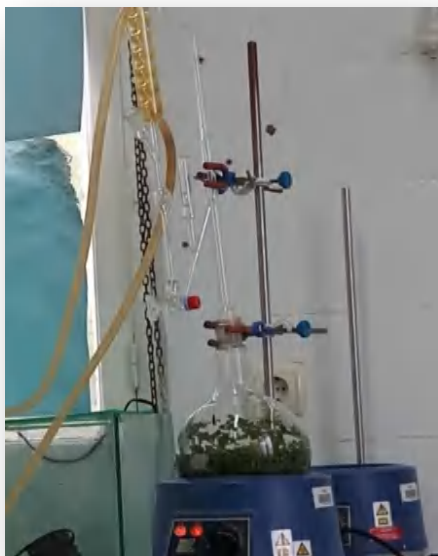
Annexe 1. La répartition géographique des ZIP (Sahi, 2016).



Annexe 2.a : Extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau et hydrodiffusion



Annexe 2.b : Dispositif du cleven=ger

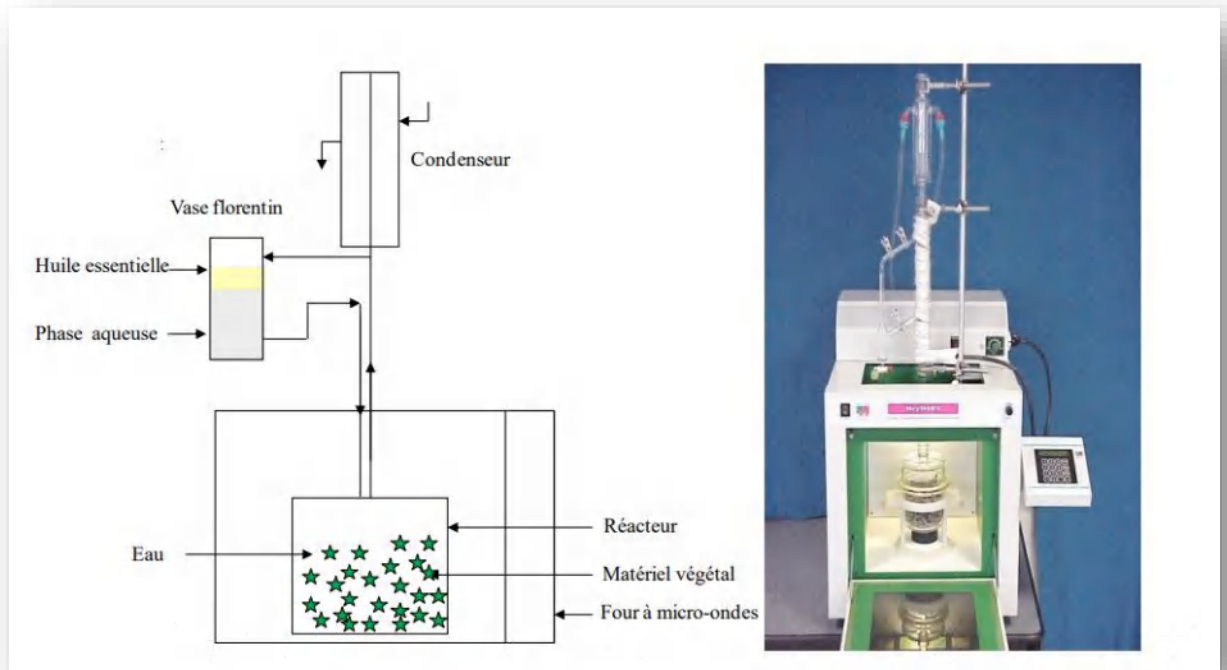


Annexe 2.c : Extraction par expression à froid

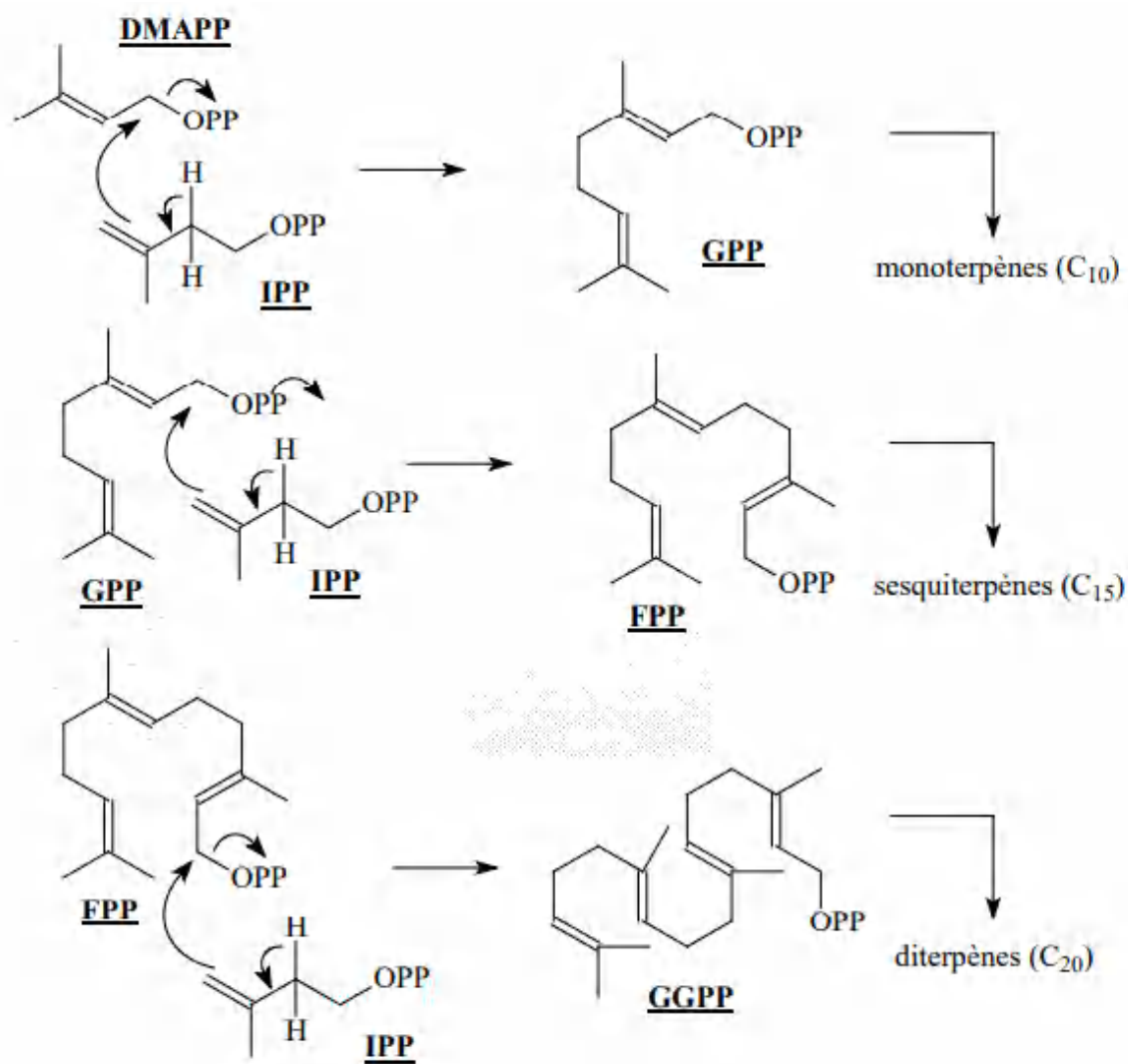
<https://www.pranarom.be/fr/content/15-la-distillation-des-huiles-essentielles>



Annexe 2.d : Extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME) (Farhat, 2010)



Annexe 3.a : Schéma de condensation du motif isoprénique

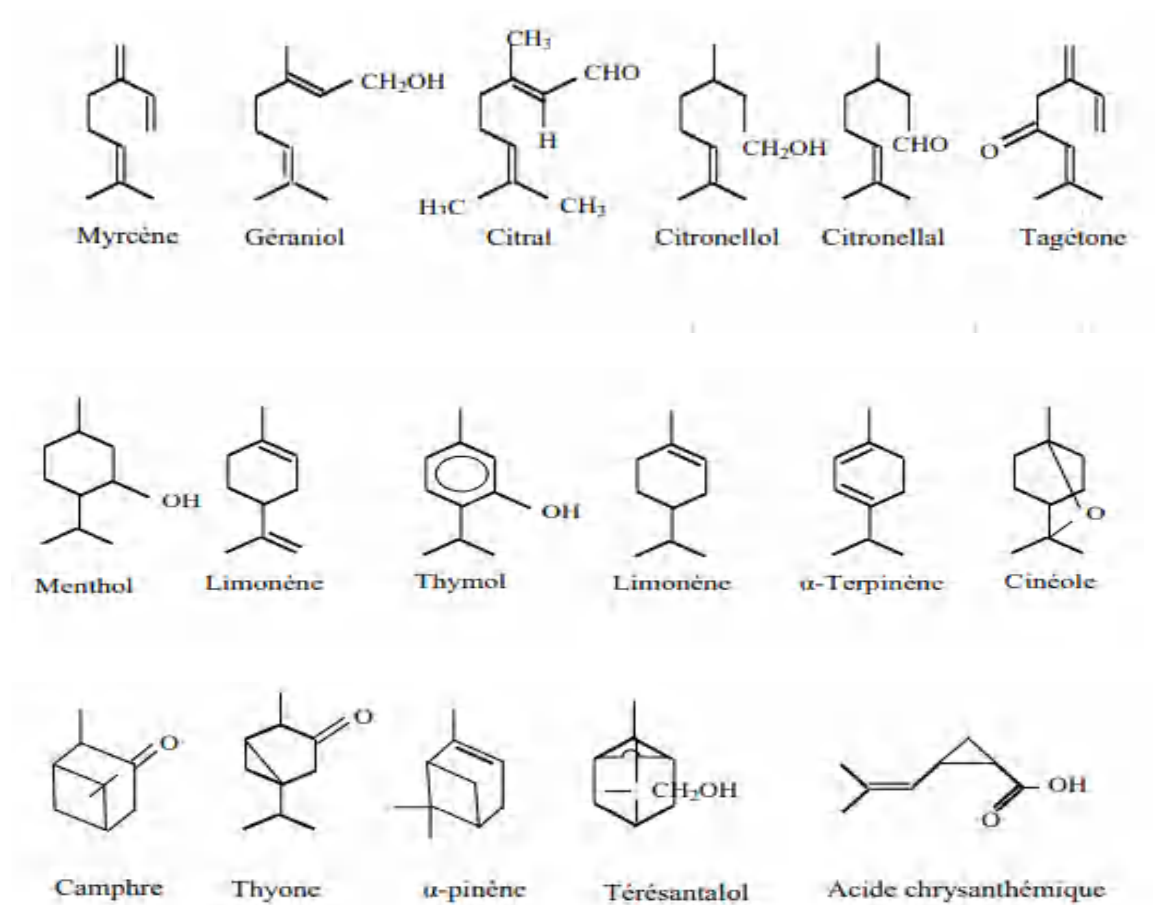


$C_{20} + C_5 \longrightarrow$ sesterpènes (C₂₅)

