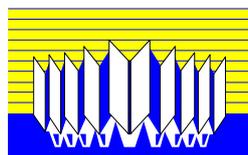




École Doctorale de Mathématiques,  
Informatique, Science  
et Technologie de la Matière



Faculté des Sciences  
Mathématiques, Physiques  
et Naturelles de Tunis



Université Tunis El Manar



Universidad del País Vasco  
Euskal Herriko Unibertsitatea

Université du Pays Basque

Laboratoire de Matériaux Molécules et Applications

Laboratoire Bio Refinery Processes

## Thèse

# Application des huiles essentielles dans le domaine des emballages alimentaires

Présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE**

Par

**MARWA YAHYAOUI**

Soutenue le .....

Devant le jury composé de

.....  
Président

.....  
Rapporteur

.....  
Rapporteur

.....  
Examineur

Mr. Manef Abderrabba

Prof. Institut préparatoire des études  
scientifique et Techniques de la Marsa

Directeur de thèse

Mr. Jalel Labidi

Prof. Université du Pays Basque

Directeur de thèse



## Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une convention de cotutelle entre l'université de Tunis el Manar (UTM) et l'université du Pays Basque (Euskal Herriko Unibersitatea UPV/EHU).

Je tiens à remercier Monsieur Manef Abderrabba et Monsieur Jalel Labidi, mes directeurs de thèse, pour m'avoir confié ce travail. Leur gentillesse et leur disponibilité ont permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions. Merci à tous les deux pour leurs précieux conseils, le soutien, la confiance et l'autonomie qu'ils m'ont accordés.

Toute ma reconnaissance va aussi au Ministère de l'Enseignement Supérieur de Tunisie, à l'université de Tunis El Manar et aussi à la direction de l'université de Carthage pour le financement d'une partie de mes travaux de thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à Oihana Gordobil et René Alexander Herrera avec qui j'ai travaillé durant ma thèse. Je les remercie pour leurs disponibilités, leurs ouvertures d'esprit et leurs nombreuses discussions et le temps consacré pour réaliser certains travaux de thèse, vous étiez plus que des amis.

Merci du fond du cœur tout le personnel du laboratoire bioraffinery process, en particulier Eduardo Robles, Silvia Dias, Sebastian Bonard, Pedro Luis, Gurutz Mondragon et Asier Martinez.

Mes remerciements vont aussi aux personnes du laboratoire matériaux molécules et applications tels que les Zeineb Maaroufi, Nessrine Gazouani et Imene Zribi.

Mes vifs remerciements s'adressent à mes amis qui n'ont pas cessé à me soutenir durant la thèse et dans les moments difficiles en particuliers, Imene Jebri, Soumaya, Imene Ghatassi, Asma Srairi, Rim Dimassi et Mohamed Mkadmini

J'adresse mes plus sincères remerciements à tout le personnel d'Opalia Pharma Recordati Group, spécialement mon boss du travail Jamel Zayani, et Ghazi El Bekri.

Plus personnellement, je dédie ce travail à toutes les personnes qui, au long de ces années mais également celles d'avant, m'ont supporté et sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Ces personnes sont mes parents LEILA et KHALED, je les remercie pour leurs accompagnements dans la vie, encouragements, soutiens morales et financiers. Je les remercie également, ainsi que mes chers oncles et tantes qui n'ont pas cessé de me supporter.

Merci aussi à mon frère Nebil qui, consciemment ou non, a su m'encourager dans cette voie. Et merci à mon grand frère mon témoin, pour tout. Pour son amour, son écoute, ses encouragements et son soutien de chaque instant.

RIEN N'ETAIT FACILE, MAIS J'AI REUSSIT..

## Avant-propos

Le présent travail a été mené grâce à la contribution de deux laboratoires à savoir : le laboratoire Matériaux Molécules et Applications (LMMA) situé à l'institut Préparatoire aux Etudes Scientifiques et Techniques (IPEST), la Marsa et le laboratoire des procédés de bioraffinage (BIORP) situé à l'Université du Pays Basque (UPV/EHU) à San Sébastian, Espagne.

Mes plus vifs remerciements s'adressent aux responsables de ces Laboratoires pour leur accueil chaleureux, pour la confiance qui m'ont accordé et pour m'avoir assuré les moyens humains et matériels pour le bon déroulement de ce travail.



L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation à l'aide d'un appareil du type « Clevenger » et la préparation des extraits organiques sont réalisées au Laboratoire Matériaux Molécules et Applications (LMMA) situé à l'Institut Préparatoire aux Etudes Scientifiques et Techniques (IPEST), la Marsa.



La caractérisation chimique et biologique des huiles essentielles et extraits organiques des plantes, la fabrication des films actifs et leurs caractérisations physico-chimique et biologique ainsi que leur étude de stabilité ont été réalisés au sein du laboratoire des procédés de bioraffinage (BIORP) situé à l'Université du Pays Basque (UPV/EHU) à San Sébastian, Espagne.

## Résumé

Au croisement d'importants enjeux économiques, environnementaux et de santé publique, l'emballage alimentaire mérite aujourd'hui une mobilisation de tous les acteurs pour faire évoluer les matériaux et les technologies vers des solutions plus respectueuses à la fois de l'environnement et du consommateur. Les emballages actifs permettent d'étendre la durée de conservation des aliments, réduire l'utilisation d'additifs et de conservateurs dans les préparations alimentaires, préserver mieux les saveurs et la qualité des aliments. La libération modifiée des substances actives à partir d'emballages alimentaires étend la stabilité des produits par enrichissement continu en composés actifs à la surface de l'aliment.

L'objectif général du présent travail était l'étude de l'applicabilité de l'acide poly lactique (PLA) et l'amidon (deux polymères biodégradables fabriqués industriellement) contenant des agents naturels, comme des emballages actifs. Pour cela, nous avons choisi plusieurs substances naturelles actives, telles que les huiles essentielles et les extraits de plantes de romarin, de myrte, de thym et du pistachier lentisque pour produire des emballages alimentaires actifs. En premier lieu, une analyse de la composition, ainsi qu'une caractérisation phytochimique et biologique de ces substances naturelles ont été réalisées. En second lieu, le mode d'inclusion de ces agents actifs dans les matrices de PLA et d'amidon et leurs effets sur diverses propriétés optiques, thermiques, mécaniques et de barrière du PLA et d'amidon ont été étudiés. Une évaluation des activités antifongiques et antioxydantes de ces films a été réalisée. En troisième lieu, une étude de la libération des agents actifs a été réalisée à partir des films de PLA et d'amidon en contact avec un simulant alimentaire (éthanol 50%) à une température de 40°C.

L'analyse par GC-MS des huiles essentielles et par LC-MS des extraits des plantes ont révélé que ces derniers sont riches en composés bioactifs générant des activités antimicrobiennes importantes. Les résultats ont montré que le PLA a la capacité de contenir des substances naturelles actives et de protéger les denrées alimentaires de la détérioration microbienne. De même, les propriétés thermiques, mécaniques, et de barrière à la vapeur d'eau de PLA sont améliorées par l'incorporation des huiles essentielles commerciales de romarin (0,5%) et de thym (0,5% et 5%) et des extraits d'acétate d'éthyle de thym (0,5%) et de myrte (0,5% et 1,5%). L'incorporation de l'huiles essentielle commerciale de thym dans la solution filmogène d'amidon a permis d'améliorer les propriétés mécaniques et de barrières. Les films de PLA contenant des huiles essentielles et les extraits de plantes ont montré des résultats prometteurs pour être appliqués en tant que des emballages alimentaires actifs, puisque ces derniers ont améliorés les propriétés antifongiques et antioxydantes de PLA.

Enfin, les résultats ont montré que les films de PLA et d'amidon ont la capacité de contenir et de libérer des agents actifs dans certains produits alimentaires en offrant une stabilité alimentaire plus longue par une libération en permanence des antimicrobiens à la surface des aliments. L'ajout des agents antimicrobiens a amélioré les propriétés thermiques, mécaniques, et de barrières de PLA. Les films de PLA ont montré des résultats prometteurs pour être applicable en tant que des films d'emballage alimentaires actifs.

## Abstract

At the crossroads of important economic, environmental and public health issues, food packaging deserves today a mobilization of all actors to move materials and technologies towards solutions that are more respectful of both the environment and the consumer. Active food packaging can extend the shelf life of foods, reduce the use of additives and preservatives in food preparations, and preserve the flavor and quality of food. The modified release of the active substances from food packaging extends the stability of the products by continuous enrichment of actives compounds on the surface of the food.

The overall objective of this work was to study the suitability of Poly Lactic Acid (PLA) and starch (two biodegradable polymers industrially produced) containing natural agents, as active packaging. For this, we chose several natural actives substances such as essential oils and plant extracts of rosemary, myrtle, thyme and pistachio tree to produce an active food packaging. Firstly, the chemical composition, as well as a phytochemical and biological characterization of these actives substances were carried out. Secondly, the mode of inclusion of these active agents in PLA and starch matrices and also their potential effects on diverse optical, thermal, mechanical and barrier properties of PLA and starch were investigated. An evaluation of the antifungal and antioxidant activities of these films was studied. Then, a study of the release of the active agents was accomplished from PLA and starch films in contact with a food simulant (50% ethanol) at a temperature of 40 ° C.

GC-MS analysis of the essential oils and LC-MS analysis of plants extracts revealed that the latter are rich in bioactive compounds generating significant antimicrobial activities. The results showed that PLA has the capacity to contain natural active substances and protect food from microbial spoilage. Also, the thermal, the mechanical, and the water vapor barrier properties of PLA were enhanced by the incorporation of commercial essential oils of rosemary (0.5%) and thyme (0.5% and 5%) and the ethyl acetate extracts of thyme (0.5%) and myrtle (0.5% and 1.5%). The incorporation of thyme commercial essential oil into starch film-forming solution, has improved the mechanical and the barriers properties. PLA films containing essential oils and plant extracts have shown promising results to be applied as active food packaging, since they have enhanced the antifungal and antioxidant properties of PLA.

Finally, the results showed that starch and PLA films have the ability to contain and release active agents in some food products by providing longer food stability by continuously releasing antimicrobials to the food surface. Adding, these antimicrobial agents have improved

the thermal, mechanical, and barrier properties of PLA. PLA films have shown promising results to be applicable as active food packaging films.

## Liste des abréviations

**ABTS** : 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate

**A.niger** : aspergillus Niger

**ANVISA** : Agence nationale de surveillance de la santé

**ATG** : analyse thermogravimétrique

**CPG-FID** : chromatographie en phase gazeuse à un détecteur à ionisation de flamme

**CPG-MS** : chromatographie en phase gazeuse à spectroscopie de masse

**DMSO** : dimethylsulfoxyde

**DP** : degré de polymérisation

**DPPH** : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

**DSC** : calorimétrie différentielle à balayage

**DRX** : diffraction des rayons x

**EtOH** : éthanol

**FDA** : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

**GRAS** : généralement reconnu comme sûr

**HPMC** : hydroxypropylmethylcellulose

**HD** : hydrodistillation

**HE** : huile essentielle

**HEs** : les huiles essentielles

**LDPE** : low density polyethylene

**MC** : huile essentielle de myrte

**MeOH** : méthanol

**M\_EtA** : extrait d'acétate d'éthyle de myrte

**M\_EtOH** : extrait éthanolique de myrte

**OA** : albumine d'œuf

**OMS** : organisation mondiale de santé

**PE** : polyethylene

**PHBV** : poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)

**PVC** : poly(chlorure de vinyle)

**PEG** : polyethyleneglycol

**PE** : polyéthylène

**PP** : polypropylène

**PS** : polystyrène

**PVOH** : polyvenylalcool

**Pist** : huile essentielle de pistacia

**Pist\_EtA** : extrait d'acétate d'éthyle de pistacia

**PDA** : Potato dextrose Agar

**PLA** : acide polylactique

**RC1** : huile essentielle de romarin commerciale

**RC2** : huile essentielle de romarin Pharmaceutique

**R\_EtOH** : extrait éthanolique de romarin

**RN** : huile essentielle de romarin extrait naturellement

**SPI** : isolat de protéine de soja

**TC** : huile essentielle de thym

**T\_EtA** : extrait d'acétate d'éthyle de thym

**T\_EtOH** : extrait éthanolique de thym

**Tg** : température de transition vitreuse

**UE** : union européenne

**WPI** : isolat de protéine de lactosérum

**WVP** : perméabilité à la vapeur d'eau

## Liste des figures

Figure II-1 : Courbe de Contrainte à la déformation pour les films d'emballage flexible.....	12
Figure III-1: Les biopolymères issus des sources renouvelables pour emballage alimentaire	16
Figure III-3: Procédés de synthèse pour l'obtention de PLA à haut poids moléculaire .....	17
Figure III-4 : Structure chimique de l'Amylose et l'Amlyopectine .....	20
Figure III-5: Organigramme illustrant les réactions enzymatiques nécessaires à la biosynthèse de l'amidon dans l'endosperme des céréales .....	21
Figure IV-1: Systèmes d'emballage alimentaire et comportement relatif des substances actives .....	30
Figure I-1: Squelette d'une unité isoprénique .....	33
Figure I-2: Squelette de base des flavonoides .....	38
Figure I-1: Le Rosmarinus officinalis L.....	54
Figure II-1: Le Myrtus communis .....	57
Figure III-1: Le Thymus capitatus .....	59
Figure IV-1: La Pistacia Lentiscus .....	63
Figure I-1 : Différentes interactions en chromatographie gazeuse .....	68
Figure I-2: Structure du radical libre de DPPH.....	72
Figure I-3: Aspect de l'Aspergillus niger dans un milieu de culture (Agar).....	74
Figure II-1: Procédé de fabrication de film à base de PLA.....	78
Figure III-1: Caractérisation des couleurs selon trois paramètres : teinte, saturation, clarté ...	80
Figure III-2: Représentation schématique d'une ATG .....	80
Figure III-3: Appareil d'ATG .....	81
Figure III-4: Appareil de DSC .....	82
Figure III-5 : Dispositif de traction [9].....	83
Figure III-6: Testeur de débit de transmission de vapeur d'eau à travers le film .....	85
Figure I-1: Courbe du rendement des HEs en fonction du temps d'extraction.....	89

Figure I-2: Les structures chimiques des composés majoritaires présents dans les HEs étudiées .....	91
Figure I-3: Les spectres Infrarouges des HEs .....	96
Figure II-1: Rendements en extraits obtenus en fonction de la nature du solvant d'extraction	97
Figure IV-1: Détermination de l'IC <sub>50</sub> des HEs de RN et TC par DPPH .....	103
Figure IV-2: Détermination de l'CI <sub>50</sub> des extraits par DPPH .....	105
Figure IV-3: Détermination de l'CI <sub>50</sub> des HEs de RN et TC par la méthode d'ABTS .....	107
Figure IV-4: Détermination de l'CI <sub>50</sub> des extraits par ABTS .....	108
Figure IV-6: Activité antifongique des HEs .....	109
Au vue de ces résultats, 5% de RN, RC1, TC et Pist été suffisants pour stopper la croissance d' <i>A.niger</i> (Figure IV-10). Tous les résultats ont été significativement différents statistiquement 0,001 (One Way ANOVA).....	109
Figure IV-7: La croissance fongique de l' <i>A.niger</i> en contact avec la pastille de cellulose contenant l'HEs après 7 jours d'incubation .....	110
Figure IV-8: La croissance fongique des HEs .....	112
Figure IV-9: Activité antifongique des extraits.....	113
Figure IV-10: La croissance fongique des extraits organiques .....	114
Figure I-1: Le changement de couleur des films de PLA avec l'addition des HEs .....	117
Figure I-2: Le changement de couleur des films de PLA avec l'addition des extraits .....	118
Figure I-3: Le changement de couleur des films d'amidon avec l'addition des HEs.....	119
Figure I-4: Aspect des biofilms de PLA et d'Amidon après le séchage.....	120
Figure II-1: Les courbes de TG (1) et DGT (2) de l'HE de TC et des films élaborés .....	121
Figure II-2 : Les courbes de TG et DGT de l'extrait de T_EtOH (a), film de contrôle (b) et de film actif .....	125
Figure III-1: Les propriétés mécaniques des films de PLA avec les HEs.....	128
Figure III-2: les propriétés mécaniques des films de PLA avec les extraits .....	130
Figure III-3: Les propriétés mécaniques des films d'amidon avec les HEs .....	133

Figure IV-1: La perméabilité à la vapeur d'eau des films de PLA avec des extraits organiques .....	137
Figure V-1: Inhibition fongique des films de PLA contenant les HEs .....	141
Figure V-2: Effet des films de PLA contenant les HEs contre la croissance fongicide.....	142
Figure V-3: Inhibition fongique des film de PLA contenant différentes concentrations des extraits .....	144
Figure II-1: Activité antioxydante des films de PLA contenant les extraites organiques par DPPH (1) et par ABTS (2) .....	150
Figure II-2: Réaction chimique possible entre PLA et les radicals DPPH et ABTS .....	151
Figure III-1: Concentration d'additifs migrant des films de PLA contenant 5% d'HEs et d'extraits (1) et des films d'amidon contenant 5% des HEs de RN et TC (2) dans le simulateur alimentaire.....	154
Figure III-2: Taux de migration des films de PLA contenant 5% HEs et d'extraits organiques (1) et des films d'amidon contenant 5% des HEs de RN et TC (2) dans le simulateur alimentaire .....	155

## Liste des tableaux

Tableau IV-1: Emballages alimentaires antimicrobiens contenant des composés organiques	31
Tableau IV-2: Emballages alimentaires antimicrobiens contenant des pédiocines et des enzymes	32
Tableau I-1: Les huiles essentielles qui présentent une toxicité aiguë ou cancérigène	35
Tableau II-1: Emballage alimentaire actifs à base des huiles essentielles et des substances naturelles	39
Tableau II-2 : Emballage alimentaire actifs à base des extraits de plante	41
Tableau II-3 : Emballage alimentaire actif à base de PLA	43
Tableau II-4: Emballage alimentaire actif à base d'amidon	43
Tableau I-1: Variation du rendement d'extraction des HEs	90
Tableau I-2: La teneur en composés bioactifs présents dans HEs	92
Tableau I-3: Nature et composition chimique des composés bioactifs identifiés dans les HEs	94
Tableau I-4: Les composés les plus abondants identifiés dans les HEs étudiés	95
Tableau III-1: Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des HEs et des extraits	100
Tableau IV-1: Activité antioxydante des HEs et des extraits organiques par DPPH et ABTS	107
Tableau II-1: Les Temperatures et le pourcentages de résidue de charbon caracteristique de l'HE de TC, film de contrôle (PLA) et des films actifs.	121
Tableau II-2: Analyse thermique par DSC de TC et des films élaborés	123
Tableau II-3 : Les Temperatures et le pourcentage de résidus de charbon caracteristique de l'extrait T_EtOH, film de contrôl (PLA) et de film actif.	125
Tableau IV-1: Pérmmeabilité à la vapeur d'eau des films de PLA et d'amidon contenant les HEs	135
Tableau IV-2: Pérmmeabilité à la vapeur d'eau des films d'amidon contenant les HEs	138
Tableau I-1: La perte et la concentration des HEs et des extraits organiques restante dans le film après la fabrication des films de PLA et d'amidon	148

## Liste des équations

Equation 1: Rendement en Huile .....	67
Equation 2: Pourcentage d'inhibition radicalaire.....	72
Equation 3: Pourcentage d'inhibition fongique .....	75
Equation 4: Différence de couleur entre de les films de control et les films actif .....	79
Equation 5: Indice de blancheur .....	79
Equation 6: Chromaticité .....	79
Equation 7: Ténacité.....	79
Equation 8: Degré de cristallinité.....	82
Equation 9: Module de Young .....	83
Equation 10: Contrainte à la repture .....	83
Equation 11: Elongation.....	84
Equation 12:Taux à la perméabilité à la vapeur d' eau.....	84
Equation 13: Permeabilité à la vapeur d'eau .....	84
Equation 14: Pourcentage d'inhibition fongique .....	86
Equation 15: Absorbance optique réel des films.....	88

## **Liste des annexes**

**Annexe 1 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyennes  $\pm$  SD de trois essais)

**Annexe 2 :** Courbe d'étalonnage de la Quercétine (moyennes  $\pm$  SD de trois essais)

**Annexe 3 :** Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique dans le DPPH (moyennes  $\pm$  SD de trois essais)

**Annexe 4 :** Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique dans l'ABTS (moyennes  $\pm$  SD de trois essais)

**Annexe 5 :** La composition préliminaires en composés bioactifs des extraits éthanoliques de romarin, de myrte et de thym et des extraits d'acétate d'éthyle de de myrte et de thym par LC-UV-ESI/MS.

