

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud MAMMERI  
FACULTE DE MEDECINE  
TIZI-OUZOU



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة مولود معمري  
كلية الطب  
تيزي وزو

X·Θ·Λ·Ξ·Χ C::/·A ·X C·A·G·O

Département de Pharmacie

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

N° D'ORDRE : 023/FM/DP/2016

Présenté et soutenu publiquement

Le : 30 Juin 2016

En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

Thème

Encapsulation du D-limonène et évaluation de son activité  
antimicrobienne en vue de son utilisation comme conservateur  
alimentaire

Réalisé par :

BEN ADJALI Zineb

ZIOUECHE Malika

Encadrées par :

Dr. KESSAL F

Dr. AZZAM A

Composition du jury:

CHELLIK	Yazid	MAHU	Faculté de Médecine	UFAS	Président de jury
KESSAL	Fetta	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Promotrice
AZZAM	Amina	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Copromotrice
BOURKAIB	Amina	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Examinatrice
CHENAFI	Yasmine	AHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Examinatrice

Promotion : 2015-2016

## Dédicace

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tout simplement que : Je dédie ce mémoire à :

*A Ma mère, qui a œuvrée pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*A mon très cher père qui m'a tout appris, pour les peines et les sacrifices qu'il s'est donné pour me voir réussir dans la vie, Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*A mon très cher mari OMAR: pour sa compréhension, son encouragement, sa confiance et son assistance qui m'ont aidé à réussir. Ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et mon respect.*

*A ma chère sœur SABRINA et son mari qui n'ont pas cessé de me porter leur pleine aide et encouragements.*

*A mes frères : KAMEL , MOHAMED et WALID.*

*A ma très chère amie et ma sœur : ZINEB, avec qui j'ai partagé les meilleurs moments de ma vie.*

*A ma belle mère, mes beaux frères et mes belles sœurs.*

*A mes nièces : CHERIFA , RITADJE ET MARIA que j'aime beaucoup.*

*A mes chères amies : SOUMIA, ASMA et KHAOULA.*

**MALIKA**

## *Dédicace*

*C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde, mes chers parents :*

*Ma mère, à qui je dois tous mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices qu'elle a consenti pour mon instruction et mon bien être. Qu'elle trouve ici l'hommage de ma gratitude qui, si grande qu'elle puisse être, ne sera à la hauteur de ses sacrifices et ses prière pour moi.*

*Mon père, qui peut être fier et trouve ici le résultat de longues années de sacrifices pour m'aider à avancer et réussir dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit.*

*Que dieu vous préserve et vous procure santé et longue vie.*

*Je dédie aussi cette modeste réalisation à :*

- Mon très cher frère AZZEDINE à qui je souhaite bonheur et réussite.*
- Ma binôme MALIKA, ma jumelle, qui a et qui gardera toujours une place unique dans mon cœur.*
- Mes chers oncles, tantes, cousins et cousines : petit ou grand, proche ou lointain.*
- Mes amies fidèles : OUISSEM, MERJEM, AMINA, IMANE et KHAOULA. Sans qui la vie me semblait bien fade, je leur souhaite la prospérité et le succès.*
- Tous ceux que j'aime et qui m'aiment.*

*Que ce travail soit une part de ma reconnaissance envers vous.*

**ZINEB**

## REMERCIEMENTS

﴿ الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي هَدَانَا لِهَذَا وَمَا كُنَّا لِنَهْتَدِيَ لَوْلَا أَنْ هَدَانَا اللَّهُ ﴾

*Nous remercions tout d'abord notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, le tout Puissant pour le courage qu'il nous a donnés durant toutes ses année d'étude et pour mener ce travail à terme.*

*On commence par exprimer nos profondes reconnaissances et nos vifs remerciements au **Dr. KESSAL F** maitre assistante en pharmacie galénique à l'université Mouloud Maamri de Tizi Ouzou qui nous a honorés en encadrant ce travail, pour ses encouragements, ses conseils et sa disponibilité. Merci de nous avoir guidé avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour notre travail; on ne peut, Madame, que sincèrement vous exprimer notre respect et notre gratitude.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à notre copromotrice **Dr. AZZAM A** maitre assistante en microbiologie à l'université Mouloud Maamri de Tizi Ouzou, pour sa collaboration et pour avoir accepté de prendre part de l'évaluation de ce travail.*

*On tient à exprimer notre très grande considération, et notre profond respect au **Dr. CHELLIK Y** maitre assistant en pharmacie galénique à l'université Ferhat Abbas de Sétif d'avoir accepté la présidence du jury de notre travail, qu'il trouve ici toutes nos expressions respectueuses.*

*On tient à remercier aussi les membres de jury à savoir **Dr. BOURKAIB A** maître assistante en chimie minérale à l'université Mouloud Maamri de Tizi Ouzou, **Dr. CHENAFI Y** assistante en*

*microbiologie au CHU de Tizi Ouzou pour nous avoir accordé cette aimable faveur d'examiner notre recherche.*

*On tient d'autre part à remercier **Dr. BOUBRIT F** pour sa disponibilité, son aide et ses conseils.*

*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont aussi à **M<sup>lle</sup> SEBAOUI O** pour son aide et tous ses encouragements.*

*On tient à remercier également **M<sup>me</sup> HADJAM Z** et **M<sup>me</sup> BOUZAR O** et tout le personnel du laboratoire de pharmacie galénique.*

## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE ET PROBLEMATIQUE.....	1
OBJECTIFS.....	3
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
CHAPITRE I : LES HUILES ESSENTIELLES.....	4
1. Bref historique.....	4
2. Définitions des huiles essentielles.....	4
3. Répartition, localisation et fonction.....	5
4. Propriétés physiques.....	7
5. Composition chimique.....	8
6. Paramètres influençant la composition qualitative et quantitative des HEs .....	10
7. Procédés d'extractions des huiles essentielles.....	11
8. Analyses des huiles essentielles et critères de qualité.....	12
9. Activités biologiques des huiles essentielles.....	13
9.1.Activités antimicrobienne.....	13
9.1.1. Mode d'action antimicrobienne des HE.....	13
9.1.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	15
9.1.3. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne.....	18
9.2.Activité antioxydante.....	19
9.3. Autres activités.....	19
10. Les huiles essentielles des agrumes.....	19
10.1. Les agrumes.....	19
10.2. Caractéristiques des huiles essentielles des agrumes.....	21
10.3. Limonène.....	23
10.3.1. Définition.....	23
10.3.2. Propriétés physico-chimiques et organoleptique.....	23
10.3.3. Propriétés optiques.....	24
10.3.4. Biosynthèse de limonène.....	24
10.3.5. Procédés de production.....	25
10.3.6. Quelques usages de limonène.....	25
10.3.7. Limonène et l'environnement.....	25
10.3.8. Aspect biologique et toxicologique.....	26
CHAPITRE II : LES EMULSIONS ET PRINCIPE D'ENCAPSULATION.....	27

1. Définitions.....	27
2. Classification des émulsions .....	27
3. Caractérisation des émulsions et contrôles physico-chimiques .....	29
3.1.Stabilité.....	29
3.2.Sens de l'émulsion.....	32
3.3.Granulométrie.....	33
3.4.Viscosité.....	34
4. Les tensio-actifs.....	34
5. Concepts de formulations.....	36
5.1.Variables de composition et variables de formulation physico-chimique.....	36
5.2.Méthodes HLB.....	36
6. Emulsification.....	39
7. Notion d'encapsulation.....	44
8. Applications pharmaceutiques des émulsions.....	45
CHAPITRE III : LES JUS ET CONSERVATEURS.....	50
1. Définitions du jus de fruit .....	50
2. Les matières premières.....	50
2.1. Fruits.....	50
2.2. Purée de fruits destinée à la production de jus et de nectars de fruits .....	51
2.3. Concentré de purée de fruits destiné à la production de jus et de nectars de fruit.	52
2.4.Nectar de fruits .....	52
2.5.L'eau de composition.....	52
2.6.Le sucre.....	53
2.7.Additifs.....	53
3. Les différents types d'altérations du jus de fruits .....	56
3.1. Altération microbiologique .....	57
3.1.1. Cas des produits ayant subi un traitement de stabilisation microbiolo.....	58
3.1.2. Cas des jus frais.....	58
PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE.....	61
CHAPITRE I: D-LIMONENE ET L'EVALUATION DE SON ACTIVITE ANTI BACTERIENNE.....	61
1. Limonène.....	61
2. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	62
2.1.Confirmation des souches.....	62

2.2. Protocole expérimentale : Evaluation de l'activité antimicrobienne du limonène..	64
2.2.1. Détermination du pouvoir antimicrobien par la technique de diffusion en milieu solide (par disque) appelée aussi aromatogramme.....	64
2.2.2. Détermination de la CMI et la CMB par la technique de dilution en milieu solide.....	66
2.3. Résultats et discussions.....	68
CHAPITRE II : ENCAPSULATION DU D- LIMONENE.....	73
1. Formulation d'une émulsion stable.....	73
1.1. Matières premières.....	73
1.2. Formulations préliminaires.....	75
1.2.1. Détermination du HLB critique.....	75
1.2.2. Protocole expérimental.....	77
1.2.3. Critères d'appréciation du HLB critique.....	78
1.2.4. Résultats et discussion.....	79
1.3. Encapsulation du D-limonène.....	85
1.3.1. Formules étudiées.....	85
1.3.2. Protocole expérimental.....	86
1.3.3. Résultats et discussion.....	86
CHAPITRE III : INTRODUCTION DES EMULSIONS A BASE DE LIMONENE DANS UNE MATRICE ALIMENTAIRE -JUS D'ORANGE- ET EVALUATION DE LEUR ACTIVITE ANTIMICROBIENNE.....	89
1. Matériels utilisés.....	89
2. Préparation des échantillons.....	90
3. Préparation des témoins.....	91
4. Analyses microbiologiques.....	92
5. Résultats et discussion.....	93
CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS.....	96
BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXE I : Calcul de la concentration du limonène	
ANNEXE II : Coloration de GRAM et Test de la Catalase	
ANNEXE III : Aspect microscopique des émulsions lors des formulations préliminaires	
ANNEXE IV : La spectrophotométrie	
RESUME	

## LESTE DES ABREVIATIONS

**AFNOR** : Association Française de Normalisation

**BRSA** : Boisson Rafraichissante Sans Alcool

**BSR** : Bactérie Sulfo-Réductrice

**°C** : Degré Celsius

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince

**CG**: Chromatographie en phase Gazeuse

**CG/MS**: Chromatographie en phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse

**CMB**: Concentration Minimale Bactéricide

**CMI**: Concentration Minimale inhibitrice

**DMSO**: Dimethylsulfoxyde

**DO** : Densité optique

**FAO**: Food and Agriculture Organization

**FDA**: Food Drug Administration

**FMC**: Formation médicale continue

**g**: Gramme

**GN** : Gélose Nutritive

**GRAS**: Generally recognised as safe (Généralement considéré sain)

**GSC** : Gélose au Sang Cuit

**G.10** : Grossissement 10

**HE** : Huile Essentielle

**HEs** : Huiles essentielles

**HLB**: Balance Hydrophile Lipophile

**McF**: McFarland

**MH**: Mueller Hinton

**mm** : Millimètre.

**PIT** : Phase Inversion Temperature

**T/min** : Tours par minute

**V/V** : Volume à volume

**µS/cm** : MicroSimens par Centimètre

**µl** : Microlitre

**UV** : Ultraviolet

**%** : Pourcentage

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Propriétés physico-chimiques et organoleptiques du limonène.....	23
<b>Tableau 2</b> : Classement des tensioactifs.....	35
<b>Tableau 3</b> : Fruits utilisables pour la fabrication de jus de fruits.....	51
<b>Tableau 4</b> : Les différents types d'altérations de jus de fruits.....	56
<b>Tableau 5</b> : Les caractéristiques morphologiques, culturelles et biochimiques des souches utilisées.....	63
<b>Tableau 6</b> : Diamètres d'inhibition en (mm) provoqué par le limonène.....	69
<b>Tableau 7</b> : Résultats de la CMI pour <i>E.coli</i> , <i>S.feacalis</i> et <i>S.aures</i> .....	71
<b>Tableau 8</b> : Résultats de la CMB pour <i>E.coli</i> , <i>S.feacalis</i> .....	71
<b>Tableau 9</b> : Propriétés physico-chimiques de SPAN 60.....	74
<b>Tableau 10</b> : Propriétés physico-chimiques de TWEEN 20.....	75
<b>Tableau 11</b> : Les formules quantitatives des émulsions selon les HLB.....	76
<b>Tableau 12</b> : Stabilités des émulsions préparées 15 min et 24h après formulation.....	79
<b>Tableau 13</b> : Stabilités des émulsions préparées 4 et 6j après formulation.....	79
<b>Tableau 14</b> : Stabilité des émulsions après centrifugation à 1000, 2000 et 3000 T/min.....	81
<b>Tableau 15</b> : Appréciation rhéologique des différentes émulsions.....	82
<b>Tableau 16</b> : Formules quantitatives des émulsions à base de limonène.....	86
<b>Tableau 17</b> : Aspect macroscopique des deux formules d'émulsions préparées.....	87
<b>Tableau 18</b> : Proportions des différents constituants des échantillons préparés.....	91
<b>Tableau 19</b> : Résultats de l'absorbance des bactéries tests au sein des préparations témoins.....	93
<b>Tableau 20</b> : Absorbance et taux de réduction de la croissance bactérienne d' <i>E.coli</i> au sein de jus d'orange en présence d'émulsion à base de limonène.....	93
<b>Tableau 21</b> : Absorbance et taux de réduction de la croissance bactérienne de <i>S.faecalis</i> au sein de jus d'orange en présence d'émulsion à base de limonène.....	94

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Structure chimique de quelques monoterpènes.....	9
<b>Figure 2</b> : Structure chimique de quelques sesquiterpènes.....	9
<b>Figure 3</b> : Structure chimique de limonène.....	23
<b>Figure 4</b> : Enantiomères de limonène.....	24
<b>Figure 5</b> : Biosynthèse de limonène par la plante .....	25
<b>Figure 6</b> : Les différents types d'émulsion.....	28
<b>Figure 7</b> : Processus de déstabilisation d'une émulsion.....	31
<b>Figure 8</b> : Schéma simplifié d'une molécule amphiphile.....	34
<b>Figure 9</b> : Images au microscope optique d'une émulsion primaire et émulsion après cisaillement.....	40
<b>Figure 10</b> : Principe de fonctionnement et différentes géométries de Rotor-Stator.....	41
<b>Figure 11</b> : Principe de fonctionnement d'un moulin colloïdal.....	41
<b>Figure 12</b> : Principe de l'émulsification sous haute pression.....	42
<b>Figure 13</b> : Mélangeur statique SULZER SMX.....	43
<b>Figure 14</b> : Emulsification par membrane.....	44
<b>Figure 15</b> : Type d'émulsion et action sur la biodisponibilité.....	46
<b>Figure 16</b> : Mini galerie pour identification d' <i>E.coli</i> .....	63
<b>Figure 17</b> : La série de dilution + la boîte témoinensemencées par les trois germes.....	67
<b>Figure 18</b> : Aromatogramme d' <i>E.coli</i> .....	68
<b>Figure 19</b> : Aromatogramme de <i>S.faecalis</i> .....	68
<b>Figure 20</b> : Aromatogramme de <i>S.aureus</i> .....	68
<b>Figure 21</b> : Aromatogramme de <i>Lactobacillus sp</i> .....	68
<b>Figure 22</b> : Résultats de la CMI pour <i>E.coli</i> , <i>S.faecalis</i> , <i>S.aureus</i> .....	70
<b>Figure 23</b> : CMB de <i>S.faecalis</i> à 2%.....	71
<b>Figure 24</b> : CMB d' <i>E.coli</i> à 4%.....	71
<b>Figure 25</b> : Structure chimique de SPAN 60.....	73

<b>Figure 26</b> : Structure chimique de TWUUN 20.....	74
<b>Figure 27</b> : Etapes de préparation des émulsions.....	77
<b>Figure 28</b> : Aspect macroscopique des émulsions après formulation.....	80
<b>Figure 29</b> : Aspect macroscopique des émulsions au HLB=5 après un mois de formulation .	80
<b>Figure 30</b> : Aspect microscopique de l'émulsion à HLB=5 au G.10.....	81
<b>Figure 31</b> : Aspect des émulsions à HLB=5 et 5.5 après centrifugation à 1000, 2000 et 3500 T/min.....	82
<b>Figure 32</b> : Aspect de l'émulsion après coloration avec le bleu de méthylène.....	83
<b>Figure 33</b> : Conductivités des émulsions préparées.....	83
<b>Figure 34</b> : Aspect microscopique de la formule à 2% observé au G.10.....	87
<b>Figure 35</b> : Aspect microscopique de la formule à 4% observé au G.10.....	87
<b>Figure 36</b> : Jus d'orange préparé.....	90
<b>Figure 37</b> : Les échantillons de jus préparés.....	90
<b>Figure 38</b> : Spectrophotomètre d'absorption utilisé pour l'analyse microbiologique.....	92

# *Introduction*

## INTRODUCTION GENERALE ET PROBLEMATIQUE

La qualité microbiologique d'un aliment constitue l'une des bases essentielles de son aptitude à satisfaire la sécurité du consommateur. Un aliment, exposé à la détérioration par les micro-organismes peut voir une diminution de ses caractéristiques sensorielles, nutritives et sanitaires [1].

Des quantités substantielles de produits alimentaires stockés sont attaquées par des bactéries et des moisissures dans le monde entier. En particulier dans les pays en voie de développement, les aliments stockés subissent des dommages sérieux, menant à de grandes pertes économiques et au risque sanitaire [2].

Pour faire face aux problèmes d'oxydation et de contamination des denrées alimentaires, l'essor de la chimie a permis l'apparition et l'utilisation de nouvelles substances en tant que conservateurs alimentaires synthétiques. Ces derniers ont été employés couramment pour empêcher la détérioration des aliments. Par la suite, l'utilisation de plusieurs conservateurs synthétiques a été limitée ou interdite dans plusieurs pays, en raison de leurs effets toxicologiques indésirables à long terme, y compris la cancérogénicité. De même, la tendance actuelle des consommateurs à chercher une alimentation plus naturelle a incité la recherche, le développement et l'application de nouveaux produits naturels ayant des activités antimicrobienne et antioxydante dans le but de les utiliser comme alternatives aux conservateurs synthétiques dans le domaine des industries agro-alimentaires [2].

Les plantes aromatiques ont été traditionnellement employées pour l'assaisonnement et la prolongation de la durée de conservation des aliments. La plupart de leurs propriétés sont dues aux huiles essentielles produites par leur métabolisme secondaire. Ces huiles sont d'intérêt croissant pour les industries et la recherche scientifique.

Le D-limonène, un monoterpène naturel est le constituant majeur des huiles essentielles de *CITRUS*, il est largement utilisé en cosmétiques, dans les aliments et les produits de consommation, en raison, d'une part, de son activité antibactérienne, antioxydante, chimio-préventive et anticancérogène voir même anti diabétique. D'autre part, le D-limonène est classé dans la liste des substances GRAS, qui le rend utile en tant que conservateur naturel et aromatisant dans les industries agroalimentaires [2].

Cependant, le D-limonène subit une dégradation par oxydation dans des conditions normales de stockage. Son caractère hydrophobe est un autre inconvénient à traiter, car il est difficile

d'obtenir une solution dans l'eau. D'où la nécessité de l'utilisation de concentrations élevées pour atteindre l'efficacité antimicrobienne dans les systèmes alimentaires. Pour cela de nombreuses approches ont été proposées parmi lesquelles son encapsulation dans des systèmes dispersés dont les nanoémulsions, cette encapsulation permet de maîtriser plus facilement son stabilité ainsi que sa dispersion dans les milieux aqueux.

La revue bibliographique de cette étude est articulée en trois chapitres. Le premier chapitre aborde des généralités sur les huiles essentielles, leur activité antimicrobienne et les caractéristiques propres du limonène. Le deuxième chapitre traite les émulsions, leurs caractéristiques et leur formulation ainsi que la notion d'encapsulation. Le troisième chapitre expose des généralités sur les jus, les conservateurs et les altérations qui peuvent affecter cette denrée alimentaire notamment les altérations microbiologiques. Cet aperçu bibliographique constitue un appui incontournable à la partie expérimentale et à l'interprétation de nos résultats.

La partie pratique illustre l'évaluation de l'activité antibactérienne du D-limonène, son encapsulation (mise au point d'un système dispersé protecteur et stabilisateur), et l'application du système formulé dans une matrice alimentaire en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire naturel.

## OBJECTIFS

Cette étude a été menée dans un but :

### ❖ Economique

- Valoriser les sous produits d'industrie alimentaire utilisant les agrumes comme matières premières (source de composés bioactifs) et minimiser ainsi les couts de production et éviter le gaspillage ;

### ❖ Scientifique

- Evaluation de l'activité antibactérienne du D-limonène ;
- Garantir le maximum de son activité antimicrobienne en l'encapsulant dans un système dispersé stable à savoir une émulsion mise au point par la technique d'inversion de phase et qui est jugée acceptable par rapport aux contrôles organoleptiques et physicochimiques ;

### ❖ Industriel

- Employer le D-limonène comme conservateur naturel dans les denrées alimentaires plus précisément les jus en remplacement des conservateurs d'origine chimique;

### ❖ De santé publique

- Satisfaire les besoins des consommateurs en leur fournissant un aliment de qualité avec minimum de produits chimiques tout en gardant les caractéristiques organoleptiques initiales du produit.

A decorative graphic of a scroll with a black outline and rounded corners. The scroll is partially unrolled, with the top and bottom edges curving upwards. The text is centered within the scroll.

*Partie I*  
*Revue bibliographique*

*Chapitre I*  
*Les huiles essentielles*

---

## I. LES HUILES ESSENTIELLES

### 1. Bref historique

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C. Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses. Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. Ces utilisations concernaient différents domaines : parfumerie, médecine, rites religieux, coutumes païennes, alimentation, etc [1].

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

Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique. Parallèlement, leur utilisation a aussi tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie. René-Maurice GATTEFOSSE a créé, en 1928, le terme de l'aromathérapie et il a mené de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment leurs propriétés ; ces résultats seront à l'origine de nombreuses autres recherches [1].

### 2. Définition des huiles essentielles

Selon BRUNETON (1999) ; Les huiles essentielles sont définies comme étant des extraits volatils et odorants, que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incisions des végétaux qu'ils les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire [3].

- Selon la pharmacopée française 8ème édition (1965)

les huiles essentielles (= essences = huiles volatiles) sont : « des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus au moins modifiés au cours de la préparation. Pour extraire ces principes volatils, il existe divers procédés. Deux seulement sont utilisables pour la préparation des essences officinales : celui par distillation dans la vapeur d'eau de plantes à essence ou de certains de

---

leur organes, et celui par expression ». La pharmacopée précise ensuite que le second procédé est recommandé pour obtenir les essences des fruits du genre *Citrus*. Depuis la 9ème édition (1972), la pharmacopée n'utilise plus que le terme huile essentielle [4].

- Selon l'AFNOR « Agence Française de Normalisation » : AFNOR NF T 75-006 (février 1998)

Elle désigne un produit obtenu à partir d'une matière première végétale: soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention ; elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (par exemple ; redistillation, aération, ....)[4].

- Selon l'ANSM « Agence nationale de Sécurité du Médicament » et la Pharmacopée Européenne 7ème édition (2010)

« Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. ».

### 3. Répartition, localisation et fonction

- Répartition

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs : il y'aurait, selon Lawrence, 17500 espèces aromatiques. Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont répartis dans un nombre limité de familles, ex : Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Astéraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingibraceae, Piperaceae, etc [4].

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs bien sur (bergamotier, tubéreuse), mais aussi feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier noble) et, bien que cela soit moins habituel, dans des écorces (cannelier), des bois (bois de rose, santal), des racines (vétiver), des rhizomes (curcuma, gingembre), des fruits (toute-épice, anis, badiane), des graines (muscade) [4].

Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon la localisation. Ainsi, dans le cas de l'oranger amer (*C. aurantium* L.ssp.aurantium, Rutaceae), le « zeste », c'est-à-dire le péricarpe frais du fruit, fournit l'huile essentielle d'orange amère ou « essence de Curaçao », la fleur fournit « l'essence de Néroli » et l'hydrodistillation de la feuille, des ramilles et des petits fruits conduit à « l'essence de petit grain bigaradier ». La composition de ces trois huiles essentielles est différente [4].

Quantitativement, les teneurs en huile essentielle sont plutôt faibles, assez souvent inférieures à 10 ml/kg. Des teneurs fortes comme celle du bouton floral de girofler (150 ml/kg et plus dans la drogue sèche) sont exceptionnelles [4].

- Localisation

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellules à huile essentielles des Lauracae ou des Zingiberaceae, poils sécréteurs des Lamiaceae, poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae, canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae [4].

- Fonction

La fonction biologique des terpénoïdes des huiles essentielles demeure le plus souvent obscure. Il est toutefois vraisemblable qu'ils aient un rôle écologique. A l'appui de cette hypothèse, on remarquera que le rôle de certains d'entre eux a été établi expérimentalement aussi bien dans le domaine des interactions végétales (agents allélopathiques, notamment inhibiteurs de germination) que dans celui des interactions végétal-animal : protection contre les prédateurs (insectes, champignons) et attraction des pollinisateurs. Pour quelques auteurs, ils pourraient constituer des supports à une « communication » et ce d'autant mieux que leur variété structurale autorise le transfert de « messages biologiques » sélectifs [4].

#### 4. Propriétés physiques

Selon (Bardeau, 1976 ; Legrand, 1978 ; Lemberg, 1982 ; Bruneton, 1999), les HE possèdent en commun un certains nombres de propriétés physiques [5] :

- Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiants et dans la pluparts des solvants organiques, et peu solubles dans l'eau (mais entraînable à la vapeur d'eau) à laquelle, toutefois, elles communiquent leur odeurs.
- Leur point d'ébullition varie de 160° à 240°C.
- Leur densité est en générale inférieure à celle de l'eau, elle varie de 0.75 à 0,99 (les HE de sassafras, de girofle ou de cannelle constituent des exceptions).
- Elles ont un indice de réfraction élevé.
- Elles sont douées de pouvoir rotatoire, dextrogyres ou lévogyres, rarement inactives sur la lumière polarisée.
- Elles dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels.
- Sont très altérables et sensibles à l'oxydation (mais ne rancissent pas).
- Ce sont des parfums, et sont de conservation limitée.
- Ce sont des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluides, voire rétinoides, très odorantes et volatiles même à température ambiante (ce qui les différencie des huiles fixes).
- A température ambiante, elles sont généralement liquides, incolores ou jaunes pales, il existe, cependant, quelques exceptions, exemple : huile essentielle à azulène de coloration bleue.