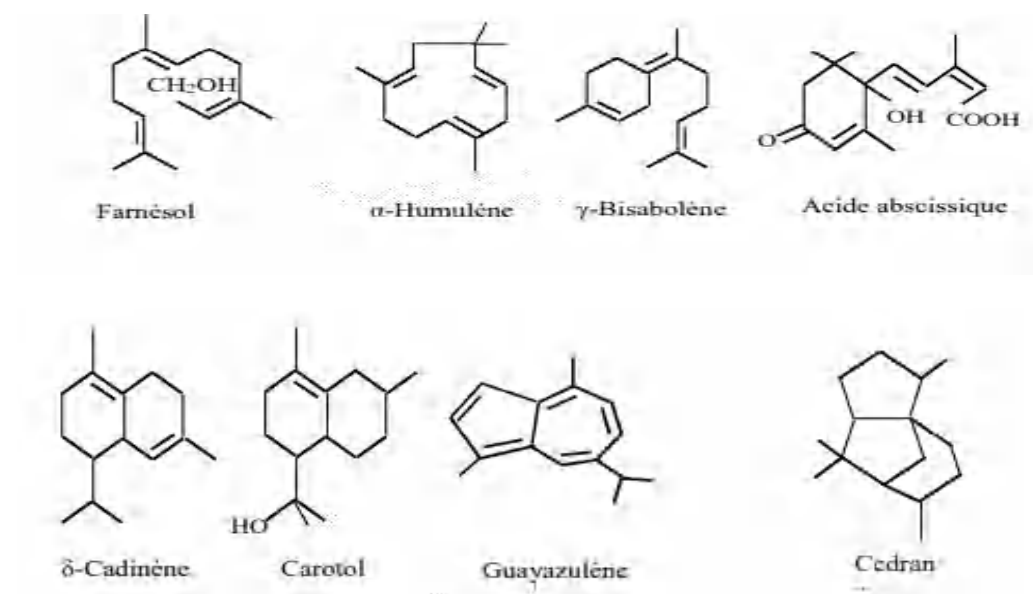
$C_{15} + C_{15} \longrightarrow$ triterpènes et stéroïdes (C₃₀)

$C_{20} + C_{20} \longrightarrow$ tétraterpènes ou caroténoïdes (C₄₀)

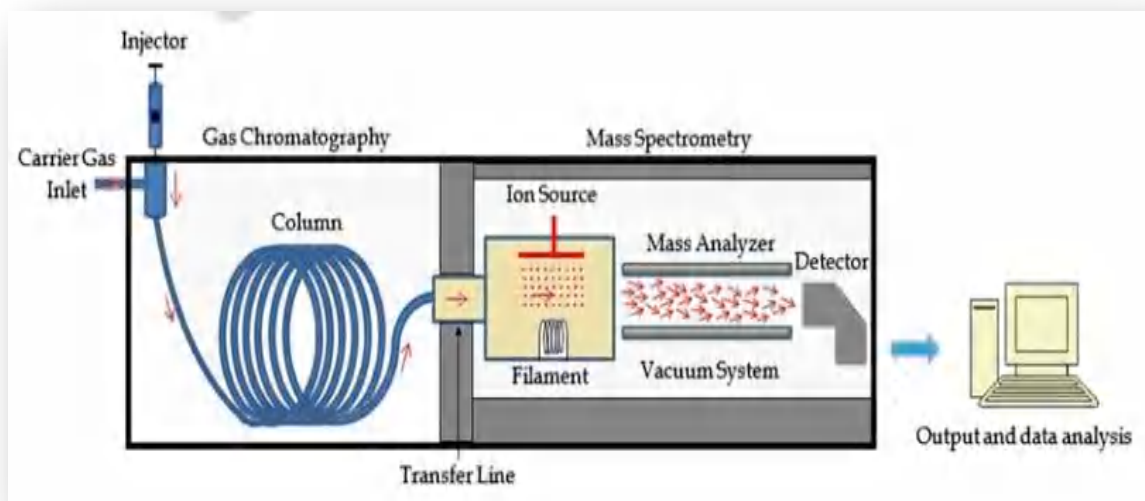
Annexe 3.b : Quelques exemples des monoterpènes



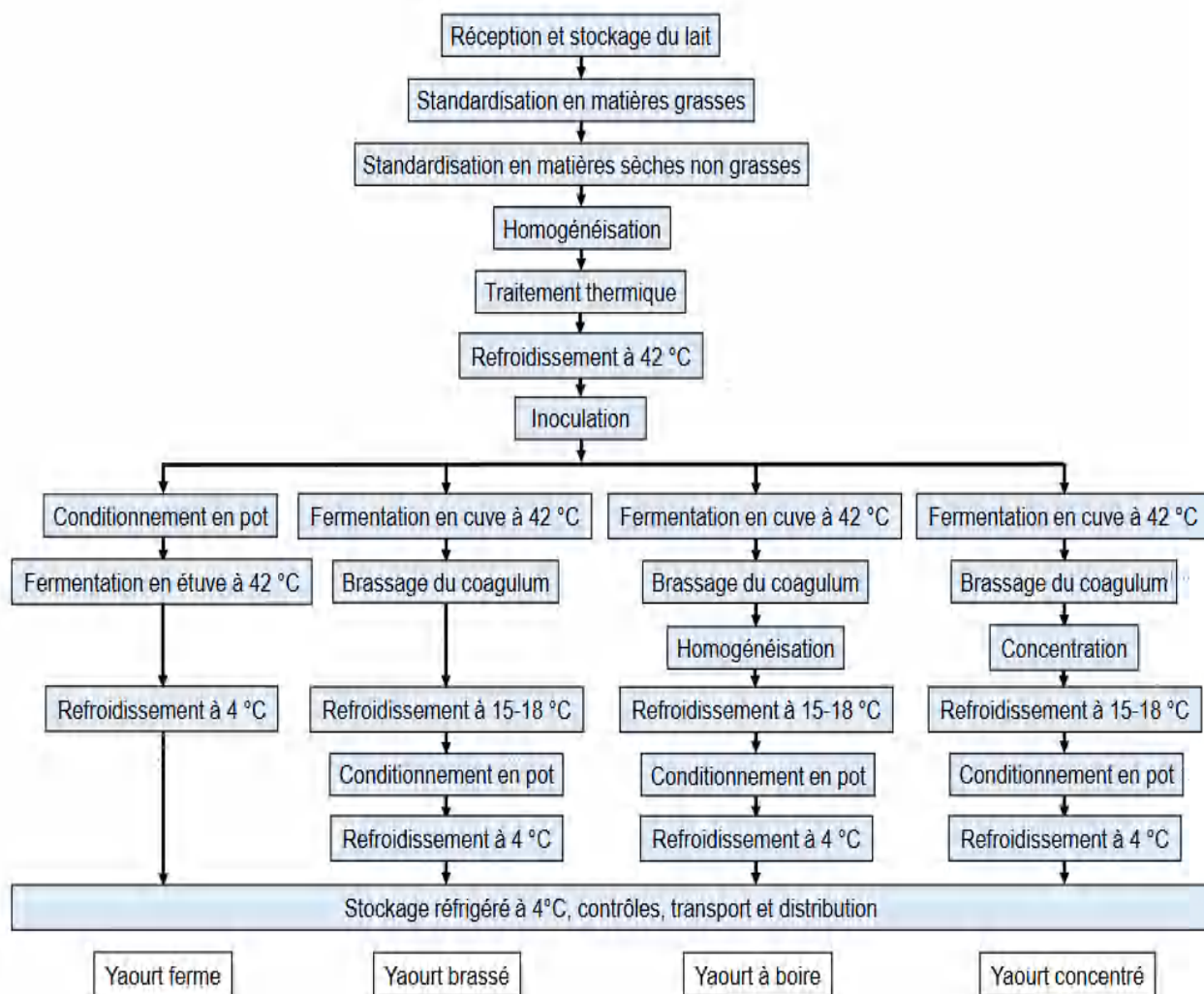
Annexe 3.c : Quelques exemples de sesquiterpènes



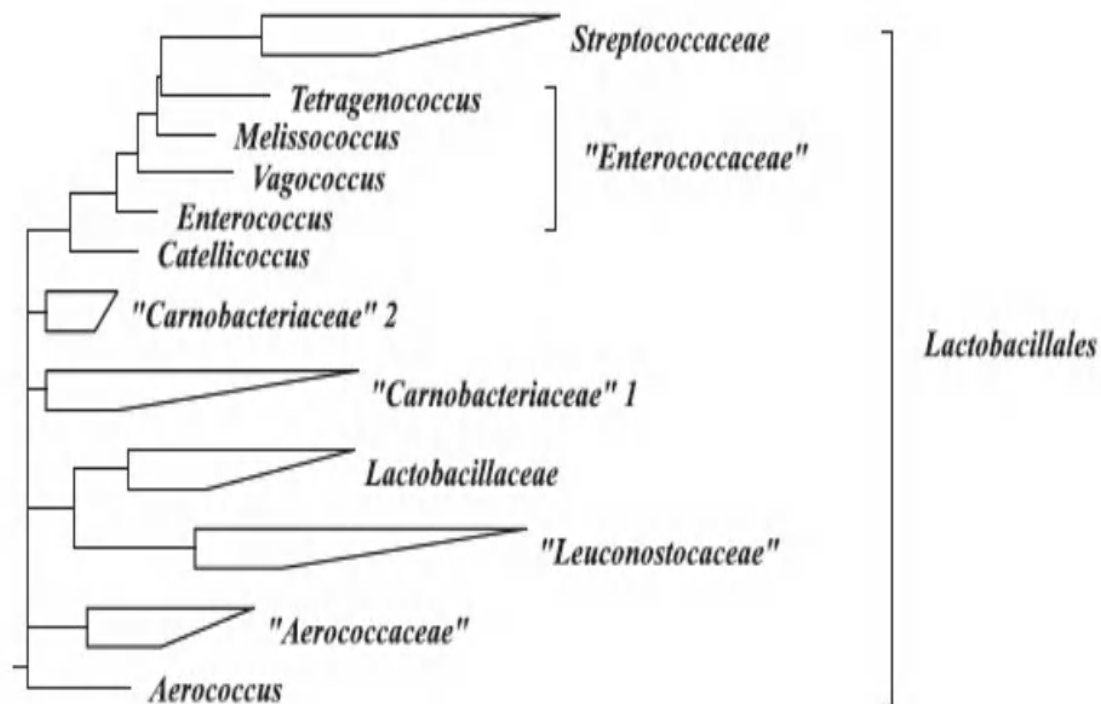
Annexe 4 : Représentation schématique des principaux composants des instruments GC-MS



Annexe 5 : Diagramme de fabrication du yaourt



Annexe 6 : Dendrogramme reflétant des relations phylogénétiques de l'ordre "Lactobacillales" (Belkheir, 2017)



Annexe 7 : Formulaire de l'enquête

Enquête sur les plantes médicinales en Algérie

Enquête sur l'usage alimentaire de trois plantes aromatiques (le thym, la verveine et la citronnelle)

[Connectez-vous à Google](#) pour enregistrer votre progression. En savoir plus

*** Indique une question obligatoire**

Adresse e-mail*

Votre adresse e-mail

Informations personnelles

Homme

Femme

Age

20 - 30

31 - 40

41 - 50

51 - 60

> 60

Résidence (wilaya et commune)

Votre réponse

Niveau d'instruction

illettré

primaire

moyen

secondaire

universitaire

Renseignements sur les plantes aromatiques à usage alimentaire. est ce que vous connaissez **les plantes aromatiques**

oui

Non

est ce que vous connaissez le **THYM**

oui

Non

Annexes

Si oui est ce qu'il y a d'autres appellations dans votre région ?