**Annexe 6 :** Chromatogrammes obtenus par LC-UV-ESI/MS des extraits de romarin, de myrte et de thym en mode d'ionisation positive et négative.

**Annexe 7 :** Les structures chimiques des composés révélées dans la composition des extraits de romarin, de myrte et de thym.

# SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
Objectifs .....	5
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>6</b>
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>Généralités sur les emballages .....</b>	<b>7</b>
I. Les emballages alimentaires.....	6
I.1 Concept de l'emballage alimentaire .....	6
I.1.1 Dans le monde .....	6
I.1.2 En Tunisie.....	6
I.2 Aperçu historique sur les emballages alimentaires .....	7
I.3 Types d'emballages alimentaires .....	7
II. Les emballages alimentaires plastiques.....	8
II.1 Les matières plastiques.....	8
II.1.1 Les polymères.....	8
II.2 Types d'emballages alimentaires plastique.....	9
II.2.1 Les films flexibles .....	9
II.2.2 Conteneurs rigides ou semi rigides .....	10
II.3 Les facteurs affectant la sélection d'un matériau d'emballage .....	10
II.3.1 La lumière.....	10
II.3.2 La température.....	10
II.3.3 L'humidité .....	11
II.3.4 Les microorganismes.....	11
II.3.5 Les propriétés mécaniques .....	12
II.4 La durée de conservation des aliments emballés .....	13
II.4.1 Définition.....	13

II.4.2	Les facteurs contrôlant la durée de conservation .....	13
II.5	Les interactions entre l’emballage et l’aliment .....	14
II.6	Les déchets d’emballage : un problème environnemental mondial .....	14
III.	Les emballages biodégradables .....	15
III.1	L’acide polylactique (PLA).....	16
III.1.1	Synthèse de PLA .....	17
III.1.2	Les propriétés de PLA .....	18
III.2	L’amidon .....	19
III.2.1	Composition et structure moléculaire.....	19
III.2.2	La biosynthèse d’amidon.....	20
III.2.3	Les propriétés de l’amidon .....	21

## **CHAPITRE II**

<b>Développement d’emballage alimentaire .....</b>	<b>6</b>
I. Généralités.....	24
II. Emballages intelligents .....	25
II.1 Limitation des emballages intelligents.....	25
III. Emballages bioactifs .....	26
IV. Emballages actifs.....	27
IV.1 Emballages actifs antioxydants .....	28
IV.2 Emballages actifs antimicrobiens.....	29
IV.2.1 Les systèmes d’emballage antimicrobien :.....	30
IV.3 Exemples de concepts d’emballages antimicrobiens .....	31
IV.4 Limitation des emballages alimentaires actifs .....	33

## **CHAPITRE III**

<b>Innovation de nouvelles technologies d’emballage alimentaires actifs .....</b>	<b>24</b>
I. Les plantes aromatiques et médicinales .....	25

I.1	Généralités.....	25
I.1.1	Définition.....	25
I.1.2	Importance des plantes aromatiques et médicinales.....	25
I.1.3	Domaine d'application .....	26
I.1.4	Actualité des plantes aromatiques et médicinales (PAM) utilisées en Tunisie.....	26
I.2	Les huiles essentielles .....	27
I.2.1	Définition.....	27
I.2.2	Les propriétés et les activités biologiques des huiles essentielles.....	27
I.2.3	Mode d'action des huiles essentielles .....	28
I.2.4	Utilité économique .....	29
I.2.5	Extraction des huiles essentielles .....	29
I.2.6	Composition chimique des huiles essentielles .....	32
I.2.7	Sensibilisation des huiles essentielles .....	33
I.2.8	Facteurs influençant la composition et la qualité d'une huile essentielle .....	34
I.2.9	Méthodes de caractérisation des huiles essentielles .....	34
I.2.10	Toxicité des HEs : aspect juridique.....	34
I.3	Les extraits organiques.....	36
I.3.1	Généralité .....	36
I.3.2	Les propriétés et les activités biologiques des extraits des plantes.....	36
I.3.3	Les éléments actifs des plantes.....	37
II.	Emballages alimentaires actifs a base des HEs et des extraits de plantes : une alternative dans les industries d'emballage alimentaire.....	38
II.1	Application des HEs.....	39
II.2	Application des extraits de plantes.....	40
II.3	Migration des composés actifs de l'emballage à la nourriture.....	42
II.4	Emballage actifs à base de PLA.....	42

II.5	Emballage actifs à base d'amidon.....	43
------	---------------------------------------	----

## CHAPITRE IV

### **Etude bibliographique sur les plantes aromatiques et médicinales : le romarin, le myrte, le thym et le pistachier lentisque..... 34**

I.	Le romarin.....	54
I.1	Habitat et description .....	54
I.2	Classification botanique .....	54
I.3	Huile essentielle de romarin.....	55
I.3.1	Principaux composition chimique .....	55
I.3.2	Propriétés biologiques .....	55
I.4	Extrait de romarin.....	56
I.4.1	Composition chimique .....	56
I.4.2	Propriétés biologiques .....	56
II.	La Myrte.....	56
II.1	Habitat et description .....	56
II.2	Classification botanique .....	57
II.3	Huile essentielle de Myrte.....	57
II.3.1	Rendement.....	57
II.3.2	Composition chimique .....	57
II.3.3	Propriétés biologiques .....	58
II.4	Extrait de Myrte .....	58
II.4.1	Composition chimique .....	58
II.4.2	Propriétés biologiques .....	59
III.	Le thym .....	59
III.1	Habitat et description .....	59
III.2	Classification botaniques.....	60

III.3	Huile essentielle de Thym .....	60
III.3.1	Rendement.....	60
III.3.2	Composition chimique .....	60
III.3.3	Propriétés biologiques .....	61
III.4	Extrait de Thym.....	61
III.4.1	Composition chimique .....	61
III.4.2	Propriétés biologiques .....	62
IV.	Le pistachier lentisque.....	62
IV.1	Habitat et description .....	62
IV.2	Classification botanique .....	63
IV.3	Huile essentielle de Pistacia .....	64
IV.3.1	Rendement.....	64
IV.3.2	Composition chimique .....	64
IV.3.3	Propriétés biologiques .....	64
IV.4	Extrait du pistachier lentisque .....	65
IV.4.1	Composition chimique .....	65
IV.4.2	Propriétés biologiques .....	65
	<b>PARTIE II</b> .....	107
	<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	107
	<b>CHAPITRE I</b>	
	<b>Caractérisation phytochimique et évaluation des activités biologiques des HEs et des extraits de plantes</b> .....	<b>108</b>
I.	Etude des huiles essentielles et des extraits organiques de <i>romarin</i> , de <i>myrte</i> , de <i>thym</i> et de <i>pistachier lentisque</i> .....	66
I.1	Extraction et analyse des HEs et des extraits organiques.....	66
I.1.1	Extraction des HEs .....	66

I.1.2	Extraction des extraits Organiques.....	67
I.1.3	Analyse des HEs par chromatographie en phase gazeuse.....	68
I.1.4	Analyse des extraits organiques par LC-UV/ESI-MS.....	69
I.1.5	Analyse des HEs et des extraits organiques par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF).....	70
I.1.6	Screening chimique des HEs et des extraits organiques .....	70
I.1.7	Évaluation de l'activité antioxydante des HEs et des extraits organiques .....	71
I.1.8	Évaluation de l'activité antifongique des HEs et des extraits .....	73

## CHAPITRE II

### **Caractérisation physicochimique et biologique des films actifs..... 69**

II.	Etude des biofilms à base des huiles essentielles et des extraits organiques .....	77
II.1	Produits.....	77
II.2	Fabrication des films par casting.....	77
II.2.1	Films à base de PLA incorporés avec les HEs et les extraits organiques .....	77
II.2.2	Films à base d'amidon et HEs.....	78
III.	Caractérisations des biofilms à base d'amidon et de PLA incorporés par des Huiles essentielles et des extraits organiques .....	79
III.1	Caractérisation optique.....	79
III.2	Caractérisation thermique .....	80
III.2.1	Analyse thermogravimétrique .....	80
III.2.2	Analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC) .....	81
III.3	Caractérisation Mécanique.....	82
III.3.1	Mesure de l'épaisseur .....	82
III.3.2	Propriétés mécaniques .....	83
III.4	Etude des propriétés barrières à la vapeur d'eau.....	84
III.5	Evaluation de l'activité antifongique des biofilms films à base des HEs et des extraits organiques .....	85

III.5.1	Objectif.....	85
III.5.2	Produits.....	85
III.5.3	Procédure microbiologique .....	85
III.6	Quantification des HEs et des extraits organiques dans les biofilms .....	86
III.6.1	Principe.....	86
III.6.2	Objectif.....	86
III.6.3	Méthode.....	86
III.7	Activité antioxydante des films à base de PLA incorporés avec les extraits organique	87
III.8	Test de migration dans un simulateur alimentaire .....	87
III.8.1	Principe.....	87
III.8.2	Objectif.....	88
III.8.3	Méthode.....	88
	<b>PARTIE III</b> .....	91
	<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS</b> .....	91
	<b>CHAPITRE I</b>	
	<b>Etude des Huiles essentielles et des extraits de plantes de romarin, de myrte, de thym et du pistachier lentisque .....</b>	<b>92</b>
I.	Extraction et analyse des HEs .....	89
I.1	Etude de la cinétique d'extraction et de rendement en HEs.....	89
I.2	Analyse des HEs par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de Masse (CPG-MS) .....	90
I.3	Analyse des HEs par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF).....	95
II.	Préparation des extraits organiques à partir de la partie aérienne de romarin, myrte, thym, et pistachier lentisque .....	96
II.1	Préparation des extraits et calcul du rendement .....	96
II.2	Analyse des extraits organiques par LC-UV/ESI-MS.....	97

II.3	Analyse des extraits organiques par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) .....	99
III.	Screening chimique des HEs et des extraits organiques .....	99
III.1	Dosage des polyphénols totaux .....	99
III.2	Dosage des flavonoïdes .....	102
IV.	Etude des activités biologiques des HEs et des extraits organiques .....	102
IV.1	Evaluation de l'activité antioxydante .....	103
IV.1.1	Test de DPPH .....	103
IV.1.2	Tests d'ABTS .....	105
IV.2	Evaluation de l'activité antifongique .....	108
IV.2.1	Activité antifongique des HEs .....	108
IV.2.2	Activité antifongique des extraits organiques .....	112

## **CHAPITRE II**

### **Etude et caractérisation des biofilms à base des huiles essentielles et des extraits de plantes .....**

**91**

I.	Caractérisation optique .....	116
I.1	Les films à base de PLA contenant des HEs .....	116
I.2	Les films à base de PLA contenant des extraits organiques .....	117
I.3	Les films à base d'amidon incorporé avec les HEs .....	119
II.	Caractérisation thermique .....	120
II.1	Les films à base de PLA incorporés avec des HEs .....	120
II.2	Analyse thermogravimétrique des films de PLA incorporés avec des extraits de plante 123	
III.	Caractérisation mécanique .....	125
III.1	Les Biofilms à base de PLA .....	126
III.1.1	Les biofilms à base de PLA contenant les HEs .....	126
III.1.2	Les films à base de PLA incorporé avec les extraits organiques .....	128

III.2	Les films à base d'amidon incorporés avec les HEs .....	131
IV.	Etude de la perméabilité des biofilms à la vapeur d'eau.....	134
IV.1	Films à base de PLA et des HEs .....	134
IV.2	Films à base de PLA et des extraits organiques.....	136
IV.3	Films à base d'amidon et des HEs .....	137
V.	Evaluation de l'activité antifongique des biofilms.....	139
V.1	Films à base de PLA incorporés avec des HEs .....	139
V.2	Les films à base de PLA incorporés avec des extraits organiques.....	142
V.3	Les films à base d'amidon incorporés avec des HEs .....	145

### **CHAPITRE III**

#### **Stabilité des composés bioactifs dans les films..... 116**

I.	Quantification des HEs et des extraits organiques dans les films de PLA et d'amidon 147	
II.	Activité antioxydante des films contenant des extraits organiques.....	148
III.	Test de migration.....	151
	Conclusion et perspectives.....	156
	Les Annexes .....	144

### **Introduction générale**

La commission européenne exige dans la législation communautaire relative aux matériaux en contact avec des denrées alimentaires que seules les matières plastiques ou en verre peuvent être en contact avec les denrées alimentaires. Cependant, au cours des dernières années, les problèmes environnementaux sont de plus en plus préoccupants. En effet, les polymères principalement utilisés dans les emballages plastiques proviennent de sources non renouvelables et ne sont pas biodégradables. La décomposition de matériaux nécessite des années et sont donc associés à des problèmes de pollution de l'environnement extrêmement complexes. En outre, toute interaction entre un matériau d'emballage plastique conventionnel et l'aliment qu'il contient est indésirable pour trois raisons : l'interaction peut avoir des effets toxicologiques sur le consommateur, et ou réduire la durée de conservation, et ou modifier les qualités organoleptiques et sensorielle de l'aliment. De plus, l'altération rapide des produits par des microorganismes est devenue un problème croissant. Ainsi, pour préserver l'environnement, la qualité de la nourriture et la fraîcheur de des produits, il est nécessaire d'identifier les matériaux optimaux, les conservateurs actifs et les technologies d'emballage innovantes. D'où l'émergence de l'emballage alimentaire actif comme solutions aux problèmes mentionnés.

Les emballages passifs ont quatre fonctions principales : la sécurité des aliments, la protection, la praticité et la communication tandis que les emballages actifs offrent une protection active libérant en permanence des composés actifs tels que des antioxydants, des agents antimicrobiens, des enzymes, des arômes et des produits nutraceutiques. Les emballages actifs par leur concept innovant et en raison de leurs interactions avec l'emballage, l'aliment et l'environnement, augmentent la durée de conservation des aliments, préservent les saveurs, et réduisent les teneurs en additifs et conservateurs dans des formulations alimentaires tout en préservant la qualité du produit. Ainsi, la plupart des emballages actifs en plastiques rencontrés dans la littérature permettent d'incorporer dans leurs systèmes des substances actifs synthétiques et artificielles. Cependant, ces substances sont associées à divers effets néfastes à la santé humaine et des fois cancérigène suite à leurs processus de migration à travers l'emballage alimentaire vers l'aliment emballé puis vers l'organisme du consommateur. Par conséquent, de nouvelles alternatives à partir de sources naturelles ont été étudiées telles que l'utilisation des huiles essentielles et des extraits des plantes aromatique et médicinales.

Les huiles essentielles et les extraits, provenant de plantes aromatiques et médicinales sont généralement reconnus comme sûrs (GRAS) par la Food and Drug Administration des États-Unis. Ils ont fait l'objet de recherches approfondies non seulement pour être des produits naturels, mais aussi parce qu'ils ont démontré des propriétés biologiques, nutritives et des avantages bénéfiques pour les aliments et pour la santé humaine. Ils ont été largement étudiés et exploités en raison de leurs propriétés biologiques. En général, les composants bioactifs majeurs présents dans les huiles essentielles et les extraits sont les principaux responsables de leurs activités biologiques, mais les composés mineurs peuvent également y contribuer et peuvent présenter une activité synergique.

Une grande variété des huiles essentielles et des extraits provenant de différentes plantes aromatiques a été appliquée dans la fabrication de l'emballage alimentaire. Or, ces substances-là ont été appliquées à des polymères non biodégradables de faible coût et à des biopolymères dont le traitement est complexe.

Pour que les changements émergents dans l'industrie de l'emballage alimentaire renforcent l'économie de notre pays en améliorant la sécurité alimentaire, la qualité, en minimisant les pertes de produits alimentaires, et en protégeant l'environnement des dégâts provoqués par les emballages plastiques, nous avons développé des nouveaux films actifs biodégradables. En effet, nous avons utilisé l'acide polylactique et l'amidon comme matrices polymériques et comme substances actives les huiles essentielles et les extraits des plantes aromatiques et médicinales du romarin, du myrte, du thym, et du pistachier lentisque, qui sont connus traditionnellement par leurs effets thérapeutiques et leurs propriétés antimicrobiennes, antibactériennes et nutritives.