## 5. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes [4] :

- Les terpénoïdes
- Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents.

Elles peuvent également renfermer divers produits issus de, processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils [4].

La nature du composé majoritaire (phénol, alcool, aldéhyde, cétone...) joue un rôle principal dans l'efficacité de leurs effets biologiques voire même celle des composés minoritaires. En général une huile essentielle contient en moyenne soixante-quinze molécules actives [6].

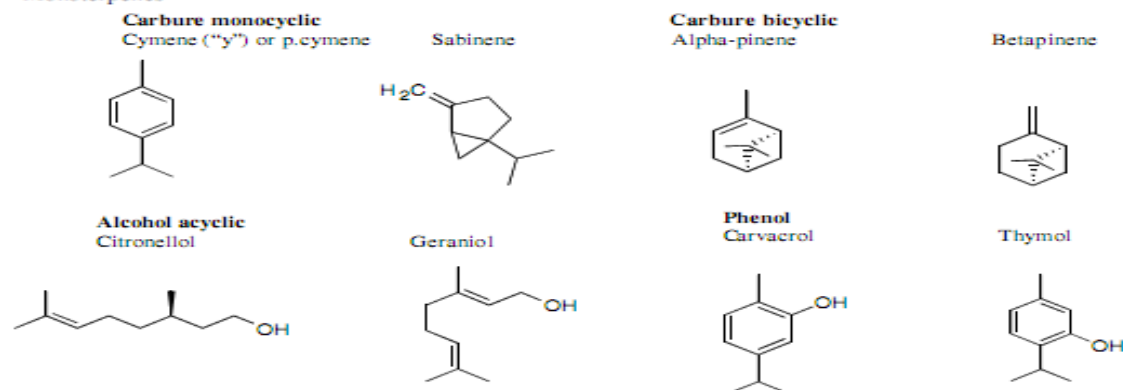
- Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone ( $C_5H_8$ ). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en monoterpènes, formés de deux isoprènes ( $C_{10}H_{16}$ ), les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes ( $C_{15}H_{24}$ ), les diterpènes, formés de quatre isoprènes ( $C_{20}H_{32}$ ). Les tétraterpènes, huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. Les polyterpènes ( $C_{5H_8}$ )<sub>n</sub> ou n peuvent-être de 9 à 30 [4].

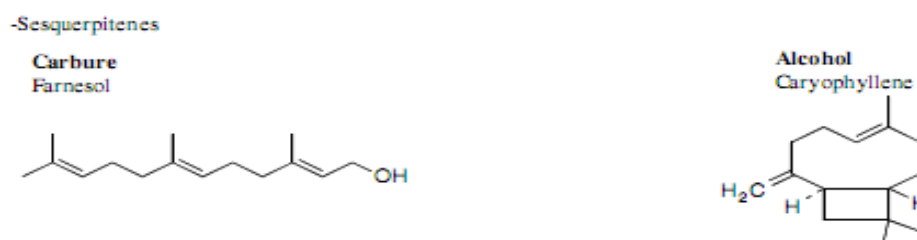
Les terpénoïdes sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide, etc.).

Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : mono\_ et sesquiterpènes.

Les monoterpènes sont volatils entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des H.Es, parfois plus de 90%. Ils peuvent être acycliques (myrcène), monocyclique (limonène) ou bicyclique (pinène). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de substances à fonction chimique : alcools (menthol), aldéhydes (sinensal), cétones (menthone), et des esters (acétate de géranyle) [4]. (figure 1)

**1. Terpenes****-Monoterpenes****Figure 1:** Structures chimiques de quelques monoterpènes [3].

Les sesquiterpènes, il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple :  $\beta$ -caryophyllène,  $\beta$ -bisabolène,  $\alpha$ -humulène,  $\alpha$ -bisabolol, farnesol [3]. (figure 2)

**Figure 2:** Structures chimiques de quelques sesquiterpènes [3].

- Les composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane ( $C_6-C_3$ ) sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Ce sont très souvent des allyl- et propénylphénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiaceae (anis, fenouil, persil, etc. : anéthole, anisaldéhyde, apiol, méthyl-chavicol [= estragole], etc.), mais aussi de celles du girofle, de la muscade, de l'estragon, du basilic, de l'acore ou des cannelles (eugénol, safrole, asarones, cinnamaldéhyde, etc.). On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés en  $C_6-C_1$  comme la vanilline (assez fréquente) ou comme l'anthranilate de méthyle. Les lactones dérivées des acides cinnamiques (i.e. les coumarines) étant, au moins pour les plus simples d'entre elles, entraînaient par la vapeur d'eau, elles seront également présentes dans certaines huiles essentielles [4].

## **6. Paramètres influençant la composition quantitative et qualitative des huiles essentielles:**

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité est fondamentale car les activités biologiques qui découlent des huiles essentielles peuvent être très différentes. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs d'origine intrinsèque, spécifiques du bagage génétique de la plante ou extrinsèque, liés aux conditions de croissance et de développement de la plante [1].

### **6.1 Facteurs intrinsèques**

Une huile essentielle doit avant tout autre chose être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue pour éviter toutes dénominations trompeuses du matériel végétal. L'influence du stade végétatif, l'organe de la plante, les hybridations, les facteurs de mutation, la polyploïdie et le polymorphisme chimique « chimiotypes » sont les principaux facteurs intrinsèques qui influencent la composition et le rendement des huiles essentielles [1].

### **6.2 Facteurs extrinsèques**

Les conditions environnementales influencent aussi la composition des huiles essentielles. La température, la quantité de lumière, la pluviométrie et les conditions édaphiques représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique d'une plante aromatique donnée. Il y a eu pas mal de travaux ayant mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première, les conditions culturales telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles [1].

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

La méthode d'extraction et l'état du matériel végétal influent aussi sur la composition et le rendement des huiles essentielles. Il faut aussi signaler que le stockage des matières premières avant distillation peut également influencer la composition et le rendement des HEs [4].

## 7. Procédés d'extraction des huiles essentielles

### 7.1 Par entraînement à la vapeur d'eau

- L'hydrodistillation simple

Consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé [turbodistillation]) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité. Dans une variante du procédé le matériel végétal est broyé in situ (turbo-extracteur) [4].

- Dans la distillation à vapeur saturée

Le végétal n'est pas en contact avec l'eau ; la vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. Pour raccourcir le temps de traitement, limiter l'altération des constituants de l'huile essentielle et économiser l'énergie, il est possible de travailler en surpression modérée (1 à 3 bar). La conséquence de la surpression étant une augmentation de la température, la qualité du produit peut en souffrir. La distillation à vapeur saturée peut également être conduite en continu, dans des installations automatisées. Pour certaines productions (lavande, menthe), on utilise des alambics mobiles qui sont en fait des bennes de récolte conçues pour être intercalées par l'agriculteur lui-même, après remplissage, dans un montage de distillation [4].

- L'hydrodiffusion

Consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0,02-0,15 bar) à travers la masse végétale, du haut vers le bas. La composition des produits obtenus est qualitativement sensiblement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classiques. Le procédé permet un gain de temps et d'énergie [4].

### 7.2 Par expression des épicarpes de Citrus

Le principe de la méthode est très simple : les « zestes » sont dilacérés et le contenu des poches sécrétrices qui ont été rompues est récupéré par un procédé physique. Le procédé classique consiste à exercer, sous un courant d'eau, une action abrasive sur la surface du fruit. Après élimination des déchets solides, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent

directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau. La plupart des installations permettent en fait la récupération simultanée ou séquentielle des jus de fruits et de l'huile essentielle, celle-ci étant recueillie par jet d'eau après abrasion (rayures, pointes) avant ou pendant l'expression du jus du fruit. Un traitement enzymatique des eaux résiduaires peut permettre de les recycler et augmente sensiblement le rendement final en huile essentielle. Les huiles essentielles de Citrus sont également obtenues directement à partir des jus de fruits (ex.: déshuilage par le vide) [4].

### 7.3 Autres procédés

Depuis quelques années, on assiste au développement de nouvelles technologies. C'est en particulier le cas de l'hydrodistillation par micro-ondes sous vide. Dans ce procédé, la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle l'huile essentielle est entraînée dans le mélange azéotropique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée (sans ajout d'eau pour les produits traités en frais). Très rapide et peu consommateur d'énergie, le procédé livre un produit qui, le plus souvent, est de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation traditionnelle (temps de travail divisé par 5 à 10 et température plus basse) [4].

## 8. Analyses des huiles essentielles et critères de qualité

Selon la Pharmacopée française et européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais. Ce contrôle a pour but de définir les caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle comme : la masse volumique, l'indice de réfraction, l'indice d'acide, l'indice d'ester, etc. Ces caractéristiques propres à chaque huile seront ensuite utilisées pour décrire l'huile essentielle et servir de critère de qualité. Les méthodes de détermination des caractéristiques physico-chimiques à utiliser sont décrites avec précision dans le recueil de normes publiées par l'Association Française de Normalisation (AFNOR, 1996), elles-mêmes identiques aux normes internationales de l'ISO (ISO, 1997) [1].

Deux autres types d'analyse qui ont pour but d'identifier les différents constituants de l'huile essentielle afin d'en connaître la composition chimique: la chromatographie en phase gazeuse GC et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse GC/MS. La chromatographie en phase gazeuse GC est utilisée pour l'analyse quantitative et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse GC/MS pour l'analyse qualitative [1].

---

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

## **9. Activités biologiques des huiles essentielles:**

Les vertus des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles des plantes aromatiques [1].

### **9.1. Activité antimicrobienne des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles sont connues pour posséder l'activité antimicrobienne et certaines sont classées comme des substances sûres et pourraient donc être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants [1]

#### **9.1.1. Mode d'action antimicrobienne des HEs :**

L'activité antimicrobienne des HEs a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale. Cependant, la majorité des travaux cités dans ces publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de ces HEs. Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable.

En effet, certains chercheurs ont montré que la puissance de l'action des HEs varie selon leurs constituants majoritaires, et que le mode d'action est principalement lié au profil chimique des constituants de chaque HE, qui est largement diversifié [7].

Du fait cette variabilité de quantités et de profils de composants des HEs. Il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire. De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxique des huiles essentielles sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique de la cellule [8].

Quelques investigations sur le mécanisme d'action antimicrobienne des HEs ou de leurs constituants ont été menées par différents auteurs :

-*Kurita et coll.* pensaient que l'activité inhibitrice de ces composés serait due à leur affinité avec les groupements SH impliqués dans la division cellulaire;

-*Franchomme* suggère que les HEs hydroxylées créent des perturbations enzymatiques et prennent pour cibles les enveloppes protectrices, le mésosome et le cytoplasme ;

-*Boochird et Flegel* ont suggéré que les HEs auraient des cibles qui dépendent de la concentration en HE qui est la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique et le cytoplasme ;

-Récemment, *Ultée et coll.* ont montré que le carvacol provoque un effet inhibiteur chez *Bacillus cereus*. Cet effet réside dans une forte diminution de l'ATP intracellulaire, une réduction du potentiel membranaire et du pH intracellulaire et aussi une influence sur le flux de potassium (intra et extracellulaire). Ceci témoigne de l'endommagement de la membrane cytoplasmique [7];

-*Smith-Palmer et al.* (2001) ont montré que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'effet des huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif qui se caractérisent par une membrane externe imperméable. Selon *Cristiani et al.* (2007), cette imperméabilité est due à la richesse de cette membrane en lipo-polysaccharides la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer;

-D'autres études ont été effectuées sur la relation entre la présence de citral (mélange des isomères néral et gèranial) dans le zeste des fruits des agrumes et l'inhibition de *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* et *Geotrichum candidum* qui sont les principales moisissures responsables de la contamination des *Citrus*. Cette inhibition est due à la présence d'un groupement carbonyle adjacent aux carbones  $\alpha$  et  $\beta$  dans les aldéhydes insaturés  $\alpha$  et  $\beta$  ; néral et gèranial ; ceci polarise positivement le carbone  $\beta$  et l'aldéhyde peut agir en tant qu'agent d'alkylation direct capable de lier les groupes nucléophiles cellulaires [9].

Des études sur le mécanisme d'action des HE réalisées en 1978 par *Valnet et coll.* montrent que dans le corps humain, les HE possèdent un mécanisme d'action différent de celui des ATB et qu'elles agissent à différents niveaux [8].

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

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires;
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure;
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie [10].

### **9.1.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne :**

A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide [7].

Nous allons essayer d'énumérer ces différentes méthodes et de discuter chacune d'entre elle.

#### **9.1.2.1. Techniques en milieu liquide.**

##### **9.1.2.1.1. Méthode des disques de Sarbach.**

L'essence est déposée à différentes concentrations sur des disques en papier filtre de 10 mm de diamètre, l'ensemble est placé dans des tubes à essai. Dans chaque tube est réparti un certain volume de bouillon nutritif ensemencé. Une agitation mécanique est assurée pendant toute la durée de l'incubation.

L'action bactéricide totale est confirmée par repiquage en milieu liquide d'une anse prélevée sur le milieu liquide de subculture. Le pouvoir bactéricide partiel est apprécié par l'évaluation du pourcentage de survivants par repiquage en milieu solide [7].

##### **9.1.2.1.2. Méthode de Maruzuella**

Elle permet l'étude du pouvoir bactéricide en bouillon après solubilisation de l'HE dans l'éthanol. Les solutions mères sont préparées dans l'éthanol 95%, la solution alcoolique est ensuite répartie à différentes doses dans le milieu liquide préalablement ensemencé. Après la durée d'incubation, on effectue des subcultures qui permettent d'évaluer les concentrations minimales inhibitrices [7].

### **9.1.2.2. Techniques en milieu solide.**

#### **9.1.2.2.1. Méthode de Vincent.**

Elle est appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme [7], ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques [9].

Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée durant 50 ans d'utilisation mondiale. Elle permet également de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes vis-à-vis des huiles essentielles et autres agents antimicrobiens [9].

Dans cette méthode, on utilise des disques de papier filtre de 10 mm de diamètre, imprégnés d'HE et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé en surface à l'aide d'une suspension bactérienne.

Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelées zones d'inhibition [9]. La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition en mm [7].

Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante [9].

La dilution des HE se fait toujours dans un solvant tel que l'éthylène glycol, l'acétone, l'éthanol à 95%.

Le principe de cette méthode est toujours la migration de l'HE par diffusion dans la gélose.

Cette technique inspirée de celle des antibiogrammes, a été généralisée aux huiles essentielles.

Une variante de cette technique consiste en l'aménagement de cavité à l'emporte pièce, dans la gélose coulée et solidifiée en boîte. On remplit cette cavité d'un volume donné d'HE qui va diffuser dans la gélose, et on procède, après incubation, à la mesure du diamètre d'inhibition comme dans la technique précédente [7].

#### **9.1.2.2.2. Méthode de Morel et Rochaix**

Elle permet d'évaluer le pouvoir antimicrobien des HE par solubilisation dans l'alcool à différentes concentrations et incorporation de chacune des concentrations dans un milieu gélosé, ensemencé, puis coulé en boîtes de Pétri. L'alcool faciliterait la diffusion de l'essence dans le milieu [7].

### **9.1.2.2.3. Méthode de microatmosphère.**

C'est une technique d'étude en phase vapeur. Son principe est d'ensemencer une boîte de Pétri avec les germes tests, tandis que l'on dépose quelques gouttes d'HE sur un papier filtre au fond et au centre du couvercle. La boîte est incubée couvercle en bas. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit après incubation, la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance [7].

### **9.1.2.3. Détermination des CMI et CMB par dispersion des HE dans le milieu de culture.**

Cette technique de détermination des CMI par contact direct en milieu gélosé ou liquide, consiste à disperser (incorporer) l'agent antimicrobien en concentration variable de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié.

Cette technique, très fiable et reproductible pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, pose un problème de diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les HE qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture aqueux. Ce problème a été résolu en partie par l'utilisation d'émulsions des HE dans des solutions de différents détergents comme le Tween 20 et le Tween 80 ou de solvant comme l'éthanol [7].

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

Bon nombre d'études ont montré que la sensibilité d'un même germe vis-à-vis d'une même HE diffère selon la méthode utilisée ou selon le mode de dispersion de l'HE dans le milieu de culture, ce qui rend toute comparaison inexacte et pousse les chercheurs à bien choisir et améliorer les techniques d'étude [7].

L'origine de ces critiques est aussi la variation de la densité bactérienne utilisée pour l'inoculum ainsi que la difficulté à déterminer le meilleur agent émulsifiant pour avoir des proportions minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) reproductibles et comparables entre les différents manipulateurs.

D'autres critiques ont été soulevées concernant l'interaction entre les agents émulsifiants et les constituants des HEs car, en raison de leur faible solubilité, les agents utilisés pour la dispersion des HEs dans le milieu de culture bactérien, représentent un facteur important pour la mesure de leur activité antibactérienne. Ce problème a été confirmé par des travaux réalisés

---

par *Remmal et coll.* en milieu liquide et en milieu solide, qui ont montré que les CMI et CMB obtenues en absence de détergents ou de solvants - dispersion dans l'agar 0,02%- sont nettement inférieures à celles obtenues en leur présence. Ceci démontre que le Tween et l'éthanol, couramment utilisés dans ce type d'étude, exercent une inhibition sur l'activité antibactérien des HE [7].

### 9.1.3. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne :

Plusieurs paramètres influencent la détermination de l'activité antimicrobienne des HEs ou de leurs composants actifs tels que la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, l'effet de la matrice biologique, le type et la structure moléculaire des composants actifs, la dose ajoutée et le type des microorganismes ciblés [9].

L'une des difficultés pour les chercheurs est l'absence d'une méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne normalisée pour examiner les activités biologiques des huiles essentielles.

L'insolubilité des huiles essentielles dans les milieux utilisés en microbiologie, explique la variété des techniques employées.

Les propriétés antimicrobiennes des HEs diffèrent en fonction de la matrice à laquelle elles sont ajoutées, ou du contact avec les macromolécules comme les lipides ou les protéines qui protègent les bactéries de l'action des HEs. Ainsi les huiles essentielles diluées dans la phase lipidique des aliments seront moins efficaces sur des bactéries de la phase aqueuse. Une réaction chimique entre les protéines et les groupes fonctionnels des HEs réduit la disponibilité des molécules actives, ceci a été observé pour le carvacrol, conduisant à une protection relative de *Bacillus cereus* contre les HEs dans le lait [9].

Selon *Malecky* (2007), le principal facteur modifiant l'activité antimicrobienne des HE est le type et la structure moléculaire de ces composants actifs. Les composants oxygénés purs ont aussi montré une activité supérieure par rapport aux HEs dans lesquelles ils se trouvent.

Un autre paramètre important déterminant l'activité antimicrobienne des HEs est le type de microorganismes ciblés. En général, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis-à-vis des HEs. Parmi les microorganismes, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* (Gram+), *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-), *Candida albicans* et *Aspergillus niger* ont été les plus étudiés. Les champignons montrent généralement une sensibilité supérieure par rapport aux bactéries dont celles à Gram- apparaissent plus résistantes que celles à Gram + vis-à-vis de l'HE [9].

## 9.2. Activité antioxydante :

Quelques récentes publications ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que quelques antioxydants synthétiques. Les effets antioxydants d'huiles essentielles et d'extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique.[1] Les huiles essentielles de Cannelle, Muscade, Clou de girofle, Basilice, Origan et Thym possèdent de puissants composés antioxydants. Le thymol et le carvacrol sont encore une fois les composés les plus actifs. Leur activité est en relation avec leur structure phénolique car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrice et jouent ainsi un rôle important en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes. L'activité antioxydante est également attribuable à certains alcools, cétones et aldéhydes monoterpéniques [11].

## 9.3. Autre activités :

Les huiles essentielles possèdent aussi des propriétés :

- Régulatrice du système nerveux : anxiolytique, antispasmodique et analgésique.
- Anti inflammatoire
- Drainante respiratoire : expectorante et fluidifiante
- Cicatrisante
- Anticancéreuse : prévention et suppression du cancer [11,12]

## 10. Les huiles essentielles des agrumes

### 10.1. Les agrumes

#### 10.1.1. Définition :

D'après *LOUSSERT*, le mot « agrumes » d'origine italienne, désigne les fruits comestibles par extension aux arbres qui les portent appartenant au genre « *Citrus* ».

Les principaux agrumes cultivés pour la production de fruit sont : les orangers, les mandariniers, les clémentiniers, les citronniers, et les pomelos.

Le terme général « orangeries » désigne non seulement les plantations d'orangers mais, par extension toute plantation d'agrumes constituant le verger agrumicole [3].

**10.1.2. Classification :**

D'après *GUIGNARD*, la position systématique des agrumes est comme suite [3] :

Règne : Végétal.  
Embranchement : Spermaphytes.  
Sous-embranchement : Angiospermes.  
Classe : Eudicotylédon.  
Sous-classe : Rosidées.  
Ordre : Rutales.  
Famille : Rutaceae.  
Genres : Poncirus, Fortunella, et Citrus.

**10.1.3. Production mondiale :**

Les agrumes sont les fruits les plus produits dans le monde. Les premières estimations réalisées par la FAO font état d'une production mondiale qui fixe 90 millions de tonnes pour la campagne 1997 à 1998 [3].

Les Etats-Unis et le Brésil qui dominent le marché, et destinent une grande partie de leurs productions agrumicoles à la transformation sous forme de jus.

Le bassin Méditerranéen produit des agrumes pour alimenter le marché international du fruit frais avec des exportations de l'ordre de 5.424100 tonnes pour la campagne de 1997 et 1998. Les agrumicoles du bassin Méditerranéen sont : L'Espagne, l'Italie, l'Egypte, le Maroc, La Grèce, l'Algérie, et la Tunisie. L'Espagne étant le premier pays producteur avec 5578000 tonnes en 1999. Parmi les producteurs d'agrumes, l'Algérie occupe la 7<sup>ème</sup> place (1999) [3].

## 10.2. Caractéristiques des huiles essentielles des agrumes :

Les diverses espèces du genre élaborent et stockent, dans des poches schizolysigènes localisées dans la partie externe du mésocarpe du fruit (flavedo), des huiles essentielles. C'est cette localisation particulière qui permet de les récupérer directement par expression. Ces huiles essentielles peuvent être utilisées pour l'aromatisation des médicaments et la formulation des produits de parapharmacie. Elles sont surtout consommées par les industries agro-alimentaires et la parfumerie [4].

Certaines de ces huiles essentielles sont inscrites à la 10<sup>ème</sup> édition de la pharmacopée française : c'est le cas de l'huile essentielle de Bergamote et de celle de Mandarine. D'autre comme celle de citron, sont prises en compte par la Pharmacopée Européenne (3 éd.). Les huiles essentielles des espèces les plus utilisées du genre Citrus font l'objet de normes AFNOR mais, à ce jour, leurs profils chromatographique n'ont pas tous été définis [4].

### 10.2.1. Huile essentielle de Bergamote :

Cette huile essentielle est extraite sans chauffage, par des procédés mécaniques, du péricarpe frais du fruit de *C. aurantium L spp. bergamia* (Wight & arnott) Engler. Sa composition chimique la différencie nettement des huiles essentielles des autres agrumes. Les profils chromatographiques retenus par la pharmacopée et par la norme NF T 75-215 sont très peu différents. Celui décrit par la pharmacopée est le suivant :  $\beta$ -pinène (5-9,5 %), limonène (33-34%),  $\gamma$ -terpinène (6-10,5%), linalol (7-15%), acétate de linalyle (22-33%), géraniol (< 0,5%) [4].

### 10.2.2. Huile essentielle d'orange douce :

Les péricarpes des différents cultivars de l'oranger à fruits douce (*Citrus sinensis (L.) Pers. (=C. aurantium L. var. dulcis Pers.)*) fournissent une huile essentielle composée très majoritairement de carbures monoterpéniques (limonène 93,5-96,5% ;  $\beta$ -myrcène , 1,5-2 % ) qu'accompagnent de faibles quantités d'aldéhydes aliphatique (ex :décanal) et monoterpénique (citral < 0,5 %) et du linalol ( 0,4-1 % ). Elle renferme en outre plusieurs dizaines de composées terpéniques et aliphatiques à l'état de trace [4].

### 10.2.3. Huile essentielle d'Orange Amère :

Le péricarpe frais d'orange amère également appelée bigarade (*C. aurantium L. ssp. aurantium*) fournit, par expression, une huile essentielle assez semblable à celle de l'orange douce, mais riche en composés carbonylés : 96-98 % de limonène et autres carbures (myrcène,  $\alpha$ -pinène, etc.), 0,4-0,5 % d'aldéhydes aliphatiques, environ 0,1 % d'aldéhydes monoterpéniques [4].

### 10.2.4. Huile essentielle de néroli bigaradier

Cette huile est obtenue à partir des fleurs de l'espèce précédente (oranger amère). Elle est très riche en linalol (28-44 %), acétate de linalyle (3-15 %), limonène (9-18 %),  $\beta$ -pinène (7-17 %). On y note également la présence d'acétate de géranyle (1-5%) et de néryle (<2,5%), de trans-nérolidol (1-5%) et de trans-trans farnésol (1-4%), etc [4].

### 10.2.5. Huile essentielle de Citron

Cette huile essentielle, préparée à partir des péricarpes de *C. limon (L.) Burm. f.* est un peu moins riche en carbures monoterpéniques que celle d'orange amère (92 à 95%) et sa teneur en limonène oscille entre 60 et 75 % ; ce carbure monocyclique est accompagné d'environ 8- 12% de  $\beta$ -pinène et 8-10% de  $\gamma$ -terpinène (valeurs moyennes). On note la présence d'aldéhyde aliphatique (0,2-0,5 %, nonanal, octanal) et d'aldéhyde monoterpénique (2-3%, gèranial, néral, citronellal) [4].

### 10.2.6. Huiles essentielles de Mandarine :

Comme l'huile essentielle de citron et celle de lime (*C. aurantiifolia* (Christm) Swingle, cf. norme NFISO 3519 [11-1997]), l'huile essentielle de mandarine d'Europe (*C. reticulata Blanco*) est caractérisée par une teneur en limonène assez faible (65-75 %), une teneur importante en  $\gamma$ -terpinène (10-20 %). La teneur en  $\beta$ -pinène est faible (1 à 3 %) [4].

### 10.3. Limonène :

#### 10.3.1. Définition

Le limonène  $C_{10}H_{16}$  est un hydrocarbure liquide appartenant à la famille des terpènes. Il est produit naturellement par divers végétaux, notamment les agrumes et représente le constituant majoritaire de toutes les huiles issues des peaux de ces fruits, environ 95 %. Les principaux synonymes de limonène sont: d-Limonène. (+)-Limonène. (R)- (+)-Limonène, (D)-Limonene , D.(+)-Limonene [13].