Votre réponse

Si oui, comment connaissez-vous le thym par?

sa morphologie

son arôme

Saison de sa collecte

Lieu de sa collecte

autres

Par quels moyens, obtenez-vous cette plante ?

Achetée auprès d'un herboriste

Achetée dans les marchés populaires (Elsouk)

Achetée dans les superettes

autres

Est-ce que vous l'utilisez dans le domaine alimentaire ou dans la préparation de boisson ?

oui

non

Si oui, à quelles fins ?

aromatisation

conservation

texturation

effet santé

autres

Quelles sont les parties utilisées ?

Racine

tige

feuilles

fleurs

Comment avez-vous appris l'utilisation de cette plante dans le domaine alimentaire

par tradition

découverte au hasard

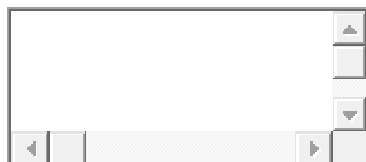
conseillée par un herboriste

Annexes

Autres

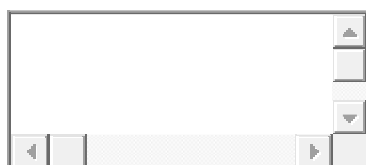
Est-ce qu'il y'a des exemples d'aliments ou boissons où vous incorporez la **partie végétative** du thym?

Votre réponse



Est-ce qu'il y'a d'exemples d'aliment ou boisson où vous incorporez **les huiles essentielles** du thym ?

Votre réponse



La Verveine. Est-ce que vous connaissez la verveine?

oui

Non

si oui, est ce qu'il y a d'autres appellations dans votre région ?

Votre réponse



comment connaissez-vous la verveine par?

sa morphologie

son arôme

Saison de sa collecte

Lieu de sa collecte

autres

Par quels moyens, obtenez-vous cette plante ?

Achetée auprès d'un herboriste

Achetée dans les marchés populaires (Elsouk)

Achetée dans les superettes

Autres

Par quels moyens, obtenez-vous cette plante ?

Achetée auprès d'un herboriste

Annexes

Achetée dans les marchés populaires (Elsouk)

Achetée dans les superettes

Autres

Est-ce que vous l'utilisez dans le domaine alimentaire ou dans la préparation de boisson ?

oui

non

Si oui, à quelles fins ?

Aromatisation

Conservation

Texturation

Effet santé

Autres

Quelles sont les parties utilisées ?

Racine

tige

feuilles

fleurs

Autres

Quelles sont les parties utilisées ?

Comment avez-vous appris l'utilisation de cette plante dans le domaine alimentaire

par tradition

découverte au hasard

conseillée par un herboriste

Autres

Est-ce qu'il y'a d'exemples d'aliment ou boisson où vous incorporez les huiles essentielles du VERVEINE ?

Votre réponse

La citronnelle. Est-ce que vous connaissez la plante CITRONNELLE?

oui

Non

si oui, est ce qu'il y a d'autres appellations dans votre région ?

Annexes

Votre réponse

comment connaissez-vous la citronnelle ? par?

sa morphologie

son arôme

Saison de sa collecte

Lieu de sa collecte

autres

Par quels moyens, obtenez-vous cette plante ?

Achetée auprès d'un herboriste

Achetée dans les marchés populaires (Elsouk)

Achetée dans les superettes

Autres

Est-ce que vous l'utilisez dans le domaine alimentaire ou dans la préparation de boisson ?

oui

non

Si oui, à quelles fins ?

Aromatisation

Conservation

Texturation

Effet santé

Autres

Quelles sont les parties utilisées ?

Racine

tige

feuilles

fleurs

Autres

Comment avez-vous appris l'utilisation de cette plante dans le domaine alimentaire par tradition

découverte au hasard

conseillée par un herboriste

Annexes

Autres

Est-ce qu'il y'a des exemples d'aliments ou boissons où vous utilisez les huiles essentielles de la **citronnelle**?

Votre réponse

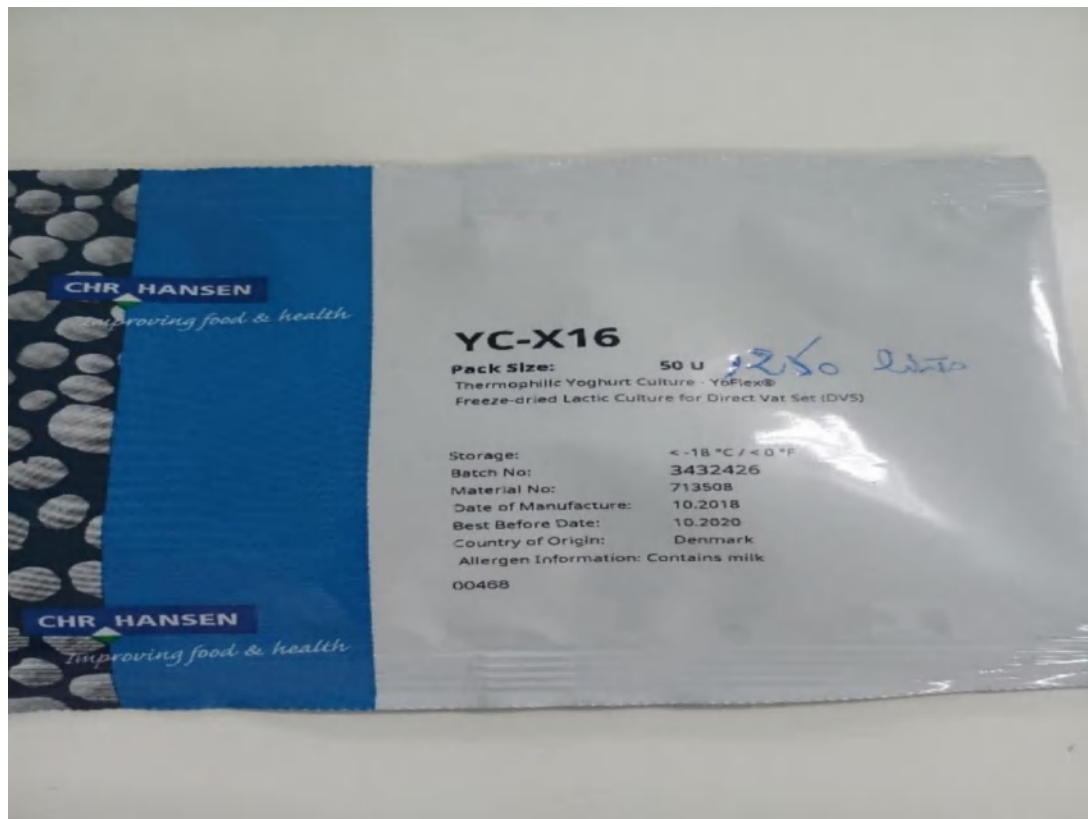


Envoyer

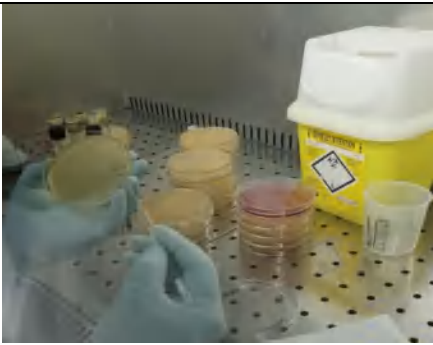
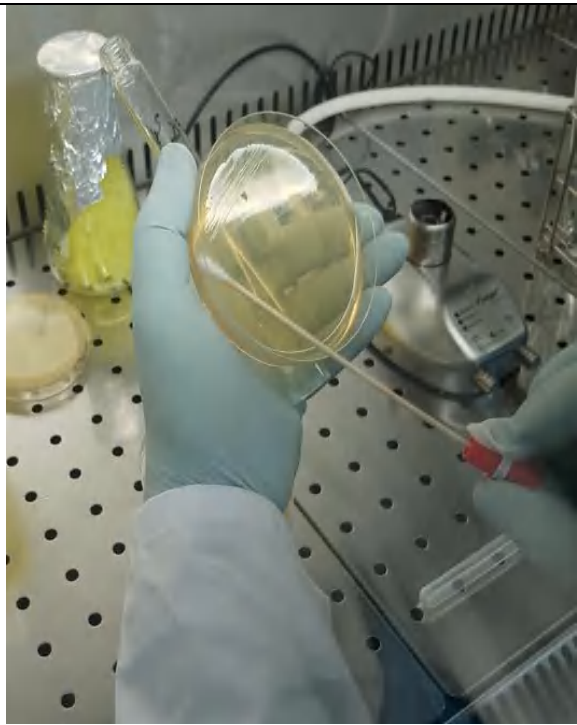
[Effacer le formulaire](#)

Annexes

Annexe 8. Ferments lactiques (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*)



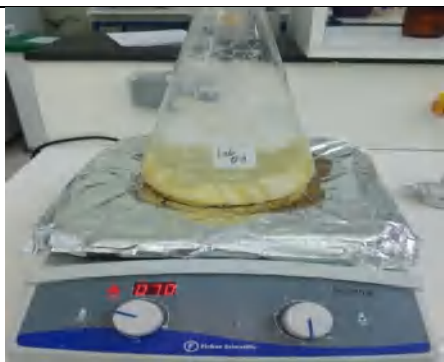
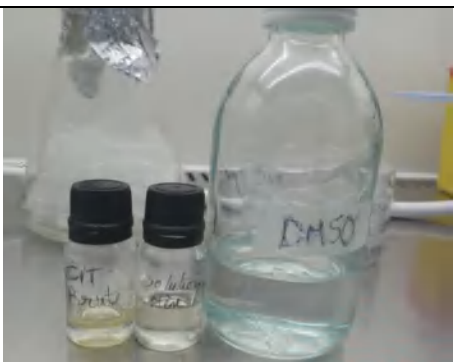
Annexe 9. Protocole de l'activité antibactérienne des HEs

	 
Préparation des boîte de Pétri coulées avec gélose MH	Préparation des suspensions bactériennes
 	
Standardisation des suspensions bactériennes à 10^8 bactéries /mL	Ensemencement par écouvillonnage