L'acide polylactique, est un polyester aliphatique biodégradable fabriqué à partir de ressources renouvelables comme le maïs. Il est considéré comme un matériau d'emballage alimentaire écologique approuvé par la FDA des États-Unis. L'amidon est utilisé pour développer des films en raison de sa disponibilité élevée, de son coût réduit et de sa capacité à former des matrices polymériques inodores et incolores à faible perméabilité à l'oxygène.

Cependant, certains inconvénients de ces bioplastiques limitent encore leur application commerciale dans les emballages alimentaires, comme les mauvaises propriétés mécaniques et de barrière à l'eau. Plusieurs travaux ont montré que ces propriétés intrinsèques peuvent être améliorées par l'incorporation des divers substances naturelles, synthétiques et artificielles mais l'utilisation des huiles essentielles (naturelles et commerciales) et des extraits des plantes de

romarin, de la myrte, de thym et du pistachier lentisque comme des agents actifs dans les emballages alimentaires à base d'acide polylactique et d'amidon n'a pas été rapporté dans la bibliographie.

Ainsi, ce manuscrit comporte trois parties :

Une partie bibliographique qui se compose de quatre chapitres, le premier présente un aperçu sur les emballages alimentaires à base de plastique et les problèmes environnementaux causés par ces derniers. Un état de l'art concernant les polymères biodégradables tels que le PLA et l'amidon. Une étude concernant les développements actuels dans les emballages alimentaires et plus précisément les emballages alimentaires actifs qui font l'objet de cette étude (polymères, les substances actives synthétiques et artificielles et leurs impacts sur la santé de consommateur) sera présenté dans le second chapitre. ~~Ainsi,~~ Le troisième chapitre comporte une étude sur les huiles essentielles et les extraits des plantes, les différentes techniques d'extraction et d'analyse, et leurs propriétés biologiques. Les travaux rapportés dans la bibliographie sur les emballages à base de PLA et d'amidon seront également présentés dans ce chapitre. Le quatrième chapitre présentera une description botanique ethnopharmacologique des espèces de romarin, de myrte, de thym et du pistachier lentisque ainsi que les travaux antérieurs réalisés sur ces plantes aromatiques et médicinales.

La deuxième partie décrit les différentes techniques et méthodes utilisées pour : (i) l'extraction des huiles essentielles et extraits de plantes tels que le romarin, le myrte, le thym et le pistachier lentisque. Nous avons décrit les différentes méthodes d'analyses de la composition chimique de ces fractions, d'analyse phytochimique de quantification des polyphénols, des flavonoïdes, et d'évaluation de leurs activités antioxydantes et antifongiques. (ii) l'optimisation du mode d'incorporation des agents actifs dans la solution filmogène, ainsi que l'influence de ces derniers sur les propriétés des films avant et après leur ajout sera étudié par une caractérisation multi-échelles des propriétés physicochimiques, thermiques, mécaniques, de barrière à l'eau, et biologiques des films actifs.

La partie résultats et discussions comporte trois chapitres, un premier chapitre concerne les huiles essentielles et les extraits des plantes de romarin, myrte, thym et pistachier lentisque qui portera sur l'analyse de leurs composition chimiques, leurs variabilité qualitative et quantitative des famille chimiques, et l'évaluation de leurs activité antioxydante et antifongique sera réalisé. Le deuxième chapitre sera consacré à l'influence des huiles essentielles et les extraits des plantes sur les propriétés physicochimique, thermique, mécanique, et de barrière à

l'eau des films polymériques à base de PLA et d'amidon. Les résultats de l'étude des activités antioxydantes et antifongiques des films d'emballages alimentaires avec et sans agents actifs prendront également place dans ce chapitre. Le troisième chapitre, il réalisera une étude sur la stabilité de substances actives (huiles essentielles et extraits) dans les films polymérique après leurs fabrications, et le phénomène de migration des agents actifs en contact avec un simulateur alimentaire.

En conclusion, nous présenterons les principaux résultats obtenus de l'étude phytochimique et biologique des huiles essentielles et des extraits de plantes de romarin, de myrte, de thym et du pistachier lentisque. Ainsi que, les systèmes d'emballages actifs qui ont montré des propriétés mécaniques, physicochimiques et biologiques améliorés par rapport au contrôle (sans agent actif), et les perspectives qui feront l'objectif des études ultérieures.

# Objectifs

*L'objectif principal* de ce travail est de développer des emballages biodégradables actifs à base de PLA et d'amidon contenant des substances actives naturelles tels que des huiles essentielles et des extraits des plantes dans le but d'améliorer les propriétés physicochimiques, mécaniques et de barrière à l'eau de PLA et d'amidon d'une part. D'autre part, pour protéger l'aliment emballé de la détérioration microbienne qui provient essentiellement de l'oxydation des lipides et des dommages fongicides que peut subir l'aliment durant la période de conservation.

Afin d'atteindre ces objectifs, il est nécessaire tout d'abord d'extraire les huiles essentielles de la partie aérienne du romarin, myrthe, et du pistachier par la méthode d'hydrodistillation et de préparer les extraits des plantes par macération successive moyennant des solvants à polarité croissante (acétate d'éthyle et éthanol).

Ensuite, nous procédons à une analyse de la composition, une identification des familles chimiques et une caractérisation biologique des huiles essentielles et des extraits des plantes à travers une étude de leurs activités antioxydantes et antifongiques.

Ainsi, une optimisation de la méthode d'inclusion des huiles essentielles et des extraits des plantes dans les solutions filmogènes de PLA et d'amidon est envisagée permettant d'aboutir à des films actifs contenant des différentes concentrations des huiles essentielles et des extraits des plantes. L'addition de ces composés actifs peut affecter les propriétés thermiques et d'autres caractéristiques physiques, mécaniques et de barrière importantes pour les aspects techniques et fonctionnels des matériaux d'emballage, de sorte qu'un emballage actif sans les propriétés souhaitées sera inutile. Cependant, la première étape pour créer un emballage actif réussi consiste à identifier les effets et les interactions entre les agents actifs et la structure du polymère. Une étude centrée sur la caractérisation des effets d'addition des huiles essentielles et extraits de plantes sur les propriétés physiques, thermiques, mécaniques et de barrière contre la vapeur d'eau du PLA et d'amidon est prévue.

Enfin, la libération des agents actifs des matrices de PLA et d'amidon afin de contrôler en permanence le processus d'altération microbienne est complétée par une étude de l'activité antioxydante et antifongique des films élaborés.

# **PARTIE I**

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

Cette partie se subdivise en 4 chapitres :

1. Un premier chapitre où nous présenterons un aperçu sur les emballages alimentaires. Nous nous limitons aux emballages alimentaires plastiques au quel nous citons les matériaux d'emballages utilisés, les facteurs affectant la selection d'un materiau d'emballage, les interactions entre l'emballage et l'aliment, aussi les matériaux d'emballage biodégradables (PLA, et amidon)
2. Le second chapitre portera sur le développement actuel des emballages alimentaires tels que les emballages intelligents, bioactifs et actifs. Dans ce dernier, nous présenterons les types d'emballages actifs et les différents additifs utilisés.
3. Le troisième chapitre traitera l'incorporation des substances naturelles tels que les huiles essentielles et les extraits de plantes en tant qu'une nouvelle alternative dans le domaine des emballages alimentaires actifs.
4. Un quatrième chapitre, dans lequel nous présenterons une description botanique, ethnopharmacologique du romarin : *Rosmarinus officinalis L.*, myrthe : *Myrtus communis*, thym : *Thymus capitatus L.*, et du pistachier lentisque : *Pistacia lentiscus L.*

# **CHAPITRE I**

## **Généralités sur les emballages**

## **I. Les emballages alimentaires**

### **I.1 Concept de l'emballage alimentaire**

Les emballages alimentaires sont essentiels et omniprésents car presque tous les aliments sont emballés d'une manière ou d'une autre. Sans emballage, la sécurité et la qualité des aliments seraient compromises [1]. L'emballage est une structure adaptée à un produit, conçu pour retarder et protéger les aliments contre la détérioration chimique, biologique et physique, prolonger la durée de conservation, maintenir, augmenter et assurer la qualité et la sécurité des produits [2,3,4].

L'emballage alimentaire peut également être défini comme une couche extérieure supplémentaire d'un produit particulier, qui devrait faciliter sa protection contre les facteurs externes, le mouvement, le stockage pendant la période de la vente et de l'utilisation [5]. Certains exemples de facteurs chimiques qui peuvent affecter négativement les aliments comprennent l'exposition aux gaz, à l'humidité et à la lumière. Les emballages offrent également une protection biologique contre les micro-organismes, les insectes, les rongeurs et autres animaux nuisibles ainsi que la protection physique contre les dommages mécaniques, les chocs et les vibrations pendant le transport et la distribution.

#### **I.1.1 Dans le monde**

Mondialement, le marché de l'emballage totalise 417 milliards de dollars et emploie 5 millions de personnes dans 100 000 entreprises. L'emballage alimentaire occupe 65% de ce marché (2). Le premier marché est les États-Unis (100 milliards de dollars), suivi du Japon (80 milliards de dollars), de l'Allemagne (29 milliards de dollars) et de la France (19 milliard de dollars). Le secteur d'emballage alimentaire en Tunisie compte 250 entreprises et emploie aux alentours de 20.000 personnes.

#### **I.1.2 En Tunisie**

En 2009, sa production totale a atteint 900.000 tonnes. Ses importations ont atteint 500 millions de dinars tunisiens (MDT) et ses exportations 320 MDT, en augmentation de 30% par rapport à 2008 [6].

### **I.2 Aperçu historique sur les emballages alimentaires**

Pendant les périodes nomades de l'histoire humaine, les gens mangeaient ce qu'ils pouvaient trouver et ramasser de l'environnement de la nourriture, sans se soucier de protéger et de stocker leur nourriture. Cependant, lorsque l'humanité a commencé à s'installer dans les communautés, les régions et les villes, les gens mangeaient de ce qu'ils chassaient avec des ustensiles, des armes et des outils fabriqués. A ce moment-là, la nécessité de renfermer et de stocker la nourriture est devenue essentielle [7]. C'était la preuve de la poterie et du verre pour le stockage des aliments qui peut être marqué à environ 3000 avant J.C, à l'époque de l'Egypte ancienne. Les égyptiens ont également appris à sceller les récipients à l'aide de cire d'abeille ou de poix, protégeant ainsi la nourriture des insectes, des rongeurs, des bactéries et de l'air. Environ 600 avant J.C, les romains et les grecs utilisaient les bouchons en liège pour la fermeture des récipients [4].

Des améliorations dans la fabrication du bois, du papier, du métal, de la céramique et du verre ont facilité l'utilisation de ces matériaux dans l'emballage et la conservation des aliments. Par exemple, le fer blanc est inventé vers 1200 et est encore utilisé aujourd'hui pour la conservation des aliments en boîtes [8]. En 1809, Nicolas Appert a mis au point un procédé de conservation des aliments dans des récipients en verre bouchés soumis à un traitement thermique dans un bain d'eau. En 1810, Durand a conduit à l'industrie de la conserverie, et quelques années plus tard, Pasteur observe que les bactéries sont la cause de la détérioration des aliments et peuvent être inactivées par un traitement à la vapeur.

Le vingtième siècle a vécu l'amélioration des matériaux d'emballage rigides et flexibles. Dans les années 1930, une méthode pour créer un vide dans les aliments renfermés par des matériaux en métal et en verre était développée. Dans les années 1950, de nouveaux matériaux comme le polychlorure de vinyle et le nylon étaient introduits et utilisés dans les films d'emballage. Vers la fin du vingtième siècle, il y a eu un certain nombre de développements importants dans l'emballage qui ont façonné le monde de l'emballage moderne et de la conservation des aliments. Les exemples incluent le traitement des emballages aseptiques, les matériaux micronodules et les systèmes d'emballage actifs, intelligents et recyclables [4].

### **I.3 Types d'emballages alimentaires**

Les matériaux utilisés pour fabriquer les emballages alimentaires comprennent un groupe hétérogène, comprenant les verres, les métaux, les plastiques, le bois, les cartons et les papiers,

avec une gamme correspondante de caractéristiques de performance. Pour les emballages en plastique, qui fournissent des degrés de protection variables, en fonction de la nature des polymères utilisés dans leur fabrication [1].

## **II. Les emballages alimentaires plastiques**

### **II.1 Les matières plastiques**

#### **II.1.1 Les polymères**

Les polymères sont des matériaux composés de très longues chaînes (*macromolécules*), elles-mêmes formées de molécules élémentaires (*monomères*) assemblées entre elles. Ces chaînes sont principalement constituées d'atomes de carbone sur lesquels sont fixés des éléments comme l'hydrogène ou l'oxygène. D'autres éléments, notamment le chlore, l'azote ou le fluor, peuvent encore intervenir dans la composition de la chaîne. Trois grandes familles de polymères peuvent être distinguées : les thermoplastiques, les thermodurcissables et les élastomères.

##### **II.1.1.1 Les thermoplastique**

Les polymères composés de chaînes macromoléculaires linéaires ou avec ramifications sont désignés sous le terme thermoplastique. Sous l'effet de la chaleur, les chaînes de ces polymères glissent les unes par rapport aux autres. Le polymère se ramollit, peut se déformer et être mis en forme. Après refroidissement, la forme donnée est figée. Cette opération peut être répétée : à nouveau chauffé, le polymère redevient malléable et peut être remis en forme. Exclusivement possédée par les polymères thermoplastiques, cette caractéristique permet la recyclabilité de ces matières.

Dans cette catégorie se trouvent les polymères suivants : le polycarbonate : PC (verre organique), les polyamides : PA (Nylon), les styréniques : PS, PSE, les polyoléfinés : PE, PP, les vinyliques : PVC [9]

##### **II.1.1.2 Les thermodurcissable**

Les polymères réticulés (contenant des nœuds entre les chaînes macromoléculaires) ou en réseau constituent les thermodurcissables. A l'inverse des thermoplastiques, la mobilité thermique est réduite. Plus la température est élevée, plus les chaînes tridimensionnelles se

figent ; les liaisons ou nœuds se renforcent. L'opération est irréversible. Le polymère se rigidifie dès la première transformation jusqu'à se dégrader si la température continue d'augmenter. Dans cette catégorie se trouvent les polymères suivants : les phénoplastes (Bakélite®), les polyépoxydes (Araldite®), les polyuréthanes : PU, les silicones [9].

### **II.1.1.3 Les élastomères**

Les élastomères sont caractérisés par leur grande déformabilité (6 à 8 fois leur longueur initiale). Ils sont obtenus à partir de polymères linéaires caractérisés par des liaisons extrêmement faibles. Ces polymères sont donc des liquides très visqueux. Pour être utilisés comme caoutchouc, des liaisons pontales (nœuds de réticulation) doivent être introduites entre les chaînes, conférant ainsi aux matériaux une structure tridimensionnelle qui assure la réversibilité de la déformation mécanique. Les nœuds de réticulation sont introduits par une réaction chimique appelée vulcanisation après la mise en forme du matériau. Dans cette catégorie se trouvent les polymères suivants : le polyisoprène : NR (caoutchouc naturel), le polyisoprène de synthèse : IR, le polychloroprène (Néoprène), les polysiloxanes (silicones) [9]

## **II.2 Types d'emballages alimentaires plastique**

Les types de film les plus importants pour l'emballage alimentaire sont : Cellulose, Éthylène-acétate de vinyle (EVA), Alcool éthylène-vinyle (EVOH), Polyamides (PA or nylons), Polyéthylène (low density (LDPE) ou high density (HDPE), Polyéthylène naphthalène dicarboxylate (PEN), Polyéthylène terephthalate (PET), Polypropylène (PP), Polystyrène (PS) and high-impact PS (HIPS), Chlorure de polyvinyle (PVC), Polychlorure de vinylidène (PVdC), Polycarbonate, Styène butadiène, Acrylonitrile butadiène styrène, Polyméthylpentène [10].

Les emballages alimentaires plastiques existent en deux catégories y compris les films flexibles et les conteneurs rigides ou semi rigides [10].

### **II.2.1 Les films flexibles**

Les emballages souples désignent tout type de matériau non rigide, mais le terme «film flexible» est généralement réservé aux polymères plastiques non fibreux (de la forme grecque : plastikos), dont l'épaisseur est inférieure à 0,25 mm. Les matériaux thermoplastiques sont capables de subir des ramollissements répétés lors du chauffage et du durcissement en refroidissant, tandis que les plastiques thermodurcissables réticulent les molécules longues

lorsqu'elles sont chauffées ou traitées avec des produits chimiques et ne se résorbent pas lorsqu'elles sont chauffées.

Certains films, y compris le polyester, le polyéthylène à faible densité, le polypropylène et le polyamide sont orientés en étirant le matériau ramolli pour provoquer l'alignement des molécules et augmenter la force, la clarté et la flexibilité du film [11, 12, 13].

### **II.2.2 Conteneurs rigides ou semi rigides**

Les plateaux, tasses, cuves, bouteilles et bocaux sont fabriqués à partir de polymères simples ou coextrudés. Ils ne sont pas réutilisables, et ont une résistance thermique faibles et sont moins rigides que le verre ou le métal. Il existe sept méthodes de fabrication de conteneurs comme le thermoformage, moulage par soufflage, moulage par injection, injection soufflage, extrusion soufflage, étirement soufflage et moulage par soufflage multicouche.

Le polystyrène est également coextrudé avec EVOH ou PVdC / PVC pour fabriquer des récipients semi-rigides et des bouteilles moulées par soufflage. HIPS est utilisé pour fabriquer des récipients rigides / semi-rigides et des plateaux pouvant être congelés [14].

### **II.3 Les facteurs affectant la sélection d'un matériau d'emballage**

Lyijynen et al. (2003), ont décrit les éléments qui affectent la sélection de l'emballage alimentaire [15].

#### **II.3.1 La lumière**

La transmission de la lumière est requise dans les emballages destinés à afficher le contenu du produit emballé, mais elle est restreinte lorsque les aliments sont sensibles à la lumière (rancissement causé par l'oxydation des lipides ainsi perte de valeur nutritive due à la destruction de la riboflavine ou par la perte de pigments naturels) [16,17,18,19].