La structure du limonène est donnée par la figure 3

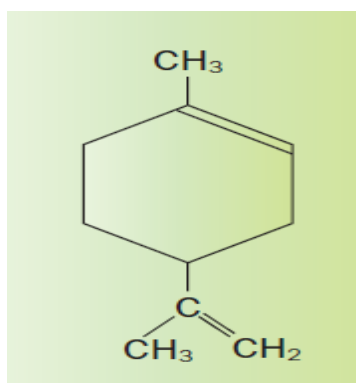


Figure 3: Structure de limonène [13].

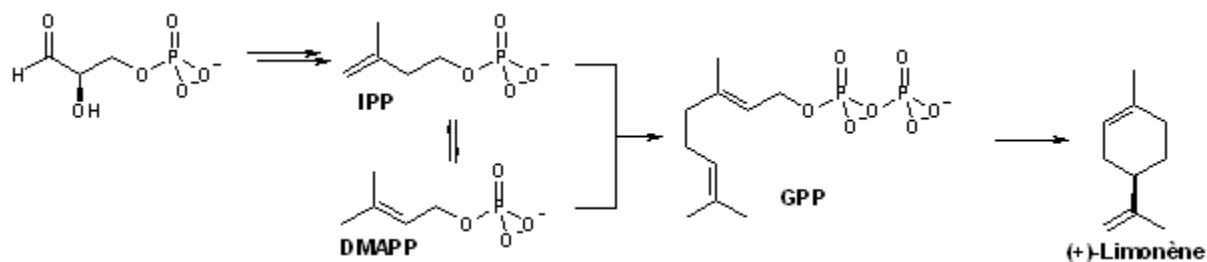
#### 10.3.2. Propriétés physico-chimiques et organoleptiques

Les propriétés physico-chimiques et organoleptiques sont mentionnées dans le tableau 1 :

Tableau 1: Propriétés physico-chimiques et organoleptiques du limonène [13].

Formule brute		$C_{10}H_{16}$
Masse molaire (g/mol)		136.23
Température d'ébullition ( $^{\circ}C$ )		176
Température de fusion ( $^{\circ}C$ )		-75
Masse volumique (g / $cm^3$ )		0.84
Solubilité	Eau	Insoluble
	Hexane	Soluble
Apparence		Liquide incolore
Odeur		Parfums caractéristique des agrumes





**Figure 5** : Biosynthèse de limonène par la plante [13].

### 10.3.5. Procédé de production

Le limonène est largement répandu dans la nature. Le centre international sur le cancer (CIRC) rapporte que le d-limonène a été décelé dans plus de 300 huiles essentielles. Le d-limonène est un sous produits de l'industrie des jus d'orange, de citron et de pamplemousses. Il est obtenu à partir de l'huile des pelures de ces agrumes dans laquelle sa concentration peut atteindre 95% en poids. La récupération du limonène se fait par extraction selon deux méthodes. l'extracteur d'huile brune « Brown Oil Extractor » récupère l'huile des fruits avant l'extraction du jus alors que l'extracteurs en ligne FMC (FMC In Line Extractor) récupère l'huile des fruits pendant le procédés d'extraction du jus. Il s'agit de procédés fonctionnant par bris mécanique des alvéoles contenant l'huile essentielle et qui sont situées dans l'épicarpe des fruits.

### 10.3.6. Quelques usages du limonène

- La thérapie anticancéreuse
- Des patchs à l'orange : pour délivrer progressivement des médicaments
- Insecticides
- Le limonène est utilisé comme solvant de nettoyage
- Préparation de plastiques
- Préparation de la carvone

### 10.3.7. Limonène et l'environnement :

Le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) rapporte la teneur de ce terpène dans une grande variété d'aliments et d'espèces végétales, il a été décelé dans l'atmosphère urbaine et forestière, l'air ambiant intérieur, les boues d'épuration et dans l'eau de consommation [13].

Si il est déversé sur le sol extérieur humide ou sec le limonène devrait se volatilisé rapidement mais son adsorption pourrait atténuer ce phénomène. Le limonène est considéré comme l'un des solvants les plus photochimiquement réactifs qui se dégrade [13].

Sa présence dans l'atmosphère pourrait contribuer à la diminution globale de l'ozone troposphérique et favoriser ainsi la suppression du smog photochimique [13].

#### **10.3.8. Aspects biologiques et toxicologiques :**

Le limonène pur n'est pas un agent sensibilisant de la peau et n'est pas allergène, en revanche ses produits d'oxydation par l'air (notamment l'oxyde de limonène) sont irritants et peuvent provoquer l'allergie.

L'oxydation du limonène dans l'air favorise la formation des nanoparticules solides et conduit également à la formation de divers composés oxygénés. En raison de leur taille, ces particules peuvent pénétrer dans les poumons.

A faible dose le limonène est non toxique chez l'humain, il est en effet classé dans la catégorie GRAS « Generally Recognized as Safe » généralement considéré sans danger. Il n'a pas été prouvé que ce produit est cancérigène ou génotoxique pour l'homme, le centre international de recherche sur le cancer a classé le d-limonène au niveau 3 : non classable comme cancérigène chez l'homme [13].

*Chapitre II*  
*Les émulsions et principe*  
*d'encapsulation*

---

## II. LES EMULSIONS ET PRINCIPE D'ENCAPSULATION

### 1. Définition :

Une émulsion est une dispersion de gouttelettes d'une phase liquide dans une autre, les deux phases étant non miscibles. On distingue donc une phase dispersée (discontinue) et une autre dispersante (continue). La persistance de l'état dispersé est assurée par la présence d'un composé stabilisant, en général un agent de surface appelé surfactif ou tensio-actif [14]. Il s'agit d'un système thermodynamiquement instable [15]

On parle d'émulsion directe dans le cas d'une émulsion d'huile dans l'eau (H/E ou O/W pour oil in water), la phase huileuse étant dispersée dans la phase aqueuse. Dans le cas contraire on parle d'émulsion inverse. On peut également trouver des émulsions multiples (H/E/H ou E/H/E).[14]

### 2. Classification des émulsions :

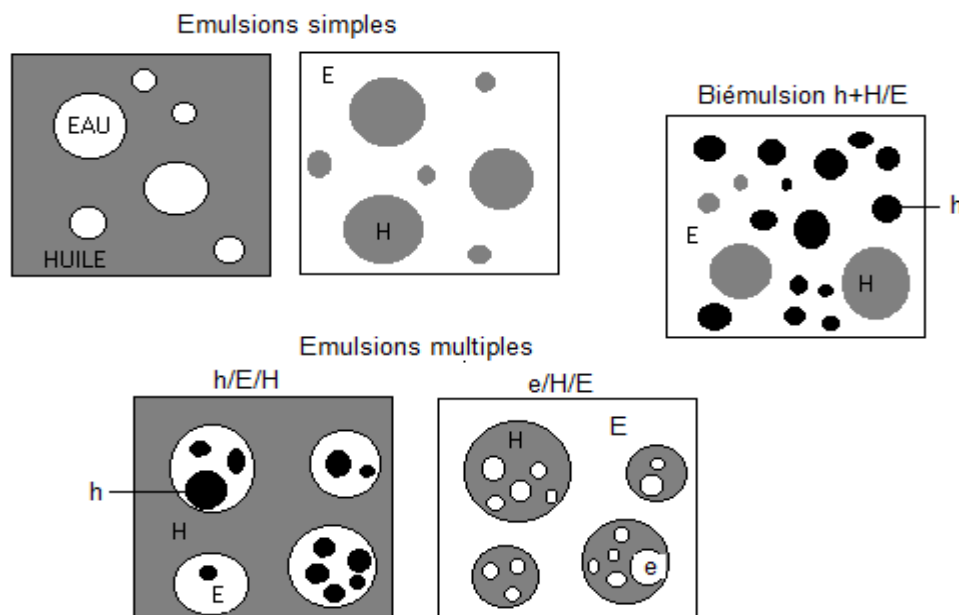
#### 2.1 En fonction de la nature des phases dispersées :

Il existe plusieurs types d'émulsions selon la dispersion des phases aqueuses et huileuses (Figure 6).

Les émulsions simples sont appelées eau-dans-huile (E/H)(ou bien hydrophile / lipophile) quand des gouttelettes d'eau sont dispersées dans la phase huileuse, et huile-dans-eau (H/E) (lipophile/hydrophile) pour l'inverse.

Les émulsions multiples sont symbolisées par h/E/H ou e/H/E; h (respectivement e) indique la phase la plus interne et H (respectivement E) indique la plus externe. Les phases h et H ou e et E peuvent être identiques ou différentes.

Les biémulsions sont des émulsions contenant deux différentes phases internes de gouttelettes, soit de même nature (mais de taille différente), soit de nature différente (quelque soit la taille). [16]



**Figure 6:** Les différents types d'émulsions [16]

## 2.2 En fonction de la taille des gouttelettes

- **Les macroémulsions ou émulsions:** Le diamètre moyen de ces émulsions classiques est supérieur ou égal au micromètre. Compte tenu de leur taille, et en fonction de la viscosité de la phase continue, les gouttes des émulsions sédimentent (ou crèment) sous l'effet de la gravité. Les émulsions sont des systèmes instables du point de vue thermodynamique, car la séparation des deux phases conduit à une diminution de l'énergie libre. Cependant, la cinétique de grossissement de gouttes peut être suffisamment retardée pour que l'émulsion reste stable pendant une durée déterminée [14].

- **Les nano/mini émulsions:** ces deux termes sont utilisés pour nommer des systèmes biphasiques, de taille de gouttes comprises entre 20 et 200 nm. En raison de la taille des gouttes, les nanoémulsions sont transparentes ou translucides à l'œil et sont stables à la sédimentation ou au crémage. La préparation des nanoémulsions exige soit l'utilisation de méthodes hautement énergétiques, comme la microfluidisation, ou bien l'utilisation de méthodes non conventionnelles et complexes, mais de faible consommation énergétique, comme l'inversion de phase. L'avantage des miniémulsions est leur extraordinaire stabilité au vieillissement et à la dilution [14].

▪ **Les microémulsions** : ce terme est utilisé aujourd'hui pour désigner un système monophasique dans lequel un tensioactif particulièrement performant rend possible la coexistence, à l'échelle quasi moléculaire, des phases eau et huile. Contrairement aux macro ou nanoémulsions, elles sont thermodynamiquement stables [14].

### 3. Caractérisation des émulsions et contrôles physico-chimiques

**3.1 Stabilité:** La stabilité d'une formulation revêt plusieurs aspects :

**3.1.1 Stabilité physique** : l'émulsion ne doit pas montrer de démixtion. Une démixtion peut être provoquée par de la coalescence ou par un phénomène de crémage/sédimentation (la phase continue apparaît mais la phase interne peut être redispersée). La stabilité physique inclut aussi une invariance du comportement rhéologique et de la granulométrie [17].

**3.1.2 Stabilité chimique** : aucun des composants de l'émulsion ne doit participer à une réaction chimique pouvant soit modifier de manière grave la stabilité physique, soit perturber les propriétés applicatives (aspect, couleur, odeur, efficacité) [17].

**3.1.3 Stabilité microbiologique** : la formulation ne doit pas être un milieu de culture pour levures, moisissures et germes bactériens, au risque de se dégrader (modification de viscosité, de couleur, d'odeur, démixtion), mais surtout pour éviter tout problème applicatif. Chaque fois que la santé publique est concernée (domaines alimentaire, cosmétique, pharmaceutique), la réglementation impose des normes microbiologiques strictes. La stabilité microbiologique est obtenue par une sélection rigoureuse de conservateurs [17].

Différents mécanismes de rupture de la stabilité existent, ils peuvent être réversibles ou irréversibles (voir figure 7) :

- **Sédimentation et crémage**

Ce mécanisme résulte de la différence de densité entre phase dispersée et phase continue. On parle de crémage quand il s'agit d'une ascension de la phase dispersée et de sédimentation quand la phase dispersée chute. C'est un phénomène réversible : l'interface existe toujours, il suffit d'agiter pour revenir à l'émulsion [16].

Pour limiter ce phénomène, on a plusieurs possibilités :

- Réduire la taille des gouttes de phase dispersée,
- Ajouter un agent qui augmente la viscosité,
- Diminuer la différence de densité entre les deux phases,
- Eviter l'agrégation des gouttes [16].

- **Floculation**

Ce mécanisme résulte de l'agrégation des gouttelettes due aux interactions attractives. L'énergie d'interactions entre les particules est due à la somme des forces de répulsions électrostatiques et au potentiel d'attraction de type Van der Waals. Ce phénomène peut être réversible lorsque l'attraction est peu énergétique et irréversible dans le cas contraire [16].

Pour éviter ce phénomène, il faut :

- Eviter le crémage et la sédimentation (car ces phénomènes mettent les gouttes en contact),
- Augmenter les répulsions stériques et électrostatiques (en utilisant des tensioactifs ioniques par exemple) [16].

- **Coalescence**

Ce mécanisme, irréversible, résulte de la rupture du film interfacial entre les gouttes de la phase dispersée. À terme on revient au système diphasique de départ. C'est un processus énergétiquement favorable [16].

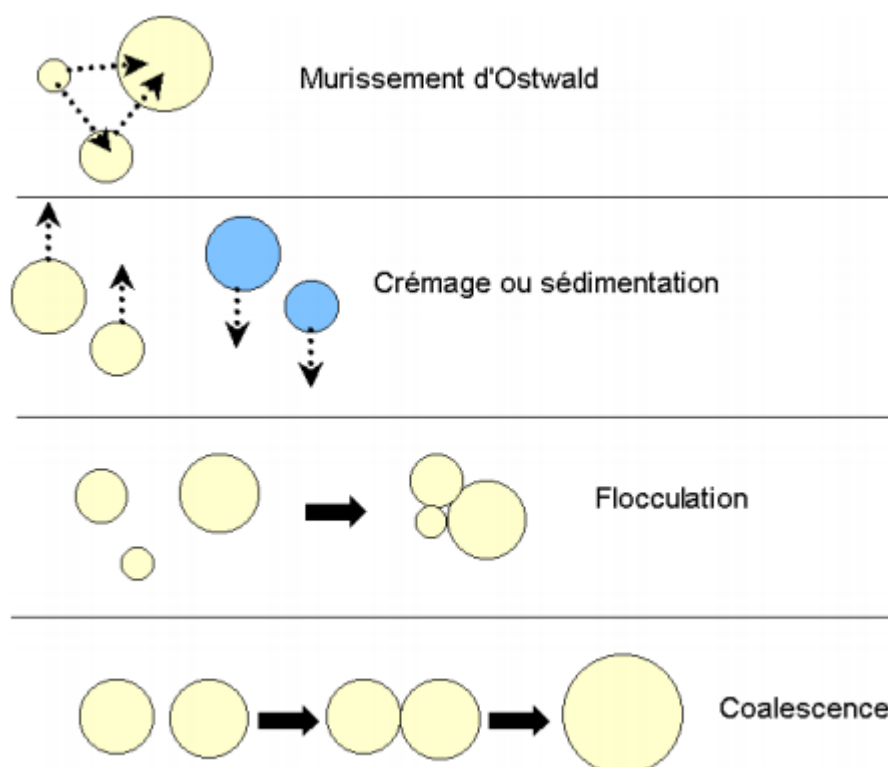
Pour éviter ce phénomène, il faut :

- Prévenir la floculation,
- Renforcer la résistance du film par le choix du tensioactif [16].

- **Mûrissement d'Ostwald ou diffusion moléculaire**

Le mûrissement d'Ostwald correspond à la diffusion des petites gouttes de la phase dispersée vers les gouttes les plus grosses [14]. Ce phénomène irréversible peut être évité par:

- Monodispersion de la population de gouttelettes,
- Diminution de la solubilité en ajoutant du sel dans une émulsion E/H ou un soluté apolaire de masse molaire élevée pour une émulsion H/E,
- Tensioactifs faisant barrière à la diffusion de molécules de la phase dispersée [16].



**Figure 7:** Processus de déstabilisation d'une émulsion [14].

- **Inversion de phases**

C'est un phénomène irréversible qui se traduit par un brusque changement du sens de l'émulsion [18]. Il est possible de provoquer l'inversion d'une émulsion en augmentant la fraction volumique de phase dispersée, on parle ici « *d'inversion catastrophique* »

Les émulsions peuvent aussi s'inverser par modification de température, ce qui change la valeur de la « balance » hydrophile-lipophile (HLB) du tensioactif stabilisant. Ce type d'inversion apparaît avec les systèmes formulés avec des surfactifs non-ioniques (exemple polyoxyde d'éthylène ; HLB élevé)

La température à laquelle se produit l'inversion s'appelle PIT (Phase Inversion Temperature) et s'utilise pour caractériser ce type de tensioactif [15]

L'inversion de phase se produit en deux étapes:

- Flocculation généralisée
- Coalescence généralisée

- **Bottle test**

Le test de l'ampoule ou bottle test consiste à observer le comportement d'une émulsion au cours du temps, à une température donnée. Ce test reproduit le vieillissement naturel de la formulation, sa mise en œuvre est simple, mais le temps nécessaire à l'obtention d'un résultat peut être long. Cette technique est donc mieux adaptée à un travail de développement plutôt qu'à une procédure de contrôle post-fabrication.

Une autre technique utilisée pour mesurer la stabilité d'une émulsion est le vieillissement accéléré, réalisable par deux méthodes :

- Le vieillissement en enceinte climatique fait subir aux émulsions des cycles de chaud-froid répétés ;
- La sédimentation forcée reprend le principe du « bottle test » mais en utilisant une centrifugeuse pour accélérer la sédimentation [14].

### **3.2 Sens de l'émulsion :**

La nature de la phase externe, et par conséquent le type d'émulsion, peuvent être détectés par différentes techniques, notamment par des expériences de dispersibilité d'un petit volume d'émulsion dans une phase aqueuse ou huileuse. La nature de la phase externe peut aussi être déterminée par des mesures de conductivité. En effet, dans la majorité des cas, l'eau, contrairement à l'huile, contient un électrolyte. La conductivité de la phase aqueuse est donc 100 à 1000 fois plus élevée que celle de l'huile. La valeur de la conductivité d'une émulsion dépendant de sa phase externe, il est donc relativement facile de déterminer si l'émulsion est de type E/H ou de type H/E. La détermination de la phase externe est d'une importance capitale dans l'interprétation des phénomènes, notamment pour détecter l'inversion de phase au cours d'un procédé d'émulsification. De plus, pour une émulsion multiple de type e/H/E, il est possible de déterminer le pourcentage de phase interne grâce à ce type de mesure [14].

La conductivité  $\kappa_{em}$  d'une émulsion H/E est directement liée à la conductivité et à la fraction volumique de la phase aqueuse continue ( $\kappa_{ext}$  et  $f_w$ ). Ainsi, en première approximation on peut utiliser la relation linéaire suivante :

$$\text{Equation 1 : } \kappa_{em} = f_w \cdot \kappa_{ext}$$

Si l'on désire plus de précision, il convient de se servir de relations plus complexes, telle que la formule de Bruggeman :

$$\text{Equation 2 : } \kappa_{em} = f_w^{3/2} \cdot \kappa_{ext} \quad [14]$$

### 3.3 Granulométrie :

Une des propriétés importantes des émulsions est la taille des gouttes, elle est particulièrement représentative des conditions d'agitation et de formulation dans lesquelles l'émulsion a été élaborée. Dans la plupart des cas, une émulsion contient des gouttes de tailles différentes, notamment à cause du caractère partiellement ou totalement aléatoire des procédés d'agitation. Il faut alors fournir non pas une valeur, mais une distribution de tailles de gouttes qui représente un inventaire statistique de la population présente dans l'émulsion.

La distribution est déterminée par des appareils à diffraction laser. Ces appareils mesurent des distributions généralement en volume, c'est-à-dire en représentant la proportion volumique d'un ensemble de gouttes dans une classe de diamètre par rapport au volume total de phase dispersée. Notons qu'il existe aussi des distributions en nombre ou en surface [14].

L'émulsion peut également être caractérisée par une seule valeur de diamètre, représentative d'une moyenne de l'ensemble de la population de gouttes. Ce diamètre moyen est calculé de diverses façons suivant le critère choisi [14].

De plus, il existe des diamètres caractéristiques correspondant au rapport de divers moments de la distribution. Ces valeurs moyennes dépendent évidemment de la façon dont on les calcule.

On distingue le diamètre moyen arithmétique  $d(4.3)$ , le diamètre en surface  $d(3.2)$  (appelé diamètre de Sauter). Ce dernier est en fait le diamètre de la sphère ayant le même rapport surface/volume que la population entière [14].

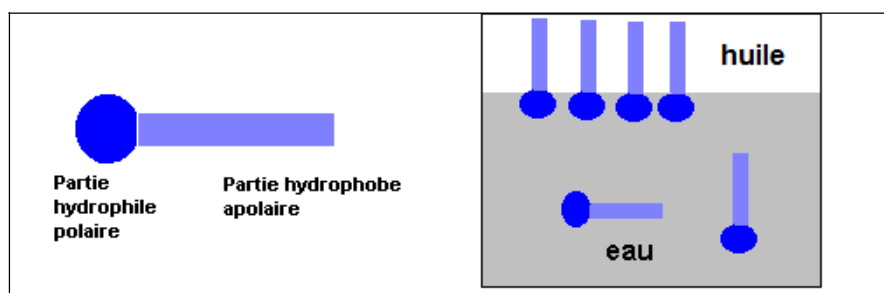
### 3.4 Viscosité:

Le comportement rhéologique d'une émulsion est souvent complexe en raison de l'influence de nombreux paramètres inhérents à la structure (tailles et organisation des gouttes) ou aux composés chimiques utilisés. D'une manière très générale, la viscosité des émulsions dépend des paramètres suivants :

- La fraction volumique de phase dispersée  $\Phi$ , nominale pour les émulsions diluées, effective pour les émulsions concentrées ;
- La taille des gouttelettes et la distribution de taille des gouttes ;
- La tension interfaciale eau/huile ;
- La viscosité de la phase continue et, à degré moindre, celle de la phase dispersée ;
- La rhéologie interfaciale [16].

### 4. Les tensioactifs

Les composés tensioactifs ou agents de surface ou encore surfactifs, appelés en anglais surfactants, ont la propriété de s'absorber aux interfaces, et donc de diminuer la tension interfaciale eau/huile afin de permettre la dispersion des deux liquides non miscibles (augmentation de l'aire de l'interface). Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles (voir figure 8) : ils possèdent une partie polaire et une partie apolaire. La partie polaire, hydrophile, lipophobe, présente une affinité pour l'eau (soluble dans l'eau). La partie apolaire, hydrophobe, lipophile, présente une affinité pour les huiles (soluble dans l'huile) [16].




**Figure 8:** Schéma simplifié d'une molécule amphiphile [16].

La partie lipophile est constituée par une ou plusieurs chaînes hydrocarbonée(s) aliphatique(s), linéaire(s) ou ramifiée(s), ou aromatique(s) ou encore alkylaromatique(s). Le caractère hydrophobe de la partie hydrocarbonée varie avec le nombre d'atomes de carbone,

le nombre d'insaturations et les ramifications. En règle générale, le caractère hydrophobe croît avec le nombre d'atomes de carbone et diminue avec le nombre d'insaturations. La partie hydrophile, ou tête polaire, est constituée par un ou plusieurs groupements polaires (s), ionique (s) ou non ioniques (s). Les agents tensioactifs sont classés en fonction de la nature de la partie hydrophile puisque celle-ci gouverne leurs propriétés [16]. (voir tableau 2).

On distingue les tensioactifs ioniques (anioniques, cationiques, zwitterioniques ou amphotères) et les non ioniques.

**Tableau 2:** Classement des tensioactifs [16].

	
Partie lipophile	Tête hydrophile
apolaire chaîne hydrocarbonée C <sub>4</sub> – C <sub>30</sub>	polaire ionique ou non ionique
Aliphatique : – linéaire – ramifiée – insaturée Aromatique Alkylaromatique  Origine : – pétrochimie – huiles végétales – graisses animales	Anionique – CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> M <sup>+</sup> – OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> M <sup>+</sup> – SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> M <sup>+</sup> – (RO) <sub>n</sub> PO <sub>4</sub> <sup>(3-n)-</sup> (3-n) M <sup>+</sup>
	Cationique – (R) <sub>n</sub> NH <sub>(4-n)</sub> <sup>+</sup> , X <sup>-</sup> – R <sub>4</sub> N <sup>+</sup> , X <sup>-</sup>
	Zwitterionique – $\overset{+}{N} \sim \text{CO}_2^-$ – $\overset{+}{N} \sim \text{SO}_3^-$
	Non ionique – OR, –OH, –CO <sub>2</sub> R, –CONHR – (CH <sub>2</sub> –CH <sub>2</sub> –O) <sub>n</sub> – polyol

Lorsque le tensioactif est en concentration suffisante, les molécules de tensioactif en excès s'autoassocient en solution sous forme d'agrégats appelés micelles. La concentration à partir de laquelle un composé tensioactif s'autoassocie sous forme de micelles en solution aqueuse est appelée concentration micellaire critique (CMC). La valeur de la CMC est une caractéristique du tensioactif et dépend de la longueur de la chaîne lipophile et de la nature de la tête polaire. Par exemple les CMC des tensioactifs non ioniques sont plus basses que celles des tensioactifs ioniques de longueur de chaîne comparable [16].

Mais la CMC dépend également de l'environnement physico-chimique : concentration en électrolytes ou température.

La capacité du tensioactif à diminuer la tension interfaciale entre les deux phases à émulsionner constitue un critère de choix du tensioactif. D'autres critères de choix plus facilement accessibles peuvent être utilisés. En règle générale, le tensioactif doit présenter une bonne affinité pour la phase continue : l'obtention d'une émulsion de type huile dans eau (H/E) nécessite un tensioactif à caractère plutôt hydrophile et inversement une émulsion de type eau dans l'huile (E/H) fera appel à un tensioactif à caractère lipophile.

Pour préciser la nature plutôt hydrophile ou lipophile d'un tensioactif, on utilise des concepts de formulation comme la balance hydrophile/lipophile (HLB) ou la différence hydrophile/lipophile (HLD) [16].

## **5. Concepts de formulation**

### **5.1 Variables de composition et variables de formulation physico-chimiques**

La formulation des émulsions se ramène au choix des valeurs de deux types de variables : les variables de composition et les variables physico-chimiques.

On appelle variable de composition les proportions relatives des constituants principaux du système : tensioactif, eau, huile.