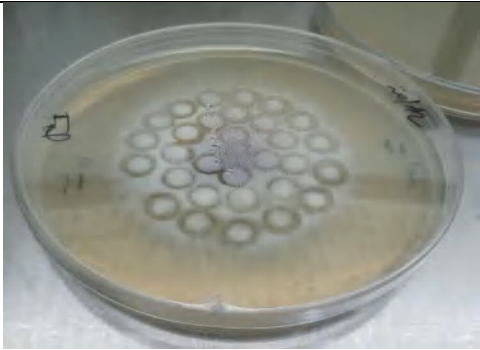
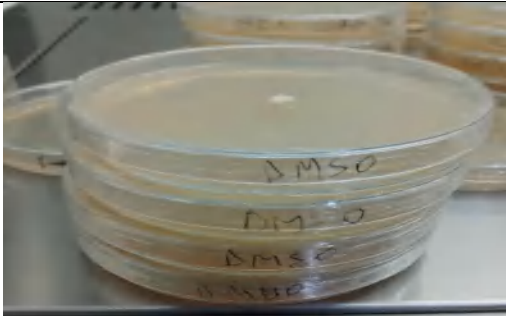
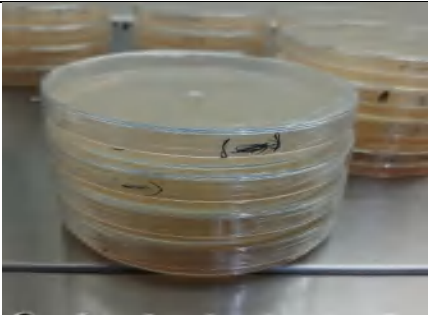
Annexes

	
Dépôt des disques de papier Wattman	Incubation à 37°C pendant 18h à 24h

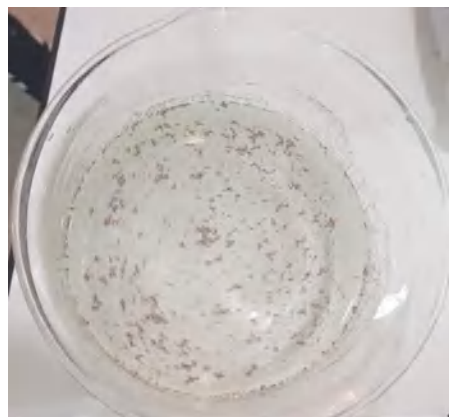
Annexe 10. Protocole de l'activité antifongique

	
Préparation du milieu PDA	Préparation des dilutions d'huiles essentielles
	
Incorporation des dilutions dans 100mL de PDA	Préparations des disques de champignon

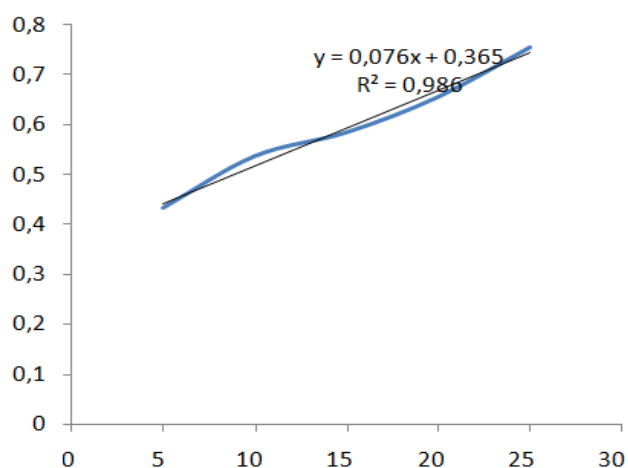
Annexes

	
Disques du champignon	Dépôt du disque au centre de la gélose
	
Témoin DMSO	Témoin négatif (gélose dans huile essentielle)
	
Quatre répétitions pour chaque dilution	Incubation à 30°C à l'étuve pendant 7 jours
	
Mesure du diamètre d'inhibition et calcul du pourcentage d'inhibition	

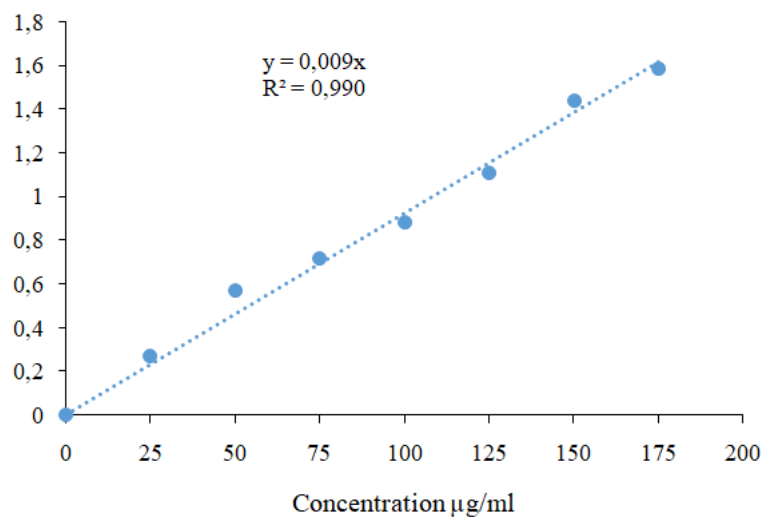
Annexe 11. Larves d'*Artemia salina* utilisées pour le test de cytotoxicité



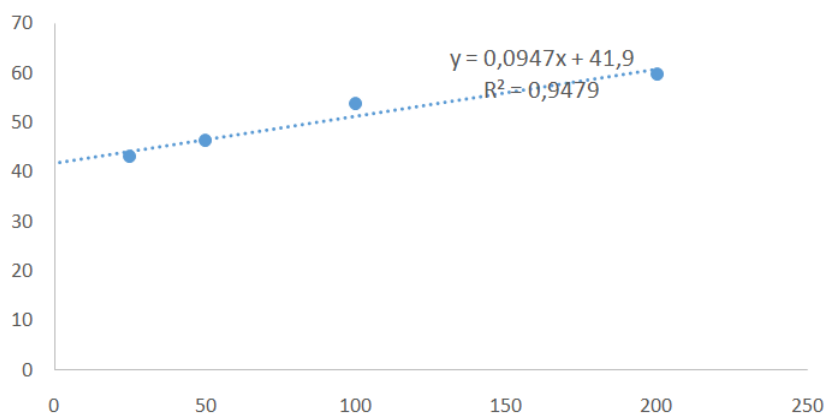
Annexe 12.a : Courbe d'étalonnage Trolox pour test ABTS yaourt



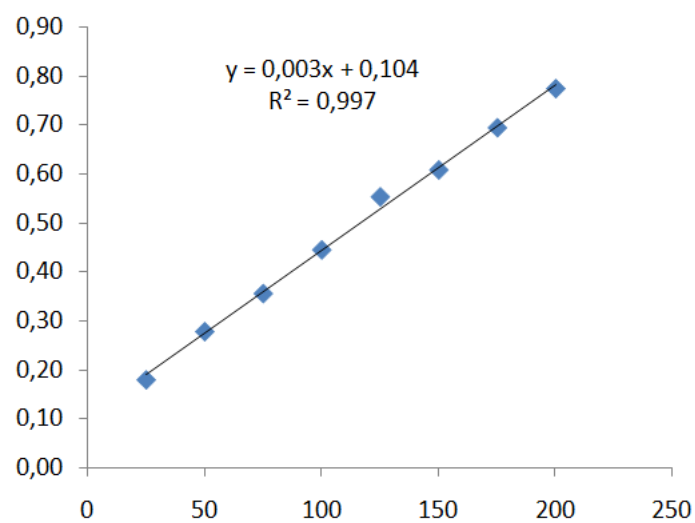
Annexe 12.b : Courbe d'étalonnage Trolox pour test CUPRAC yaourt



Annexe 12.c : Courbe d'étalonnage Trolox pour test ORAC yaourt



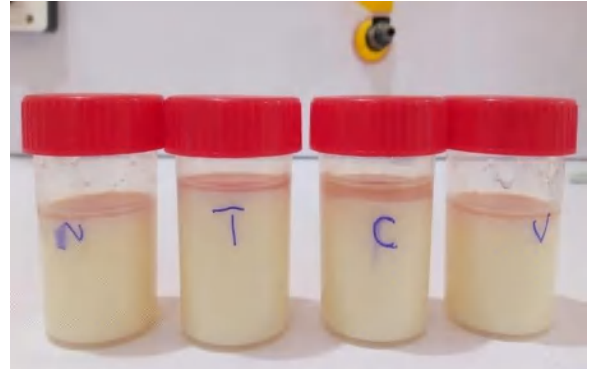
Annexe 12.d : Courbe d'étalonnage Acide gallique pour le test de Composés phénoliques



Annexe 13. Dispositif de l'HPLC



Annexe 14 : Dispositif de l'analyse sensorielle



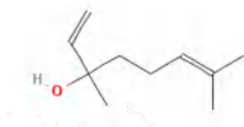
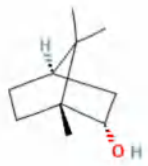
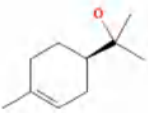
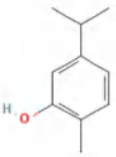
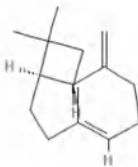
N : yaourt non incorporé

T : yaourt incorporé de l'HE de *T. willdenowii*

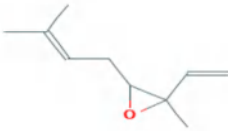
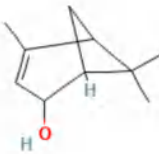
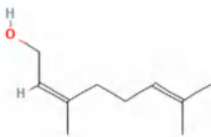
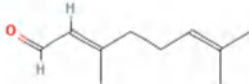
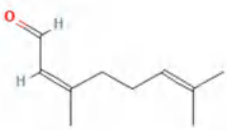
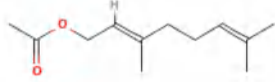
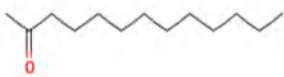
C : yaourt incorporé de l'HE de *C. citratus*

V : yaourt incorporé de l'HE de *A. citriodora*

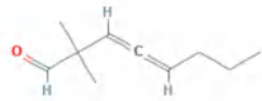
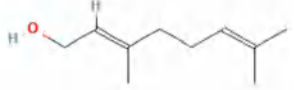
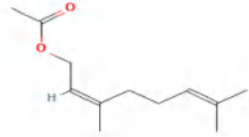
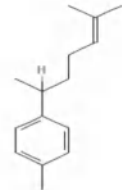
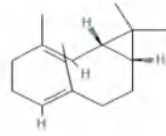
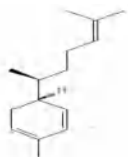
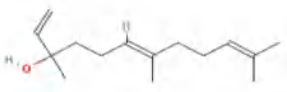
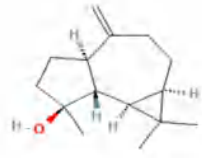
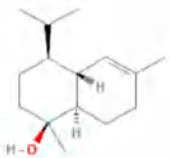
Annexe 15.a. Structure chimique des composés de l'HE de thym