#### **II.3.2 La température**

Le contrôle de la température de stockage pour protéger les aliments contre la chaleur est essentiel pour garder la qualité de l'élément emballé. Dans les applications où l'emballage est chauffé (par exemple, la stérilisation dans un récipient ou plats cuisinés à la microonde), le matériau d'emballage doit pouvoir supporter les conditions de traitement sans dommage et sans interaction avec les aliments. L'emballage pour les aliments congelés doit rester flexible et ne pas se fissurer à des températures de stockage [16,17,18,19].

### **II.3.3 L'humidité**

La perte d'humidité ou l'absorption est l'un des facteurs les plus importants qui contrôlent la durée de conservation des aliments. Il y a un microclimat dans un emballage, qui est déterminé par la pression de vapeur de l'humidité dans l'aliment à la température de stockage et la perméabilité du matériau d'emballage. Le contrôle de l'échange d'humidité est nécessaire pour empêcher la détérioration microbologique ou enzymatique, la perte d'humidité et l'assèchement des aliments (par exemple viandes fraîches ou cuites, fromages).

Une perméabilité élevée est requise pour l'emballage des aliments afin d'éviter la condensation de l'humidité à l'intérieur des emballages qui entraînant la formation de moisissures. Les aliments séchés, cuits au four ou extrudés qui ont un faible taux d'humidité relative à l'équilibre nécessitent un emballage ayant une faible perméabilité à l'humidité pour éviter qu'ils ne dégagent pas de l'humidité dans l'atmosphère, entraînant un ramollissement et une perte de croustillance.

Les mécanismes de déplacement des vapeurs à travers les matériaux d'emballage comportent trois étapes :

1. Du côté du film qui a la concentration la plus élevée, les molécules de la vapeur d'eau se dissolvent dans le matériau polymère.
2. Les molécules diffusent à travers le film de polymère vers l'autre côté, conduit par le gradient de concentration. Les molécules de vapeur passent à travers les espaces interstitiels entre les molécules de polymères.
3. Désorption des molécules de vapeur et évaporation par l'autre surface de film.

La diffusion dépend de la taille, la forme et la polarité des molécules de vapeur d'eau et de la structure et le degré de réticulation de la matrice polymère. Si les molécules de vapeur sont insolubles dans le matériau, ou s'il y a un plus petit volume disponible dans la matrice de polymère pour la pénétration de ces molécules, le film a une barrière élevée à ces vapeurs. La perméabilité est donc liée à la fois au type de film [16, 17, 18, 19].

### **II.3.4 Les microorganismes**

Les paquets qui sont pliés, agrafés ou emballés par torsion ne sont pas vraiment scellés et peuvent être contaminés par des microorganismes. Les principales causes de contamination

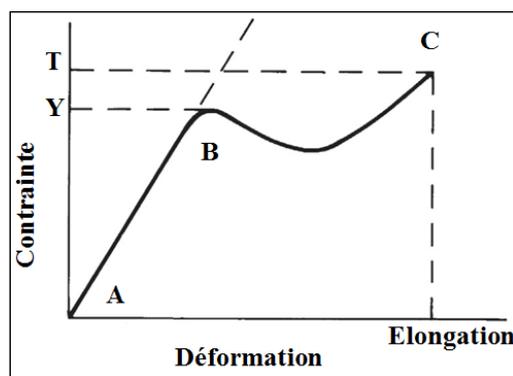
microbienne des aliments sont : l'air, l'eau, la thermosoudure inadéquate, les déchirures ou les plis du matériau d'emballage.

Dans d'autres procédés, les basses températures de stockage, les faibles teneurs en humidité ou l'utilisation de conservateurs limitent la croissance microbienne et le rôle de l'emballage est moins critique [16, 17, 18, 19].

### **II.3.5 Les propriétés mécaniques**

L'aptitude d'un emballage à protéger les aliments contre les dommages mécaniques dépend de sa capacité à résister à la traction, causée par l'empilage des véhicules, à l'abrasion causée par le frottement pendant la manipulation et le transport, à la perforation ou rupture causée par des impacts pendant la manipulation, ou à la vibration pendant le transport.

La résistance des matériaux d'emballage peut être évaluée en mesurant l'allongement (déformation) qui résulte d'une force appliquée (contrainte) partir d'un diagramme contrainte-déformation ci-dessous :



**Figure II-1** : Courbe de Contrainte à la déformation pour les films d'emballage flexible

T : résistance à la traction; Y : limite d'élasticité; AB : pente de la courbe, module de Young;  
C : point de rupture [20]

La résistance à la traction d'un matériau est la capacité maximale de tension (étirement) à laquelle il peut être soumis avant la rupture. L'élongation est une mesure de la déformation des matériaux, dont certains peuvent avoir des élongations de 3 ou 4 avant de se détruire. Le module de Young (YM) est une mesure de la rigidité, définie comme le rapport entre la vitesse de variation de contrainte avec la déformation, et la pente de la courbe contrainte-déformation. Les plastiques sont souvent anisotrope (le module de Young et la résistance à la traction diffèrent en fonction de la direction dans laquelle la force est appliquée) selon l'orientation des molécules. La structure moléculaire des films polymères peut être alignée de différentes manières en fonction du type de film et du procédé de fabrication. L'orientation des molécules dans une

direction (uniaxiale) ou dans les deux directions (biaxiale) améliore les propriétés mécaniques de certains films (comme le polyéthylène, le polypropylène, le polyéthylène téréphtalate et le polystyrène). Le module de Young peut être calculé en divisant la contrainte de traction par la contrainte de déformation.

$$YM = \frac{(F/A0)}{(\Delta L/L0)}$$

où YM (MPa) : module d'Young (module d'élasticité), F (N) : force appliquée au film, A0 (m) section transversale d'origine à travers laquelle la force est appliquée,  $\Delta L$  (m) différence de longueur de film, L0 (m) longueur d'origine de film.

La limite d'élasticité d'un matériau est la contrainte à laquelle il commence à se déformer. Avant la limite d'élasticité, le matériau se déforme élastiquement et reprend sa forme initiale lorsque la contrainte est annulée. Lorsque la limite d'élasticité est dépassée, une partie de la déformation devient permanente et non réversible. La limite d'élasticité est donc la limite supérieure de la force qui peut être appliquée au matériau [20].

## **II.4 La durée de conservation des aliments emballés**

### **II.4.1 Définition**

En termes simples, la durée de conservation est le temps pendant lequel toutes les caractéristiques primaires de l'aliment restent acceptables pour la consommation. Ainsi, la durée de conservation se réfère au temps pendant lequel un aliment peut rester sur le rayon du commerçant puis sur celui du consommateur avant qu'il ne devienne inacceptable [21].

### **II.4.2 Les facteurs contrôlant la durée de conservation**

La durée de conservation d'un aliment est contrôlée par trois facteurs :

- ✚ Les caractéristiques du produit, y compris les paramètres de formulation et de traitement (facteurs intrinsèques)
- ✚ Environnement auquel le produit est exposé pendant la distribution et le stockage (facteurs extrinsèques) : la température, l'humidité, la lumière, les contraintes mécanique
- ✚ Propriétés de l'emballage [1]

## **II.5 Les interactions entre l'emballage et l'aliment**

Toute interaction entre un matériau d'emballage et l'aliment qu'il contient est indésirable pour deux raisons : l'interaction peut avoir des effets toxicologiques sur le consommateur et ou réduire la durée de conservation ou la qualité sensorielle de l'aliment. La migration des huiles provenant des aliments dans les plastiques est également préoccupante car cela peut modifier les propriétés de barrière du matériau. Les matériaux des emballages plastiques sont principalement des films souples contenant des polymères résiduels et des additifs pour les plastiques, y compris les agents de nucléation, les stabilisants, les charges, les plastifiants, les agents antibuée et les pigments (Lee et al. (2008d) et Mercea (2000)). Certains types de matériaux d'emballage contiennent également des composés volatils qui peuvent être absorbés et provoquer l'altération des aliments. Ceux-ci peuvent provenir du procédé de fabrication (solvants utilisés) [19, 22].

## **II.6 Les déchets d'emballage : un problème environnemental mondial**

Les emballages en plastique non biodégradables destinés à l'alimentation constituent une préoccupation environnementale mondiale grave. Le rejet des emballages après la consommation des produits a soulevé l'inquiétude du public face au dilemme mondial des déchets solides dans lequel les plastiques constituent une part considérable du problème, en raison de leur popularité dans les applications d'emballage. En Europe, les conteneurs et les déchets d'emballage ont contribué à 56,3 millions de tonnes (25% des MSW) en 2005, 74,8 millions de tonnes (31,6% des MSW) à l'États-Unis en 2003 et 3,3 millions de tonnes (10% des total MSW) à l'Australie en 2004[23, 24].

Les méthodes de récupération telles que le recyclage ou le compostage sont des moyens écologiques d'éliminer les déchets. Tous les emballages plastiques peuvent être récupérés grâce au recyclage. Cependant, si les matériaux d'emballage sont salis avec des aliments ou d'autres substances biologiques, même le recyclage peut devenir impossible et nécessite un tri et un nettoyage excessifs [25]. De plus, la majorité des matériaux d'emballage à base de plastique sont éliminés dans les décharges, ce qui augmente la pression sur les systèmes municipaux d'élimination des déchets [26].

Les stratégies de réutilisation et de recyclage des matériaux sont importantes, mais aussi la biodégradabilité et la compostabilité des matériaux d'emballage alimentaire sont devenues des solutions « vertes » et des caractéristiques de plus en plus essentielles [26].

### **III. Les emballages biodégradables**

Les matériaux biodégradables sont des matériaux qui peuvent être dégradés par l'action enzymatique de bactéries, de levures et ou de champignons. Le développement des biopolymères (bioplastique) issus des sources renouvelables est devenu l'intérêt des industries des emballages alimentaires. Ces matériaux bioplastiques devraient avoir une durabilité suffisante pour maintenir leurs propriétés mécaniques et physiques pour la qualité du produit, et également se biodégrader rapidement lors de l'élimination.

Ces biopolymères peuvent être regroupés selon la méthode de production (Figure 2) :

1. Polymères directement extraits de matériaux naturels (exemple : amidon, cellulose, caséine et gluten de blé)
2. Polymères produits par synthèse chimique à partir de monomères renouvelables (exemple : polylactate polymérisé à partir de monomères d'acide lactique)
3. Polymères produits par fermentation microbienne (exemple : polyhydroxyalcanoates) [\[27, 28, 29, 30\]](#)

Les principaux groupes sont les agro-polymères (polysaccharides, protéines, etc.) et les biopolyesters (polyesters biodégradables) tels que l'acide polylactique (PLA), le polyhydroxyalcanoate (PHA) et les copolyesters aromatiques et aliphatiques [\[31\]](#). Parmi les biopolymères les plus prometteurs dans le marché sont le PLA et l'amidon.

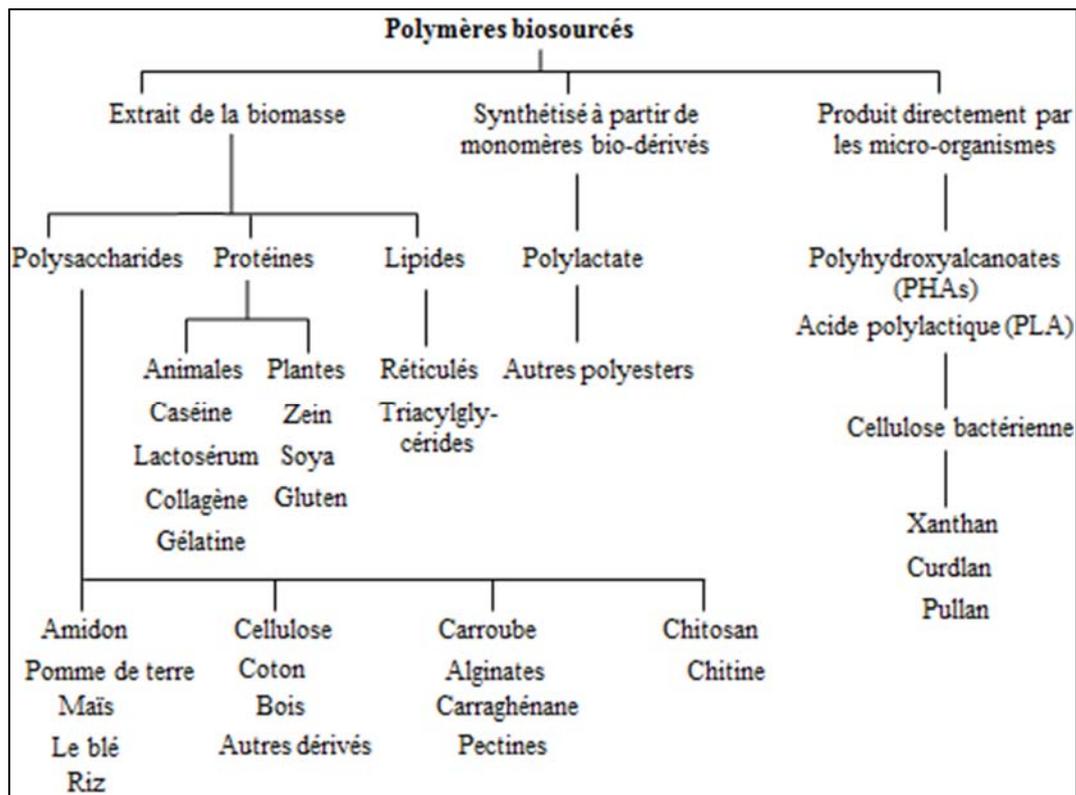


Figure III-1: Les biopolymères issus des sources renouvelables pour emballage alimentaire [32]

### III.1 L'acide polylactique (PLA)

Le PLA est commercialement et largement disponible (production à grande échelle) dans une large gamme de qualités. Il existe dans le marché à un prix raisonnable et avec des propriétés remarquables pour différentes applications. Ainsi, ce polymère présente un fort potentiel de développement.

Le PLA appartient à la famille des polyesters aliphatiques couramment fabriqués à partir d' $\alpha$ -hydroxyacides, qui comprend également, par exemple, l'acide polyglycolique (PGA). C'est l'un des rares polymères dans lesquels la structure stéréochimique peut être facilement modifiée par polymérisation contrôlée des L et D pour donner des polymères de poids moléculaire élevé, amorphes ou semi-cristallins (Figure III-2).

Le PLA peut être dégradé par la dégradation abiotique (c'est-à-dire l'hydrolyse simple de la liaison ester sans nécessiter la présence d'enzymes pour la catalyser). Au cours du processus de biodégradation, et seulement dans une deuxième étape, les enzymes dégradent les oligomères résiduelles jusqu'à la minéralisation finale (dégradation biotique).

Tant que les monomères basiques (acide lactique) sont produits à partir de ressources renouvelables (hydrates de carbone) par fermentation, PLA respecte le concept mondial croissant de développement durable et est classé comme un matériau respectueux de l'environnement.

### III.1.1 Synthèse de PLA

La synthèse de PLA est un procédé à plusieurs étapes qui part de la production d'acide lactique et se termine par sa polymérisation [33, 34, 35, 36]. Une étape intermédiaire se traduit par la formation du lactide. La figure III-3 montre que la synthèse du PLA peut suivre trois voies principales. L'acide lactique est polymérisé par condensation pour donner un polymère fragile de faible poids moléculaire, qui est inutilisable, sauf si des agents de couplage externes sont utilisés pour augmenter sa longueur de chaîne. La seconde voie est la déshydratation azéotropique condensée par l'acide lactique. Il se produit par la suite du PLA de masse moléculaire élevée sans l'utilisation d'extendeurs de chaîne ou d'adjuvants spéciaux [37]. Le troisième et le principal procédé est la polymérisation par ouverture de cycle (ROP) du lactide pour obtenir du PLA de haut poids moléculaire [38]. Enfin, les unités d'acide lactique peuvent faire partie d'une architecture macromoléculaire plus complexe comme dans les copolymères.

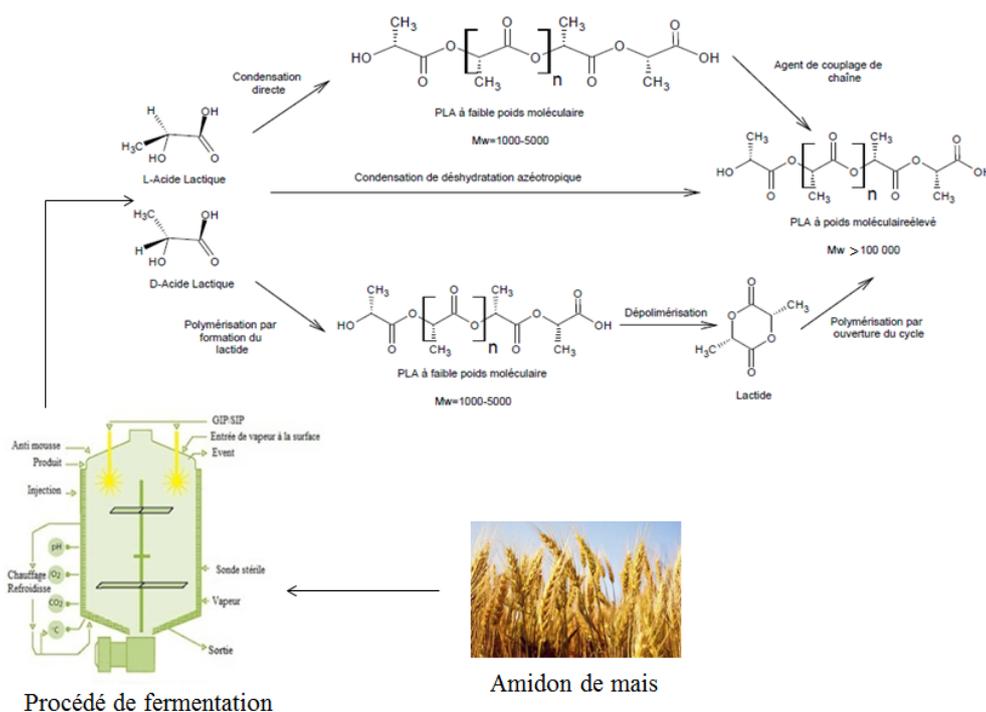


Figure III-2: Procédés de synthèse pour l'obtention de PLA à haut poids moléculaire [39]

### **III.1.2 Les propriétés de PLA**

#### **III.1.2.1 Cristallinité et propriétés thermiques**

Le PLA peut être produit comme totalement amorphe ou avec une cristallinité allant jusqu'à 40%. Les résines de PLA contenant d'environ plus de 93% d'acide L-lactique sont principalement semi-cristallines. Les deux méso L- et D-lactide induisent des rebondissements dans l'architecture PLLA très régulière. Les imperfections macromoléculaires sont responsables de la diminution de la vitesse et de taux cristallisation du PLLA [40].