On appelle variables de formulation physico-chimiques tous les paramètres physiques (température, pression) ou chimiques (nature des constituants principaux et des additifs, proportion des additifs) susceptibles d'influer sur le système. [16]

### **5.2. Méthode HLB**

Le concept HLB, introduit par Griffin, permet de formuler des émulsions stables. Cette méthode est basée sur une classification des tensioactifs par hydrophilie croissante (elle correspond au rapport entre la proportion des groupements hydrophiles, ayant une affinité pour l'eau, et la longueur de la chaîne lipophile, ayant une affinité pour l'huile) et sur l'utilisation de règles simples de calcul des propriétés de mélanges de tensioactifs.

En dessous d'un HLB d'une valeur de 9, l'émulsifiant est de caractère lipophile (formation d'une émulsion E/H) tandis qu'entre 11 et 20, il a un caractère hydrophile (formation d'une émulsion H/E) [17].

Le HLB peut être déterminé selon plusieurs méthodes [17] :

- A partir de la structure chimique à l'aide de formules simples ; par exemple pour un tensioactif non-ionique polyéthoxylé à partir de la relation (*Griffin*) :

$$\text{HLB} = \frac{100}{5} \times \frac{(\text{masse de la chaîne polyéthoxylée})}{\text{masse molaire}}$$

- Par une méthode de contribution de groupes lipophiles et hydrophiles par la formule (*Davies*):

$$\text{HLB} = 7 + \sum (\text{HLB groupe hydrophile}) - \sum (\text{HLB groupe lipophile})$$

Toutefois, les deux échelles ne sont pas compatibles et demeurent plus ou moins précises.

Aujourd'hui, il est possible de trouver le HLB de tensioactifs reporté dans la littérature ou dans les catalogues de produits chimiques [17].

Les émulsifiants sont avantageusement utilisés en mélange : la valeur HLB d'un mélange binaire se calcule en première approximation par la relation linéaire suivante:

$$\text{HLB}_{\text{mélange}} = X_1 \text{HLB}_1 + X_2 \text{HLB}_2$$

Où :  $X_1$  est la fraction massique du tensioactif 1 dans la formulation,

$X_2$  la fraction massique du tensioactif 2 dans la formulation,

HLB1 valeur HLB du tensioactif 1,

HLB2 valeur HLB du tensioactif 2 [17].

### 5.2.1 Principe

La méthode de Griffin repose sur deux principes forts : la notion de valeur HLB optimale et la notion de type chimique.

Admettons que, pour une formule donnée (phase polaire + phase grasse + nature des émulsifiants), la variation de composition du mélange d'émulsifiants permet de passer par un optimum de stabilité après émulsification. Cet optimum est donc caractérisé par la valeur HLB du mélange le plus efficace. Le principe de la valeur HLB optimale impose alors qu'un maximum de stabilité existe encore, même si la nature des émulsifiants est changée : la composition optimale du nouveau mélange est fixée par la valeur HLB déterminée lors de la première expérience [17].

Il devient donc inutile de réaliser une série complète d'émulsions pour obtenir la meilleure composition d'un mélange d'émulsifiants.

Seuls sont à comparer les optimums obtenus pour différents couples d'émulsifiants pour déterminer lequel donne la meilleure stabilité pour l'émulsion recherchée. Cette seconde étape consiste à identifier le meilleur type chimique, selon le terme même de Griffin qui reconnaissait par ce terme peu explicite que la seule structure chimique du tensioactif n'est pas suffisante pour interpréter la capacité à émulsionner un système donné [17].

### **5.2.2 HLB requis (ou HLB critique)**

Une notion supplémentaire permet de faire l'économie même de la première série d'émulsions (détermination de la valeur HLB optimale) : la valeur HLB requise (HLBR). Dans l'exemple précédent, nous imposons au mélange d'émulsifiants de posséder une valeur HLB égale à la valeur HLB optimale. Cette valeur optimale est ainsi caractéristique du mélange phase grasse-phase polaire en présence.

Si l'on fixe la nature de la phase polaire, cette HLB optimale peut donc être affectée à la phase grasse à émulsifier : pour réaliser une émulsion stable avec cette phase grasse, il convient d'utiliser un mélange d'émulsifiant dont la composition permet d'atteindre la valeur HLB optimale. Nous connaissons donc la valeur HLB requise (HLBR) pour réaliser cette émulsion. Des tables de valeurs de HLB requises sont disponibles dans la littérature.

De la même manière que pour les émulsifiants, il existe une règle linéaire de mélange pour calculer la valeur HLBR d'une phase grasse complexe [17].

### **5.2.2 Limitation de la méthode HLB**

Bien que très utile, la méthode HLB souffre de lacunes importantes. En attribuant une valeur unique à chaque émulsifiant, on néglige l'effet des autres constituants de la formulation sur les interactions dans la zone interfaciale (un même tensioactif peut apparaître lipophile en présence d'hexane et hydrophile si l'on substitue de l'hexadécane à l'hexane dans la formulation), et l'on ne prend absolument pas en compte l'effet de la température (un tensioactif non-ionique éthoxylé paraîtra hydrophile à 20 °C et lipophile à 40 °C). De plus, des émulsifiants de même HLB peuvent présenter des comportements complètement différents, surtout s'ils sont le résultat du mélange de plusieurs émulsifiants [17].

Partant de la méthode HLB, certains auteurs ont proposé des approches moins empiriques que la méthode HLB. Ces approches sont à rapprocher du concept de rapport R de Winsor utilisé avec succès pour la formulation des microémulsions. Citons le concept de différence hydrophile lipophile (HLD) de *Salager* et la température d'inversion de phase (PIT ou température HLB) de *Shinoda*, désignant la température à laquelle le tensioactif change son affinité de la phase aqueuse pour la phase huileuse [17].

Citons également l'émulsification par cisaillement laminaire, une méthode intéressante décrite assez récemment. Cette méthode est applicable lorsque la phase continue et la phase dispersée sont visqueuses, et pour une fraction volumique en phase dispersée élevée. Il suffit alors d'un cisaillement doux (régime laminaire) pour obtenir une dispersion extrêmement régulière de gouttelettes. Si l'énergie nécessaire reste faible, le temps d'émulsification est généralement long [17].

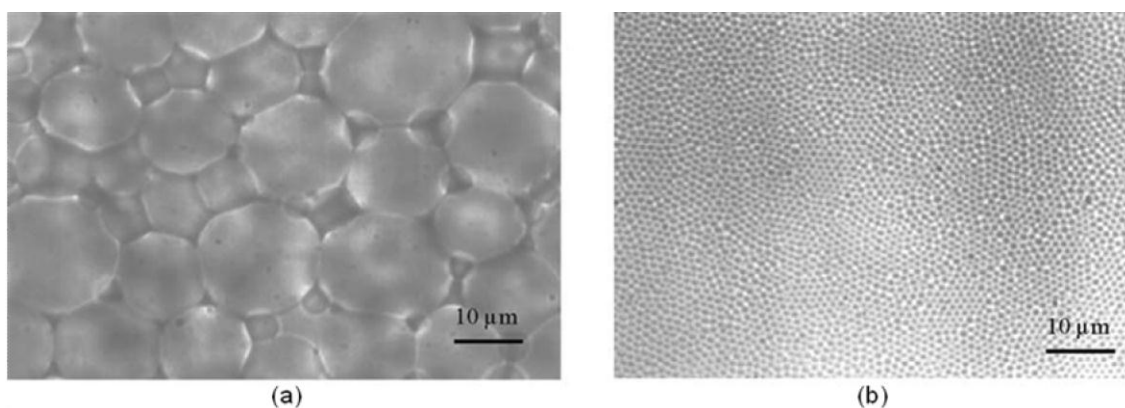
## **6. Emulsification:**

L'énergie nécessaire à l'opération d'émulsification peut être apportée au système de différentes façons, ce qui entraîne l'existence de nombreux procédés. Elle peut être d'origine mécanique (procédé le plus couramment utilisé) mais aussi sonique, électrique...

Une façon de classer les procédés d'émulsification les plus courants selon le mécanisme qu'ils mettent en jeu consiste à distinguer les systèmes qui génèrent un cisaillement et ceux qui font appel au phénomène de cavitation. Le premier groupe rassemble, entre autres, les mobiles spécifiques à l'émulsification (turbines, hélices...), les dispositifs à rotor-stator et les broyeurs colloïdaux. Le deuxième groupe comprend les techniques ultrasonores et les homogénéiseurs haute pression [16].

### **6.1. Etapes de fabrication d'une émulsion**

Généralement, l'émulsification se décompose en deux étapes successives : d'abord une étape de dispersion-mélange, que l'on appelle pré-émulsification et qui va conduire à une simple mise en suspension des gouttelettes de la phase dispersée vers la phase continue (gouttes de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ ), puis une étape dite d'homogénéisation dont le but est de réduire la taille des gouttes de façon à conférer à l'émulsion les propriétés requises et à la stabiliser (figure 9). Ces deux opérations s'effectuent dans des cuves agitées ou dans des conduites munies d'outils appelés respectivement disperseurs et homogénéiseurs [17].



**Figure 9:** Images au microscope optique d'une : (a) émulsion primaire, (b) émulsion après cisaillement (après homogénéisation) [17].

## 6.2. Emulsification par agitation mécanique

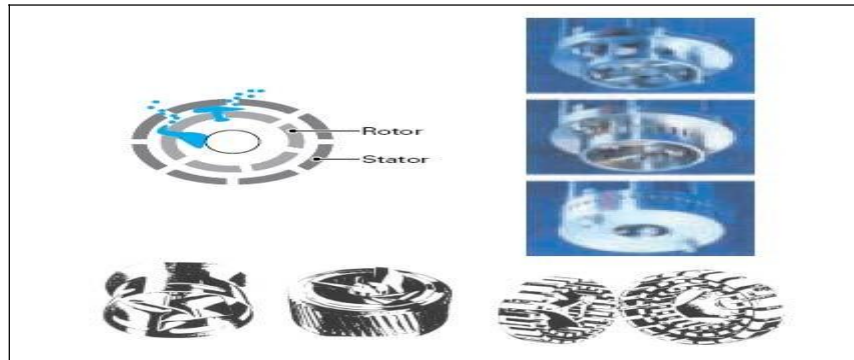
### 6.2.1 Disperseurs

Le but de ces appareils est de créer un bon cisaillement pour favoriser la rupture des gouttes tout en assurant une bonne circulation, afin de fournir une distribution assez étroite car lorsque les gouttes s'éloignent de l'agitateur elles ont tendance à coalescer. Les mobiles bien adaptés sont des mobiles comme la turbine de Rushton ou la turbine à pales inclinées générant un fort cisaillement accompagné d'un bon débit de pompage. Lorsque la dispersion est facile à mettre en œuvre, l'utilisation de mobiles axiaux, comme les hélices est suffisante [16].

### 6.2.2 Homogénéiseurs

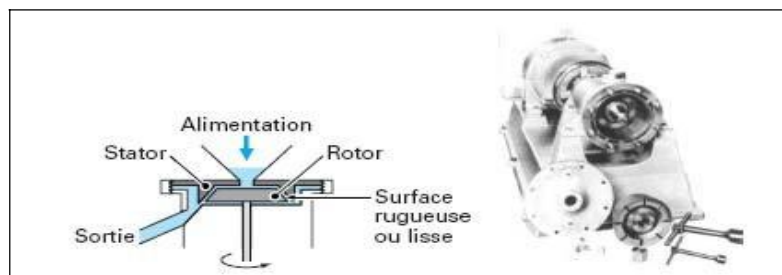
L'homogénéisation des dispersions doit permettre de conférer au produit fini la granulométrie et la stabilité requises, au moyen d'outils à très fort taux de cisaillement, la taille des gouttes passant de l'ordre de 10 à 100  $\mu\text{m}$  à une valeur inférieure au micromètre.

Une des technologies le plus couramment utilisé est le dispositif rotor-stator. Il est constitué d'un stator percé d'orifices ou de fentes plus ou moins serrées et d'un rotor tournant à grande vitesse (figure 10). Le produit est aspiré dans la tête de travail, puis expulsé après avoir traversé les lames du rotor et du stator, où il subit de très forts cisaillements du fait de l'entrefer entre le rotor et le stator (de l'ordre du millimètre ou moins) et de la vitesse très élevée [16].



**Figure 10:** Principe de fonctionnement et différentes géométries de rotor-stator [16].

Le second dispositif utilisé est le moulin colloïdal. Celui-ci, à la différence des rotors- stators, dispose d'un entrefer progressif et variable. Le fluide est contraint à passer dans un espace confiné entre un stator et un rotor (généralement de forme tronconique), tournant à très grande vitesse (figure 11). Le fluide pénètre dans le système par la partie supérieure où il subit un cisaillement dû à l'étranglement de l'entrée, puis circule dans l'entrefer, où il est soumis à des contraintes de cisaillement très fortes, provoquées par la rotation du rotor et le faible espace. Il est enfin éjecté par le bas de l'appareil. Les surfaces internes de l'entrefer peuvent être lisses ou rugueuses [16].



**Figure 11:** Principe de fonctionnement d'un moulin colloïdal [16].

### 6.2.3 Inversion de phase

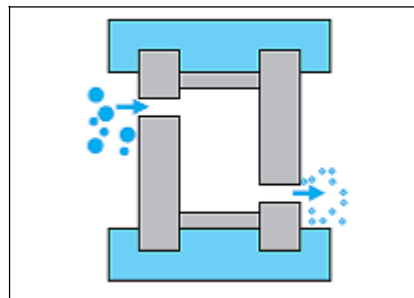
Cette méthode est basée sur la transformation d'émulsion E/H en émulsion H/E ou inversement. Les méthodes aujourd'hui utilisées sont soit un changement de composition, soit une variation de température en utilisant la PIT.

Elle a pour avantage d'obtenir des émulsions très fines en apportant peu d'énergie mécanique au système [16].

### 6.3 Homogénéiseurs haute pression

Ces systèmes fonctionnent selon le principe de la pompe à piston : on force à passer par un orifice de très petite dimension une préémulsion très fortement comprimée ; à la sortie du dispositif, une détente subite engendre un phénomène de cavitation provoquant l'éclatement des gouttes de microbulles de gaz [16].

Il existe des systèmes moyenne pression (5 à 80 MPa) ou d'autres allant jusqu'à 100 MPa. Dans les premiers systèmes, la préémulsion est envoyée par un piston dans un entrefer étroit ou dans une filière (diamètre inférieur à 10  $\mu\text{m}$ ). Le mélange sous pression est successivement laminé, soumis à de fortes dépressions puis à de fortes pressions : la cavitation aboutit alors à une pulvérisation des gouttelettes. Dans les systèmes à fortes pressions, la préémulsion est introduite dans une chambre de turbulence par un orifice de très petit diamètre (0,2 mm) et est soutirée par un diamètre légèrement plus grand décalé par rapport à l'entrée (figure 12).



**Figure 12:** Principe de l'émulsification sous haute pression : Technologie « chambre de turbulence » [16].

### 6.4 Mélangeurs statiques

Un mélangeur statique est composé d'un ensemble d'éléments immobiles placés bout à bout dans un tube. Chaque élément a une structure géométrique rigide particulière qui divise le flux et le recombine. En général, le contact entre les fluides a lieu grâce au mouvement radial engendré par les mélangeurs. L'aire interfaciale générée dépend directement de l'énergie dissipée sous forme de perte de charge. Les fluides sont mis en circulation à l'aide d'une pompe dont les caractéristiques sont fonction de la perte de charge dans le mélangeur statique et des débits désirés [16].

L'efficacité de l'opération mise en œuvre dépend beaucoup du régime d'écoulement. Un des mélangeurs les plus utilisés pour la production d'émulsions est le mélangeur Sulzer SMX (figure 13). Il est constitué par un réseau de lames croisées inclinées par rapport à l'axe du tube. Chaque élément est décalé de 90° par rapport à l'élément qui le précède.



**Figure 13:** Mélangeur statique SULZER SMX [16].

Les mélangeurs statiques ont pour avantage de produire des émulsions relativement fines (1 $\mu$ m) ayant une granulométrie resserrée. Leur inconvénient majeur est leur nettoyage difficile dû à une géométrie complexe [16].

### 6.5. Procédé ultrasonore

Deux mécanismes permettent d'expliquer l'effet des ultrasons sur l'émulsification :

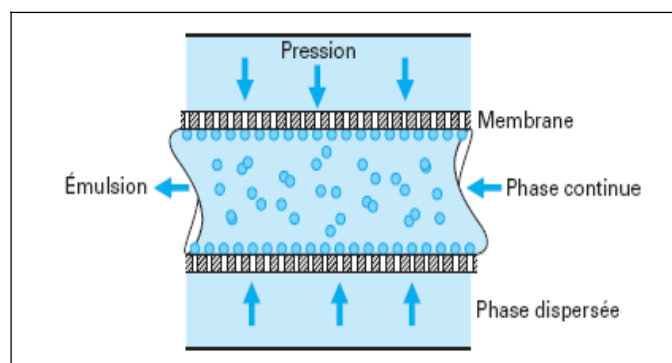
- L'onde génère des instabilités à l'interface liquide-liquide, qui vont induire la formation de gouttes ;
- L'implosion des bulles de cavitation près des gouttes de liquide va casser ces gouttes et on observe une réduction progressive du diamètre moyen de l'émulsion.

On génère des ultrasons de 2 façons : par action mécanique (sifflet) ou en transformant un signal électrique en vibration de même fréquence (transducteur).

Les émulsions générées pas ultrasons sont très fines et très stables. La quantité de tensioactif nécessaire est généralement plus faible qu'avec les autres techniques. La cavitation favoriserait la formation de charges qui s'absorberaient à l'interface et stabiliseraient l'émulsion [16].

### 6.6. Procédés à membranes

Ce procédé récent demande peu d'énergie et produit un cisaillement faible, il est donc bien adapté aux produits sensibles au cisaillement. Il consiste à faire passer la phase dispersée dans la phase continue, qui contient des tensioactifs, à travers une membrane de microfiltration ou d'ultrafiltration. Les gouttes ainsi formées se détachent de la surface de la membrane par l'écoulement de la phase continue (figure 14). Un autre procédé consiste à faire passer une émulsion grossière à travers la membrane, de façon à réduire la taille des gouttes [16].



**Figure 14:** Emulsification par membranes [16].

### 7. Notion d'encapsulation :

L'encapsulation fait référence aux technologies permettant de formuler un (ou plusieurs) actif(s) au sein de particules individualisées présentant une géométrie et des propriétés spécifiques. [19].

Le terme «encapsulation» ne définit pas une gamme de taille particulière donnée.

-Microencapsulation fait référence à des particules de tailles comprises entre 1  $\mu\text{m}$  et 1 mm

-Nanoencapsulation est utilisé pour les particules de tailles nanométriques

Les Tensio-actifs : lecithines, Spans®, Tweens® sont utilisés comme matériaux pour l'encapsulation

Les particules se présentent sous forme de :

-Structure matricielle : dispersion du (ou des) actif(s) au sein du matériau support (billes, microparticules, microsphères)

-Structure cœur / membrane : l'actif (pur ou non) est confiné dans un cœur par une ou plusieurs membranes (microparticules, microcapsules)

Les deux structures peuvent être combinées : cœur matriciel / membrane, ou cœur /

membrane matricielle (un actif dans le cœur et un autre dans la membrane) etc...

L'encapsulation d'un principe actif répond à quatre grands objectifs pouvant être combinés.

- Immobilisation :

Composés volatiles (exemple: arômes)

Procédés de bioconversion en continu (e.g. enzymes, microorganismes)

- Protection / Stabilisation :

Stabiliser et protéger le composé actif vis-à-vis de son environnement.

Protéger le manipulateur ou le consommateur (exp. protéases dans les détergents, pesticides)

- Libération contrôlée (à un temps donné, sous l'action d'un déclencheur) :

Libération déclenchée par une condition prédéterminée (chimique, physique, mécanique) :  
température, pH, humidité, pression...

Libération prolongée avec un profil cinétique déterminé (e.g. vitamines, arômes, pesticides)

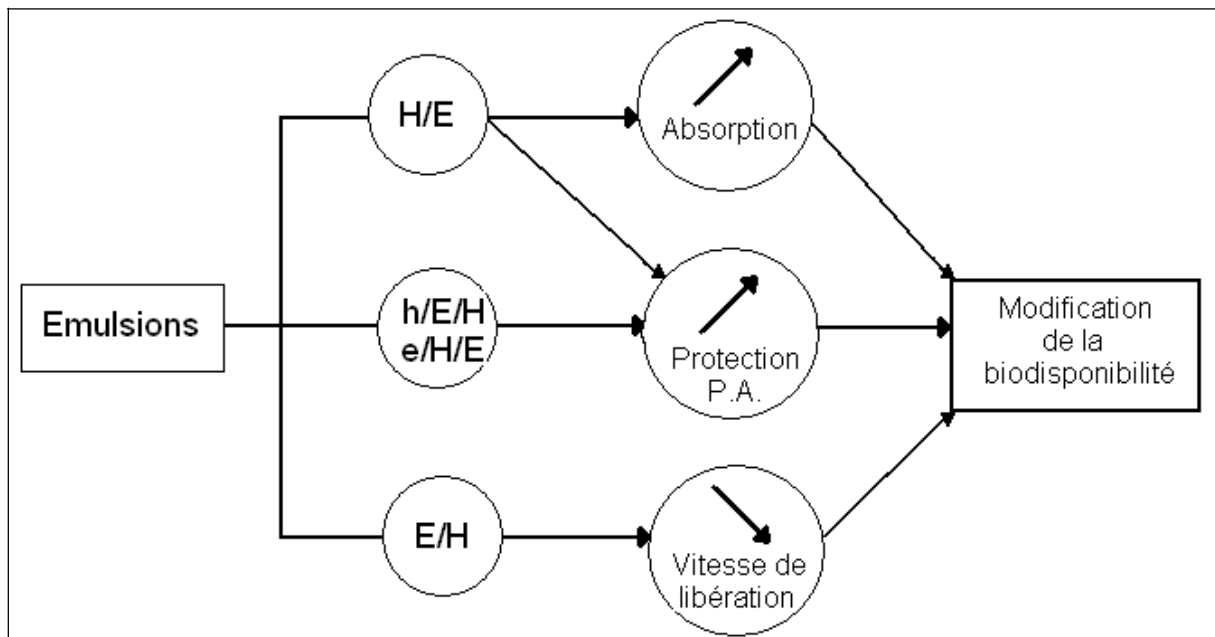
- Structuration / Fonctionnalisation :

Masquage de goût, d'odeur ou de couleur [19]

## **8. Applications pharmaceutiques des émulsions**

### **8.1. Biodisponibilité des émulsions**

Les émulsions sont préconisées soit pour faciliter l'absorption des médicaments, soit pour ralentir la libération (figure 15). Elles sont également utilisées pour protéger un principe actif labile, par exemple dégradé par un milieu de pH défavorable ou par des enzymes des fluides digestifs. Il en résulte indirectement une amélioration de la biodisponibilité [16].



**Figure 15 :** Type d'émulsions et action sur la biodisponibilité

## 8.2. Les émulsions parentérales

Ce sont des émulsions avec des gouttelettes de diamètre moyen de 200 à 500 nm. Pour les applications intraveineuses, la taille des gouttes ne doit pas excéder le diamètre des capillaires (5 µm environ).

Plusieurs types d'émulsions, H/E et E/H et émulsions multiples, sont utilisés pour former des émulsions parentérales. Le type d'émulsion employé est déterminé par le rôle que va jouer l'émulsion et la voie d'administration. Par exemple, une émulsion E/H peut être utilisée pour améliorer et contrôler la libération d'un médicament injecté par voie intramusculaire (IM). Inversement, une émulsion H/E sera utilisée comme transporteur de médicaments par voie intraveineuse (IV)

Elles sont utilisées comme :

- Emulsions lipidiques pour nutrition parentérale;
- Emulsions lipidiques comme systèmes de délivrance de médicaments;
- Agents de contraste radiologiques;
- Emulsions de perfluorocarbures comme substituts temporaires du sang [16].

### 8.3. Les émulsions topiques :

L'objectif de la formulation des émulsions topiques est l'optimisation de la délivrance du médicament à travers la peau. En plus de cette contrainte thérapeutique, l'émulsion doit être esthétique, répondre à des critères de stabilité et de sécurité, ainsi qu'à ses conditions d'utilisation.

Dans la composition de la phase huileuse on trouve des glycérides, des cires, des hydrocarbures et aussi des acides gras et des alcools gras ou encore des tensioactifs lipophiles. Dans celle de la phase aqueuse, de l'eau qui peut être additionnée de polyalcools : glycérine, di-éthylène-glycol, propylène-glycol, macrogols, etc

➤ Les différents types d'émulsions topiques

- Les crèmes topiques : visqueuses et semi-solides et sont généralement des émulsions H/E (crèmes aqueuses) ou E/H (crèmes huileuses).
- Les lotions : en général moins visqueuses et possèdent une plus grande fraction aqueuse.

D'un point de vue pharmacologique, les émulsions sont utilisées pour appliquer des solutions ou des suspensions de médicaments à la peau dans un but thérapeutique de manière non occlusive [16].

### 8.4. Les émulsions ophtalmiques

Une des alternatives des formes ophtalmiques est l'émulsion H/E (particulièrement les microémulsions) pour les principes actifs lipophiles.

Dans ces émulsions H/E, le principe actif insoluble dans l'eau est solubilisé dans la phase interne huileuse. En gardant le principe actif en solution, le problème potentiel d'absorption dû à la dissolution lente des particules solides est évité. En plus l'effet de trouble de la vision est minimisé par l'eau dans la phase externe. De plus, la concentration du principe actif dans la phase huileuse peut être ajustée pour maximiser l'activité thermodynamique, et ainsi augmenter la pénétration du principe actif

Cependant, au cours des dernières années il y a eu de nombreuses études pour les microémulsions et les émulsions multiples comme vecteurs oculaires, bien qu'il n'y ait pas encore d'applications commerciales [16].

### **8.5. Les émulsions orales**

Les émulsions sont administrées par voie orale pour deux principales raisons. Soit pour un effet sur l'appareil gastro-intestinal (traitement de la constipation par exemple). Soit comme vecteurs pour l'administration de principes actifs, offrant ainsi la possibilité d'augmenter la biodisponibilité orale de principes actifs faiblement absorbés [16].

#### **8.5.1. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS)**

SEDDS sont une classe d'émulsions physiquement stables, il s'agit de mélanges isotropiques d'huile, tensioactif, co-surfactif et d'un principe actif solubilisé qui est délivrable oralement dans des capsules de gélatine. En fonction du choix de l'excipient, de la composition et de la formulation, un ajout de solution aqueuse conduira à la formation spontanée de gouttelettes lipidiques de taille d'environ 100 nm (émulsion : SEDDS) ou inférieures à 50 nm (microémulsions : Self-microemulsifying drug delivery systems SMEDDS).