Composé chimique	Formule chimique
Linalool L	
Endo-Borneol	
α -terpineol	
Lynalyl acetate	
Carvacrol	
Caryophyllene	

Annexe 15.a. Structure chimique des composés de l'HE de citronnelle

Composé chimique	Formule chimique
Cis epoxyocimene	
Verbenol	
Terpineol	
Nerol	
E-citral (géraniol)	
Z-citral (néral)	
Geranylacetate	
Tridecanone	

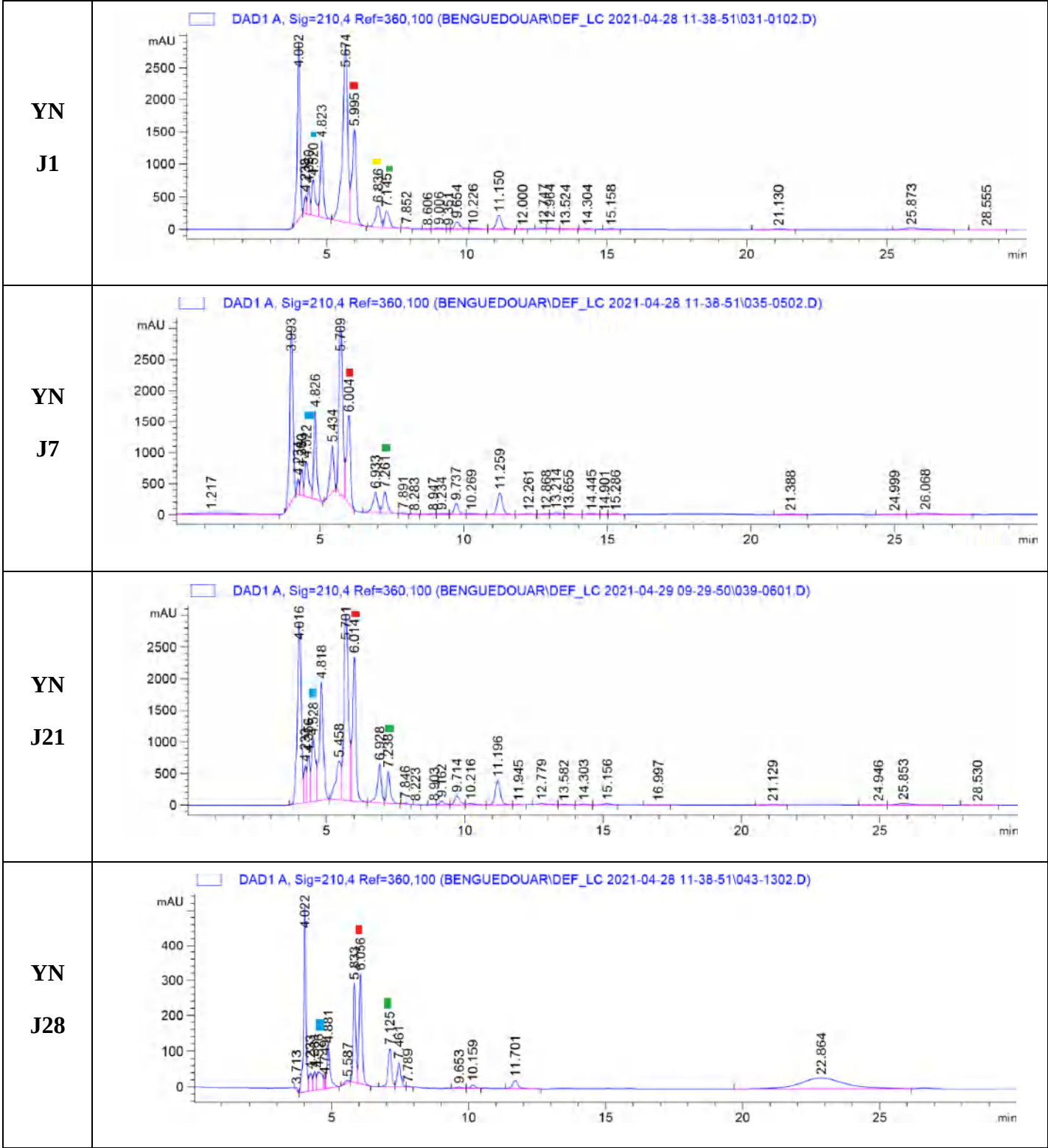
Annexe 15.c. Structure chimique des composés de l'HE de la verveine

Composé chimique	Formule chimique
2,2 Dimethylocta 3,4 dienal	
Geraniol	
Nerolacetate	
Curcumene	
Bicyclogermacrene	
Zingiberene	
Nerolidol	
Spathulenol	
T-Cadinol	

Annexes

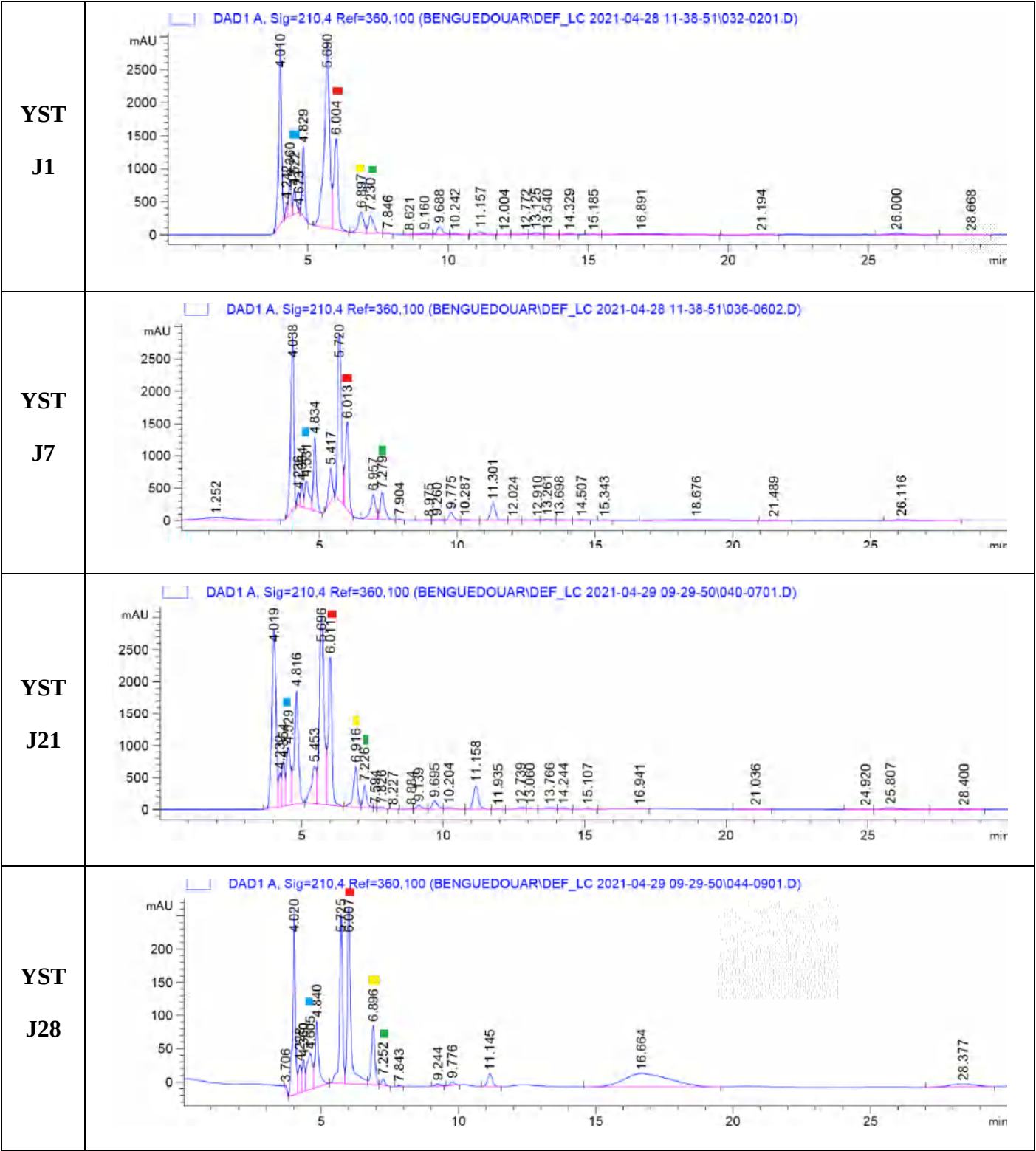
Annexe 16 : Spectres des acides organiques et arôme des yaourts non incorporés d'HE
(révélés par HPLC)

■ Acide formique, ■ Acide lactique, ■ Acide acétique, ■ Acide citrique



Annexe 17 : Spectres des acides organiques et arôme des yaourts incorporés de l'HE de thym
(révélés par HPLC)

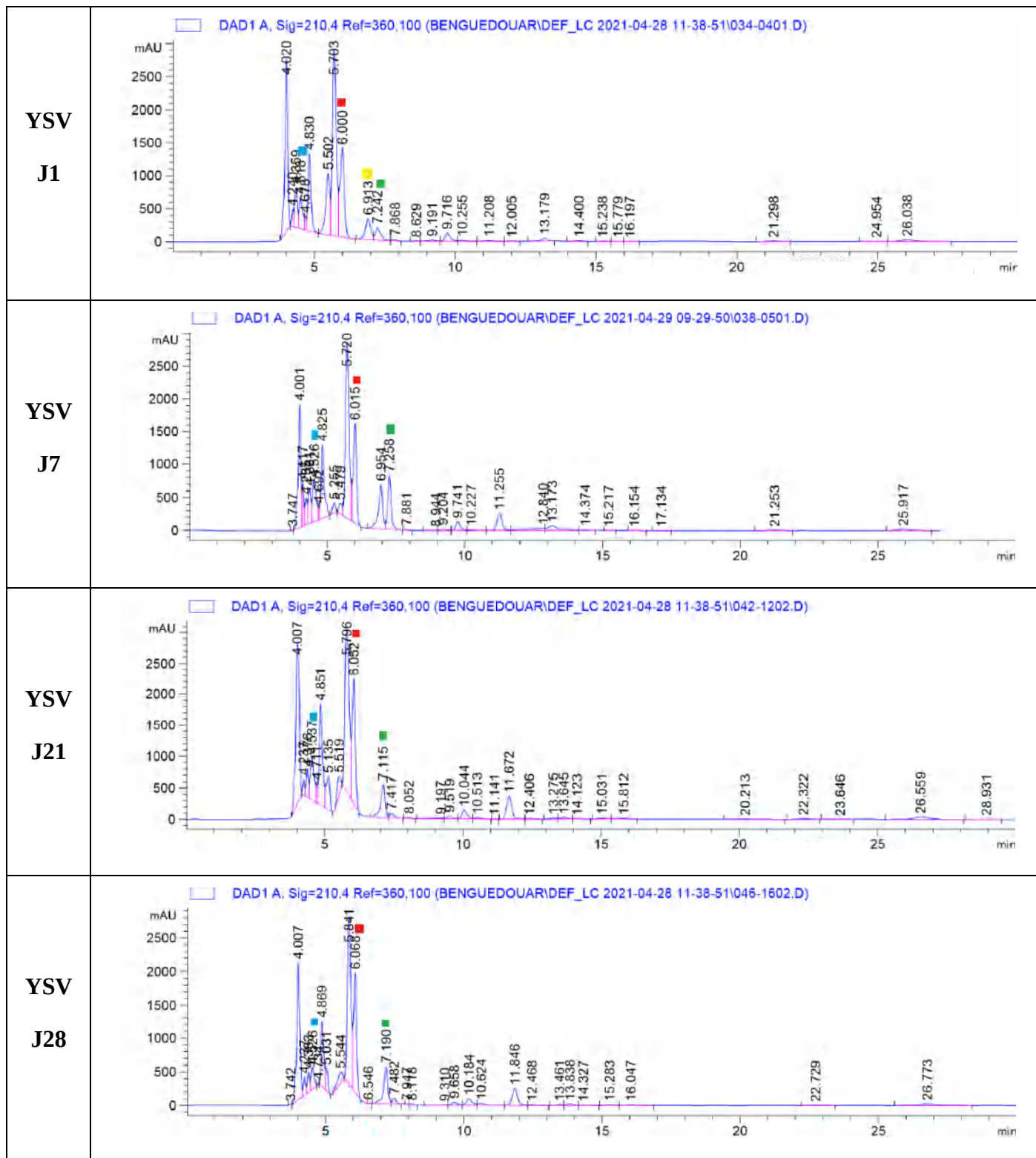
■ Acide formique, ■ Acide lactique, ■ Acide acétique, ■ Acide citrique