Selon les conditions de préparation, le PLLA cristallise sous différentes formes. La forme  $\alpha$ - présente un diagramme de diffraction bien défini. Cette structure, avec une température de fusion de 185 °C, est plus stable que son homologue  $\beta$ -, qui fond à 175 °C [41]. Cette dernière forme peut être préparée à un taux et une température d'étirage élevé [42]. La forme  $\gamma$ - est formée par cristallisation épitaxiale [43].

La cinétique de cristallisation du PLA a été largement étudiée et s'est révélée plutôt lente, comme dans le cas du poly (téréphtalate d'éthylène) (PET). La vitesse de cristallisation augmente avec la diminution du poids moléculaire et dépend de la composition de (co) polymère [34]. Le PLLA peut cristalliser en présence de D-lactide. Cependant, la structure devient plus désordonnée et la vitesse de cristallisation diminue [44].

#### **III.1.2.2 Solubilité**

Le meilleur solvant pour le PLA et pour la plupart des copolymères correspondants est le chloroforme [36].

#### **III.1.2.3 Les propriétés de barrière à l'eau**

Le PLA a de nombreuses applications dans l'emballage alimentaire, ses propriétés barrières (principalement la vapeur d'eau) ont été largement étudiées. Le PLA est hydrophobe et le film correspondant absorbe de très faibles quantités d'eau, présentant des propriétés barrières similaires [34].

#### **III.1.2.4 Les propriétés mécaniques**

Les propriétés mécaniques du PLA peuvent varier dans une large mesure, allant des matériaux mous et élastiques aux matériaux rigides et à haute résistance. Le PLA commerciale présente à peu près de 9 % d'élongation et 2.1 GPa de Module de Young, après l'ajout des

plastifiants le Module de Young diminue et l'élongation augmente avec une diminution de la température de transition vitreuse ( $T_g$ ) [45].

### **III.2 L'amidon**

L'amidon est un polysaccharide dont le monomère est le glucose, de formule  $C_6H_{10}O_5$ , présent sous sa forme cyclisée appelée  $\alpha$ -D-glucopyranose (ou  $\alpha$ -D-glucose ou encore anhydroglucose). Ce cycle adopte la conformation chaise la plus stable. Les unités sont liées par des liaisons de type éther, appelées glycosidiques, en conformation  $\alpha$  [46].

L'amidon est un polymère naturel qui pourrait être une alternative pour produire des matériaux d'emballage alimentaire. Il a été largement étudié à cause de son abondance dans le marché, économique, biodégradable et comestible. L'amidon est un biopolymère agricole présent dans diverses plantes dans leurs organes de réserve, notamment le blé, le maïs, le riz, les haricots et les pommes de terre [47]. Ce polymère constitue plus de 60% des grains de céréales et il est relativement facile de le séparer des autres composants [48]. Selon la source botanique, les granules d'amidon varient selon la forme, la taille, la structure et la composition chimique [49].

Les amidons de tubercules sont généralement volumineux, ellipsoïdaux et présentent un hile excentré. Les amidons de céréales sont très polymorphes, et de tailles extrêmement différentes. Les grains d'amidon de céréales sont polyédriques, alors que les amidons de tubercules et de légumineuses sont réniformes [50].

#### **III.2.1 Composition et structure moléculaire**

L'amidon est composé à 98-99% de deux homopolymères de glucose : l'amylose et l'amylopectine (Figure III-4). L'amylose est un polymère à chaîne linéaire d'unités d'anhydroglucose lié par la liaison  $\alpha$ -1,4 ayant une taille moléculaire allant de 20 à 800 kg / mol. Il représente environ 20-25% de la plupart des amidons granulaires. L'amylose est le responsable des propriétés filmogènes de l'amidon [48, 51, 52, 53]. L'amylopectine est un polymère hautement ramifié par les chaînes  $\alpha$ -1,4 liées par liaison  $\alpha$ -1,6 glycosidiques. Il représente de 25-30 unités de glucose et avec un poids moléculaire très élevé (5000-30 000 kg / mol) [48, 53]. L'amylopectine est le constituant principal de la plupart des amidons [54]. La teneur en chacun des constituants est différente suivant l'origine de l'amidon. L'amidon de maïs renferme 28% d'amylose et 72% d'Amylopectine [55].

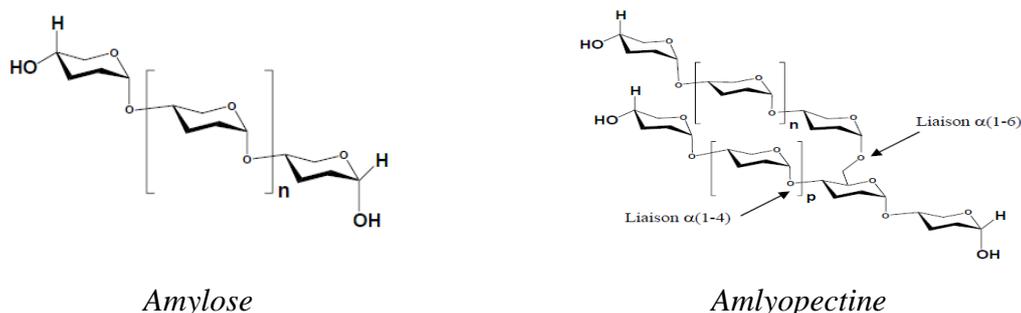
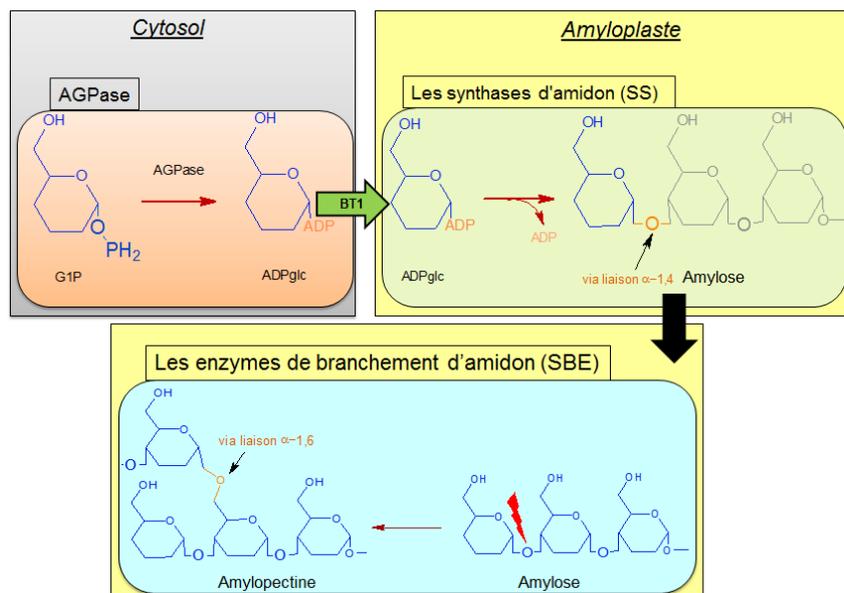


Figure III-3 : Structure chimique de l'Amylose et l'Amylopectine [55]

### III.2.2 La biosynthèse d'amidon

La biosynthèse de l'amidon est réalisée par une série de réactions enzymatiques (Figure III-5). Le saccharose, produit par photosynthèse dans les feuilles, est converti en glucose-1-phosphate (G1P). Le G1P fournit les squelettes de carbone pour la synthèse de l'amidon et elle est d'abord converti en adénosine 50 diphosphate glucose (ADPglc) par le catalyseur l'adénosine 50 diphosphate glucose pyrophosphorylase (AGPase) (le carreau rose). L'ADPglc représente le substrat primaire et sa formation représente la première étape de la biosynthèse de l'amidon. ADPglc est transporté dans l'amyloplaste par un transporteur membranaire à enveloppe interne, BT1. Les synthases d'amidon (SS) sont des enzymes jouant le rôle des catalyseurs pour former des chaînes glucanes allongé contenant des fractions de glucose provenant d'ADPglc par des liaisons  $\alpha$ -1,4 en libérant l'ADP comme sous-produit et créant ainsi l'Amylose (le carreau vert). Puis les enzymes de branchement d'amidon (SBE) ajoutent des points de ramification aux chaînes de glucanes linéaires en coupant les liaisons  $\alpha$ -1,4 et en les réintégrant ensuite les chaînes via  $\alpha$ -1,6 il se forme ainsi l'Amylopectine [56].



**Figure III-4:** Organigramme illustrant les réactions enzymatiques nécessaires à la biosynthèse de l'amidon dans l'endosperme des céréales [56]

### III.2.3 Les propriétés de l'amidon

#### III.2.3.1 Cristallinité et propriété thermique

La majorité des amidons sont des matériaux semi-cristallins de degré de cristallinité de 15 à 45% selon le rapport Amylose / Amylopectine (généralement de 20-25 / 75-80%). Les régions cristallines sont formées par chaînes ramifiées courtes dans l'amylopectine pendant que l'amylose et les points de ramification de l'amylopectine forment les régions amorphes.

En effet, la nature semi-cristalline des amidons natifs a été mise en évidence par diffraction des rayons X [57]. Il s'est avéré que les chaînes macromoléculaires de l'amidon de maïs s'organisent en double hélice gauche à 6 unités glucose par tour. Cette structure est stabilisée par des interactions Van der Waals et des liaisons hydrogènes. Ces doubles hélices s'organisent pour former des cristallites. Pour l'amidon de maïs, les cristallites sont formées par des hélices d'amylopectine [58].

#### III.2.3.2 Solubilité

Les granules d'amidon ne sont pas solubles dans l'eau froide car les liaisons hydrogènes maintiennent les chaînes d'amidon ensemble. Cependant, lorsque l'amidon est chauffé dans l'eau, la structure cristalline est perturbée et les molécules d'eau interagissent avec les groupes hydroxyle de l'amylose et de l'amylopectine, ce qui entraîne une solubilisation partielle.

Chauffer les suspensions d'amidon en excès d'eau à des températures comprises entre 65 et 90°C permet de gonfler la graine par pénétration de l'eau dans celle-ci, c'est un processus de gélatinisation irréversible à lieu [48]. Pour obtenir une solution homogène de la solution filmogène d'amidon, il est nécessaire de continuer à gélatiniser les granules dans un excès d'eau (> 90% w /w). Ce processus casse la matrice d'amylopectine et libère l'amylose. Ces changements se produisent parce que l'eau diffuse à travers les granules favorisant la fusion des cristallites d'amidon. Le processus de gélatinisation est très complexe [59] et il est nécessaire pour obtenir une solution homogène pendant la préparation du film [46].

Pour obtenir des films à partir d'amidon, deux techniques sont principalement employées : procédé à sec et procédé par voie humide. Le procédé à sec est basé sur les propriétés thermoplastiques de l'amidon par extrusion. Dans cette méthode, l'amidon est plastifié et chauffé au-dessus de sa température de transition vitreuse dans des conditions de faible teneur en eau. Dans le procédé humide, les polymères sont solubilisés et ensuite la solution filmogène est séchée. Le procédé humide est généralement préféré pour former des films préformés comestibles, [53]. Néanmoins, les méthodes sèches sont plus réalisables pour la fabrication de films au niveau industriel [48].

### **III.2.3.3 Les propriétés de barrière d'amidon**

Les films d'amidon ont d'excellentes propriétés de barrière à l'oxygène en raison de leur structure en réseau. Hautement ordonnée par les liaisons l'hydrogènes dans laquelle l'amylose et l'amylopectine, forment des régions cristallines et non cristallines, sont en couches alternées. Les films à base d'amidon présentent certains inconvénients par rapport aux polymères synthétiques conventionnels. Bien que ces films soient des matériaux hydrophiles qu'ils soient sensible à l'humidité, les films d'amidon à structure cristalline plus élevée sont moins sensibles [60, 61]. L'amidon de maïs présente une structure cristalline élevée avec un taux de cristallinité qui varie de 38-43% (par DRX) [62].

### **III.2.3.4 Les propriétés mécaniques**

La résistance à la traction est relativement élevée mais le pourcentage d'allongement est faible, ce qui entraîne de mauvaises propriétés mécaniques. Cet inconvénient est dû aux régions amorphes formées par l'Amylose. C'est pourquoi il est nécessaire d'ajouter un plastifiant pour surmonter la fragilité du film causée par des forces intermoléculaires étendues, en améliorant ainsi la flexibilité du film [46]. De plus, leur sensibilité à l'eau les rend dépendants des

conditions dans lesquelles ils sont stockés. La quantité d'eau contenue dans les films modifie de manière très importante la Tg et donc les propriétés mécaniques [55].

#### **III.2.3.5 La dégradation**

La dégradation de l'amidon se fait par une hydrolyse enzymatique. Les enzymes qui cassent ou hydrolysent l'amidon en sucres simples sont connues sous le nom d'amylases [63] [64]. L' $\alpha$ -amylase, qui agit au hasard sur la chaîne macromoléculaire, est présente dans les plantes et dans les animaux. La salive humaine est riche en amylase, et le pancréas aussi sécrète cette enzyme [65].

## **CHAPITRE II**

# **Développement d'emballage alimentaire**

L'emballage alimentaire a toujours été défini comme un obstacle passif qui retarde les effets de l'environnement sur les produits alimentaires [66, 67]. Cependant, les tendances de la recherche actuelle impliquent le développement de matériaux d'emballage qui peuvent interagir positivement avec l'environnement et la nourriture, en jouant un rôle actif dans la préservation [68].

### **I. Généralités**

Les nouveautés et les tendances récentes dans les techniques d'emballage alimentaire sont les résultats des préférences des consommateurs à l'égard des produits alimentaires transformés ayant une durée de conservation et une commodité accrue [69]. De plus, la tendance moderne des pratiques de vente au détail et l'évolution du style de vie incitent à l'évolution des techniques d'emballage novatrices sans compromettre la sécurité et la qualité des aliments [70]. La croissance rapide des nouveaux emballages dans le segment alimentaire est due à l'énorme utilisation d'aliments emballés, au besoin croissant d'aliments préparés et à l'utilisation croissante d'emballages alimentaires de taille fine [71]. Une autre raison importante pour les emballages alimentaires innovants, est le problème croissant des épidémies microbiennes d'origine alimentaire qui exige l'utilisation d'emballages avec des effets antimicrobiens et la conservation de la qualité des aliments [72].

Les innovations en emballage ont commencé plus tôt sous la forme de machines d'emballages électriques, de boîtes métalliques, d'emballages désinfectants, d'emballages flexibles et de feuilles d'aluminium. Les changements émergents dans l'industrie de l'emballage en utilisant des matériaux et des additifs appropriés permettent de réduire l'impact sur l'environnement et ne pourraient que renforcer l'économie en améliorant la sécurité alimentaire, la qualité et en minimisant les pertes de produits [73].

Les recherches approfondies ont donc abouti à une nomenclature diversifiée et souvent confuse désigner une certaine fonctionnalité de l'emballage au-delà de son utilisation traditionnelle, telle qu'intelligente, bioactive, active [74].

Cependant, ces systèmes d'emballage peuvent être classés en deux groupes généraux en fonction de leur historique, origines et propriétés fonctionnelles : les systèmes d'emballage (bio) actif, qui ralentissent les processus de dégradation (bio) chimiques et contrôlent le comportement des micro-organismes pour améliorer la sécurité, la qualité et la commodité des

aliments. Les systèmes d'emballage intelligents, qui informe le consommateur sur les changements cinétiques liés à la qualité de la nourriture ou à l'environnement dans lequel elle est contenue [75].

## **II. Emballages intelligents**

Un emballage intelligent est capable de suivre le produit, de détecter l'environnement interne / externe de l'emballage, et communiquer avec le consommateur, fournir des informations et avertir des problèmes éventuels. Il convient de noter que les termes emballage intelligent et emballage actif ne s'excluent pas mutuellement, car certains systèmes d'emballage peuvent être classés dans les deux catégories. Il y a une dizaine d'années, l'emballage intelligent n'était pas un concept commercialement viable parce que les appareils d'emballage et les réseaux informatiques étaient coûteux et très limités. Maintenant, La technologie de l'information plus puissante et plus abordable à créer un environnement favorable pour que cette technologie prospère [76].

Un système d'emballage intelligent contient des dispositifs intelligents qui sont des étiquettes, capables d'acquérir, de stocker et de transférer des informations sur les fonctions et les propriétés des aliments emballés [77].

### **II.1 Limitation des emballages intelligents**

Comme indiqué précédemment, l'utilisation et l'application de technologies d'emballage intelligent présentent de nombreux avantages. Cependant, il existe également certaines limites, dont l'une concerne les effets inconnus des nanomatériaux tels que la migration, la sécurité, la qualité et le principe du mouvement. L'utilisation de capteurs sur des emballages intelligents présente également certains avantages et limites. L'utilisation des capteurs offre une alternative aux techniques analytiques longues, coûteuses et laborieuses qui sont actuellement appliquées pour surveiller un produit alimentaire emballé et son environnement tout au long de la chaîne d'approvisionnement. D'un autre côté, des obstacles se confrontent à ces systèmes d'emballages tels que : la rigidité des systèmes, les coûts de production élevés, la faible robustesse et sensibilité, leurs conformité à des législations strictes et la sécurité alimentaire [78].

### **III. Emballages bioactifs**

Actuellement, la majorité des aliments fonctionnels commerciaux sont présentés avec les composants bioactifs contenus dans les aliments compatibles, un aspect qui impose à l'industrie alimentaire un certain nombre de limitations et de complications pendant le traitement et la fabrication. Certaines des difficultés techniques rencontrées par les industries dans le développement de produits alimentaires fonctionnels sont [79] :

- ✓ la perte de fonctionnalité du produit pendant le traitement, le stockage et ou la commercialisation.
- ✓ La substance fonctionnelle n'est pas souvent compatible avec la matrice alimentaire. C'est le cas, pour des vitamines liposolubles dans les aliments aqueux.
- ✓ Le composé bioactif ajouté peut induire le développement des arômes indésirables ou d'odeurs étranges.
- ✓ La modification de la texture du produit alimentaire en conséquence du composé ajouté doit être contrôlée afin de fabriquer un produit acceptable d'un point de vue commercial [80].