Les concentrations optimales d'huile, tensioactif, et co-surfactif nécessaires pour promouvoir la « self-émulsification » sont déterminées par la construction d'un diagramme de phase, qui peut aussi estimer les effets de la charge en principe actif sur l'efficacité de la « self-émulsification ».

Les formulations SMEDDS ont permis d'atténuer l'effet de l'alimentation sur l'absorption des principes actifs peu solubles dans l'eau [16].

#### **8.5.2 Devenir des émulsions dans le tractus gastro-intestinal**

L'utilisation d'émulsions (SEDDS ou émulsions conventionnelles) pour la délivrance orale de principes actifs solubles dans l'huile résulte du fait que le principe actif est présenté au tractus comme une dispersion moléculaire avec une grande surface à partir de laquelle le principe actif va se dissoudre dans la phase aqueuse. Il apparaît également que le mécanisme d'absorption du vecteur lui-même va jouer un rôle central dans le procédé.

En pénétrant dans le tractus, l'émulsion va subir l'action d'enzymes lipolytiques et de

cisaillements. L'association des 2 phénomènes va permettre la digestion de la phase huileuse et sa seconde émulsification au niveau de l'estomac (sous l'action de l'agitation et d'agents émulsifiants comme les protéines ou les polysaccharides). Les petites chaînes lipidiques sont susceptibles de se dissoudre dans la phase aqueuse et d'être absorbées au niveau de l'estomac, tandis que l'autre partie lipidique avec de longues chaînes se retrouve dans l'émulsion et se dirige vers les intestins où la taille des gouttes va diminuer et où les lipides vont subir une solubilisation micellaire qui va favoriser l'absorption. Le principe actif lipophile est alors incorporé dans les micelles et subit le même parcours que les acides gras.

De nouvelles études ont également montré l'intérêt des émulsions multiples e/H/E pour l'administration de médicaments par voie orale. Elles ont pour intérêt de protéger le principe actif introduit en phase interne, modifiant ainsi sa libération et favorisant son absorption [16].

*Chapitre III*  
*Les jus et conservateurs*

---

### III. LES JUS ET CONSERVATEURS

#### 1. Définition du jus de fruits

Le jus de fruits est le liquide non fermenté, mais fermentescible, tiré de la partie comestible de fruits sains, parvenus au degré de maturation approprié et frais ou de fruits conservés dans de saines conditions par des moyens adaptés et/ou par des traitements de surface post-récolte appliqués conformément aux dispositions pertinentes de la Commission du Codex Alimentarius [20].

Dans le cas des agrumes, le jus de fruits doit provenir de l'endocarpe. Toutefois, le jus de limette peut être obtenu à partir du fruit entier [21].

Certains jus peuvent être obtenus à partir de fruits comprenant des pépins, graines et peaux qui ne sont pas habituellement incorporés dans le jus, bien que des parties ou composants de pépins, de graines et de peaux –impossibles à retirer par des bonnes pratiques de fabrication (BPF)- soient acceptés [20].

Le jus est obtenu par des procédés adaptés qui conservent les caractéristiques physiques, chimiques, organoleptiques et nutritionnelles essentielles des jus du fruit dont il provient [20].

Le jus peut être trouble ou clair et peut contenir des substances aromatiques et des composés volatils restitués, à condition qu'ils proviennent des mêmes espèces de fruits et soient obtenus par des moyens physiques adaptés. De la pulpe et des cellules obtenues par des moyens physiques adaptés à partir du même type de fruits peuvent être ajoutées [20].

#### 2. Les matières premières

##### 2.1. Fruits

Le fruit frais ou conservé par le froid, sain exempt de toute altération, privé d'aucun de ses composants essentiels pour la fabrication des jus ou nectars de fruits et parvenu au degré de maturité approprié; la tomate n'est pas considérée comme un fruit [22].

Une liste indicative des fruits utilisables pour la fabrication des jus de fruits est représentée dans le tableau 3:

**Tableau 3:** Fruits utilisables pour la fabrication de jus de fruits [22].

-Abricots	-Goyaves
-Agrumes	-Graines de sorbier
-Airelles rouges	-Grenades
-Anarcade ou noix de cajou	-Groseilles à maquereau
-Ananas	-Groseilles blanches
-Azeroles	-Groseilles rouges
-Baies de sureau	-Imbu ( <i>Spondia tuberosa aroda</i> )
-Bananes	-Litchis
-Caja ( <i>Spondia purpurea</i> )	-Mangues
-Cassis	-Morelles de Quito ( <i>Salanum Quitoense</i> )
-Cerises	-Mûres
-Chérimoles	-Myrtilles
-Cœur de bœuf ou Cachimam ( <i>Annoma reticulata</i> )	-Nectarines
-Coings	-Papayes
-Corossol ( <i>Annona muricata</i> )	-Pêches
-Cynorhodons (fruits de <i>Rosa sp</i> )	-Poires
-Dattes	-Pommes
-Fraises	-Prunelles
-Framboises	-Prunes
-Fruits de l'argousier ( <i>Hippophae</i> )	-Quetsches
-Fruit de la passion ( <i>Passiflora edulis</i> )	-Raisins

## 2.2. Purée de fruits destinée à la production de jus et de nectars de fruits :

La purée de fruits destinée à la production de jus et de nectars de fruits est le produit non fermenté, mais fermentescible, obtenu par des procédés appropriés, par exemple en passant au tamis ou en broyant la partie comestible du fruit entier ou pelé sans en prélever le jus.

La purée de fruits peut contenir des substances aromatiques et des composés aromatisants volatils restitués, à condition qu'ils aient été obtenus par des moyens physiques adaptés et à partir du même type de fruit. De la pulpe et des cellules obtenues par des moyens physiques adaptés à partir du même type de fruit peuvent être ajoutées [20].

### **2.3. Concentré de purée de fruits destiné à la production de jus et de nectars de fruit**

Le concentré de purée de fruits destiné à la production de jus et de nectars de fruits est obtenu par élimination physique de l'eau de la purée de fruits en quantité suffisante.

Le concentré de purée de fruit peut contenir des substance aromatiques ou des composé aromatisants volatils restitués, à condition qu'ils aient été obtenus par des moyens physiques adaptés et à partir du même type de fruit [20].

### **2.4. Nectar de fruits :**

Le nectar de fruits est le produit non fermenté, mais fermentescible, obtenu en ajoutant de l'eau, avec ou sans adjonction de sucres, de miel et/ou de sirops, et/ou d'édulcorants aux purées ou concentrés de purée de fruits destinés à la production des jus et de nectars de fruits ou à un mélange de ces produits. Des substances aromatiques, des composés aromatisants volatils, de la pulpe et des cellules, qui doivent tous avoir été obtenus à partir du même type de fruit et par des moyens physiques adaptés, peuvent être ajoutés. Le produit doit en outre répondre aux critères définis pour les nectars de fruits dans la norme CODEX CAC/STAN 247-2005.

Le mélange de nectars de fruits est le même produit, obtenu à partir de plusieurs types de fruits différents [22].

### **2.5. L'eau de composition**

Dans les boissons aux fruits, l'eau constitue environ 87 à 92% du volume de la boisson. L'eau utilisée est généralement prétraitée séparément afin qu'elle soit débarrassée des impuretés, des micro-organismes, et d'autres éléments indésirables tels que les odeurs, les arrière-goûts et la turbidité. Elle est aussi traitée afin de réguler son alcalinité et sa dureté [22].

Dans les BRSA, la qualité de l'eau est un élément essentiel, le contrôle de la qualité de l'eau inclut aussi l'évaluation sensorielle pour s'assurer qu'elle ne contient pas d'arrière goût ou d'odeurs indésirables. L'eau potable utilisée pour la reconstitution doit, au minimum, être

---

conforme à la loi 05-12 du 4 août 2005 relative à l'eau et à la dernière édition des directives relatives à la qualité de l'eau potable de l'Organisation Mondiale de la Santé (Volumes 1 et 2) [22].

## **2.6. Le sucre**

Les sucres présentant une humidité inférieure à 2%, telle que définie dans l'arrêté interministériel du 20 Dhou El Hidja 1417 correspondant au 27 avril 1997, fixant les spécifications techniques du sucre blanc [22].

L'adjonction simultanée de sucres et d'agent acidifiants dans le même jus de fruits est interdite.

L'utilisation d'un sucre liquide (sirop) a pour principal avantage d'être facile à manipuler en plus du fait qu'il soit déjà dissous [22].

## **2.7. Additifs**

En plus de l'arôme naturel du fruit et d'autres extraits ajoutés, l'adjonction d'additifs est tolérée pour les jus de fruits, dans la limite de la législation en vigueur.

### **2.7.1. Définition**

Est considérée comme additif, toute substance :

- Qui ne peut être consommée normalement en tant que denrée alimentaire;
- Qui présente ou non une valeur nutritive;
- Qui n'est pas assimilée à une matière première indispensable dans la composition d'une denrée alimentaire;
- Dont l'adjonction volontaire dans une denrée alimentaire, à une étape donnée de mise à la consommation, et ce par des considérations technologiques et/ou organoleptiques, entraîne ou peut entraîner, directement ou indirectement, l'incorporation de cette substance ou de ce dérivé dans la composition de la denrée alimentaire concernée, ou bien peut affecter les caractéristiques de cette denrée.

Le Décret exécutif n° 92-25 du 13 janvier 1992 fixe les conditions et modalités d'utilisation des additifs dans les denrées alimentaires. La liste des additifs autorisés est quant à elle publiée dans l'arrêté interministériel du 2 Dhou El Hidja 1422 correspondant au 14

février 2002 et les conditions d'utilisation des édulcorants sont fixées par l'arrêté interministériel du 7 Ramadan 1420 correspondant au 15 décembre 1999 [22].

Pour les jus de fruits, les additifs généralement utilisés sont:

### 2.7.2. Agents acidifiants et antioxydants

- L'acide citrique (E330) et ses sels: l'acide citrique se place largement en tête des acides organiques utilisés par l'industrie agroalimentaire. Obtenu autrefois par extraction à partir de sources naturelles, l'acide citrique est maintenant obtenu par fermentation d'*Aspergillus niger* sur milieu glucosé. Les BRSA (ou soft drinks) riches en sucres et éléments nutritifs sont très sensibles au développement microbien, l'acide citrique, antioxydant et acidulant, permet d'abaisser le pH à un seuil qui empêche la croissance des micro-organismes.
- L'acide ascorbique (E300) et ses sels : l'acide ascorbique est un antioxydant, acidifiant séquestrant et renforçateur de goût. Etant donné qu'il s'agit d'une vitamine, aucune restriction ne pèse sur l'utilisation de l'acide lui-même et de ses sels [22].

### 2.7.3. Conservateurs

Un additif conservateur est défini comme étant une substance non consommée normalement en tant que denrée alimentaire, que l'on incorpore à un aliment en vue d'accroître sa sécurité et sa stabilité microbiologique [9].

Il existe deux types de conservateurs : minéraux et organiques dont on trouve parmi eux :

- Sorbates de potassium (E202): de la famille de l'acide sorbique et sorbates, dont la formule chimique contient des doubles liaisons qui accroissent l'activité antimicrobienne et fongistatique. Actif jusqu'à pH 6.5, son action antifongique est plus importante en tant qu'inhibiteur des levures et des moisissures, celles-ci étant incapables de le métaboliser ce qui entraîne son accumulation dans le cytoplasme [22].
- Benzoates de sodium (E211): de la famille de l'acide benzoïque et benzoates. L'acide benzoïque existe à l'état naturel dans de nombreuses variétés de baies, et peut être obtenu également par synthèse, il est utilisé fréquemment dans les BRSA à une dose limite de 150 mg/L. Actifs à pH < 4, les sels sont plus utilisés que l'acide lui-même, car plus solubles dans l'eau, pour leur action contre les bactéries, les levures, et dans une moindre mesure, les moisissures [22].

#### 2.7.4. Epaississants et gélifiants

Épaissir, gélifier, stabiliser font appel, dans l'industrie agroalimentaire, à une série de composés hydrocolloïdes qui constituent une gamme complète sur le marché international. Ces polysaccharides ont une origine très variée, mais présentent des fonctions identiques: rétention d'eau, structuration du milieu environnant, propriétés mécaniques et rhéologiques.

Ils peuvent provenir:

- Du règne végétal: pectine, gomme de guar;
  - Du règne animal: gélatine;
  - De micro-organismes: xanthane.
- Pectine: présente dans tous les végétaux, principalement extraite de marc de pommes ou d'écorces d'agrumes. Les pectines utilisées dans les boissons aux fruits sont les pectines LMN (low methoxy non amidées) pour leur propriété à apporter une bonne stabilité en milieu acide, un épaississement, une brillance, une bonne pompabilité et une bonne suspension des fruits.
  - Gomme de guar (E412): extraite de l'albumen des graines de *Cyamopsis tetragonolobus*, plante annuelle de la famille des légumineuses qui pousse au Pakistan, en Inde et aux Etats-Unis.
  - Gomme xanthane (E415): fabriquée industriellement par biosynthèse grâce à *Xanthomonas campestris* [22].

- 

#### 2.7.5. Colorants

- Caroténoïdes (E160a): il s'agit de pigments de couleur jaune, orange et rouge précurseurs de la vitamine A. Rencontrés dans les végétaux: fruits (orange), légumes (carottes), ou chez certains animaux (homards) [22].

#### 2.7.6. Les vitamines

L'ajout des vitamines dans les boissons aux fruits peut avoir plusieurs objectifs:

- Ajout pour restaurer dans la boisson la qualité initialement présente et perdue lors du processus de fabrication;

- Ajout pour enrichir la boisson en vitamine et communiquer sur cette valeur ajoutée auprès du consommateur (impact marketing);
- Ajout de vitamine en tant que colorant;
- Ajout de vitamine en tant qu'anti-oxydant pour assurer une meilleure conservation de la boisson au cours de son vieillissement [22].

Remarque :

- Les vitamines étant très sensibles à la chaleur et à l'oxydation, il est judicieux d'ajouter les vitamines le plus tard possible pour limiter leur dégradation en cours de process. Ainsi l'incorporation des vitamines est le plus souvent réalisée dans le produit fini, juste avant l'étape de pasteurisation et d'embouteillage, pour éviter toutes les étapes de mélanges et stockage intermédiaires des matières semi-ouvrées [22].

### 3. Les différents types d'altérations du jus de fruits :

En égard aux exigences des réglementations nationales et internationales actuellement en vigueur, des données bibliographiques disponibles et des rapports des différentes autorités sanitaires, les dangers à considérer dans la filière jus de fruits et qui devraient faire l'objet de mesures préventives sont représentés dans le tableau 4 [22]:

**Tableau 4 :** Les différents types d'altercations de jus de fruit [22].

Chimique	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ AVANT Phytopsanitaires, nitrates, métaux lourds, produits de nettoyage, additifs, encre, auxiliaires techniques, qualité de la soude, qualité de l'eau, allergènes, OGM.</li> <li>▪ PENDANT Soude, résidus de nettoyage, eau glycolée, insecticide, peroxyde, encre, lubrifiants, parfum, migration produit chimique (transport).</li> <li>▪ APRES : Néant</li> </ul>
----------	--

Physique	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ AVANT</li> </ul> Plastique, verre, métal, bois, objets personnels, paille, saletés, mégots. <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ PENDANT</li> </ul> Joints, bouchons, papier, becs de remplissage personnels, bris de verre. <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ APRES</li> </ul> Néant
Microbiologique	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ AVANT</li> </ul> * Jus: bactérie acidophile ( <i>Lactobacillus</i> ), coliformes totaux, levures-moisissures, germes totaux. *Eau: coliformes totaux, levures-moisissures, germes totaux, coliformes fécaux E.coli, E.faecalis [23], BSR. *Sucre: levures-moisissures. *CO2: contaminants. *Azote: contaminants. *Bouchons-boîtes: coliformes totaux, levures-moisissures, germes totaux. <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ PENDANT</li> </ul> Coliformes, levures-moisissures, germes totaux, bactérie acidophile, E-coli, shigella, staphylocoque, E.faecalis [23], listeria. <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ APRES</li> </ul> Levures-moisissures, oxydation

### 3.1. Altération microbiologique :

Dans notre travail, il sera question d'éviter une altération microbiologique de la matrice alimentaire qui est le jus de fruits :

Les dangers d'origines biologiques regroupent [22] :

- Les micro-organismes sous forme végétative;
- Leurs formes de résistance éventuelle "spores";
- Leurs toxines.

Bien que la composition des jus de fruits, en particulier leur pH inférieur à 4.5 interdit la multiplication des micro-organismes pathogènes, les dangers biologiques doivent être pris en compte dans le secteur des jus de fruits, d'une part pour des raisons de santé publique, d'autre part en cas d'altération du produit. De plus, on ne peut exclure totalement la mise en évidence de nouveaux micro-organismes susceptibles de poser des problèmes sanitaires.

D'une façon générale, dans le cas des jus ayant subi un traitement de stabilisation biologique, une recontamination par des germes d'altération est susceptible de dénaturer le produit de manière importante et, dans le cas des jus frais, la survie à court terme de certains pathogènes est possible [22].

### **3.1.1. Cas des produits ayant subi un traitement de stabilisation microbiologique :**

En ce qui concerne le risque pathogène, on le considère négligeable pour ces produits, car, même dans le cas d'une recontamination post traitement, la flore d'altération se développera rapidement, rendant le produit visiblement impropre à la consommation.

Pour le produit en cours de fabrication, et le produit fini, les conditions de pH et d'acidité ne permettent pas le développement des principaux germes pathogènes. En effet, bien que les levures pathogènes telles que *Candida albicans* soient théoriquement capables de se développer à pH acide, on ne les a jamais retrouvées dans des produits à base de fruits. La littérature fait état de la présence dans des jus de certaines levures décrites comme pathogènes opportunistes telles que *Candida parapsilosis*, mais aucun lien n'a jamais été établi avec une intoxication.

En ce qui concerne les mycotoxines, deux cas sont à considérer : la patuline et Ochratoxine A, sachant que les champignons susceptibles de produire d'autres mycotoxines, en particulier les aflatoxines, sont incapables de contaminer des produits à base de fruits [22].

### **3.1.2. Cas des jus frais :**

Intoxications alimentaires dues à l'ingestion de fruits ou jus frais :

Plusieurs cas d'intoxication par les fruits ou jus frais ont été décrits dans la littérature:

### 3.1.2.1. A partir de parasites

Les *Cryptosporidium parvum* sont des protozoaires parasites, et sont un des trois principaux responsables de diarrhée à travers le monde. Les troubles sont généralement sans gravité sauf chez les sujets immunodéprimés. Ils ont été responsables d'intoxications en 1993 (160 personnes touchées par une infection liée à un jus de pomme non pasteurisé fraîchement pressé, les pommes ayant apparemment été contaminées par des veaux paissant à proximité du verger) et en 1996 (31 personnes touchées par une infection liée à du jus de pomme artisanal fraîchement pressé, type "Apple cider").

Une étude sur la survie des oocystes (formes de résistances) dans les boissons a montré une réduction de viabilité de 85% en 24 heures dans des jus de fruits et des sodas. A noter qu'un autre parasite, *Cyclospora cayentanensis*, a été retrouvé sur des framboises du Guatemala, mais jamais dans des jus de fruits [22].

### 3.1.2.2. A partir de virus

Plusieurs cas de contamination par virus HAV (hépatite A) citent le jus d'orange frais comme vecteur de contamination. Il s'agit toujours d'une contamination par un porteur asymptomatique dans des circuits de distribution très courts (hôtels ou restaurant préparant des jus sur place), jamais de jus commerciaux [22].

### 3.1.2.3. A partir de bactéries

Un micro-organisme a été largement impliqué dans des toxi-infections alimentaires liées à des produits frais.

#### 3.1.2.3.1. *Escherichia Coli* O 157: H7

Cette bactérie présente la particularité au sein de l'espèce *Escherichia Coli*, d'être acidorésistante et de produire une toxine entérohémorragique.

Ces capacités lui permettent de survivre avec une décroissance lente dans des produits acides et de traverser la barrière stomacale d'où une dose infectieuse très faible.

Elle est responsable de diarrhées hémorragiques susceptibles de générer chez les enfants un syndrome urémique hémolytique, provoquant la destruction des reins et la mort. Bien qu'elle soit retrouvée principalement dans les produits carnés ("hamburger disease"), elle a causé la mort d'un enfant ayant consommé du jus de pommes frais (cas Odwalla, automne 1996, Californie), et a également été responsable de plusieurs épidémies impliquant du "Apple Cider". Cette bactérie n'a jamais été identifiée dans des jus d'orange et n'a jamais été impliquée dans des épidémies, y compris à partir de produits d'origine animale [22].



*Partie II*  
*Etude expérimentale*

# *Chapitre I*

## *Limonène et l'évaluation de son activité antibactérienne*

---

## I. D-LIMONENE ET L'EVALUATION DE SON ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

### 1. Limonène

Le limonène est un monoterpène très abondant que l'on trouve dans une grande variété des HEs et qui représente le composé majoritaire dans les HEs des agrumes.

Le limonène n'est pas obtenu directement après l'extraction de l'HE, cette dernière doit passer par une étape d'analyse pour pouvoir isoler le composé voulu des autres constituants.

L'extraction de l'HE se fait généralement à partir des épicarpes (zestes) d'agrumes par la méthode d'expression à froid qui représente la méthode de référence recommandée pour ce type de fruit. Cette méthode n'est réalisable qu'à l'échelle industrielle car elle nécessite un très grand équipement bien adapté pour cette fonction.

A notre échelle (échelle laboratoire), deux méthodes peuvent être réalisées :

- Extraction par le Soxhlet : qui est une extraction épuisante ou on peut avoir jusqu'à environ 2.5% de rendement dans les conditions optimales [13], mais qui au cours de laquelle on utilise un solvant extracteur qui est généralement l'hexane ou le cyclohexane et ses deux solvants sont connus pour leur toxicité.

Vu que notre formulation finale est destinée au domaine alimentaire donc cette méthode est inenvisageable.

- Extraction par hydrodistillation : c'est une méthode sécurisée car on utilise que de l'eau mais l'inconvénient est son très faible rendement qui ne dépasse pas les 0.5% [13], c'est pour cette raison qu'on a abandonné cette méthode car on a besoin d'une quantité importante de limonène.

Donc, dans le but de faire notre étude dans les conditions et les délais préétablis on a décidé de se procurer le limonène synthétique auprès d'un fournisseur

Les informations concernant le limonène synthétique sont les suivantes:

- Le laboratoire fabricant : SIGMA aldrich : Produit allemand
- Le produit : (R)-(+)-Limonène
- Formule chimique brute :  $C_{10}H_{16}$
- Masse molaire : 136.23 g/mol
- Densité : 0.84
- Pourcentage de pureté : 97%
- Concentration calculée : 6 mol/l (voir annexe I)

## 2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Les tests de l'activité antibactérienne sont réalisés au niveau du service de microbiologie du Centre hospitalo-universitaire Nedir Mohamed de Tizi Ouzou.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne du « D-limonène » a été réalisée par deux méthodes : la méthode de Vincent et la méthode de dilution en milieu solide.

Dans cette partie, on a testé l'activité sur quatre bactéries impliquées fréquemment dans la contamination et l'altération des denrées alimentaires notamment les jus (voir tableau 4) :

*Escherichia coli*, *Lactobacillus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* (anciennement appelée *Streptococcus faecalis*).

Ces germes ont été fournis par le laboratoire de microbiologie.

### 2.1. Confirmation des souches

Les souches que l'on a utilisé ont été déjà au préalable confirmées par le laboratoire, mais on a tenu à vérifier leur pureté par les caractéristiques morphologiques, culturelles et quelques tests biochimiques :

Pour chaque germe on a fait un état frais et une coloration de GRAM (voir annexe II).

On a procédé à des ré-isolements des souches sur leurs milieux sélectifs appropriés et cela pour deux raison :

-Pour s'assurer de la pureté des souches.

-Pour obtenir des souches jeunes (incubation à l'étuve à 37°C pendant 18-24H) dont on a besoin pour l'évaluation de l'activité.

Les résultats d'identifications et quelques autres caractéristiques sont résumés dans le tableau 5.

**Tableau 5:** les caractéristiques morphologiques, culturelles et biochimiques des souches utilisées

Nom de la souche	Forme	Gram	Type énergétique	mobilité	Mode de regroupement	Milieux de culture utilisés
<i>E.coli</i>	bacille	Gram-	Aéro-anaérobie facultatif	mobile	isolé	GN Hektoen
<i>Enterococcus faecalis</i>	cocci	Gram+	Aéro-anaérobie facultatif	immobile	En chaînette	GSC
<i>Staphylococcus aureus</i>	cocci	Gram+	Aéro-anaérobie facultatif	immobile	En amas (grappe de raisin)	Chapman
<i>Lactobacillus sp</i>	bacille	Gram+	Aéro-anaérobie facultatif	immobile	Isolé, en paire ou en chaînette	GN

Vu les caractères morphologique très proches entre *Staphylococcus* et *Enterococcus*, on a ajouté le test à la catalase (voir annexe II) pour bien les différencier. Ce test est positif pour *Staphylococcus* et négatif pour *Enterococcus*.

Pour *E.coli*, on a ajouté les tests biochimiques sur mini-galerie (figure 16)



**Figure 16:** Mini-galerie pour identification d'E.coli.

## **2.2. Protocole expérimentale : Evaluation de l'activité antimicrobienne de limonène.**

### **2.2.1. Détermination du pouvoir antimicrobien par la technique de diffusion en milieu solide (par disque) appelée aussi aromatoگرامme :**

La technique utilisée est une modification d'une vieille méthode de Shroeder et Messing datant de 1949 [24].

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante [3].

#### **➤ Préparation des suspensions bactériennes:**

Se fait à partir de colonies bien isolées et identique issues d'une culture de 18-24heures, introduites dans de l'eau physiologique stérile à 0,9% de NaCl, contenue dans un tube à essai, de sorte à avoir une suspension d'une densité égale à 0.5McF.

L'ensemencement doit se faire en moins 15 min après la préparation de l'inoculum [24].

#### **➤ Ensemencement :**

- 20 ml de milieu gélosé Muller Hinton sont coulés dans une boîte de pétri, puis laisser jusqu'à refroidissement.

- Après la solidification et le refroidissement des milieux la suspension bactérienne est ensemencée en surface :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (il évite la contamination du manipulateur et de la paillasse).

- L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.

- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.

- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri il faut recharger l'écouvillon à chaque fois [24].

➤ **Préparation des disques**

Les disques sont fabriqués à partir du papier Buvard par un perforateur à 2 trous du papier, avec un diamètre de 6mm. Ensuite, ces disques sont stérilisés à l'autoclave à 134°C pendant un temps de 40 minutes à la pression atmosphérique de 2 Bar, puis stockés à une température ambiante.