Annexes

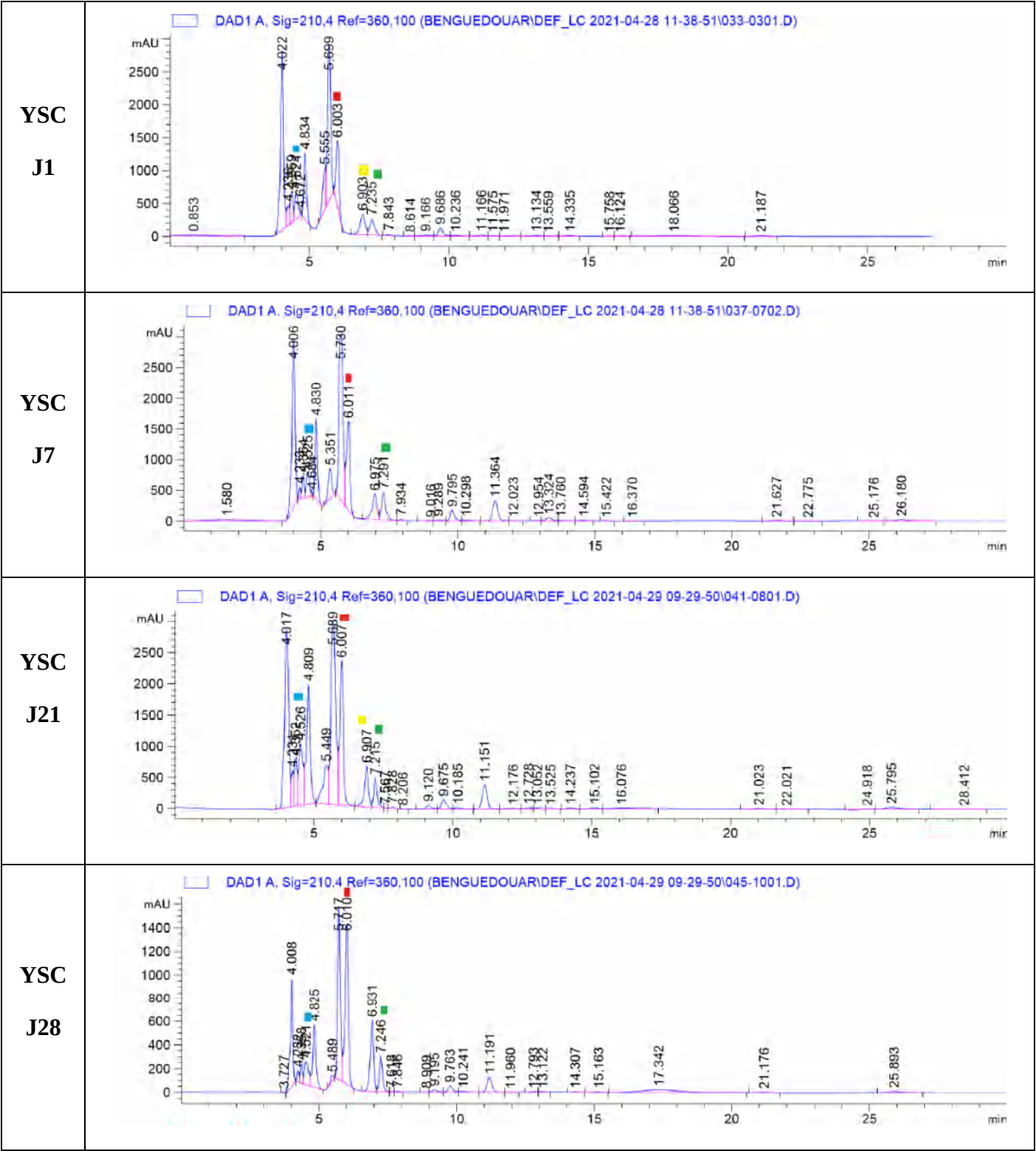
Annexe 18 : Spectres des acides organiques et arôme des yaourts incorporés de l'HE de verveine (révélés par HPLC)

■ Acide formique, ■ Acide lactique, ■ Acide acétique, ■ Acide citrique



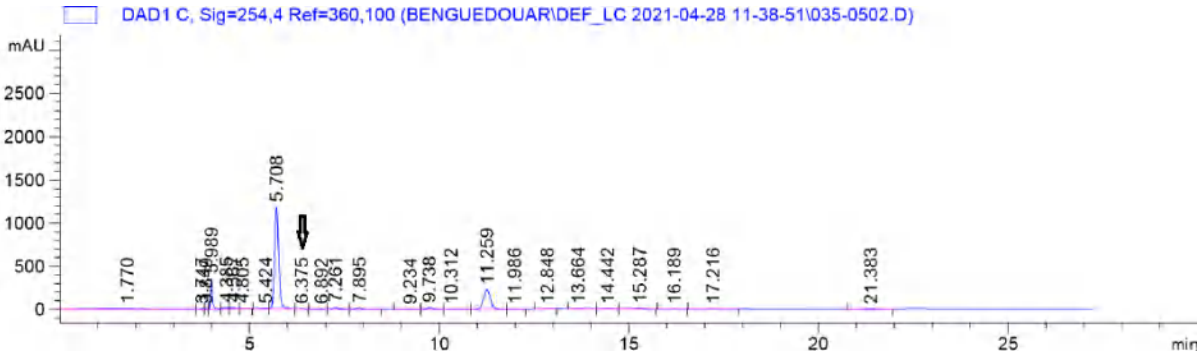
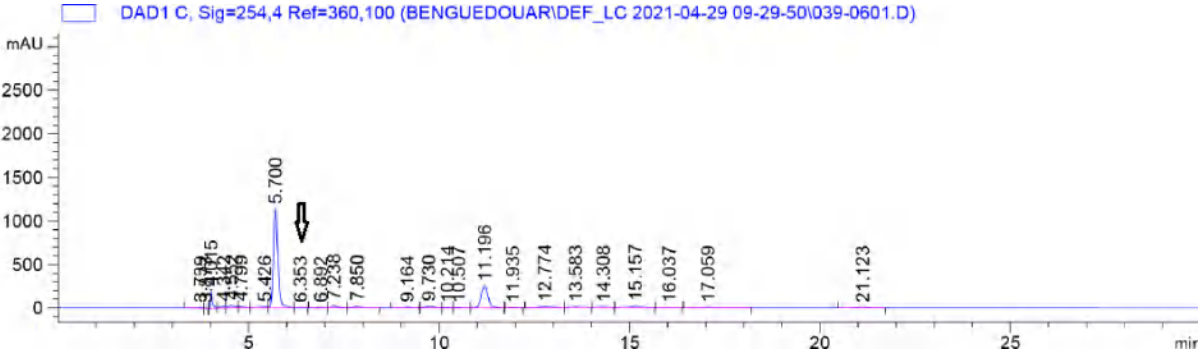
Annexe 19 : Spectres des acides organiques et arôme des yaourts incorporés de l'HE de citronnelle (révélées par HPLC)