Actuellement, la demande industrielle de technologies assurant la stabilité des composés bioactifs dans les aliments reste forte. De cette manière, les nouvelles technologies telles que la micro et la nanoencapsulation ont été mise en évidence des perspectives prometteuses d'amélioration des performances. Cette nouvelle technologie crée ainsi une toute nouvelle discipline technologique d'emballage que l'on peut généralement qualifier d'emballage bioactif [79].

Les emballages fonctionnels, ou plus précisément bioactifs, seraient ainsi capables de retenir les principes bioactifs désirés dans des conditions optimales jusqu'à leur libération éventuelle dans le produit alimentaire soit par libération contrôlée ou rapide pendant le stockage, soit juste avant la consommation, en tenant compte du produit spécifique et les caractéristiques de la substance fonctionnelle.

Il est envisagé (Lagaron, 2005a) que le développement de ces concepts innovants puisse être réalisé par (i) l'intégration et la libération contrôlée de composants bioactifs ou de nanocomposants à partir de matériaux biodégradables et / ou des systèmes d'emballage durables, (ii) la micro et nanoencapsulation de ces substances actives dans l'emballage et / ou dans les aliments [74, 81].

Parmi les substances fonctionnelles qui sont considérées comme les plus appropriées pour leur incorporation dans la paroi de l'emballage sont les composés phytochimiques, les vitamines, les nanofibres et les prébiotiques. Les composés phytochimiques sont des produits chimiques végétaux non nutritifs qui contiennent des composés protecteurs, prévenant les maladies comme le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires et l'hypertension [82]. De nombreux composés phytochimiques sont des composés polyphénoliques ayant une activité antioxydante [83, 84, 85].

De nombreux composés phytochimique et des vitamines peuvent être dégradé au cours des étapes de traitement, de raffinage, de mise en conserve et de congélation et par conséquence le produit alimentaire sera jeté [86].

#### **IV. Emballages actifs**

L'emballage actif est l'un des concepts innovants d'emballage alimentaire qui ont été introduits en réponse aux changements continus des demandes actuelles des consommateurs et des tendances du marché [87]. Les systèmes d'emballage actif alimentaire sont basés sur des matériaux dans lesquels des additifs ayant des propriétés active (antimicrobiennes et ou antioxydantes) sont incorporés dans la matrice polymérique dans le but d'augmenter la durée de conservation des produits alimentaires et de maintenir ou d'améliorer les propriétés des aliments emballés [72, 88, 89, 90]. Alors, les emballages alimentaires actifs peuvent offrir plusieurs fonctions qui n'existent pas dans les systèmes d'emballage conventionnels. Les fonctions actives peuvent inclure le piégeage de l'oxygène, et l'activité antimicrobienne [87]. De même, l'emballage actif est utilisé comme un substitut aux techniques conventionnelles de transformation des aliments (Traitements thermiques élevés, saumurage, acidification, déshydratation et des additifs de conservation) [91].

Les matériaux d'emballage utilisés dans ces systèmes peuvent incorporer des composants destinés à être libérés dans les aliments ou absorber des substances provenant des aliments emballés responsables de leur détérioration. Les substances responsables de la fonction active de l'emballage peuvent être placées dans un support séparé ou être directement incorporées dans le matériau d'emballage (Commission européenne, 2004, 2009) [92].

L'emballage actif existe à ce jour dans le but de satisfaire la demande des consommateurs en matériaux d'emballage naturels, recyclables et biodégradables [93].

Les produits d'oxydation de faible poids moléculaire donnent un mauvais goût, détruisent les éléments nutritifs essentiels, et produisent des composés toxiques [94]. La libération contrôlée d'agents actifs dans les aliments via des films d'emballage pendant de longues périodes de stockage et de distribution limite la génération des arômes indésirables produits par l'incorporation directe d'additifs dans les aliments [75].

Les emballages actifs par leur concept innovant et en raison de leurs interactions avec l'emballage, l'aliment et l'environnement, génèrent de plus longues durées de conservation des aliments, une protection plus élevée des saveurs, ainsi que de faibles teneurs en additifs dans les formulations alimentaires tout en préservant la qualité du produit [94].

Les emballages contenant un antioxydant sont une catégorie importante des emballages actifs qui permet d'augmenter la durée de stockage des aliments. Les antioxydants protègent le polymère contre la formation de produits d'oxydation et de composés indésirables qui peuvent migrer vers les aliments provoquant une diminution de la qualité des produits [94].

L'utilisation des agents antimicrobiens dans l'emballage est une forme d'emballage actif qui vise à diminuer ou à inhiber la croissance microbienne dans l'aliment emballé ou lui-même dans l'emballage alimentaire [72]. L'agent antimicrobien contenu dans les emballages se fonctionnalise soit par une diffusion directe à la surface de la nourriture, soit sous forme de vapeur [95].

### **IV.1 Emballages actifs antioxydants**

L'oxydation des lipides dans les aliments entraîne non seulement le développement du rancissement, mais aussi la formation potentielle des aldéhydes toxiques et la perte de qualité nutritionnelle [77]. Afin de protéger l'oxydation des lipides, les antioxydants sont traditionnellement ajoutés dans la formulation alimentaire initiale. L'ajout direct des antioxydants dans les aliments est limité par leur participation à des réactions complexes devenant parfois prooxydantes et le manque de sélectivité pour cibler la surface des aliments où la plupart des réactions d'oxydation se produisent [94]. L'emballage actif antioxydant peut être utilisé comme moyen d'améliorer la qualité du produit et de prolonger la durée de conservation des aliments en particuliers les viandes et des produits carnés en contrôlant le niveau d'oxygène auquel le produit est exposé [74].

Les outils de piégeage de l'oxygène utilisés dans les matériaux d'emballage inhibent les réactions oxydatives en éliminant l'oxygène et sont sous forme des sachets. Parmi les capteurs

d'oxygène utilisés sont, l'oxyde de fer qui réagit avec l'oxygène pour diminuer sa concentration [96], les capteurs de dioxyde de carbone qui diminuent la vitesse de respiration des aliments frais [88]. La capacité de ces sachets à absorber est très limitée, nécessitant ainsi plusieurs sachets pour un produit conçu pour une longue durée de conservation, ce qui n'est pas pratique et commercialement acceptable [97].

Cependant, l'addition des antioxydants synthétiques dans les formulations de polymères est une pratique de plus en plus courante en tant que moyen de protection de la dégradation des polymères pendant leur traitement et pendant leur durée de vie. Parmi les antioxydants synthétiques, seulement quatre sont couramment employés les aliments on note principalement le butylatedhydroxyanisole (BHA), le butylatedhydroxytoluene (BHT), propyl gallate (PG), et le tert-butylhydroquinone (TBHQ) [94, 98].

Les systèmes de films fonctionnels antioxydants sont une technologie alternative réalisable pour telles applications. Cette technologie est bénéfique à la fois pour l'emballage et les aliments emballés, car d'une part les antioxydants incorporés stabilisent le polymère pendant le traitement et d'autre part inhibent l'oxydation du produit [99].

Cependant, la plupart des recherches menées dans ce domaine utilise des matériaux non renouvelables principalement constitués de polyoléfines [100, 101]. Les tendances actuelles mènent à développer des films fonctionnels antioxydants à partir de polymères biosourcés tels que le PLA, PHBV, protéines de soja, polymères à base d'amidon [99].

### **IV.2 Emballages actifs antimicrobiens**

Les emballages antimicrobiens sont des moyens novateurs résultant des problèmes d'origine alimentaire. Cette option permet de inhiber la croissance microbienne tout en maintenant la qualité, la fraîcheur et la sécurité de l'aliment. Les emballages alimentaires antimicrobiens agissent pour réduire, inhiber ou retarder la croissance des microorganismes qui peuvent être présents dans les aliments emballés ou les matériaux d'emballage eux-mêmes.

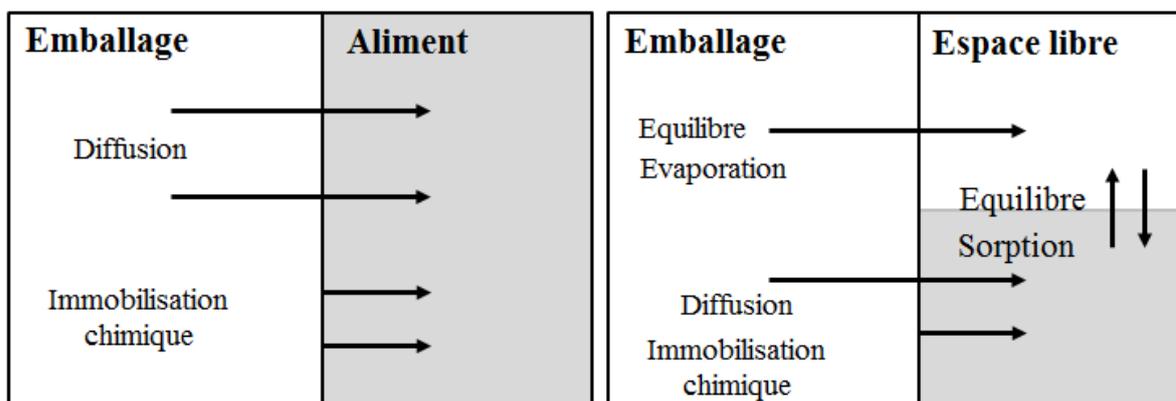
L'utilisation des films d'emballage contenant des agents antimicrobiens pourrait être l'emballage le plus performant, par une lente migration des agents du matériau d'emballage à la surface du produit, aidant ainsi à maintenir des concentrations élevées là où elles sont nécessaires. Si un antimicrobien peut être libéré de l'emballage pendant une période prolongée, l'activité peut également être étendue à la phase de stockage, de transport et de la distribution alimentaire [87].

**IV.2.1 Les systèmes d’emballage antimicrobien :**

La plupart des systèmes d'emballage alimentaire représentent soit un système Emballage / Aliment, soit un système Emballage / Espace libre / Aliment (Figure 6).

Un système Emballage / Aliment est un produit alimentaire solide, liquide ou de faible viscosité en contact avec le matériau d'emballage. Les produits de viande prêts-à-manger emballés individuellement, les produits cuits «sous vide» et les produits de charcuterie sont de bons exemples. La diffusion de matériau d'emballage vers l’aliment et la répartition à l’interface sont les principaux phénomènes de migration impliqués dans ce système (Figure 6). Les agents antimicrobiens peuvent être initialement incorporés dans les matériaux d'emballage et migrer dans les aliments par une diffusion et une répartition [102].

Les systèmes Emballage / Espace libre / Aliment sont représentés par des aliments emballés dans des emballages flexibles, des tasses et des cartons. L'évaporation ou la distribution équilibrée d'une substance dans l'espace libre, le matériau d'emballage et l’aliment doit être considérée comme faisant partie de principaux mécanismes de migration pour estimer la distribution interfaciale de la substance (Figure IV-1). Une substance active volatile peut être utilisée dans ces systèmes, car elle peut migrer à travers l'espace libre entre l'emballage et les aliments [87].



**Figure IV-1:** Systèmes d'emballage alimentaire et comportement relatif des substances actives [102]

Les systèmes d’emballages alimentaires existent en plusieurs formes notamment :

✚ *Des sachets ou des tampons contenant des agents antimicrobiens :*

Les sachets sont des absorbeurs d’oxygène et d’humidité (source de moisissure), les tampons renferment les acides organiques et les surfactants [103].

**✚ Des agents antimicrobiens directement incorporés dans les polymères :**

l'Imazalil, les acides organiques, l'hexaméthylènetétramine ont été ajoutés au LDPE, les peptides antimicrobiens ont été ajoutés au PE et la nisine au HPMC [103].

**✚ Revêtement les antimicrobiens sur les surfaces de polymères**

Des films comestibles ont été utilisés comme support pour des agents antimicrobiens et appliqués en tant que revêtements sur des matériaux d'emballage. La nisine / méthylcellulose pour les films de polyéthylène [103].

**✚ Immobilisation des antimicrobiens aux polymères par des liaisons ioniques ou covalentes :**

Ce type d'immobilisation nécessite la présence de groupes fonctionnels sur l'agent antimicrobien et le polymère à la fois. Des exemples des agents antimicrobiens ayant un groupe fonctionnel sont des peptides, des enzymes, des polyamines et des acides organiques. L'immobilisation peut nécessiter l'utilisation des molécules qui lient la surface du polymère à l'agent bioactif. Les molécules qui pourraient potentiellement être utilisé comprennent les dextrans, le polyéthylèneglycol, l'éthylènediamine et la polyéthylèneimine. Ainsi, ces molécules présentent une faible toxicité pour les aliments et pour le consommateur [103].

**✚ Utilisation des polymères intersequement antimicrobiens :**

Les polymères tels que le polyamide traité, le chitosane et la poly-L-lysine favorisent l'adhésion cellulaire puisque les amines chargées interagissent avec des charges négatives de la membrane cellulaire, provoquant une fuite des constituants intracellulaires [104].

### **IV.3 Exemples de concepts d'emballages antimicrobiens**

Au Japon, la zéolite substituée par l'argent a été mise au point en tant qu'agent antimicrobien le plus commun incorporé dans les films d'emballage en plastique [87].

Plusieurs autres composés ont été proposés et testés pour l'activité antimicrobienne dans des emballages alimentaires comprenant des acides organiques (Tableau IV-1). Aussi, des bactériocines et des fongicides [105] (Tableau IV-2).

**Tableau IV-1:** Emballages alimentaires antimicrobiens contenant des composés organiques

<b>Agent antimicrobien</b>	<b>Matériau d'emballage</b>	<b>Reference</b>
Acide acétique	Chitosane	[106]

Acide benzoïque	PE-co-MA	[107]
Anhydride benzoïque	LDPE	[108]
Benzoate de sodium	MC/Chitosane	[109]
Acide p-aminobenzoïque	WPI	[110]
Acide lactique	Alginate	[111]
Acide laurique	Corn zein film	[112] [113]
Acide propanoïque	Chitosane	[114]
Acide sorbique	WPI	[110]
Anhydride d'acide sorbique	PE	[107]
Sorbate de potassium	MC/HPMC	[115]
	MC	[116]
	Starch	[117]
	MC/ Chitosan	[109]
	LDPE	[118] [119]
Cellulose noncrystal/Argent	PLA	[120]

**Tableau IV-2:** Emballages alimentaires antimicrobiens contenant des pédiocines et des enzymes

<b>Agent antimicrobien</b>	<b>Matériau d'emballage</b>	<b>Reference</b>
Glucose oxidase	Alginate	[121]
Lysozyme	PVOH, Nylon, Acétate de cellulose	[72]
Nisine	Revêtement Silicone	[122]
	SPI	[123]
	PE	[112]
	PVC, LDPE	[124]
	HPMC	[125]
	SPI, WPI, WG, EA	[126]
Pédiocine	Cellulose	[127]
Imazalil	LDPE	[128]

#### **IV.4 Limitation des emballages alimentaires actifs**

La prévention des microorganismes pathogènes et la détérioration des aliments ont nécessité l'utilisation d'agents synthétiques et artificiels tels que butylate hydroxytoluène (BHT), butylate hydroxyanisole (BHA), tert-butylhydroxyhydro quinone (TBHQ), propyl gallate (PG), les thioesters et les composés organophosphorés comme additifs d'emballage actif. Cette utilisation est limitée en raison de leur toxicité résultant de leurs migrations dans les produits alimentaires [129]. En effet, elles provoquent des effets néfastes et indésirables pour la santé humaine suite à leur migration et leur diffusion dans l'organisme à travers l'emballage alimentaire [130]. Il a été démontré que le BHA était cancérigène dans les expériences sur les animaux. Aussi, à des doses élevées, le BHT a causé une hémorragie interne et externe, ce qui a entraîné la mort de certaines souches de souris et de cobayes [131]. Ceci a entraîné une demande aux fabricants des emballages à trouver d'autres moyens [132, 133].

Ainsi, l'utilisation d'additifs synthétiques est désormais remplacée par l'utilisation des substances naturelles d'herbes, d'épices, et d'extraits végétaux généralement reconnus comme sûrs et sains [129, 134]. En outre, ces additifs naturels sont de bonnes sources de divers composés bioactifs [135] et sont utilisés comme excellente forme de conditionnement actif dans les produits carnés en raison de leurs propriétés biologiques importantes [136].

## **CHAPITRE III**

### **Innovation de nouvelles technologies d'emballage alimentaires actifs**

Au cours des dernières années, la recherche sur le développement de matériaux ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes a connu un grand essor dans le but de protéger les aliments contre les réactions oxydatives et la croissance microbienne [137].

En outre, l'application d'ingrédients naturels est une nouvelle tendance dans l'industrie alimentaire, c'est-à-dire des conservateurs naturels dérivés de sources naturelles, au lieu de substances synthétiques. L'incorporation des substances naturelles telles que les huiles essentielles et les extraits de plantes aromatiques et médicinales est une nouvelle approche dans les emballages alimentaires actifs [129, 138].

## **I. Les plantes aromatiques et médicinales**

### **I.1 Généralités**

#### **I.1.1 Définition**

Une plante aromatique et médicinale est une drogue végétale selon la pharmacopée européenne utilisée en médecine traditionnelle pour ses vertus thérapeutiques. Cela signifie qu'au moins une de ses parties possède des propriétés curatives. Leur activité thérapeutique relève de leurs principes actifs, à savoir les composants présents dans cette dernière [139].

Les plantes médicinales ont été toujours associées aux comportements et au savoir traditionnel. Selon les statistiques de 2003 de l'OMS, 80% de la population mondiale a recours aux médecines traditionnelles pour satisfaire des besoins en soins de santé primaire [140]. Il pousse dans le monde plus de 20000 espèces de végétaux, à usages condimentaires, médicinaux ou cosmétiques, dont 50% est utilisée en industrie pharmaceutique [141].

#### **I.1.2 Importance des plantes aromatiques et médicinales**

##### **I.1.2.1 L'action des plantes médicinales**

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie : elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus [142].

## *La phytothérapie*

La phytothérapie ou bien «la thérapie par les plantes» est en pleine expansion. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques. C'est pour cela on voit que la phytothérapie qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques [142].

### **I.1.3 Domaine d'application**

Au fil des années, la demande en substances d'origine naturelle a augmenté d'une façon considérable grâce à leurs propriétés thérapeutiques, organoleptiques et odorantes. Les essences et les extraits préparés à partir des plantes peuvent être utilisés dans des domaines aussi divers que la parfumerie, l'agro-alimentaire, l'aromathérapie, la pharmacie, la phytothérapie et les produits cosmétiques naturels.