➤ **Imprégnation des disques par le limonène :**

- 3 disques imprégnés de limonène pur (10ul)
- un témoin négatif : un disque imprégné de 10ul d'eau physiologique stérile
- un témoin positif : un disque d'antibiotique (chloramphénicol à 5ug d'après la Société Française de l'Antibiogramme). Ce choix est dû à la sensibilité des souches à tester pour cet antibiotique.

➤ **Dépôt des disques**

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, les disques imbibés sont déposés sur les milieux, précédemment inoculé avec les microorganismes choisis

- Laisser les boîtes 1 heure à température ambiante pour que le limonène puisse diffuser puis retourner et incuber à 37°C pendant 24 heures [24].

➤ **Expression des résultats**

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (y compris le diamètre de disque de 6mm).

Dans la littérature relative aux huiles essentielles, les résultats de l'aromatogramme sont exprimés exclusivement à partir de la mesure du diamètre des halos d'inhibitions en mm.

D'après *Ponce et al*, la sensibilité à l'huile a été classée par le diamètre des halos d'inhibition :

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 [24].

Les bactéries montrant une sensibilité à l'huile essentielle sont sélectionnées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI)

## 2.2.2 Détermination de la CMI et la CMB par la technique de dilution en milieu solide [25]

### 2.2.2.1. Détermination de la CMI

Pour chaque bactérie ayant montré une sensibilité au limonène, on recherche la CMI

#### ➤ Préparation de la suspension bactérienne

Colonies issues d'une culture de 18-24h sont prélevées et mises en suspension dans de l'eau physiologique stérile pour avoir une densité de 0.5 McF

#### ➤ Préparation des dilutions de limonène

Une série de dilution est préparée à des concentrations allant de 8 % à 0.06 %. Cette série a été faite avec un large intervalle de concentration pour essayer de couvrir un maximum de CMI dans les normes possibles :

- 4 ml de limonène sont dilués dans 46 ml du milieu MH additionné de Tween 20 -qui est un émulsifiant favorisant la diffusion de limonène dans le milieu gélosé- maintenu en surfusion, dans un premier flacon ce qui donne une dilution de 8% (solution mère)
- Verser la moitié du premier flacon dans un deuxième flacon et ajuster avec 25 ml de milieu pour la dilution 4%
- Procéder de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution de 0.06%.
- Les mélanges de chaque dilution sont immédiatement repartis dans deux boîtes de Pétri à raison de 12.5 ml de milieu par boîte.
- Laisser les boîtes jusqu'à solidification des milieux.

La gamme de concentration finales ainsi obtenue correspond à 8% ; 4% ; 2% ; 1% ; 0.5% ; 0.25% ; 0.125% ; 0.06%.

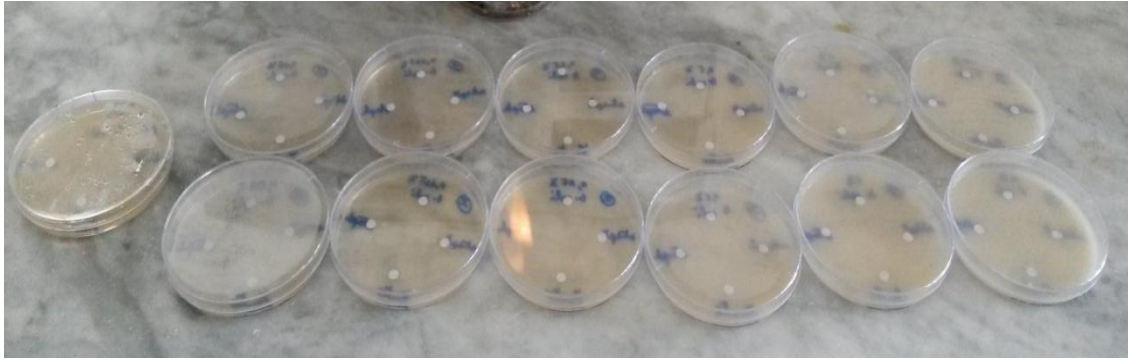
#### ➤ Dépôt des disques Après solidification :

-Les disques stériles en papier buvard de 6 mm imbibés de la suspension bactérienne sont déposés à la surface du milieu gélosé.

-Une boîte de gélose sans limonène est utilisée comme témoin négatif.

-Pour toute dilution ; deux essais (boîtes) sont réalisés.

-Chacune des boîtes a étéensemencée par trois espèces différentes (*E.coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*). (Voir figure 17)



**Figure 17:** La série de dilution+la boîte témoin ensemencées par les trois germes

-Le 4eme disque sur les boites est imbibé par de l'eau physiologique (comme témoin-)

La lecture des résultats se fait visuellement par l'observation de la croissance ou de l'inhibition de la croissance du microorganisme par l'antimicrobien testé par rapport à la croissance sur une boîte témoin sans extrait.

La CMI est définie comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu.

#### **2.2.2.2. Détermination de la CMB**

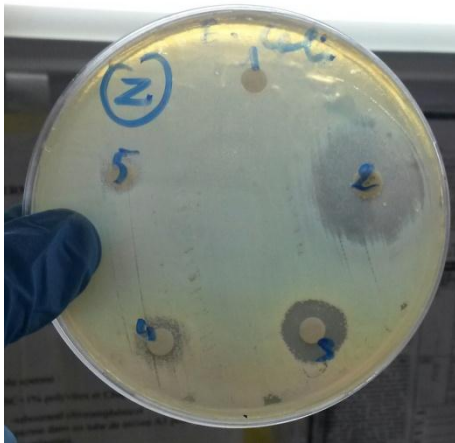
Pour les boites qui ne présentent pas de croissance, le disque de bactérie est transféré sur un milieu gélosé MH neuf pour confirmer s'il s'agit d'un effet bactériostatique ou bactéricide sur les bactéries.

La CMB a été définie comme étant les plus faibles concentrations de l'agent pour lesquelles il y a absence totale de colonies en comparaison avec les témoins après 24H de culture à 37°C.

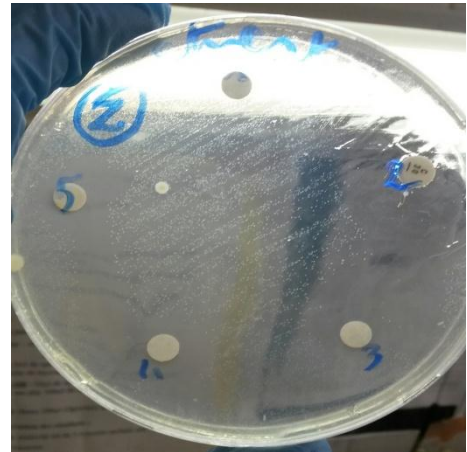
### 2.3. Résultats et discussions :

#### ❖ Méthode de diffusion en milieu solide ou l'aromatogramme

Les résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles obtenues, par mesure des diamètres d'inhibition de la croissance des microorganismes, sont reportés dans les figures (18, 19, 20, 21) et le tableau 6s :



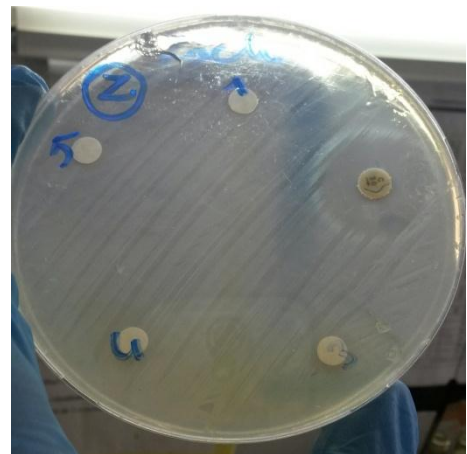
**Figure 18 :** *E. coli*



**Figure19 :** *E. faecalis*



**Figure 20 :** *S. aureus*



**Figure21 :** *Lactobacillus sp*

Dans les figures ci-dessus les numéros indiqués sur les boîtes représentent :

- le 1 : témoin négatif (disque imbibé d'eau physiologique).
- le 2 : témoin positif (disque de chloramphénicol).
- le 3,4 et 5 : disques imbibés de limonène.

**Tableau 6:** Diamètres d'inhibition en mm provoqués par le limonène

Les souches	Le diamètre d'inhibition (mm)	Sensibilité vis à vis de limonène
<i>E.coli</i>	11±1*	sensible
<i>E.faecalis</i>	17±1*	Très sensible
<i>S.aureus</i>	13±1*	sensible
<i>Lactobacillus sp</i>	6±0*	résistante

\*Les diamètres mentionnés dans le tableau sont la moyenne des halos des trois disques : 3 ,4 et 5.

\*Le diamètre du disque (6mm) est inclus dans la mesure du diamètre de la zone d'inhibition

#### ➤ Discussion des résultats :

Les résultats ci-dessus concernant l'activité antimicrobienne « *in vitro* » obtenue à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme) montrent que l'activité antibactérienne du limonène testé est en fonction de la bactérie cible.

Il s'est avéré qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis de *Lactobacillus sp*. Cette bactérie possède un potentiel de résistance très élevé vis-à-vis du limonène.

En revanche, *E.coli* et *E.faecalis* ont manifesté une sensibilité appréciable vis-à-vis du limonène, surtout pour la 2ème bactérie.

Pour *S. aureus*, elle a montré une certaine sensibilité mais qui n'est pas sûre vu que les halos d'inhibition ne sont pas bien clairs.

Dans la présente étude, nous n'avons testé que du limonène pur (pas de dilution ni rajout d'autres composés), car, d'après *Manou et al* et *Bagamboula et al*, il n'y a aucun rapport entre la concentration d'huile essentielle ou du composé actif et la zone d'inhibition ; cette dernière semble dépendre de la capacité des huiles essentielles à diffuser uniformément sur l'agar. Le limonène (ou l'HE) est médiocrement soluble dans l'eau, ce qui pose beaucoup de problèmes pour étudier son activité antibactérienne, ceci a été déjà rapporté par *Southwell et al* et *Griffin* [3].

La méthode de l'aromatogramme est généralement employée comme une analyse préliminaire pour étudier l'activité antibactérienne ensuite viennent des méthodes plus détaillées. Dans cette méthode, les paramètres tels que le volume de l'huile essentielle placé sur les disques de papier, l'épaisseur de la couche d'agar et si un dissolvant est employé

varient considérablement entre les études. Ceci signifie que cette méthode est utile pour le choix du composé actif (ou l'HE) (c'est l'étape de screening) et pour la mise en évidence de leur activité antibactérienne, mais la comparaison des données éditées n'est pas faisable [1].

#### ❖ Détermination de la CMI

Les tests de la CMI ont été réalisés sur les trois germes qui ont présenté une sensibilité vis à vis du limonène : *E.coli*, *E. faecalis*, *S.aureus*

Les figures a, b, c, d, e, f, g, h, i (22) montrent les résultats obtenus qui vont être résumé dans le tableau 7:



**Figure 22:** Résultats de la CMI pour *E.coli*, *E. faecalis*, *S.aureus* avec les différentes dilutions

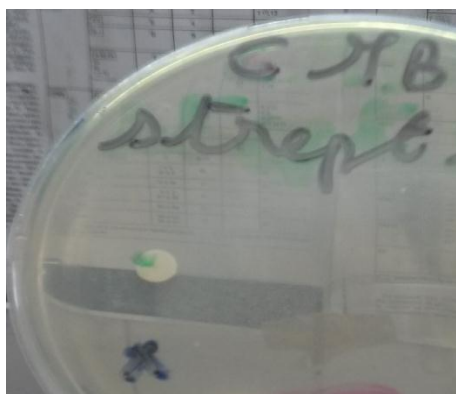
\*Les deux dernières boîtes sur les photos correspondent aux dilutions 4% (h) et 8% (i).

**Tableau 7:** Resultats de la CMI pour *E.coli*, *E. faecalis*, *S.aureus*

Les souches	<i>E. faecalis</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>
CMI (%)	2%	4%	>8%
CMI (mol/l)	0.12	0.24	>0.48

#### ❖ Détermination de la CMB

Après avoir déterminé la CMI des trois germes, on fait transférer les disques de bactérie des boites ou il y'a absence de croissance (les boites ou la dilution est supérieure ou égale à la CMI) sur des boites MH neuf. Les résultats sont présentés dans les figures 23, 24 et le tableau 8 :

**Figure 23:** CMB de *E.faecalis* à 2%**Figure 24:** CMB de *E.coli* à 4%**Tableau 8:** Résultats de la CMB pour *E.faecalis* et *E.coli*

Les souches	<i>E. faecalis</i>	<i>E.coli</i>
CMB (%)	2%	4%
CMB (mol/l)	0.12	0.24

#### ➤ Discussion des résultats :

Selon les résultats de la CMI ; il a été démontré que *E.faecalis* est la souche la plus sensible parmi les bactéries testées vu qu'elle a présenté la CMI la plus faible qui est de 2%. Ce résultat est concordant avec les résultats obtenus dans l'aromatogramme (*E.faecalis* a présenté le plus grand diamètre d'inhibition).

Pour *E.coli* ; le limonène a montré un effet inhibiteur à une dilution de 4%.

En revanche pour *S.aureus* la CMI est estimée à une valeur supérieure à 8% et en comparant ces résultats à ceux de l'aromatogramme on conclue que les halos (qui n'étaient pas bien clairs) ne correspondent pas vraiment à des diamètres d'inhibition et que la souche est résistante ou relativement résistante.

Concernant *E.faecalis* et *E.coli* ; les résultats de la CMB ont révélé que la CMI=CMB : 2% pour *E.faecalis* et 4% pour *E.coli* (voir tableau 7 et 8). Et en se basant sur la littérature; le limonène a une action bactéricide absolu (CMB / CMI = 1) sur ces deux germes.

Nos observations rejoignent celles de plusieurs auteurs qui ont démontré que les bactéries à Gram (-) peuvent être sensibles à l'action des HEs. MOREIRA *et al.* (2005), ont montré que l'H.E de *C. limonum* (dont le limonène fait partie de ses constituants) était efficace contre 3 souches d'*E.coli* avec des diamètres d'inhibition variant de 9 à 12 mm (voir tableau 6) [3].

D'après KALEMBA & KUNICKA, la sensibilité d'un microorganisme aux HEs dépend des propriétés de l'H.E et le microorganisme lui-même [3].

Plusieurs travaux réalisés sur les HEs des agrumes (genre : *Citrus*), qui contiennent une panoplie de composants et dont les plus importants sont les monoterpènes « limonène » et les composés phénoliques, ont prouvé une activité importante sur *S.aureus* avec des diamètres d'inhibition considérable, comme il y'a aussi les différentes études de LAMBERT *et al* qui ont testé l'effet antibactérien des polyphénols de plusieurs plantes contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les résultats ont indiqué que *S. aureus* était plus sensible que *E. coli* [3].

En comparant les résultats obtenus et les données des études citées ci-dessus on suppose que les HEs des agrumes sont actives sur *S.aureus* par le biais de ses composés phénoliques.

*Chapitre II*  
*Encapsulation du*  
*D- limonène*

## II. ENCAPSULATION DU D-LIMONENE

### 1. Formulation d'une émulsion stable

L'encapsulation du limonène est réalisée au niveau du laboratoire de pharmacie galénique de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

Cette encapsulation est faite par émulsion type H/E préparée par inversion de phase, contenant l'eau déminéralisée comme phase hydrophile et l'huile de maïs comme phase lipophile, ce système est stabilisé par l'ajout de deux tensioactifs : SPAN 60 (Monostéarate de sorbitane) et TWEEN 20 (Polysorbate 20).

Une série de formulations préliminaires sont réalisées sans limonène, dans le but de déterminer le HLB optimal et donc l'émulsion la plus stable.

#### 1.1. Matières premières :

##### 1.1.1. Principe actif : D-LIMONENE (Voir chapitre I)

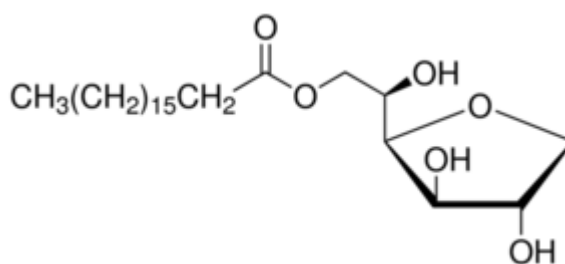
##### 1.1.2. Huile de maïs : (La phase huileuse)

L'huile de maïs utilisée comme phase lipophile est d'origine commerciale de marque « AFIA »

##### 1.1.3. Eau déminéralisée: (La phase aqueuse)

##### 1.1.4. Surfactif lipophile : Monostéarate de sorbitane (SPAN 60)

C'est un ester de sorbitane (figure 25), commercialisé sous le nom SPAN 60, il est obtenu à partir du sorbitol qui subit une déshydratation interne pour donner le sorbitane. Celui-ci est ensuite estérifié par l'acide stéarique [26].



**Figure 25:** Structure chimique de monostéarate de sorbitane-SPAN 60- [27].

- Formule :  $C_{24}H_{46}O_6$
- Nom chimique : mono-octadécanoate de sorbitane
- Catégorie : tensioactif non ionique
- Propriétés : (voir tableau 9)

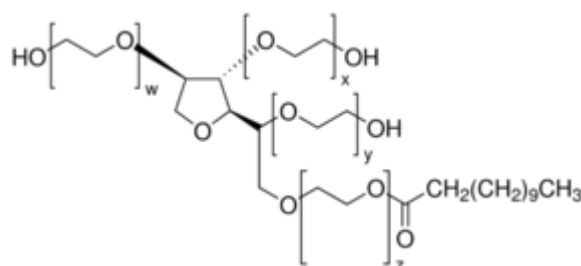
**Tableau 9** : Propriétés physico-chimiques de SPAN 60 [26].

Poids moléculaire (g/mol)	431
HLB	4.7
Température de fusion (°C)	53-57
Indice de saponification	147-157
Indice d'acide	5-10
Indice d'hydroxyle	235-260

Le monostearate de sorbitane est largement utilisé en cosmétique, dans les produits alimentaires, et les formes pharmaceutiques orales et topiques, il est généralement considéré comme non toxique [26].

#### 1.1.5. Surfactif hydrophile : Polysorbate 20 (TWEEN 20)

C'est un ester de sorbitane polyoxyéthyléné (figure 26), commercialisé sous le nom TWEEN 20, il est obtenu à partir du sorbitol [26].



**Figure 26**: Structure chimique de polysorbate 20-TWEEN 20- [27].

- Formule :  $C_{58}H_{114}O_{26}$
- Nom chimique : monolaurate polyoxyéthylène de sorbitane.
- Catégorie : tensioactifs non ionique
- Propriétés :(voir tableau 10)

**Tableau 10** : Propriétés physico-chimiques du TWEEN 20 [26].

Poids moléculaire (g/mol)	1128
HLB	16.7
Indice de saponification	40-50
Indice d'acide (%)	2
Indice d'hydroxyle	96-108

Le polysorbate 20 se présente sous forme d'un liquide jaunâtre plus au moins visqueux. Il est soluble dans l'eau et l'éthanol, insoluble dans les huiles végétales et minérales.

Le TWEEN 20 est largement utilisé en cosmétique, dans les produits alimentaires, les formes pharmaceutiques orale, topiques et parentérale. Il est généralement considéré comme non toxique [26].

## 1.2. Formulations préliminaires :

### 1.2.1. Détermination du HLB critique :

La composition de base des émulsions préparées est la suivante :

- Phase lipophile.....20g
- Mélange d'émulsifiants.....5g
- Eau déminéralisée.....Q.S.P.....100g.

La proportion de chacun des surfactifs est calculée en appliquant la formule de GRIFFIN comme suit :

$$HLB\ m = X.HLB\ L + (1 - X).HLB\ H$$

Ou :

HLB m : HLB du mélange de surfactif.

X : proportion de SPAN 60.

1-X : proportion de TWEEN 20.

HLB L: HLB du SPAN 60 = 4.7

HLB H: HLB du TWEEN 20 = 16.7

En faisant varier les valeurs de HLB m de 5 à 13 en progression arithmétique de raison  $r = 0.5$ , on obtient une série d'émulsions à tester [18].

On a commencé à formuler des émulsions à partir de HLB=5 pas 4.5, car pour HLB=4.5, en appliquant la formule de GRIFFIN (la proportion de SPAN 60)  $X=101.6\%$  et c'est irréalisable.

Le détail des formules est donné dans le tableau 11 :

**Tableau 11** : Les formules quantitatives des émulsions selon les HLB m proposés.

<b>HLB m</b>	<b>5</b>	<b>5.5</b>	<b>6</b>	<b>6.5</b>	<b>7</b>	<b>7.5</b>	<b>8</b>	<b>8.5</b>	<b>9</b>
Huile de maïs (g)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Eau déminéralisé (g)	75	75	75	75	75	75	75	75	75
SPAN 60 (g)	4.875	4.67	4.46	4.25	4.04	3.83	3.625	3.42	3.21
TWEEN 20 (g)	0.125	0.33	0.54	0.75	0.96	1.17	1.375	1.58	1.79
<b>HLB m</b>	<b>9.5</b>	<b>10</b>	<b>10.5</b>	<b>11</b>	<b>11.5</b>	<b>12</b>	<b>12.5</b>	<b>13</b>	
Huile de maïs (g)	20	20	20	20	20	20	20	20	
Eau déminéralisé (g)	75	75	75	75	75	75	75	75	
SPAN 60 (g)	3	2.79	2.58	2.375	2.17	1.96	1.75	1.54	
TWEEN 20 (g)	2	2.21	2.42	2.625	2.83	3.04	3.25	3.46	

### 1.2.2. Protocole expérimental :

Les émulsions sont préparées selon la technique d'inversion de phase, en respectant les étapes suivantes :

- Introduction des deux surfactifs dans la phase lipophile.
- Chauffage de la phase lipophile et hydrophile à 75°C dans un bain marie
- Introduction de la phase hydrophile dans la phase lipophile goutte à goutte sous agitation mécanique à 300 tours / min pendant 15 min à l'aide d'un agitateur à hélice (figure 27).
- Au cours de cette opération il y a formation d'une émulsion primaire E/H qui devient H/E par inversion de phase à partir d'une certaine concentration de la phase hydrophile.
- Homogénéisation de la préparation à 24000 tours/min pendant 5 min à l'aide d'un homogénéisateur Ultra Turrax de marque 'IKA' (figure 27).
- Refroidissent du mélange par un bain d'eau froide toute la durée de l'homogénéisation [18].



**Figure 27:** Etapes de préparation des émulsions (à gauche: introduction de la phase hydrophile dans la phase lipophile sous agitation, à droite: l'homogénéisation)

**1.2.3. Critères d'appréciation du HLB optimal [18]:**

- **Aspect macroscopique :**

Chaque émulsion est examinée dans les 15 min qui suivent sa fabrication et 24 heures après, on note s'il y a ou non séparation de phase.

- **Stabilité à température ambiante :**

Une quantité de chaque émulsions est mise dans des flacons placés sur la paillasse à température du laboratoire, la stabilité est appréciée macroscopiquement à plusieurs reprises.

- **Stabilité à la centrifugation :**

Les émulsions préparées sont soumis à la centrifugation pendant 15 min, successivement à 1000, 2000 et 3500 T/ min à l'aide d'une centrifugeuse de marque 'HETTICH ZENTIGUGEN'. on note la séparation de phase.

- **Sens de l'émulsion :**

Par la méthode des colorants : Quelques gouttes du bleu de méthylène qui est un colorant hydrophile ont été ajoutées à l'émulsion mise au préalable dans un tube sec transparent à fin de mieux visualiser la dispersion du colorant, cette dernière est appréciée après une agitation.

- **Conductivité :**

Elle est mesurée à l'aide d'un conductivimètre. Elle permet de compléter les tests relatifs au sens de l'émulsion et d'attester ce dernier.

- **Viscosité :**

En absence d'appareillage adéquat la viscosité a été appréciée subjectivement.

- **Granulométrie :**

Par défaut d'appareillage adéquat, la taille des gouttelettes a été estimée approximativement après lecture au microscope (de marque ZEISS).

On estime que le HLB critique est atteint lorsque l'émulsion présente :

- Un maximum de stabilité et de conductivité.
- Un minimum de granulométrie [18].

#### 1.2.4. Résultats et discussions:

- **Aspect macroscopique après fabrication :**

Les émulsions préparées sont toutes stables à l'œil nu (pas de séparation de phase visible) immédiatement après leur fabrication à part celle du HLB = 10, les résultats sont récapitulés dans le tableau 12.

**Tableau 12:** Stabilités des émulsions préparées 15 minutes et 24 heures après formulation ; S : stable, I : instable.

HLB		5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	10
Stabilité	15min	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
	24H	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I

**Remarque :**

On s'est arrêté au HLB = 10, car à ce stade on a observé une nette séparation de phase juste après formulation.

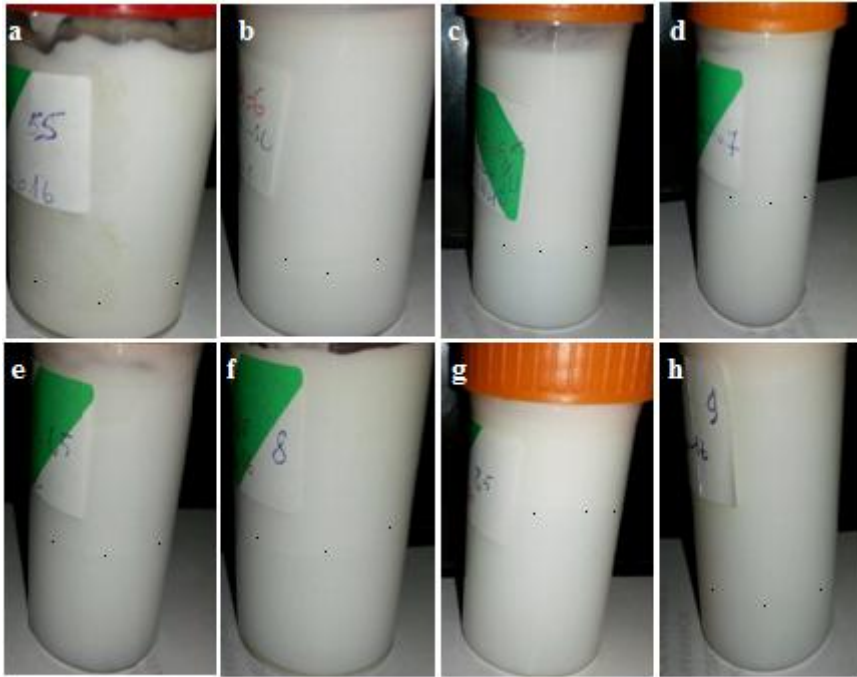
- **Stabilité à température ambiante**

On a suivi l'aspect macroscopique des émulsions préparées dans le temps, les lectures après 4 et 6 jours sont mentionnées dans le tableau 13 ci-après

**Tableau 13:** Stabilités des émulsions préparées 4 et 6 jours après formulation, S : stable, I : instable

HLB		5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	10
Stabilité	4Jours	S	S	S	S	I	I	I	I	I	I	I
	6Jours	S	S	I	I	I	I	I	I	I	I	I

-Un mois après formulation l'émulsion au HLB = 5.5 a présenté aussi une séparation de phase (Figure 28) par contre celle de HLB=5 est restée intact même 3mois après formulation (figure 29).