■ Acide formique, ■ Acide lactique, ■ Acide acétique, ■ Acide citrique



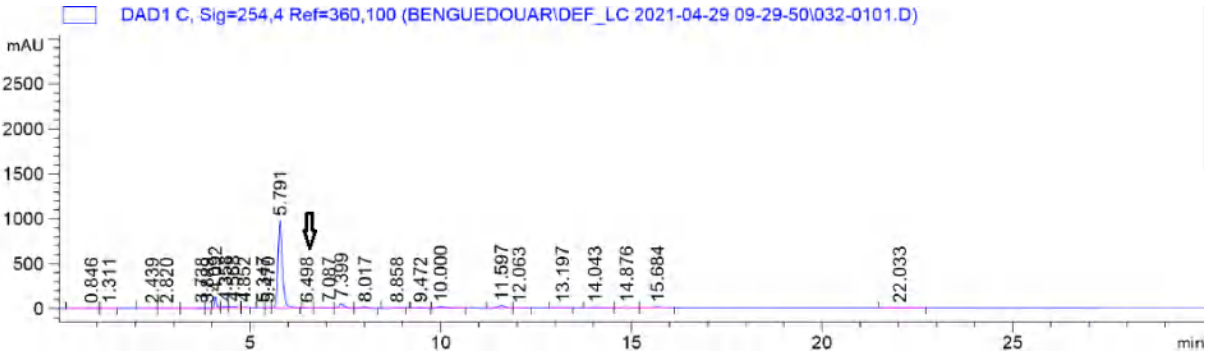
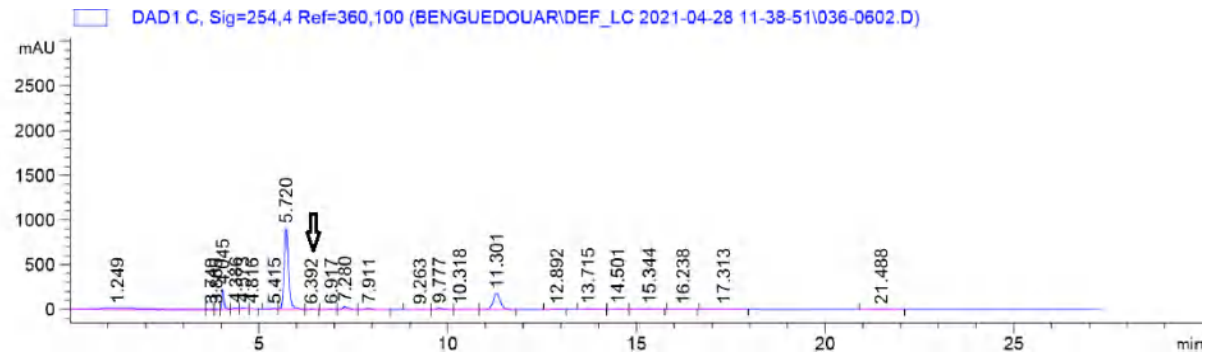
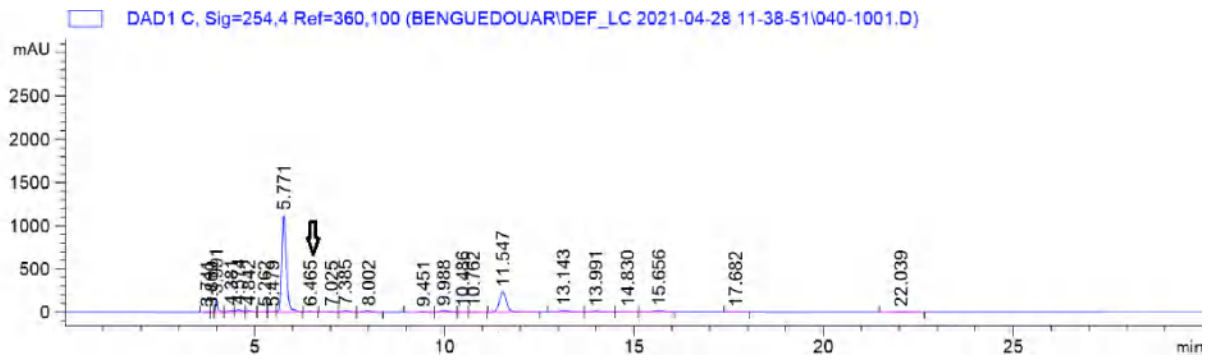
Annexe 20. Spectres de l’acétaldéhyde des yaourts non incorporés d’HE

■ Acide formique, ■ Acide lactique, ■ Acide acétique, ■ Acide citrique

YN J1	ND
YN J7	 DAD1 C, Sig=254,4 Ref=360,100 (BENGUEDOUAR\DEF_LC 2021-04-28 11-38-51\035-0502.D)
YN J21	 DAD1 C, Sig=254,4 Ref=360,100 (BENGUEDOUAR\DEF_LC 2021-04-29 09-29-50\039-0601.D)
YN J28	ND

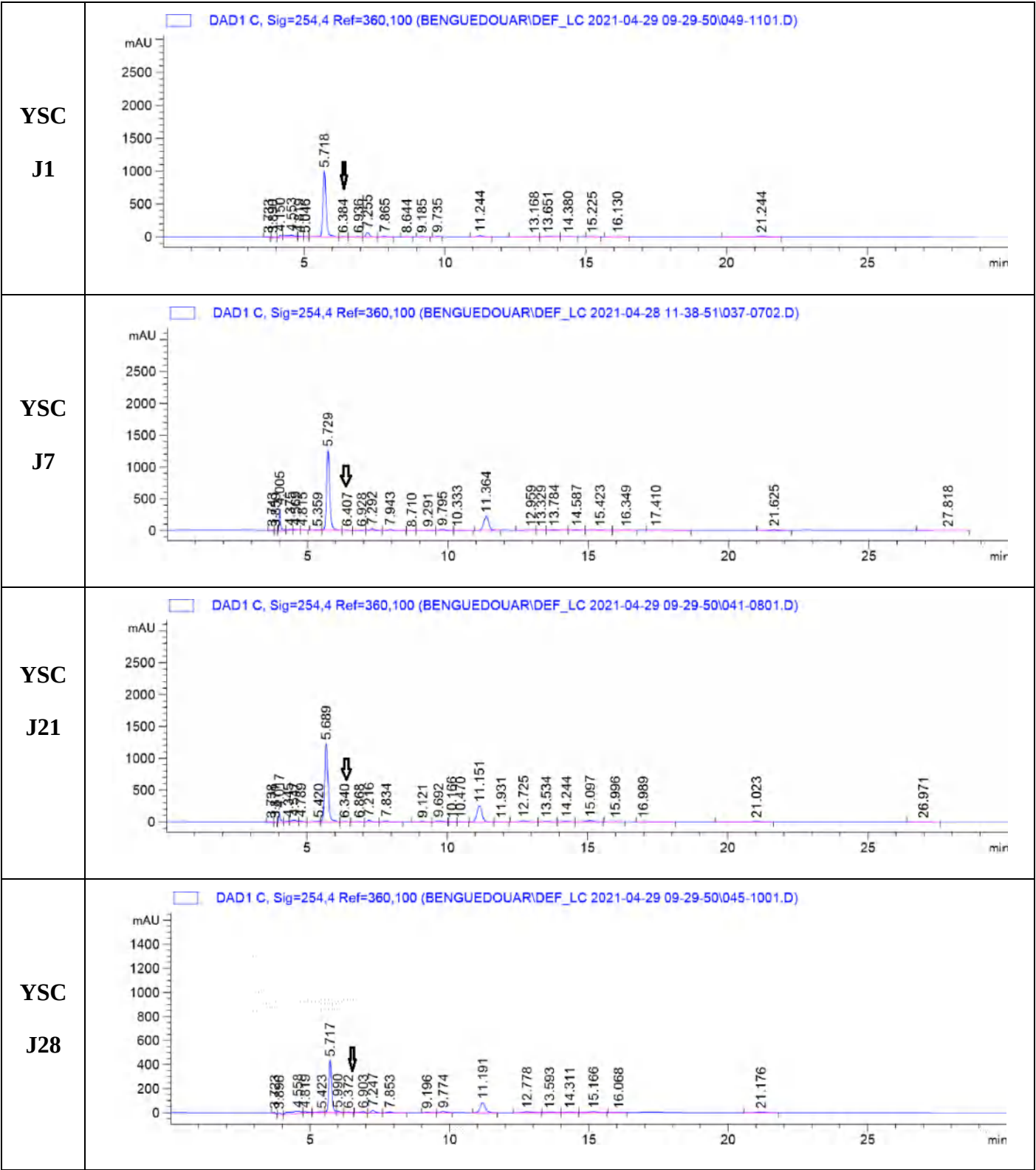
ND : non détecté

Annexe 21. Spectre de l'acétaldéhyde des yaourts incorporés d'HE de *T. willdenowii*

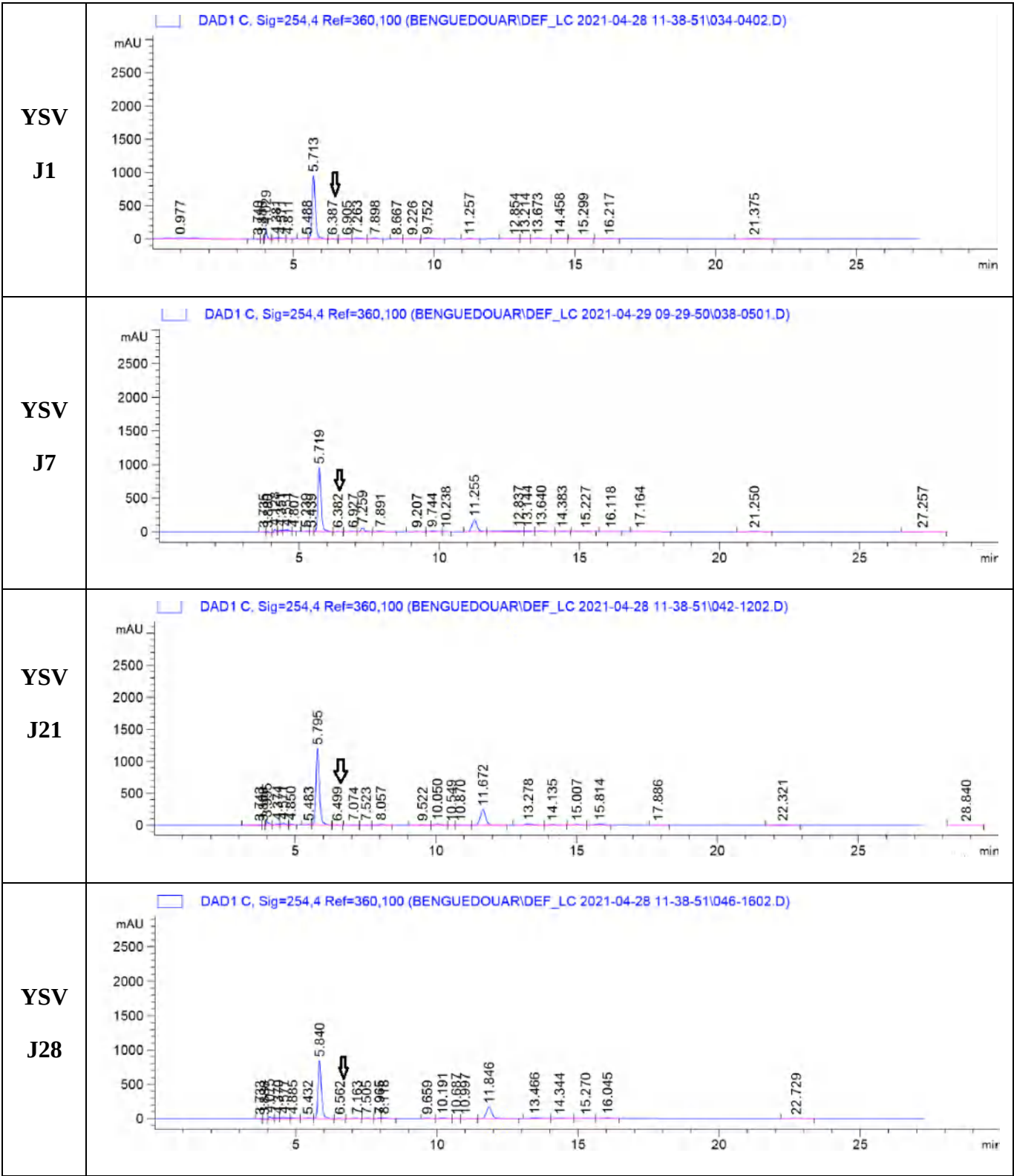
YST J1	
YST J7	
YST J21	
YST J28	ND

ND : non détecté

Annexe 22. Spectre de l'acétaldéhyde des yaourts incorporés d'HE de *C. citratus*