### **I.1.4 Actualité des plantes aromatiques et médicinales (PAM) utilisées en Tunisie**

La Tunisie, de par sa position géographique privilégiée et son contexte climatique, est connue pour être un réservoir riche et immense en PAM. Sa flore s'élève à 2163 espèces végétales dont environ 187 PAM sont connues pour être non toxiques, ces données traduisent la grande diversité des systèmes écologiques du pays. Les plantes aromatiques et médicinales tunisiennes sont au centre des orientations stratégiques, mais paradoxalement cette richesse demeure sous-exploitée et marginalisée.

Au cours de la dernière décennie, la PAM et applications s'est développée suite à la demande sans cesse par les industries de transformation locales et étrangères. Cette demande a encouragé la Tunisie à intensifier la culture et améliorer la qualité et l'exploitation de ces plantes. Ces dernières sont exportées sous les formes séchées, fraîches, transformées en eaux florales ou HE sans valorisation et sans aucune valeur ajoutée jusqu'ici [143].

A l'échelle mondiale, la Tunisie est un producteur important de certains produits tels que le néroli, le romarin, les essences d'agrumes, l'huile essentielle de myrte et la marjolaine. Le taux d'exportation est estimé à 250 tonnes/an d'huiles essentielles et d'aromates. La Tunisie est devenue le premier exportateur mondial de néroli (34%) et le deuxième d'essence de romarin

(31%). Les fleurs d'agrumes et les autres plantes aromatiques ne représentent que 35%. Les principaux partenaires commerciaux sont l'Europe et l'Amérique du Nord [144].

Actuellement, la Tunisie compte 36 unités (situées principalement à Sfax, Nabeul, Zaghouan et Tunis) connues pour leur engagement dans le domaine d'exploitation, de transformation et de distillation des PAM [145].

## **I.2 Les huiles essentielles**

### **I.2.1 Définition**

Une HE, appelée également « essence végétale = huile volatile », constitue « la matière odoriférante » de la plante aromatique. C'est un mélange naturel de composition assez complexe renfermant des molécules aromatiques volatiles [146]. Selon la norme française, AFNOR NF T 75-006 [147]. Ces extraits sont appelés HEs, parce que, le terme «**huile**» s'explique par le caractère visqueux et hydrophobe de ces principes, et le terme «**essentielle**» reflète la caractéristique principale du végétal.

Les huiles volatiles sont des substances odorantes largement réparties dans les matières naturelles végétales et de quantité variable. Plus de 2000 espèces appartenant à 60 familles différentes produisent les HEs. Les principales familles à haute teneur en matières odorantes sont les *Lamiaceae*, *Rutacées*, *Myrtacées*, *Apiacées*, *Pinacées* [146].

En principe, tous les tissus végétatifs contiennent ces essences végétales comme les sommités fleuries (marjolaine, lavande), les feuilles (laurier, eucalyptus), les écorces (cannelier), le bois (bois de rose, santal), les racines (vétiver), les rhizomes (acore), les fruits (citron) ou les graines (carvi). Elles peuvent coexister simultanément dans différents organes au sein de la même plante [148]. La teneur et la composition chimique d'une HE peuvent varier d'un organe à un autre [149]. Généralement, la teneur des plantes en essences végétales est faible de l'ordre de 0,1 à 3% du poids sec du matériel végétal [150].

### **I.2.2 Les propriétés et les activités biologiques des huiles essentielles**

Les HEs sont des substances très odorantes et aromatisants, désignés comme étant GRAS « généralement considérés comme sûrs » [151]. Elles sont volatiles à la température ambiante, liquides à l'exception de quelques-unes qui sont solide à la température ambiante (HE d'Anis et de la Menthe du japon). Elles sont solubles dans les solvants organiques usuels et insolubles dans l'eau. La densité des HEs est généralement inférieure à celle de l'eau (0,85 à

0,95) à l'exception de trois huiles dites lourdes à savoir l'huile de cannelle, de girofle et de sassafras [152, 153].

L'activité antimicrobienne inhérente des HEs est communément liée à la structure chimique de leurs composants, la concentration dans laquelle les composants sont présents, et les interactions entre eux affectent leurs propriétés bioactives. L'activité antimicrobienne des HE est associée aux composants terpénoïdes et phénoliques des huiles. Certaines études ont démontré que les HEs ont une plus grande activité antibactérienne que leurs principaux constituants lorsqu'ils sont testés séparément [151]. Outre, il a été démontré que les HEs présentent des propriétés antivirales [154], antimycosiques [155,156,157,158], antiparasitaires [15,160], et insecticides [161,162]. Ces caractéristiques sont possiblement liées à la fonction de ces composés dans les plantes [163,164].

En outre, les HEs sont connues par leurs bienfaits potentiels sur la santé humaine telle que les propriétés anticancéreuses, antiinflammatoires, antidiabétiques, antiulcérogènes, antidépressives, antianxiolytiques [165,166,167,168].

### **I.2.3 Mode d'action des huiles essentielles**

Plusieurs chercheurs ont suggéré que l'action antimicrobienne des HEs peut être attribuée à leur capacité à pénétrer à travers les membranes bactériennes à l'intérieur de la cellule et à exercer une activité inhibitrice sur les propriétés fonctionnelles de la cellule et sur leurs propriétés lipophiles [169,170]. La nature phénolique des HEs provoque également une réponse antimicrobienne contre les bactéries pathogènes d'origine alimentaire [169,171]. Les composés phénoliques perturbent la membrane cellulaire, ce qui entraîne l'inhibition des propriétés fonctionnelles de la cellule et finit par provoquer une fuite du contenu interne de la cellule [169].

L'interaction des HEs avec les membranes cellulaires microbiennes entraîne l'inhibition de la croissance de certaines bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus*) et à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Salmonella Enteritidis*) [172]. Cependant, il a été démontré que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux HEs que les bactéries à gram négatifs en raison de l'interaction directe de la membrane cellulaire avec les composants hydrophobes des HEs [173,174]. Contrairement aux bactéries à Gram négatifs, qui possèdent des parois cellulaires hydrophiles ce qui aide à prévenir la pénétration des composés hydrophobes des HEs [172].

## **I.2.4 Utilité économique**

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie cosmétique, alimentaire et médicale [175]. L'utilisation des HEs comme base dans la fabrication de parfums et de savons constitue une pratique courante depuis des siècles dans la plupart des civilisations. La consommation d'huile dans ce secteur se caractérise par le besoin d'une très grande variété de produits, de quantités relativement faibles et de prix souvent élevés. La parfumerie technique a également recours aux HEs pour l'image de propreté à laquelle elles sont associées, mais aussi parfois pour leurs propriétés antiseptiques [176].

En ce qui concerne l'industrie alimentaire, les HEs sont utilisées pour rehausser le goût des aliments, pour parfumer et colorer. Le nombre de produits augmente et le consommateur recherche d'avantage les produits avec des ingrédients naturels (par exemple : HE d'orange la plus utilisée dans le monde) [177]. Les huiles à utilisations médicinales peuvent être vendues comme tel en petits flacons ou sous forme de vaporisateurs, de pastilles, de bonbons. Ces huiles peuvent également être utilisées comme inhalant pour soulager les difficultés respiratoires, comme dentifrice (dans l'eau), ainsi que pour rafraîchir ou soulager la gorge [178]. L'homéopathie et l'aromathérapie sont des exemples courants d'usage d'HEs en médecine douce, et leur popularité s'est accrue d'une façon considérable ces dernières années [176].

## **I.2.5 Extraction des huiles essentielles**

### **I.2.5.1 Principe général**

Les HEs sont des principes aromatiques obtenus à partir des plantes, botaniquement définies, par extraction solide-liquide. Cette extraction consiste en un transfert ou échange de matière entre deux phases hétérogènes : l'une solide contenant la matière à extraire « solution riche » et l'autre liquide correspondant au « solvant d'extraction » [179].

### **I.2.5.2 Méthodes d'extraction**

Les HEs représentent de 0,1 à 3% du poids sec du matériel végétal, ce qui en fait des molécules rares, mais précieuses [150]. Le choix de la technique d'extraction influe directement sur le rendement d'extraction et sur la qualité des essences obtenues.

#### *a. La distillation*

La distillation à la vapeur d'eau est la principale méthode traditionnelle et commerciale utilisée pour isoler les HEs (trésors aromatiques) à partir du matériel végétal. Trois groupes de techniques sont utilisés :

#### *L'hydrodistillation*

Ce procédé consiste à extraire par l'eau vapeur les molécules volatiles du matériel végétal. Une condensation ultérieure en circuit fermé permet de récupérer ces essences.

La matière végétale est immergée directement dans un récipient « alambic » rempli d'eau placée sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes, au contact du froid, se condensent et deviennent liquides. Ce liquide est formé d'un mélange d'eau et d'huile parfumée. Cette dernière se sépare de l'hydrolat par non miscibilité et différence de densité.

#### *L'entraînement à la vapeur ou distillation à la vapeur d'eau*

La technique d'entraînement à la vapeur d'eau est mise au point pour minimiser les altérations de l'HE liées à certains phénomènes de dégradation des composés de cette essence végétale ou des réactions chimiques comme l'hydrolyse des esters. La conséquence étant une augmentation de la qualité d'HE obtenue.

La matrice végétale est disposée sur des plaques perforées situées à une certaine distance au-dessus du fond rempli d'eau. La masse végétale est donc en contact direct avec la vapeur d'eau saturée, mais pas avec l'eau.

#### *L'hydrodiffusion (la percolation)*

Appelée aussi « la distillation à la vapeur directe », est une variante de l'entraînement à la vapeur mais sans eau dans le fond de l'alambic. La vapeur d'eau est introduite par le haut par rapport à la matière végétale pour percoler à travers la charge végétale. Le mélange de vapeur (vapeurs d'eau et les vapeurs d'huile) est ensuite condensé et recueilli [153, 180].

#### b. *L'expression*

L'expression, appelé également « pression à froid », est une technique « physique » essentiellement utilisée pour l'extraction des essences des écorces des agrumes telles que la mandarine, le citron, l'orange amère, etc. Le principe consiste à briser les parois des sacs oléifères renfermant l'HE sans aucune source de chaleur, ce qui permet d'éviter les phénomènes

d'hydrolyse. L'huile ainsi libérée présente une odeur très proche de la plante fraîche, d'où son appellation « essence » [153].

c. *L'extraction aux solvants organiques volatils*

Cette technique est utilisée pour l'extraction des substances odorantes volatiles à partir des organes de végétaux trop fragiles et qui ne supportent pas la chaleur (thermolabiles). L'extraction consiste à épuiser la matière végétale à l'aide d'un solvant approprié pendant une durée déterminée. Après décantation et concentration, le solvant est ensuite éliminé par distillation partielle et on obtient un mélange pâteux odorant appelé « **concrète** ». Ce dernier ne contient pas uniquement des molécules volatiles mais également des cires et des acides gras [148].

d. *L'enfleurage*

Cette technique d'extraction est réservée aux organes fragiles de la plante : les fleurs (le jasmin, la tubéreuse,...). Elle repose sur l'affinité des composés parfumés pour les corps gras. Le principe consiste à diffuser les tissus végétaux dans un corps gras pour le saturer en arômes végétales. Le mélange obtenu (composé du gras et de l'extrait) est ensuite traité à l'alcool pour ne laisser que l'essence dite « absolue » [181, 182].

e. *Extraction par micro-ondes sous vide*

C'est un procédé d'extraction assisté par micro-ondes, où la matrice végétale fraîche est placée dans un réacteur micro-ondes sans ajout de solvant. Le chauffage de l'eau intrinsèque du végétal permet la rupture des glandes sécrétrices d'HE. Les métabolites secondaires sont alors libérés et entraînés dans le mélange formé avec la vapeur d'eau propre du végétal. Ces métabolites secondaires sont recueillis suite à des étapes de condensation, refroidissement et décantation.

C'est une technique très rapide, qui permet de réduire les dépenses en énergie et d'obtenir des substances de meilleure qualité olfactive et de plus grand rendement avec une consommation moindre de solvants [183].

f. *Extraction par CO<sub>2</sub> supercritique*

Apparue vers la fin des années 1970, l'extraction aux fluides supercritiques, en particulier le CO<sub>2</sub> supercritiques, est un procédé innovant conçu pour le traitement des essences aromatique thermosensibles. Elle présente un large spectre de potentialité dans les industries :

agro-alimentaires, chimiques : polymérisation, photochimie, biochimiques, pharmaceutiques ainsi que l'extraction des arômes et parfums [184, 185].

Un fluide est dit à l'état supercritique lorsqu'il est porté à une température et à une pression au-delà de son point critique : un couple de pression-température critiques ( $P_c$ ,  $T_c$ ). Ce FSC présente alors un comportement intermédiaire entre celui d'un gaz et d'un liquide. Différents FSC sont utilisés tel que l'eau, l'éthane, le propane, etc., mais le dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) reste le solvant le plus communément utilisé. Il se révèle être un solvant alternatif pour l'extraction des composés actifs de plantes. Les produits ainsi obtenus sont très concentrés avec une fragrance très proche du végétal et sans solvant résiduel. Le choix de  $CO_2$  supercritique comme solvant alternatif d'extraction est justifié par ses coordonnées critiques modérées ( $T_c = 31,1\text{ °C}$ ,  $P_c = 73,8\text{ bar}$ ). C'est un solvant « vert », chimiquement inerte, non polluant, inodore, peu onéreux, de haute pureté (99,99%), naturellement abondant avec un bon pouvoir de solubilisation, à l'état supercritique, vis à vis des molécules apolaires ou faiblement polaires et de petite masse molaire [153, 184].

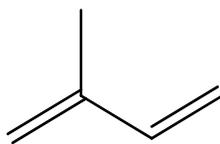
Le flux de  $CO_2$  supercritique est acheminé vers l'extracteur qui contient le végétal préalablement broyé. Le tout est maintenu pendant plusieurs heures afin d'atteindre les conditions opératoires recherchées. Ce fluide va alors se charger des principes aromatiques de la plante. A la sortie de l'extracteur le  $CO_2$  est détendu, redevient gazeux et se sépare des actifs végétaux extraits. Il en résulte, au niveau des séparateurs, des composés odorants spécifiques liquides ou pâteux [153, 184].

## **I.2.6 Composition chimique des huiles essentielles**

Les HEs sont des mélanges naturels extrêmement complexes. Plus de 300 constituants différents à fonctions organiques classiques (hydrocarbures, alcools, acides, esters,...). Ces composés sont classés en deux séries distinctes : la série des terpénoïdes d'une part et la série des composés aromatiques dérivés du phénylpropane ( $C_6-C_3$ ) d'autre part.

### **I.2.6.1 Les terpénoïdes**

Les terpénoïdes appelé également « les terpènes » sont des hydrocarbures issus du couplage d'un nombre d'unités « isopréniques »  $(C_5H_8)_n$  (Figure I-1).



**Figure I-1: Squelette d'une unité isoprénique**

Les terpènes sont classés selon le nombre  $n$  d'unités isopréniques en **monoterpènes** formés de deux unités ( $C_{10}H_{16}$ ), **les sesquiterpènes** formés de trois unités ( $C_{15}H_{24}$ ), **les diterpènes** formés de quatre unités ( $C_{20}H_{32}$ ), **les sesterpènes** ( $C_{25}H_{40}$ ), **les triterpènes** ( $C_{30}H_{48}$ ) et **les tétraterpènes** ou **polyterpènes** ( $C_5H_8$ ) $_n$ . L'étude de la composition chimique des HEs révèle la présence des terpènes volatils, c'est à dire de faible masse moléculaire (des monoterpènes et des sesquiterpènes) et plus rarement de quelques diterpènes ( $C_{20}H_{32}$ ) [148,186,187].

### **I.2.6.2 Les composés aromatiques**

Dérivés du phénylpropane, forment un groupe de constituants naturels moins présents que les terpénoïdes mais néanmoins très importants. Ce sont des substances odorantes bien connues : l'eugénol (clou de girofle), la vanilline (vanille), l'estragole (l'estragon), ect. Ils sont davantage présents dans les HEs d'Apiaceae (fenouil, vanille, basilic...) [148,186,187].

Les composants majeurs peuvent constituer jusqu'à 85% d'une HEs et définissent généralement leurs propriétés biologiques. Cependant, les 15% restants sont constitués de composants mineurs qui, bien que présents à l'état de traces, jouent un rôle important dans les activités biologiques, agissant en synergie avec les composants principaux (Burt, 2004, Pavela, 2015). Un effet de synergie se produit lorsque l'effet des substances combinées est supérieur à la somme des effets individuels [151].

### **I.2.7 Sensibilisation des huiles essentielles**

Les HEs sont sensibles à peu de facteurs physicochimiques tels que l'oxygène, la lumière, la température et le pH. Ainsi, l'oxygène en présence de lumière conduit à l'oxydation des composés insaturés avec la génération de radicaux libres. Les HEs perdent de petites quantités de composés volatils lorsqu'ils sont stockés à des températures élevées. De plus, certains composants sont très instables à pH variable [188].

### **I.2.8 Facteurs influençant la composition et la qualité d'une huile essentielle**

La composition et la qualité des HEs sont naturellement affectées par les caractéristiques de la plante, telles que le stade de développement, la variété, l'origine géographique, la partie de la plante utilisée, l'âge, la saison et les facteurs environnementaux, comme la température, l'humidité, l'altitude et la nature du sol [92]. Ainsi, le mode de récolte, les conditions de transport, séchage et de stockage peuvent générer des dégradations enzymatiques [189]. Mais, également la méthode d'extraction, les conditions opératoires (notamment la température, la durée d'extraction, le broyage, la pression, l'agitation) et le solvant utilisé contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'HE [190,191,192,193].

### **I.2.9 Méthodes de caractérisation des huiles essentielles**

L'identification qualitative et quantitative des différents composés d'une HE demeure une étape délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques.

La chromatographie en phase gazeuse (GC) reste la technique incontournable pour la caractérisation des HEs. C'est une méthode d'analyse par séparation des constituants gazeux ou susceptibles d'être volatilisés par élévation de température sans décomposition. Le couplage de la GC à un Détecteur à Ionisation de Flamme (FID ou DIF) permet la quantification des composés et le calcul de leurs indices de rétention à partir d'une série d'alcane de référence.