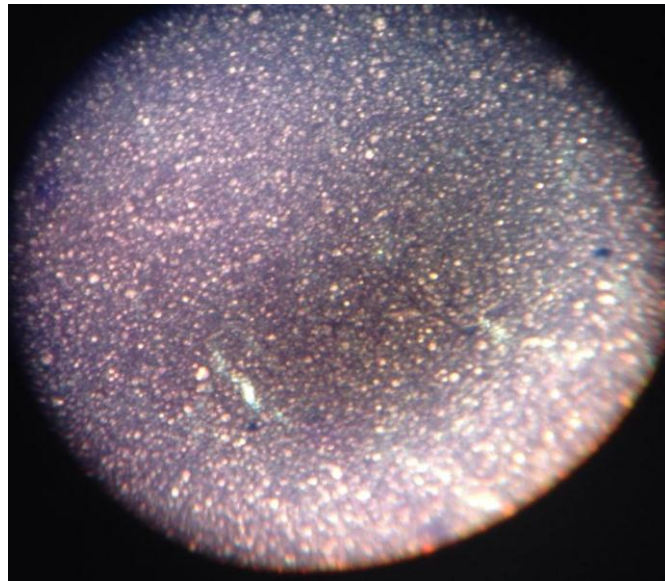
**Figure 28:** Aspect macroscopique des émulsions ayant des HLB de 5,5 à 9 (de a à h respectivement) après un mois de formulation.



**Figure 29:** Aspect macroscopique de deux émulsions à HLB = 5 après trois mois (à gauche) et deux mois (à droite) de formulation.

- **Observation microscopique :**

L'observation des émulsions au microscope optique permet une appréciation de la taille des gouttelettes et une révélation des types d'instabilités produites (voir figure 30 et annexe III).



**Figure 30:** Aspect microscopique de l'émulsion au HLB = 5 colorée au bleu de méthylène au grossissement 10.

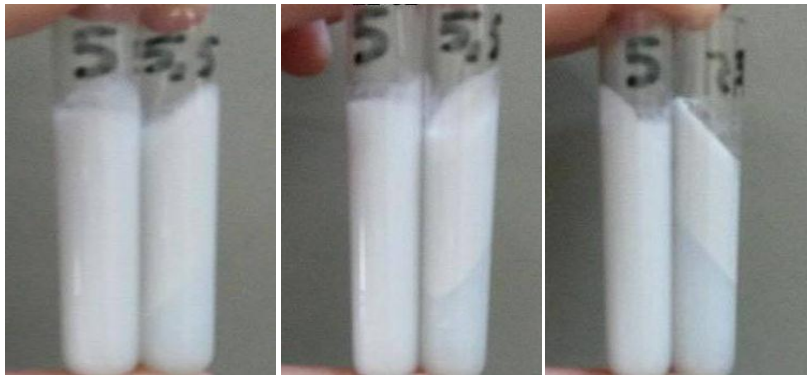
- **Stabilité à la centrifugation :**

Seul le HLB = 5 a présenté une stabilité après centrifugation à 1000, 2000 et 3500 tours /min pendant 15 minutes, les résultats sont présentés dans le tableau 14. (Figure 31)

**Tableau 14:** Stabilité des émulsions après centrifugation à 1000, 2000 et 3500 tours/ min.

S : stable, I : instable.

Centrifugation HLB m	1000 tours /min	2000 tours/min	3500 tours/min
5	S	S	S
5.5	I	I	I
6	I	I	I
6.5	I	I	I
7	I	I	I
7.5	I	I	I
8	I	I	I
8.5	I	I	I
9	I	I	I
9.5	I	I	I



**Figure 31:** Aspects des émulsions à HLB = 5 et 5.5 après centrifugation à 1000, 2000 et 3500 T/min (de gauche à droite) pendant 15 min.

- **Viscosité**

Dans l'étude de la viscosité des émulsions, on a constaté que la consistance de l'émulsion diminue au fur et à mesure que le HLB augmente.

Les différents aspects des émulsions préparées sont mentionnés dans le tableau 15

**Tableau 15:** Appréciation rhéologique des différentes émulsions ; M : molle, +/-M : plus au moins molle, +/-F : plus ou moins fluide, C : crémeux, L : laiteux.

HLB m	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	10
Appréciation rhéologique											
Consistance	M	+/-M	+/-M	+/-M	+/-F	+/-F	+/-F	+/-F	+/-F	+/-F	+/-F
Aspect	C	C	L	L	L	L	L	L	L	L	L

- **Sens de l'émulsion :**

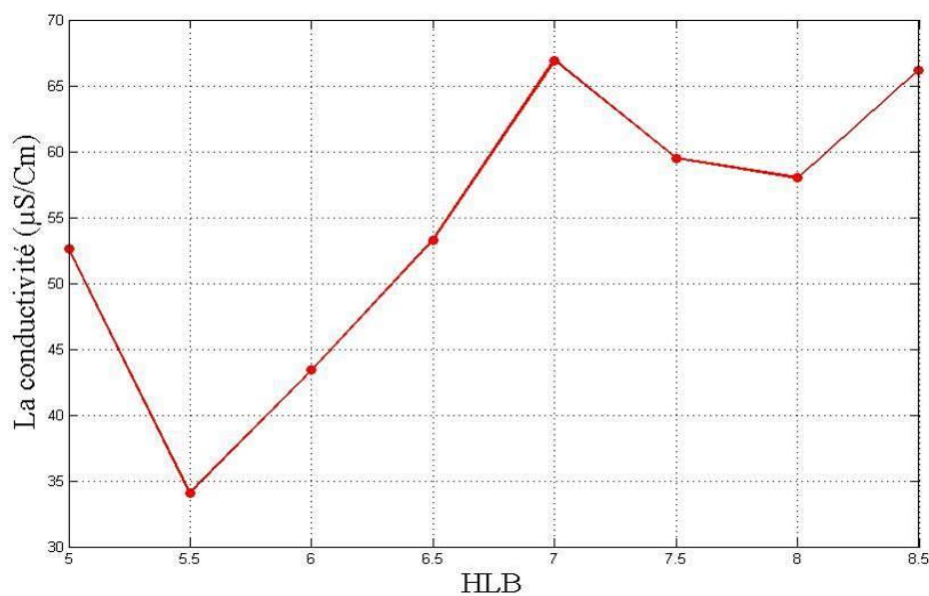
Toutes les émulsions préparées aux différents HLB ont présenté le même aspect (figure 32) lors de la coloration : une coloration homogène tout au long du tube ce qui indique que le colorant s'est dispersé dans la phase dispersante aqueuse et que notre émulsion est de type H/E.



**Figure 32 :** Aspect de l'émulsion après coloration avec le bleu de méthylène.

- **Conductivité :**

Les mesures de conductivité sont effectuées à l'aide d'un conductivimètre, les résultats sont exprimés en  $\mu\text{S}/\text{cm}$  et présentés sur le graphe ci-dessous. (Figure 33)



**Figure 33:** Conductivité des émulsions préparées.

- **Granulométrie :**

Les méthodes de faible consommation énergétique comme l'inversion de phase utilisée dans notre formulation permettent la préparation d'émulsion nanométrique [16], de même l'utilisation d'homogénéisateur à 24000 tours/min pendant 5 min donne une taille de particule comprise entre 174,8 et 5,7 nm [28].

La taille des gouttelettes dans notre cas a été appréciée au microscope optique de marque 'ZEISS' à différents grossissements avec absence d'échelle. On a constaté que la taille des gouttelettes tend à se minimiser à partir du HLB=8.

➤ **Discussion des résultats**

Toutes les émulsions sont stables à l'œil nu immédiatement après formulation sauf HLB = 10 qui montre une démixtion nette. Mais après un mois à température ambiante seul le mélange de surfactifs correspondant à un HLB m = 5 conserve sa stabilité.

Lorsque les émulsions sont soumises à la centrifugation, la meilleure stabilité est obtenue pour le HLB m = 5.

La consistance de ces émulsions diminue en augmentant le HLB. Ceci s'explique par le fait qu'au HLB le plus bas, la proportion en surfactif lipophile étant plus importante, celui-ci n'est pas adsorbé totalement à l'interface, une partie passe dans la phase continue aqueuse augmentant ainsi la viscosité du milieu. [18]

Un maximum de conductivité est retrouvé au HLB = 7, et une taille des gouttelettes minimale au HLB = 8.

La variation de conductivité est proportionnelle à la variation de proportion de phase externe quand il s'agit d'une émulsion H/E. c'est un indicateur du sens de l'émulsion [16].

Si on fait une récapitulation des différents critères d'appréciation, la stabilité d'une émulsion est primordiale, l'émulsion dont le HLB m = 5 répond à ces critères avec :

- Une durée de vie importante;
- Des propriétés physiques acceptables;
- Un aspect macroscopique satisfaisant.

Il semble donc que l'émulsion qui présente un HLB m = 5 répond positivement à l'attente d'une formulation stable sur le plan physicochimique mais aussi macroscopique. En effet elle présente :

- Une consistance appréciable et séduisante (voir tableau 15).
- Une conductivité élevée (figure 33).
- Pas de séparation de phase (voir tableaux 12, 13, 14 et figures 29, 31) ni de phénomène d'instabilité mais aussi les gouttelettes semblent individualisées et de distribution granulométrique étroite vu au microscope optique (voir figure 30).

Elle sera donc retenue pour la suite à savoir l'encapsulation de notre limonène en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire.

Selon les études effectuées sur les émulsions, leur instabilité vient de la nécessité pour le système de minimiser son énergie libre de surface, créée lors de la fabrication, par la dispersion mécanique de la phase dispersée huileuse ou aqueuse. La manifestation principale de cette instabilité est la coalescence des gouttes qui tend à diminuer l'aire interfaciale huile-eau, donc l'énergie d'interface. Si la coalescence se produit sans être ralentie, elle donne rapidement naissance à deux phases non miscibles. L'addition d'émulsifiants ou d'autres stabilisants peut minimiser la coalescence et les autres formes d'instabilités [17].

### 1.3. Encapsulation du D-LIMONENE :

L'encapsulation de composés bioactifs représente une approche viable et efficace pour augmenter leur stabilité physique, en les protégeant contre les interactions avec les ingrédients alimentaires et, en augmentant leur activité biologique.

Dans le cas des antimicrobiens, l'encapsulation peut augmenter la concentration des composés bioactifs dans les zones alimentaires où les micro-organismes sont de préférence situés, par exemple dans des phases riches en eau ou interfaces liquide solide [28].

Les microcapsules puissent garantir une excellente protection des huiles essentielles contre la dégradation ou l'évaporation en outre ils n'altèrent pas l'activité antimicrobienne. En revanche, les systèmes d'administration nanométrique, en raison de la taille subcellulaire, peuvent augmenter les mécanismes d'absorption cellulaire passive, réduisant ainsi les résistances de transfert de masse et l'augmentation de l'activité antimicrobienne [28].

Les formulations les plus prometteuses sont testées dans le jus d'orange frais, afin d'évaluer la conservation du jus des micro-organismes d'altération et l'éventuelle extension de la durée de conservation contre la modification des paramètres de qualité du jus [28].

#### 1.3.1. Formules étudiées :

-Le HLB critique choisi d'après les formulations préliminaires est égale à 5.

-Le choix des quantités de limonène utilisées pour l'encapsulation est fait en prenant en compte les valeurs des CMI et la DL50 de limonène.

-D'après les résultats obtenus au chapitre I, les CMI sont de 2 % pour *E. faecalis* et 4 % pour *E. coli*. (Voir tableau 7)

-La DL 50 de limonène chez la souris est de 5.6 g /Kg chez le male et de 6.6 g/kg chez la femelle, pour le rat elle est de 4,4 g/Kg chez le male et de 5,1 g/Kg chez la femelle [29].

-Si on prend la valeur la plus petite 4.4 g/Kg est l'équivalent de 264 g pour un adulte de 60 Kg, les 2% et 4% incorporés dans notre formulation sont nettement inférieurs, et donc loin de la toxicité.

A noter que la concentration de limonène est de 6 mol/l (voir annexe I)

Les formules détaillées des émulsions préparées sont présentées dans le tableau 16

**Tableau 16:** Formules quantitatives des émulsions à base de limonène.

Composition de l'émulsion à HLB m=5	Formule à 2 %	Formule à 4%
LIMONENE (g)	2	4
Huile de maïs (g)	18	16
SPAN 60 (g)	4.875	4.875
TWEEN 20 (g)	0.125	0.125
Eau déminéralisé Q.S.P (g)	100	100

### 1.3.2. Protocole expérimental :

L'introduction de limonène dans la phase huileuse se fait juste avant l'ajout de la première goutte de la phase hydrophile pour éviter l'altération du principe actif au cours du chauffage. L'émulsion est préparée par la technique d'inversion de phase déjà décrite [18] (voir page 77).

### 1.3.3. Résultats et discussions :

- **Aspect macroscopique et caractéristique olfactives :**

L'introduction du limonène n'a pas affecté ni la stabilité ni la consistance du système dispersé du départ (voir tableau 17).

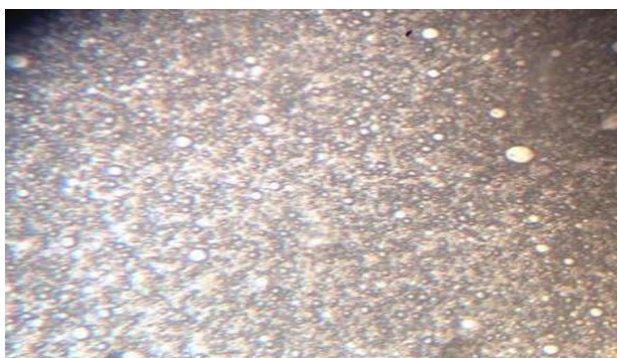
**Tableau 17:** Aspect macroscopique des deux formules d'émulsion préparées, S : stable, M : molle.

	Formule à 2%	Formule à 4%
Stabilité	S	S
Consistance	M	M

Les caractéristiques macroscopiques initiales ont été conservées. Ajouter à cela l'encapsulation de limonène à conférer à notre émulsion une odeur citronnée qui après un mois est resté inchangée.

- **Aspect microscopique :**

L'observation du système dispersé au microscope optique pour les deux formulations à donner une distribution de taille identique dans les deux cas (figure 34 et 35) comparés à l'émulsion initiale sans limonène (figure 30).



**Figure 34:** Aspect microscopique de la formule à 2% colorée au bleu de méthylène observé au Grossissement 10.



**Figure 35:** Aspect microscopique de la formule 4% observé au grossissement 10.

- **Conductivité :**

On a noté une diminution de la conductivité dans les deux formules comparé à l'émulsion placebo (HLB m =5) qui est de 52.6  $\mu\text{S} / \text{cm}$  (voir figure 33)

-Formule à 2% : conductivité = 31.6  $\mu\text{S} / \text{cm}$

-Formule à 4% : conductivité = 28.8  $\mu\text{S}/\text{cm}$

Sachant que la conductivité d'une phase huileuse est inférieure à 1  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , le sens de notre émulsion est toujours conservé (la phase dispersante est toujours l'eau → émulsion H/E).

- **Stabilité à température ambiante et à froid :**

Des échantillons de chaque émulsion sont placés au laboratoire à température ambiante, et à froid à + 4°C. Leur stabilité est appréciée macroscopiquement après un mois.

Les émulsions sont restées intactes toute la durée de conservation indiquée et dans les deux conditions.

**Remarque :**

Contrairement à l'émulsion placebo placée, à température ambiante, les préparations renfermant le limonène n'ont pas présentées des moisissures, on conclue donc que c'est l'effet antimicrobien du limonène qui a empêché leur développement.

En récapitulation, l'introduction du limonène dans une émulsion n'a pas altéré la stabilité du système.

L'inhibition du développement des moisissures semble indiquer que l'encapsulation joue en faveur d'une action antimicrobienne et même antifongique. D'où l'intérêt de ce présent travail, qui s'articule autour de la promotion et la valorisation des déchets de l'agroalimentaire en vue de leur utilisation à des fins scientifiques en l'occurrence comme conservateur alimentaire (D-limonène issu de l'extraction des HEs de citrus).

D'après RAYI KUMAR 2000, l'encapsulation de composés bioactifs représente une approche réalisable et efficace pour moduler la libération du principe actifs, augmenter la stabilité physique de ces substances, les protéger contre les interactions avec l'environnement, améliorer leur bioactivité, réduire la toxicité et leur volatilité [30].

# *Chapitre III*

*Introduction des émulsions à base de limonène dans une matrice alimentaire –jus d'orange- et évaluation de leur activité antibactérienne*

---

### **III. INTRODUCTION DES EMULSIONS A BASE DE LIMONENE DANS UNE MATRICE ALIMENTAIRE -JUS D'ORANGE- ET EVALUATION DE LEUR ACTIVITE ANTIMICROBIENNE**

Au cours des dernières années, les antimicrobiens naturels ont attiré une attention considérable en raison de la sensibilisation accrue des consommateurs sur les aspects qualité et sécurité de la nourriture.

Comme la plupart des composés bioactifs, les agents antimicrobiens sont des espèces chimiquement réactives, ce qui peut provoquer des problèmes considérables lorsqu'ils sont incorporés dans un système alimentaire complexe, tels que les effets négatifs sur la stabilité physique ou l'intégrité de la chimie alimentaire, ainsi que la dégradation de l'activité biologique des composés bioactifs.

Cela se traduit par la nécessité d'utiliser des concentrations suffisantes pour inhiber la croissance microbienne dans les limites imposées par la réglementation dans le domaine agroalimentaires, mais en même temps, peu modifier les propriétés qualitatives du produit [28].

L'objectif de notre travail est de proposer une alternative pour l'utilisation de conservateur chimique au profit d'un conservateur bioactifs naturel de même origine que le fruit utilisé pour la production du jus à savoir le D-limonène.

L'utilisation du D-limonène seul n'a aucun intérêt puisque ce dernier est rapidement volatil d'où son encapsulation dans un système qui permet de promouvoir sa stabilité, son activité antimicrobienne prouvée (voir chapitre I).

#### **1. Matériels utilisés :**

##### **1.1. Jus d'orange frais :**

Il est obtenu par pression manuelle des oranges fraîche d'origine algérienne de la région de Tizi Ouzou, bien nettoyées et essuyées (figure 36).



**Figure 36:** Jus d'orange préparé.

### 1.2. Germes utilisés :

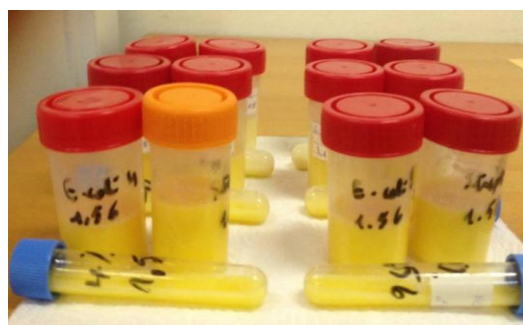
D'après les résultats de l'étude de l'activité antimicrobienne de limonène, les germes utilisés pour l'inoculation de jus d'orange sont : *E.coli* et *E.faecalis*. (Voir tableaux 6, 7, 8)

### 2. Préparation des échantillons :

On a préparé deux séries d'échantillon de jus inoculés par *E.coli* et *E.faecalis* séparément. Pour chaque série, on a introduit une quantité bien définie de chaque émulsion (à 2% et 4% de limonène) de façon à avoir une concentration de 1/16, 1/8, et 1/4.

Le conditionnement est effectué dans des piluliers stériles.

On a obtenu donc une gamme de 12 échantillons (figure 37)



**Figure 37:** Les échantillons de jus préparés

Le tableau 18 récapitule les détails des préparations :

**Tableau 18:** Proportion des différents constituants des échantillons préparés.

	2%			4%		
	1/16	1/8	1/4	1/16	1/8	1/4
Emulsion (g)	1.56	3.12	6.25	1.56	3.12	6.25
Jus Q.S.P (g)	25	25	25	25	25	25

**Remarque :**

Le choix des doses d'incorporation en limonène est motivé par la DL 50 de limonène (voir chapitre II) et les résultats des CMI obtenus à partir des études de l'activité antimicrobienne de limonène (voir tableau 7), mais aussi la conservation des caractères organoleptiques du jus d'orange.

**3. Préparation des témoins :**

❖ Les échantillons témoins sont traités avec des émulsions placebo (émulsion sans limonène) à un HLB  $m = 5$ , dans le but d'éliminer toute ambiguïté sur l'action antibactérienne propre du limonène et pour s'assurer de l'inertie des constituants de l'émulsion vis-à-vis la croissance bactérienne.

Première série :

- Jus d'orange frais + émulsion placebo + *E. coli*
- Jus d'orange frais + émulsion placebo + *E. faecalis*

❖ La 2<sup>ème</sup> série des témoins ne contient pas d'émulsion, l'objectif dans ce cas est de confirmer que les souches utilisées sont vivantes et que le jus d'orange constitue un milieu adéquat pour leur développement.

Deuxième série :

- Jus d'orange frais + *E.coli*
- Jus d'orange frais + *E faecalis*.

Les échantillons et les témoins (inoculés) sont incubés à l'étuve à 37°C. Les lectures sont faites juste après l'inoculation (avant incubation), 24 et 48 heures après.

#### 4. Analyse microbiologique :

Afin de déterminer l'effet du limonène appliqué sur le jus d'orange inoculé par deux bactéries tests, des mesures de turbidité par spectrophotomètre (voir annexe IV) de marque 'BIOMATE' (figure 38) à une longueur égale à 600nm [2] ont été réalisées pour suivre la cinétique de la croissance bactérienne en présence et en absence de limonène.



**Figure 38:** Spectrophotomètre d'absorption utilisé pour l'analyse microbiologique.

Les lectures sont faites à J0 ( $t_0$ ), J1 ( $t_1$ ) et J2 ( $t_2$ ) pour les échantillons et les témoins.

A noter que les blancs contiennent tous le mélange à part le paramètre à mesurer, dans notre cas : les bactéries.

## 5. Résultats et discussion :

Le spectrophotomètre mesure l'absorbance des bactéries présente dans les systèmes utilisés (jus inoculé).

- Les résultats des témoins sont mentionnés dans le tableau 19 à  $t_0$ ,  $t_1$ .

**Tableau 19:** Résultat de l'absorbance des bactéries testées au sein des préparations témoins.

	Les germes	Jus	Jus + émulsion placebo
Absorbance	<i>E.coli</i>	$t_0 = 0.030$	$t_0 = 0.001$
		$t_1 = 0.046$	$t_1 = 0.007$
	<i>E. faecalis</i>	$t_0 = 0.001$	$t_0 = 0.013$
		$t_1 = 0.008$	$t_1 = 0.070$

- Les résultats du développement d'*E.coli* et de *E.faecalis* au sein de jus d'orange additionné de concentrations différentes de limonène après mise aux conditions accélérées sont rapportés dans les tableaux 20 et 21 ci-dessous exprimés en valeur DO et en taux de réduction de leur croissance.

**Tableau 20:** Absorbance et taux de réduction de la croissance d'*E.coli* au sein de jus d'orange en présence d'émulsion à base de limonène.

		2%			4%		
		1.56g 1/16	3.125g 1/8	6.25g 1/4	1.56 g 1/16	3.125g 1/8	6.25g 1/4
Absorbance	$t_0$	0.044	0.059	0.038	0.006	0.084	0.162
	$t_1$	0.007	0.019	0	0.002	0	0
	$t_2$	0.003	0	0	0	0	0
Taux de réduction (%)	$t_0-t_1$	84	68	100	67	100	100
	$t_0-t_2$	93	100	100	100	100	100

**Tableau 21:** Absorbance et taux de réduction de la croissance de *E.faecalis* au sein de jus d'orange en présence d'émulsion à base de limonène.

		2%			4%		
		1.57g 1/16	3.125g 1/8	6.25g 1/4	1.56 g 1/16	3.125g 1/8	6.25g 1/4
Absorbance	t <sub>0</sub>	0.034	0.061	0.033	0.013	0.089	0.142
	T <sub>1</sub>	0.005	0.002	0	0.002	0	0
	t <sub>2</sub>	0.001	0	0	0	0	0
Taux de réduction (%)	t <sub>0</sub> -t <sub>1</sub>	85	97	100	85	100	100
	t <sub>0</sub> -t <sub>2</sub>	97	100	100	100	100	100

#### ➤ Discussion des resultats

Le tableau (19) révèle une multiplication importante d'*E.coli* et *E.feacalis* au sein des préparations témoins (dans le jus et en présence d'émulsion placebo) ce qui confirme l'inertie des constituants de l'émulsion vis-à-vis des bactéries et que la matrice alimentaire constitue un milieu favorable pour leur développement.

Les résultats des tableaux (20,21) ont montré une réduction significative de la croissance microbienne vis à vis des deux bactéries ce qui explique que le limonène encapsulé a exercé un effet antibactérien puissant aux différentes concentrations utilisées. Cet effet a atteint son maximum après 24 heures d'incubation à 2% avec 6,25g (1/4) d'émulsion et à 4% avec 3.125g (1/8) d'émulsion.

L'activité de limonène a persisté et même évolué après une incubation de 48 heures pour tous les échantillons. La charge d'*E.coli* et de *E.feacalis* atteint des valeurs nulles même aux petites proportions.

Concernant les caractères organoleptiques de jus d'orange ; aux proportions élevés (1/4 d'émulsion), on note une altération de ces caractères : changement de la couleur, un aspect laiteux et une viscosité plus au moins élevée. Ces caractéristiques peuvent cependant être corrigées en rapportant par exemple un colorant autorisé par les autorités compétentes en se qui concerne la couleur et l'aspect. Ce qui est intéressant c'est que notre jus ne nécessite aucun aromatisant et aucun édulcorant.

Si on récapitule, les proportions 1/4 pour la formule à 2%, 1/8 et 1/4 pour la formule à 4 % ont réduit totalement la croissance des deux bactéries (les trois échantillons ont donné le même taux de réduction), la concentration en limonène pour le 1/4 à 2% et le 1/8 à 4% est relativement la même. En prenant en compte les caractères organoleptiques du jus d'orange, l'altération est importante à proportions élevées, une quantité de 6.25 g est à écarter. La proportion 1/8 pour la formule 4% est à retenir car elle présente un effet maximale avec une altération minime des propriétés de notre jus d'orange.