Annexe 23. Spectre de l’acétaldéhyde des yaourts incorporés d’HE d’A. citriodora



Abstract

The characterization of three essential oils (EOs) of aromatic and medicinal plants : thyme (*T. wilddenowii*), verbena (*A. citriodora*) and lemongrass (*C. citratus*) and their incorporation into yogurt were the subject of this study. A survey of Internet users via Google Forms revealed that a high percentage did not use EOs in cooking or drinking. Analysis of the chemical composition by GC/MS revealed citral with its two isomers E-citral (38.6%) and Z-citral (29.89%) for citronella, and E-citral (34.43 %) and Z-citral (27.85%) for verbena and linalool (89.55%) for thyme. The essential oil extraction yields are $1.23 \pm 0.23\%$, $0.83 \pm 0.35\%$ and $0.83 \pm 0.27\%$ respectively for lemongrass, thyme and verbena. Thyme has a higher antiradical activity than verbena and lemongrass as well as the highest content of phenolic compounds (405.67 ± 13.08 μg GAE/mL of yogurt). A strong inhibition of pathogenic bacteria such as *B. cereus*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa* and *E. coli* is obtained with thyme EO. Lemongrass EO has proven to be the most inhibitory of lactic acid bacteria in yoghurt: *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*. The antioxidant and antibacterial activities of verbena EO were weak. However, it showed an interesting inhibitory activity of the butyrylcholinesterase enzyme, just after lemongrass EO. The inhibitory activity of the α -amylase, urease and tyrosinase enzymes was weak for the EOs studied. The evaluation of the cytotoxic effect of EOs on *Artemia salina* larvae did not show any cytotoxicity. The incorporation of essential oils into yogurt at a dose of 25 $\mu\text{L/L}$ maintained satisfactory microbiological quality of the products. The physico-chemical analysis of the different yogurts revealed a decrease in pH throughout the cold storage period. However, the pH values, significantly are elevated in yogurts incorporated essential oils of lemongrass and verbena. The incorporation of essential oils of lemongrass and thyme significantly increased the antioxidant potential of these yogurts on the seventh day of storage evaluated by the CUPRAC test, as well as on the 21st day of storage for the yogurt incorporating the essential oils of thyme evaluated by the test ORAC. The antioxidant potential of lactic acid bacteria increased after their fermentation with the different EOs studied. HPLC analysis of the organic acids and aromas produced revealed an increase in the production of lactic and citric acid at the end of cold storage for yogurts containing verbena and lemongrass essential oils. The three HEs also stimulated the production of the acetaldehyde aroma from the first day of storage. The evaluation of the phenolic compounds content of the formulated yogurts revealed an increase of these compounds in the lemongrass EO yogurt on the first day and in the thyme yogurt on the seventh day of storage. The yogurt incorporated with verbena EO was the most appreciated by the panel of tasters, followed by the yogurt incorporating lemongrass and thyme EO.

Keywords: aromatic and medicinal plants, essential oils, antioxidant activity, antibacterial, antifungal, yogurt, organic acids, lactic acid bacteria.

موضوع هذه الدراسة وصف ثلاثة زيوت أساسية من النباتات العطرية والطبية: *A. Citriodora*، *T. wilddenowii* و *C. citratus* وإدماجها في الزبادي. كشفت دراسة استقصائية لمستخدمي الإنترنت عبر Google Forms أن نسبة عالية من الناس لا يستخدمون الزيوت الأساسية في الطهي أو المشروبات كما أظهر تحليل التركيب الكيميائي بواسطة GC / MS تواجد مركب السترال مع مأكبيه E-citral (38.6%) و Z-citral (29.89%) في الزيت الأساسي لـ *C. citratus*، و E-citral (34.43%) و Z-citral (27.85%) في الزيت الأساسي لـ *A. Citriodora* ولينالول (89.55%) في الزيت الأساسي لـ *T. wilddenowii*. كان مردود استخلاص الزيت العطري هو $0.23 \pm 1.23\%$ ، $0.35 \pm 0.83\%$ و $0.27 \pm 0.83\%$ على التوالي بالنسبة لكل من *C. citratus* و *T. Wilddenowii* و *A. Citriodora*. يحتوي *T. wilddenowii* على نشاط مضاد للجذور أعلى من *A. Citriodora* و *C. Citratus* بالإضافة إلى أعلى محتوى من المركبات الفينولية (405.67 ± 13.08) ميكروغرام مكافئ لحمض الغاليك بالمليتر من الزبادي (GAE / مل)). تم الحصول على تثبيط قوي للبكتيريا الممرضة مثل *B. cereus* و *S. enteritidis* و *P. aeruginosa* و *E. coli* باستخدام الزيت الأساسي لـ *T. Wilddenowii* في حين أثبت الزيت الأساسي لـ *C. citratus* أنه أكثر تثبيطاً للبكتيريا حمض اللاكتيك: *L. bulgaricus* و *S. thermophilus*. كانت الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا للزيت الأساسي لـ *A. Citriodora* ضعيفة ومع ذلك فقد أظهر نشاطاً مثبطاً مثيراً للاهتمام لأنزيم butyrylcholinesterase، بعد زيت *C. citratus* مباشرة. كان النشاط التثبيطي لإنزيمات α -amylase و urease و tyrosinase ضعيفاً بالنسبة للزيوت الأساسية المدروسة. لم يظهر تقييم التأثير السام للخلايا بالنسبة للزيوت المدروسة المنجز على يرقات *Artemia salina* أي سمية خلوية. أدى دمج الزيوت الأساسية في الزبادي بجرعة 25 ميكرو لتر / لتر إلى الحفاظ على الجودة الميكروبيولوجية المرضية للمنتجات كما أظهر التحليل الفيزيائي والكيميائي لأنواع الزبادي المختلفة انخفاضاً في ال pH طوال فترة التخزين البارد. ومع ذلك، فإن القيمة المسجلة كانت مرتفعة بشكل ملحوظ في الزبادي الممزوج بالزيوت الأساسية لكل من *C. Citratus* و *A. Citriodora*.

أدى دمج الزيوت الأساسية لـ *A. Citriodora* و *T. Wilddenowii* إلى زيادة كبيرة في إمكانات مضادات الأكسدة لهذا الزبادي في اليوم السابع من التخزين الذي تم تقييمه بواسطة اختبار CUPRAC وكذلك في اليوم الحادي والعشرين لتخزين الزبادي الذي يحتوي على الزيوت الأساسية لـ *T. wilddenowii* التي تم تقييمها بواسطة اختبار ORAC. زادت القدرة المضادة للأكسدة لبكتيريا حمض اللاكتيك بعد تخميرها مع مختلف الزيوت الأساسية التي تمت دراستها. كما كشف تحليل HPLC للأحماض العضوية والمركبات العطرية المنتجة عن زيادة في إنتاج حمض اللاكتيك وحمض الستريك في نهاية التخزين البارد للزبادي المحتوي على زيوت أساسية لـ *A. Citriodora* و *C. Citratus*، كما حفزت الزيوت الأساسية الثلاثة أيضاً إنتاج المركب العطري للأسينالديهيد من اليوم الأول للتخزين. أظهر تقييم محتوى المركبات الفينولية في الزبادي المصنع زيادة في هذه المركبات في زبادي *C. Citratus* في اليوم الأول وفي زبادي *T. wilddenowii* في اليوم السابع من التخزين. كان الزبادي المدمج مع الزيت الأساسي لـ *A. Citriodora* هو الأكثر تقدراً من قبل لجنة المتذوقين، يليه الزبادي المدمج مع الزيت الأساسي لـ *C. Citratus* ثم الزبادي المدمج مع الزيت الأساسي لـ *T. wilddenowii*.

الكلمات الرئيسية: النباتات العطرية والطبية، الزيوت الأساسية، النشاط المضاد للأكسدة، مضاد للبكتيريا، مضاد للفطريات، الزبادي، الأحماض العضوية

Résumé

La caractérisation de trois huiles essentielles (HEs) de plantes aromatiques et médicinales : le thym (*T. wilddenowii*), la verveine (*A. citriodora*) et la citronnelle (*C. citratus*) et leur incorporation dans le Yaourt ont fait objet de cette étude. Une enquête réalisée auprès d'internautes via Google Forms a permis de déduire qu'un pourcentage élevé n'utilisaient pas les HEs dans la cuisine ou les boissons. L'analyse de la composition chimique par GC/MS a révélé le citral avec ses deux isomères E-citral (38,6%) et Z-citral (29,89%) pour la citronnelle, et E-citral (34,43%) et Z-citral (27,85%) pour la verveine et le linalool (89,55%) pour le thym. Les rendements d'extraction des huiles essentielles sont de $1,23 \pm 0,23\%$, $0,83 \pm 0,35\%$ et $0,83 \pm 0,27\%$ respectivement pour la citronnelle, le thym et la verveine. Le thym possède une activité antiradicalaire supérieure à celle de la verveine et de la citronnelle ainsi que la plus grande teneur en composés phénoliques ($405,67 \pm 13,08 \mu\text{g GAE/mL}$ de yaourt). Une forte inhibition des bactéries pathogènes telles que *B. cereus*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa* et *E. coli* est obtenue avec l'HE de thym. L'HE de citronnelle s'est révélée la plus inhibitrice des bactéries lactiques du yaourt : *L. bulgaricus* et *S. thermophilus*. Les activités antioxydantes et antibactériennes de l'HE de verveine étaient faibles. Cependant, elle a montré une activité inhibitrice intéressante de l'enzyme butyrylcholinestérase, juste après l'HE de citronnelle. L'activité inhibitrice des enzymes α -amylase, uréase et tyrosinase était faible pour les HEs étudiées. L'évaluation de l'effet cytotoxique des HEs sur les larves d'*Artémia salina* n'a pas montré de cytotoxicité. L'incorporation des huiles essentielles dans le yaourt à une dose de $25 \mu\text{L/L}$ a maintenu une qualité microbiologique satisfaisante des produits. L'analyse physico-chimique des différents yaourts a révélé une diminution du pH tout au long de la période de stockage au froid. Cependant, les valeurs du pH sont significativement élevées dans les yaourts incorporés des HEs de la citronnelle et de la verveine. L'incorporation des HEs de citronnelle et thym a significativement augmenté le potentiel antioxydant de ces yaourts au septième jour de stockage évalué par le test CUPRAC, ainsi qu'au 21ème jour de stockage pour le yaourt incorporant l'HE de thym évalué par le test ORAC. Le potentiel antioxydant des bactéries lactiques augmentait après leur fermentation avec les différentes HEs étudiées. L'analyse par HPLC des acides organiques et des arômes produits a révélé une augmentation de la production d'acide lactique et citrique à la fin du stockage au froid pour les yaourts aux HEs de verveine et de citronnelle. Les trois HEs ont également stimulé la production de l'arôme acétaldéhyde dès le premier jour de stockage. L'évaluation de la teneur en composés phénoliques des yaourts formulés a révélé une augmentation de ces composés dans le yaourt à l'HE de citronnelle au premier jour et dans le yaourt au thym au septième jour de stockage. Le yaourt incorporé d'HE de verveine a été le plus apprécié par le panel de dégustateurs, suivi du yaourt incorporant l'HE de citronnelle et de thym.

Mots clés : plantes aromatiques et médicinales, huiles essentielles, activité antioxydante, antibactérienne, antifongique, yaourt, acides organiques, bactéries lactiques.