Il ressort que lorsque le limonène encapsulé dans une émulsion est introduit dans le jus à une faible concentration, l'effet observé est aussi meilleur, avec un changement négligeable des propriétés organoleptiques de la matrice alimentaire (jus).

Les résultats obtenus sont concordants avec ceux des autres études de *Donsi F et al* [28] qui soulignent l'avantage de l'encapsulation des huiles essentielles et plus précisément du D-limonène.

L'encapsulation du limonène est une approche efficace pour augmenter la stabilité et améliorer ainsi son activité antimicrobienne dans les matrices alimentaires. Le même composé bioactif encapsulé dans les gouttelettes d'une émulsion, présente une activité antimicrobienne supérieure à la forme classique (limonène seul) en raison de la taille des gouttelettes plus petites. Les gouttelettes formées peuvent fusionner avec les parois des cellules bactériennes, ce qui conduit à la déstabilisation de l'enveloppe lipidique des agents pathogènes et d'initier leur rupture [2]. On note aussi que l'encapsulation permet de stabiliser ce composé bioactif et de perdurer son activité dans le temps.

# *Conclusion*

## CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS

Les huiles essentielles et leurs composants ont des potentiels antimicrobiens très importants. Toutefois, leur caractère hydrophobe et leur volatilité élevée ont limité leur application. En effet, l'encapsulation des molécules actives constitue un outil très attrayant en mesure de résoudre l'inconvénient majeur des huiles essentielles en augmentant leur stabilité chimique au sein des matrices alimentaires.

Dans cette optique, se situe notre étude, au cours de laquelle nous avons évalué *in vitro* l'activité antimicrobienne du D-LIMONENE et encapsulé ce dernier dans une émulsion afin d'introduire le système dans une matrice alimentaire.

Pour l'activité antibactérienne, la méthode de l'aromatogramme nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien du D-limonène vis-à-vis de quatre bactéries. Ce pouvoir est différent selon les genres allant d'un pouvoir nul à un pouvoir très puissant, avec des zones d'inhibition variant entre 6 et 17 mm. Les CMI obtenues sont comprises entre 0,12 à 0,48 mol/l. De même, les valeurs de la CMB s'avèrent égales à la CMI pour *E.faecalis* et *E.coli*.

Concernant l'encapsulation du D-limonène, le concept HLB nous a permis de formuler des émulsions parmi lesquelles seule la formulation à un HLB égal à 5 est stable, cette stabilité est appréciée par plusieurs critères et contrôles. C'est l'émulsion retenue pour la suite de l'étude.

L'introduction du D-limonène encapsulé dans un jus d'orange inoculé a exercé une réduction significative de la croissance des deux bactéries utilisées : *E.coli* et *E.feacalis* même à de faible concentration.

En fin, nos résultats indiquent que le D-limonène possède une activité antibactérienne intéressante qui s'est multipliée après encapsulation, ce qui permet de l'utiliser comme un agent conservateur très prometteur dans l'industrie alimentaire capable d'empêcher la croissance bactérienne responsable de l'altération des aliments.

A l'essor de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie sur le D-limonène et ses activités biologiques non seulement seul, mais également en mélange, explorant ainsi une éventuelle synergie. En perspective, nous souhaiterions que cette étude soit poursuivie en ce qui concerne la confirmation de la persistance de l'activité en

fonction du temps pour prouver l'utilité de rajouter ce composé bioactif plutôt qu'un composé chimique.

Il est aussi souhaitable de remplacer les méthodes de formulation empirique par de nouveau procédé plus performant et développer de nouvelles approches pour l'encapsulation de ces molécules bioactives. En vue de leur application non seulement en agroalimentaire mais aussi dans la recherche médicale et de la santé.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Bouguerra M A. Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire [Mémoire].Constantine : Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires ; 2012.
- [2] Qipeng Y et al. Improving the antimicrobial activity of D-limonene using a novel organogel-based nanoemulsion. Food control [En ligne].2014 oct [consulté le 13/10/2014];1(1): [6 pages]. Disponible sur [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)
- [3] Hellal Z. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. Application sur la sardine [Mémoire].Tizi Ouzou : Université Mouloud Mammeri.
- [4] Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales 3<sup>e</sup> édition ; 1999
- [5] Abdelouahid Dj et Bekhechi Ch. Les huiles essentielles. 2eme Edition. Alger : Office des publications universitaires ; 2014.
- [6] Louni M. Extraction, caractérisation physico-chimique et microbiologique de l'huile essentielle de clou de girofle [Mémoire].Tizi Ouzou : université Mouloud Mammeri ; 2012.
- [7] Rhayour Kh. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* [Thèse]. Fès : Université Sidi Mohamed Ben Abdellah ; 2002.
- [8] Chouitah Ou. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra* [Thèse]. Oran : Université d'Oran ; 2012.
- [9] Kehal F. Utilisation de l'huile essentielle de *Citrus limon* comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche [Mémoire]. Constantine : Université de Constantine I ; 2013.
- [10] El Kalamouni Ch. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées [Thèse]. Toulouse : Université de Toulouse ; 2010.
- [11] Piochon M. Etude des huiles essentielles d'espèce végétale de la flore laurentienne [Mémoire].Québec : université du Québec ; 2008
- [12] Chuittah O. Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite [Thèse].LORRAINE: université de Lorraine ; 2012.
- [13] Alliouane F. Extraction de limonène à partir des épicarpes d'orange. [Mémoire].Tizi Ouzou : Université Mouloud Mammeri.
- [14] Allouche J. Développement de nouvelles méthodes pour l'élaboration d'émulsions multiples eau/huile/eau [Thèse].LORRAINE : Ecole national supérieur des industries chimique ; 2003.
- [15] Thiam A R. Emulsions adhésives et non adhésives : Stabilité et propriétés des interfaces étudiées par la microfluidique [Thèse]. PARIS : École doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique ; 2011.
- [16] Pierat N. Préparations d'émulsions par inversion de phase induite par agitation [Thèse] .Nancy : université Henri Poincaré ; 2010.

- [17] Chabni M. Etude de la stabilité physique des systèmes dispersés [Thèse].Tizi Ouzou : Université Mouloud Mammeri; 2012.
- [18] Kassa D. Etude d'une émulsion à visée anti inflammatoire destinée à la voie orale [Thèse]. Alger : Université Ben Youcef Ben Khada;1991.
- [19] Capsulae innovative microencapsulation [en ligne].introduction aux technologies d'encapsulation [Consulté le 20/06/2016]. Disponible sur [www. Capsulae.com](http://www.Capsulae.com)
- [20] Norme générale Codex pour les jus et les nectars de fruits .CODEX STAN 247-2005. 2005
- [21] Avis de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail « Anses » relatif aux jus de fruits et à certains produits similaires; Saisine n°2012-SA-0258, Maisons-Alfort, le 24 juin 2013
- [22] Association des Producteurs Algériens de Boissons. Guide des bonnes pratiques d'hygiène. Industrie algérienne des jus de fruits, nectars et produits dérivés. Décembre 2011.
- [23] Becila A. Préventions Des Altérations et Des Contaminations Microbiennes des Aliments. [Mémoire]. Constantine : Université Mentouri.2009.
- [24] Lamamra M. Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de Tinguarra sicula (L.) Parl. et de Filipendula hexapetala Gibb.[Mémoire]. Sétif : Université Ferhat Abbas.
- [25] Mebarki N. Extraction de l'huile essentielle de Thymus fontanesii et application à la formulation d'une forme médicamenteuse – antimicrobienne. [Mémoire]. Boumerdes : Université M'hamed Bougara. 2010.
- [26] Rowe CR. Handbook of pharmaceutical excipients . 5ème édition. London : Royal pharmaceutical of Great Britain ;2006.
- [27] Sigma Aldrich [En ligne].; 2015 [Consulté le 01/06/2016]. Disponible sur : <http://www.sigmaaldrich.com/>.
- [28] Donsi F et al. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. Food science and technology [en ligne]. 2011[consulté le 05/12/2015].[7 PAGES].
- [29] Jidong S. D limonène : safety and clinical applications. Alternative medicine review. 2007 ; 12(3).
- [30] Bilia AR et al. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. Hindawi Publishing Corporation.2014 ; (651593), [14 pages].

## ANNEXE I : Calcul de la concentration du limonène

Sur l'étiquette du flacon de limonène, outre les pictogrammes de sécurité, figurent trois informations qui nous permettront de déterminer une valeur approchée de la concentration. Celles-ci sont : la masse molaire 'M', la pureté 'P' et de la densité 'd' :

On peut lire sur l'étiquette :

$$M = 136.23 \text{ g/mol}$$

$$p = 97 \%$$

$$d = 0.84$$

De ces informations, on peut en tirer que :

- 1 mole du limonène a une masse de 136.23g.
- 1 L du limonène a une masse de 840 g.

On peut donc tirer de ces 2 informations le nombre de moles de produits dans la bouteille si le produit était pur : 1 mole pèse 136.23g. J'ai donc dans 1L soit dans 840 g de produit :

$$\frac{840}{136.23} = 6.16 \text{ mol de produit.}$$

L'étiquette me précise maintenant que le produit a une pureté de 97%. Ceci signifie que sur 100 mol de produit, seules 97 seront de Limonène pur. Sur les 6.16 mol calculées précédemment, j'aurai donc  $\frac{6.16 \times 97}{100}$  soit 6 mol de produit pur dans le litre de solution.

La concentration calculée est donc de **6 mol/L**

La formule est donc la suivante :  $C = \frac{d \times 1000 \times P}{M}$

## **ANNEXE II : Coloration de GRAM et test de la CATALASE**

### **• Coloration de GRAM**

L'étude des caractères morphologiques sont recherchés par la coloration de Gram et l'examen microscopique au grossissement 1000x. Ils permettent l'observation du mode de regroupement, la forme des cellules bactériennes, et le type de Gram.

La coloration de Gram selon la méthode décrite par DELARRAS (2007).

- Préparer un frottis de la souche test ;
- Recouvrir le frottis de violet de gentiane, laisser agir 1 minute puis rincer à l'eau distillée ;
- Verser du lugol et laisser agir pendant 1 minute, rincer à l'eau distillée ;
- Décolorer à l'alcool à 95°, entre 15 et 30 secondes ; rincer à l'eau distillée ;
- Recolorer avec de la fuchsine pendant 10 à 30 secondes, rincer à l'eau distillée ;
- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen ;
- Observation au microscope optique à l'objectif x 100 à l'immersion.

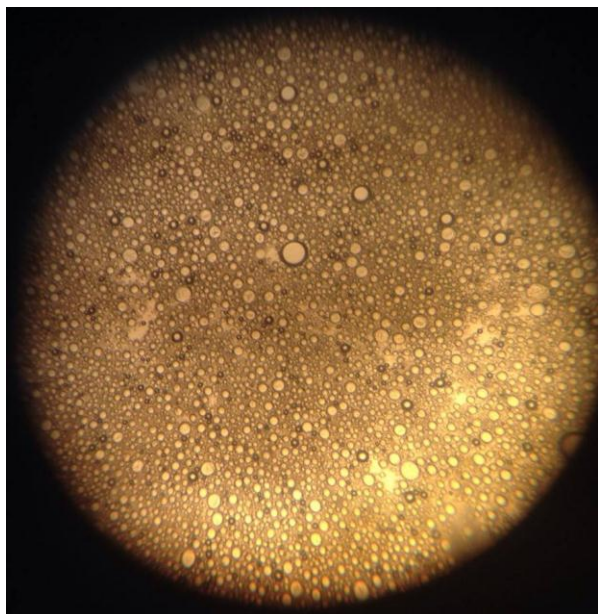
Les bactéries colorées en violet sont des bactéries à Gram positif, et celles colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif [3].

### **• Test de la CATALASE**

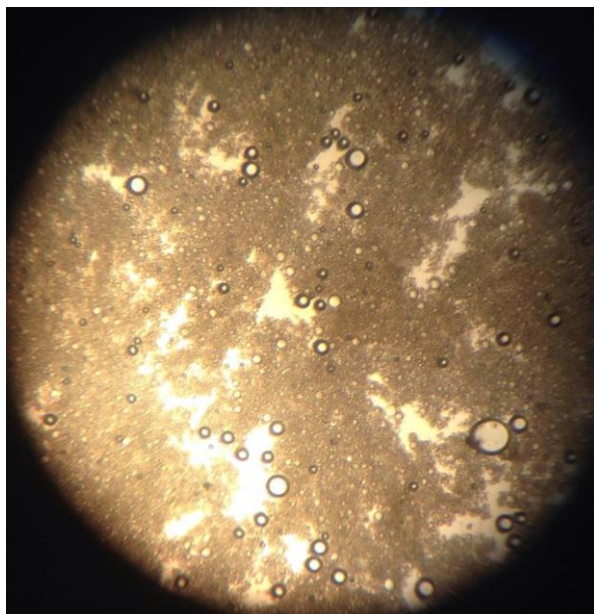
Ce test permet de différencier les bactéries à Gram positif de la famille des *Micrococcaceae* (*S.aureus*) qui sont catalase positive, des familles *Streptococcaceae* et *Enterococcaceae* (*E.faecalis*) qui sont catalase négative. La catalase agit en dégradant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (eau oxygénée) en H<sub>2</sub>O et oxygène qui se manifeste par un dégagement gazeux [3].

### **ANNEXE III : Aspects microscopique des émulsions préparées au cours de la formulation préliminaire**

Les émulsions sont observées au microscope optique de marque 'ZEISS' au G 10.



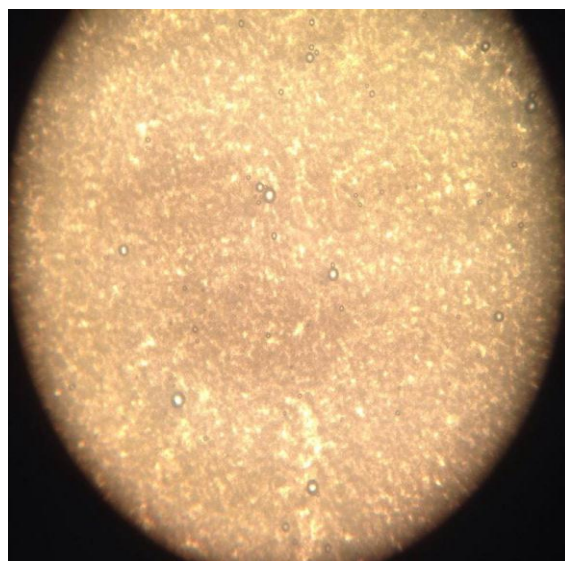
**HLB = 5.5**



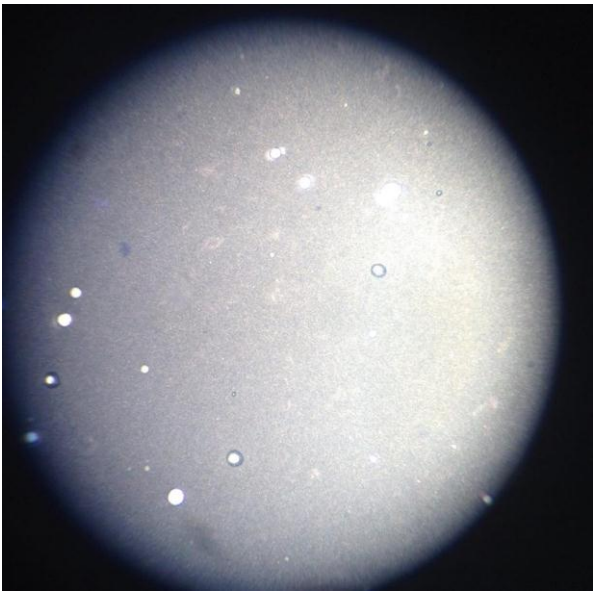
**HLB = 6**



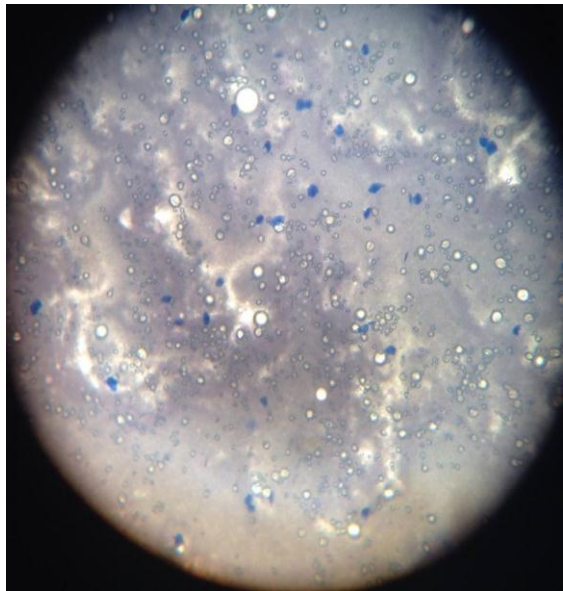
**HLB = 6.5**



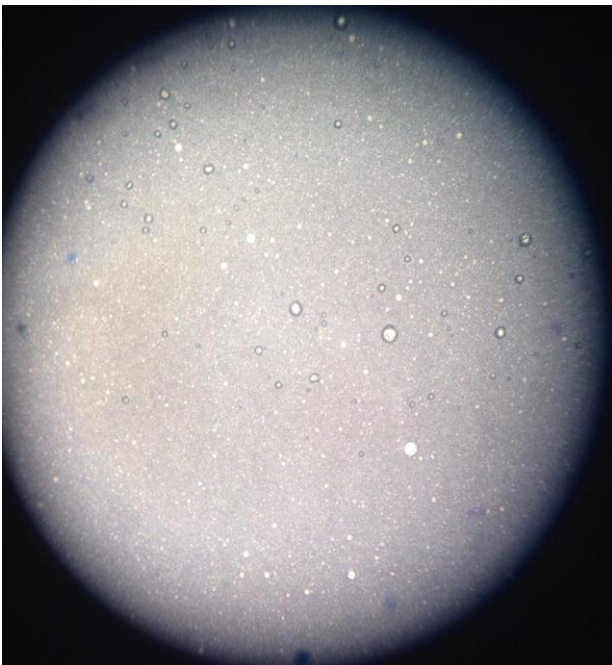
**HLB = 7**



**HLB = 7.5**



**HLB = 8**



**HLB = 8.5**

## ANNEXE IV : La spectrophotométrie

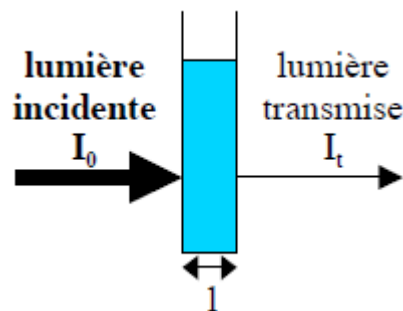
### Définition de l'absorbance (ou densité optique DO)

Lorsqu'une lumière d'intensité  $I_0$  passe à travers une solution, une partie de la lumière est absorbée. L'intensité  $I_t$  de la lumière transmise est donc inférieure à  $I_0$ .

L'absorbance de la solution est définie comme:

$$A = \log (I_0 / I_t)$$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible.



### La loi de Beer-Lambert

La relation de Beer-Lambert décrit que, à une longueur d'onde  $\lambda$  donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des espèces de la solution, et à la longueur du trajet optique (distance sur laquelle la lumière traverse la solution).

Ainsi, pour une solution contenant une seule espèce absorbante:  $A_\lambda = \epsilon l c$

$A_\lambda$  : est l'absorbance de la solution pour une longueur d'onde  $\lambda$ .

$c$  : (en M) est la concentration de l'espèce absorbante.

$l$  : (en cm) est la longueur du trajet optique

$\epsilon$  : (en  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) est le coefficient d'extinction molaire de l'espèce absorbante à la longueur d'onde  $\lambda$ .

Il rend compte de la capacité de cette espèce à absorber la lumière, à la longueur d'onde  $\lambda$ .

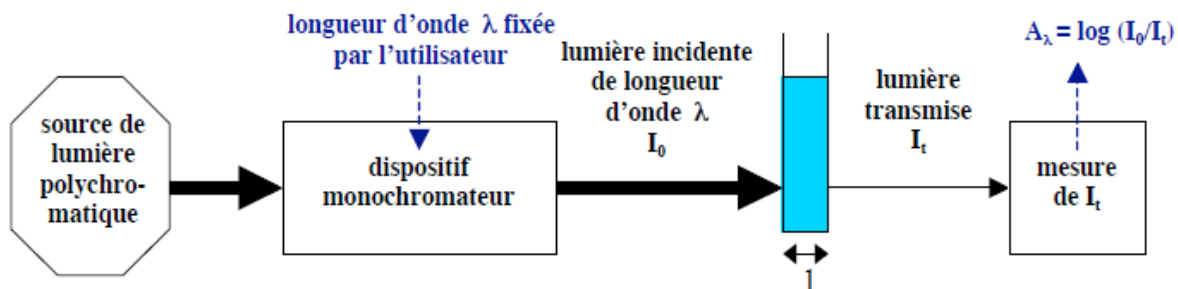
La loi de Beer-Lambert est additive. Ainsi, pour une solution contenant plusieurs espèces absorbantes, l'absorbance de la solution est la somme de leurs absorbances.

### Le spectrophotomètre

Un spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée.

Un dispositif monochromateur permet de générer, à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette, une lumière monochromatique, dont la longueur d'onde est choisie par l'utilisateur. La lumière monochromatique incidente d'intensité  $I_0$  traverse alors une cuve contenant la solution étudiée, et l'appareil mesure l'intensité  $I_t$  de la lumière transmise.

La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée.



Le spectrophotomètre peut être utilisé pour mesurer de manière instantanée une absorbance à une longueur d'onde donnée, ou pour produire un spectre d'absorbance. Dans ce dernier cas, le dispositif monochromateur décrit en un temps court l'ensemble des longueurs d'ondes comprises entre deux valeurs choisies par l'utilisateur.

## Cuves

Les cuves couramment utilisées peuvent recevoir des volumes de 1 à 3mL, et présentent un trajet optique de 1cm. Pour travailler dans le visible (ex. à 500nm), on utilise des cuves en verre ou en plastique jetable. Par contre, pour travailler dans l'UV (ex. à 260nm ou 280nm), il faut utiliser des cuves en quartz, car le verre ou le plastique ne laissent pas passer ces longueurs d'ondes.

### «Faire le zéro» ou «faire le blanc»

Comme les absorbances sont des valeurs additives, pour mesurer l'absorbance d'une espèce A dans une solution B, on commence par mesurer l'absorbance de B et on règle le spectrophotomètre pour y attribuer la valeur 0.

## RESUME

A l'heure actuelle, l'homme fait très attention à son alimentation et essaye par tous les moyens de rendre cette dernière la plus naturelle possible. Pour cette raison l'industrie agro-alimentaire tend à remplacer tout ce qui est chimique et artificiel par des composés naturels notamment les conservateurs qui sont de large utilisation du fait de leur importance majeure dans la qualité de l'aliment et sa durée de vie, mais qui sont très connus pour leurs effets indésirables et leur toxicité. C'est dans cette voie que ce travail s'oriente.

Cette étude porte sur l'évaluation de l'activité antibactérienne du D-limonène qui est le composé majoritaire des huiles essentielles des agrumes, ensuite l'introduction de ce composé dans un système dispersé (à savoir une émulsion stable) et enfin l'appliquer sur une matrice alimentaire (jus de fruit) comme étant un conservateur alimentaire naturel.

Au cours de cette étude, des tests sur l'activité antibactérienne ont été faits sur quatre germes connus dans l'altération de jus de fruit : *E.coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Lactobacillus sp*, l'évaluation de cette activité a été réalisée par la méthode des aromatogrammes pour sélectionner les germes sensibles puis par la méthode des dilutions dans le milieu solide pour connaître les concentrations minimales inhibitrices des germes sensibles. Il s'est avéré que *S.faecalis* est le germe le plus sensible avec une CMI=2% ensuite *E.coli* avec une CMI=4% par contre les deux autres germes sont résistants.

Le D-limonène est caractérisé par sa volatilité et son instabilité et aussi par sa mauvaise diffusion dans les aliments à cause son hydrophobicité, c'est pour cela qu'on a opté pour l'encapsulation de ce composé dans une émulsion de type H/E afin de le protéger et d'améliorer voire de promouvoir son activité.

Avant de choisir la formule la plus adéquate des émulsions, des essais préliminaires ont été faits en utilisant la méthode des HLBs.

Les émulsions formulées à base du D-limonène ont été introduites dans une matrice alimentaire (un jus d'orange) à raison de plusieurs concentrations, ces jus sont ensuite inoculés par les deux germes sensibles et la croissance bactérienne a été évaluée par spectrophotométrie à 600nm. Les résultats obtenus sont concluants et la formulation retenue est celle de 4% avec une concentration de 1/8 qui a donné la meilleure activité antimicrobienne tout en gardant les caractères organoleptiques du jus.

**Mots clés :** D-limonène, HEs, Agrumes, Activité antimicrobienne, émulsion stable, encapsulation, conservateur alimentaire, jus d'orange.

## ABSTRACT

These days, people are very careful about their diet and are trying by all means to make it as natural as possible. For this reason the food industry tends to replace all that is chemical and artificial by natural ingredients including conservators that are widely used because of their major importance in the quality of food and lifespan, but which are well known for their side effects and toxicity. This study is directed in that way.

This study focuses on the evaluation of the antibacterial activity of D-limonene that is the major component of the essential oils of citrus, then the introduction of this compound in a dispersed system (namely stable emulsion) and then apply it to a food matrix (fruit juice) as a natural food preservative.

In this study, tests on the antibacterial activity were made on four bacteria known in alteration of fruit juice: *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus sp*; the evaluation of this activity was carried out by aromatogrammes method for selecting sensitive germs and by the dilution method in the solid medium to know the minimal inhibitory concentrations of sensitive germs. It turned out that *S.faecalis* is the most sensitive germ with MIC = 2% then *E.coli* with MIC = 4% although the two other germs are resistant.

D-limonene is characterized by its volatility and its instability and also by its poor distribution in the food because of its hydrophobicity, this is why we opted for the encapsulation of this compound in an emulsion of type O/W to protect and improve view to promote its activity.

Before choosing the most appropriate form of emulsions, preliminary tests were made using the method of HLB.

Emulsions formulated with D-limonene were introduced in a food matrix (an orange juice) with different concentrations; these juices are then inoculated with the two sensitive germs and the bacterial growth was assessed by spectrophotometry at 600 nm. The results are inconclusive and the formulation chosen is that of 4% with a concentration of 1/8 that gave the best antimicrobial activity and maintained the organoleptic characteristics of the juice.

**Keywords:** D-limonene, EOs, Citrus, antimicrobial activity, stable emulsion, encapsulation, food conservator, orange