La combinaison de la chromatographie en phase gazeuse avec une technique spectroscopique : la Spectrométrie de Masse (GC/MS) permet ainsi l'identification de ces composés volatils du mélange complexe par analyse comparative des spectres de masse relatifs avec ceux d'une bibliothèque spectrale [194,195].

### **I.2.10 Toxicité des HEs : aspect juridique**

Les huiles essentielles et leurs constituants sont également enregistrés comme GRAS par la FDA de l'Etats-Unis. Cependant, La FDA a rapporté une liste des HEs les plus toxiques et qui ne doivent pas être utilisés (tableau I-1) [196].

La toxicité des HEs varie selon leur composition qui, elle-même varie selon la plante source qui elle-même peut varier selon le terrain où elle est cultivée. Par exemple, l'HE de feuille de *Silvia officinalis* L est plus riche en thujone toxique en Estonie que celle du reste de l'Europe [197].

L'industrie alimentaire utilise principalement la cannelle, l'agrume, le clou de girofle, la citronnelle, la coriandre, l'origan, la sauge, le piment, le thym et le romarin, et seuls de faibles pourcentages des HEs sont tolérables dans les aliments [198]. L'ingestion de fortes doses de composés naturels peut induire de graves problèmes de toxicité. Il est nécessaire de trouver un équilibre entre la dose effective d'HE et le risque de toxicité [199]. Le carvacrol, le carvone, le cinnamaldéhyde, le citral, le *p*-cymène, l'eugénol, le limonène, le menthol et le thymol sont des composants chimiques présents dans les HEs sont homologués et reconnus comme des agents sains dans les pays de l'Union européenne (UE). D'autre part, l'estragole et le méthyl eugenol ont été retirés de la liste de sécurité [200].

A nos jours, des groupes internationaux impliqués en santé publique comme le No observed adverse effect level (NOAEL) travaillent pour évaluer la toxicité de certains composants d'HEs, leurs études visent à fixer des normes pour assurer la sécurité d'emploi des produits [197].

En dépit d'être approuvé en tant qu'additif alimentaire, certains HEs de lavande, de jasmin, de palissandre, de laurier, d'eucalyptus, d'ylang-ylang, de citronnelle, de santal de clou de girofle et de poméranche peuvent provoquer des réactions allergiques [92].

**Tableau I-1:** Les huiles essentielles qui présentent une toxicité aiguë ou cancérigène

<b>HEs</b>	<b>source</b>
huile d'amande (amère, non rectifiée)	graines
huile boldo	feuilles
huile de cade	bois
l'huile de raifort	racines
huile de moutarde	graines
Huile de pin	Bois
huile de sassafras	racines
l'huile de racine de serpent	racines
huile d'arbre à thé	feuilles
huile de wormseed	graines

## **I.3 Les extraits organiques**

### **I.3.1 Généralité**

Les extraits naturels sont obtenus par l'action extractive d'un solvant organique appropriée ou de l'eau avec une matière végétale sèche et fraîche. Le choix du solvant d'extraction est alors d'une importance essentielle. On utilise souvent des solvants ayant la capacité d'extraire, de dissoudre les éléments actifs de la plante et de s'évaporer tels que l'eau, l'acétone, l'acétate d'éthyle, les alcools (méthanol, éthanol, propanol) et leurs mélanges. Ces extraits sont le plus souvent concentrés ce qui permet d'obtenir une consistance fluide, molle ou sèche très riche en molécules actives. L'acétate d'éthyle et l'acétone récupèrent les composés non polaires comme les flavonoïdes (quercétine, lutéoline, apigénine, ériodictyol) et les terpénoïdes (carnosol, thymol, carvacrol) tandis que les alcools, l'eau et les mélanges hydroalcooliques sont de bons solvants pour les acides phénoliques (caféiques, rosmarinique, salvianolique) et les glycosides flavonoïdes (rutine, apigénine glycoside).

Le rendement final peut être influencé par plusieurs paramètres, y compris le solvant d'extraction, le temps, la température, le rapport solvant-échantillon et le nombre d'extractions d'échantillons [201].

### **I.3.2 Les propriétés et les activités biologiques des extraits des plantes**

Les extraits de plantes sont constitués par des composés phytochimiques qui ont des activités biologiques. Ces composés phytochimiques peuvent contenir une couleur, une odeur et / ou un arôme qui donnent des caractéristiques uniques et variées selon les espèces, les parties, l'âge des plantes et l'environnement [202].

Les extraits de plantes sont des sources d'antioxydants tels que les polyphénols et les flavonoïdes, dont l'activité est bien connue dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires [203]. Les polyphénols présentent un grand intérêt pour la thérapeutique. Le métabolisme cellulaire produit plusieurs espèces d'oxygène réactif (ROS). Si les cellules eucaryotes présentent des mécanismes de piégeage pour ces ROS, il a été démontré qu'avec le vieillissement, la quantité de ROS augmente et peut produire des dommages à l'ADN qui pourraient conduire à la sénescence cellulaire. Les polyphénols jouent un rôle protecteur dans de tels phénomènes [204].

En outre, les extraits de plantes ont montré diverses propriétés biologiques : antibactériennes, antifongiques, antivirales, antigénotoxiques, antiinflammatoires,

antiulcérogènes, cardioprotectrice, antiallergiques, anticancéreuse, chimiopréventives, radioprotectrices, hépatoprotectrices, antidiarrhéiques, hypoglycémiques et antidiabétiques [205].

### **I.3.3 Les éléments actifs des plantes**

La recherche des constituants phytochimiques des plantes est une étape préliminaire permettant de mieux connaître et mieux comprendre comment elles agissent au niveau de l'organisme [206].

#### **I.3.3.1 Les composés phénoliques**

##### *a. Définition, structures et activités biologiques*

Les composés phénoliques, avec plus de 8000 composés identifiés, constituent la principale famille des métabolites secondaires des plantes. On les retrouve dans divers organes et tissus des végétaux supérieurs tels que les tiges, les racines, les feuilles, les graines, les fruits... Ces molécules sont impliquées dans la défense des végétaux contre les agressions de notre environnement (la pollution, radiation UV, etc.).

Le squelette de base qui les caractérise est la présence d'un noyau aromatique benzénique contenant un ou plusieurs substituants hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction (éther, ester, sucre...). Ils sont communément classés en plusieurs catégories selon la complexité du motif de base, le degré de modification du motif et les liaisons possibles de ces éléments fondamentaux avec d'autres molécules. La vaste famille des polyphénols regroupe les phénols simples appelé également « les acides phénoliques », les stilbénoides, les lignines et les lignanes, les flavonoïdes, les tannins, les coumarines, etc.

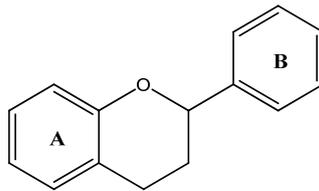
Les composés phénoliques sont très étudiés et sont reconnus comme étant des puissants antioxydants naturels ce qui explique leurs utilisations dans la prévention et le traitement de nombreuses pathologies liées au stress oxydant telles que le cancer, la maladie d'Alzheimer, les maladies cardio-vasculaires et inflammatoires [206,207,208].

##### *b. Les flavonoïdes : des polyphénols intéressants*

Avec plus de 5000 molécules identifiées, les flavonoïdes représentent un groupe principal de substances naturelles appartenant à la famille des composés phénoliques [209,210]. Ces composés naturels sont largement distribués dans le règne végétal et désormais reconnus comme des pigments responsables de la coloration des plantes et notamment les fleurs.

Ces substances naturelles sont connues pour leurs propriétés biologiques antioxydantes et antiradicalaires, inhibitrices d'enzymes, anti-cancéreuses, antivirales et anti-inflammatoires [206,209,211].

Ils sont dotés d'une grande diversité structurale dont le point commun, à l'exception des chalcones, auronones, isoflavones, est la structure de base à quinze atomes de carbone (C6-C3-C6) constituée de deux noyaux aromatiques (A et B) reliés par un hétérocycle en C3 (le noyau 2-phényl-1-benzopyrane) (Figure I-2).



**Figure I-2:** Squelette de base des flavonoides [209]

Selon le degré d'oxydation et d'insaturation du noyau 2-phényl-1-benzopyrane, les flavonoïdes sont regroupés en différentes classes telles que les flavones, les flavanones, les flavonols, les isoflavones, les anthocyanidines et les cathéchines.

## **II. Emballages alimentaires actifs a base des HEs et des extraits de plantes : une alternative dans les industries d'emballage alimentaire**

Étant donné que la FDA États-Unis et la réglementation européenne classent les additifs naturels tels que les HEs, les extraits de plantes et leurs constituants comme GRAS, plus sains et beaucoup moins toxique que ceux les substances synthétiques [212]. Les fabricants d'emballages et les consommateurs exigeants, considèrent leurs incorporation dans les films d'emballage alimentaire sont un moyen attrayant d'éviter la détérioration microbienne des aliments [213].

Conformément au règlement (EU) n ° 450/2009 (Commission européenne, 2009), «*matériaux actifs qui sont destinés à prolonger la durée de conservation ou à maintenir ou à améliorer l'état des denrées alimentaires emballées, ils sont conçus à incorporer des composants actifs qui libéreraient dans l'aliment emballés ou dans le milieu de l'aliment environnante.* Une fois les composés actifs incorporés dans l'emballage alimentaire, ces derniers peuvent être libérés de manière contrôlée pour maintenir ou améliorer les propriétés organoleptiques, la qualité et l'intégrité microbiologique des aliments [214].

## II.1 Application des HEs

Des exemples prometteurs d'emballages actifs incorporant des HEs ou leurs constituants sont rassemblés dans le tableau II-1.

Plusieurs facteurs affectent les propriétés mécaniques d'un emballage actif incorporant les HEs, telles que les propriétés de l'HE, la quantité incorporée, l'utilisation de plastifiant et la matrice polymère [215,216].

Lopez et al. (2007) ont observé que le film de polyéthylène enrichi en cinnamaldéhyde était efficace à 4% (w / w) en inhibant la croissance des champignons (*Penicillium islandicum*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium nalgiovense*, *Eurotium repens*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii* et *zigosaccharomyces rouxii*). Les bactéries (*Listeria monocytogenes* et *S. aureus*) ont été inhibés à une concentration d'agent actif de 8% (w / w). *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella choleraesuis* et *P. aeruginosa* ont été inhibés avec une concentration la plus élevée à 10% (w / w) [217].

**Tableau II-1:** Emballage alimentaire actifs à base des huiles essentielles et des substances naturelles

HE/ Agent actif	Matériau d'emballage	Reference
Sarriette	Agar-cellulose	[218]
Origan- thym		[219]
	LDPE	[220]
Linalool		[221]
Estragole		
Zataria multiflora Boiss -Mentha pulegium	polysaccharide de soja	[222]
Origan	alcool éthylène-vinyle (EVOH)	[223]
	PP	[217]
Cannelle	LDPE-PP	[224]
	PE/EVOH	[217]
Cannelle- Origan- Clou de girofle	PP	[217]
	PE-EVOH	
Ail- origan- Romarin	isolat de protéines de lactosérum	[225]
Ail	Alginate	[226]
	PE	[227]
	Mucilage de graine de coing	[228]
Origan	Résine cellulosique	[229]

HE/ Agent actif	Matériau d'emballage	Reference
	PP- PE- PET	[230]
Thymol- Carvacrol	PP	[231]
Ziziphora clinopodioides		[232]
Carvacrol	Cellulose	[233]
Origan		[234]
Origan- Cannelle- Citronnelle		[235]
Thym (Thymus piperella Thymus moroderi)	Chitosane	[236]
Ail		[237]
Origan- Sarriette- cannelle	Alginate-Polycaprolactone	[238]
Carvacrol	PE/EVOH/PET	[239]
Cinnemaldéhyde	MC/HPMC-LDPE	[240]
	PE	[217]
	PA- LDPE	[241]
Eugenol	PP	[242]
	MC/HPMC-LDPE	[240]
Hydrocinnamaldehyde	PP	[242]
Methylchavicol	LDPE/EVA	[243]
Thymol	EVA-LDPE	[244]
Cannelle - Origan	Alginate	[245]
Romarin	Acetate de cellulose	[246]
Bergamote	chitosane	[247,248]
Clou de girofle	Chitosane de gélatine	[249]
	protéines de tournesol	[250]
Satureja - hortensis	k-carraghénane	[251]
piment	Protéines de lait	[252]
Origan- Thym	Protein de Soja	[253]

## II.2 Application des extraits de plantes

Actuellement, l'une des dernières tendances en matière de recherche s'est concentrée sur l'incorporation d'extraits naturels bioactifs dans des matériaux polymériques alimentaires. En fait, l'ajout d'extraits de plantes s'est avéré qu'il fournit certaines modification physicochimiques des films / matériaux, et pourrait donc étendre leurs applications globales (Tableau II-2).

L'incorporation d'extraits de cannelle, de clou de girofle et d'anis étoilé dans un film de gélatine partiellement hydrolysé a permis d'augmenter la résistance à la traction et la perméabilité à la vapeur d'eau des films [254].

Dans une autre étude, l'ajout d'extrait de grenade de canneberge à la solution filmogène de SPI a fourni des films avec une couleur rouge vif et a détérioré la qualité de l'aliment en favorisant un goût puissant de canneberge [255].

Les recherches citées ci-dessus rapportent que des extraits naturels de plantes bioactives pourraient potentiellement être utilisés comme ingrédient prometteur pour améliorer certaines propriétés physicochimiques et ou la bioactivité des films pour différentes applications.

**Tableau II-2 : Emballage alimentaire actifs à base des extraits de plante**

Extrait	Matériau d'emballage	Reference
Thé vert	alcool éthylène-vinyle (EVOH)	[223]
	Chitosane	[256]
Fruit de murta	Cellulose	[257]
		[258]
Origan- Romarin	Gelatine	[259]
		[260]
Extrait de pépins de raisin	LDPE	[261]
	PA	[262]
	Isolat de protéine de soja	[263]
	Isolat de protéine de lactosérum	[264]
Propolis	Chitosane	[264]
Cannelle	LDPE	[265]
Citron	LDPE- PCL	[266]
Rheum palmatum	LDPE	[213]
Romarin	PP	[258]
	Gélatine	[267]
Extrait de coptis chinensis	LDPE	[268]
Myrtille	Isolat de film de soja	[269]
Framboise rouge	Isolat de film de soja	[270]
GJHraines de bourrache	Gélatine	[254]
Cannelle -extrait de girofle- extrait d'anis étoilé (SAE)	Gélatine	

### **II.3 Migration des composés actifs de l’emballage à la nourriture**

L'un des plus grands défis de la science de l'emballage alimentaire est la surveillance des composés qui migrent des matériaux d'emballage dans les aliments, en raison de leur toxicité possible [271,272,273,274]. Le taux de libération des agents actifs du matériau d'emballage a un effet significatif sur l'activité antimicrobienne et les applications potentielles des films actifs dans les emballages alimentaires [275,276].

La vitesse de libération de l'agent actif à travers le matériau d'emballage est principalement influencée par divers facteurs y compris la méthode de fabrication du film, les propriétés de l'agent actif (telles que la volatilité, la polarité et la concentration), l'interaction chimique entre l'agent actif et les chaînes polymériques, l'affinité de la substance active avec l'aliment, l'hydrophobicité et l'hydrophilie du polymère, la composition alimentaire, l'activité de l'eau et le pH de l'aliment. Ainsi que des facteurs environnementaux tels que les conditions de stockage, principalement la température et l'humidité relative [108,220].

La composition des aliments comme les matières grasses peut affecter le mécanisme de migration de l'agent actif dans l'aliment, ainsi que le niveau élevé d'hydratation du film peut augmenter le taux de diffusion des composés phénoliques du film à la nourriture [252, 277]. De plus, la haute température engendre une mobilité des molécules actifs ce qui accélère leurs migration [278].

Le potentiel de migration du composant actif qui migre de l'emballage vers l'aliment, est accessible par des tests de migration. Ceux-ci doivent être effectués dans des conditions de temps, de température spécifique et dans des simulateurs alimentaires en fonction des caractéristiques d'utilisation et de stockage du produit et en fonction de la nourriture qui sera emballée [279].

La quantité de migrants devrait être dans les limites de migration globales et spécifiques. La limite de migration spécifique est la quantité maximale autorisée d'une substance dans les aliments qui ne constitue pas un risque pour la santé. La liste des composés pouvant migrés vers les aliments et leurs limites maximales sont établies pour chaque pays ou chaque union de pays [280,281].

### **II.4 Emballage actifs à base de PLA**

Des films à base de PLA incorporés avec différentes substances synthétique tels que la nisine [282], les nanoparticules d'argent [283], l'alpha-tocophérol, le BHT, le PEG [284] ont été

développés pour améliorer les propriétés antimicrobiennes et ou antioxydantes des emballages alimentaires des produits périssables. Et d'autre à base des substances naturelles afin d'améliorer les propriétés mécaniques (Tableau II-3).

**Tableau II-3 :** Emballage alimentaire actif à base de PLA

<b>Agent actifs</b>	<b>Référence</b>
$\alpha$ -tocophérol	[285]
Resveratrol	[286]
Limonéne	[287]
Thymol	[288]
HE de Ziziphora clinopodioides	[232]
Extrait ethanolique de propolis	[289]
Extrait d' Allium	[290]
Limonéne	[291]
Extrait de fleur de souci	[292]
Cinnemaldéhyde	[293]
Extrait de pépins de raisin	[260]

## II.5 Emballage actifs à base d'amidon

Les chercheurs ont développé des films à base d'amidon contenant des extraits de chou rouge, d'origan, de romarin... etc (Tableau II-4), dans le but d'améliorer les propriétés antioxydantes et ou antimicrobiennes des emballages alimentaires.

**Tableau II-4:** Emballage alimentaire actif à base d'amidon

<b>Agent actifs</b>	<b>Références</b>
Cinnemaldéhyde	[291]
Extrait de romarin	[292]
Extrait de Chou rouge	[293]
Extrait d'origan	[294]
Extrait d'yerba mate	[295]
Argile ménérale	[296]
HE d'oranger-extrait de propolis	[297]
Acide oleique, $\alpha$ -tocopherol	[298]
Caséinate de sodium	[299]
HE d'origan	[300]

HEs de cannelle et de citronnelle	[235]
Acide palmitique- Acide oleique, acide stearique	[301]
Carvacrol- Thymol- Linalool	[278]
HE de Zataria multiflora Boiss et Mentha pulegium	[302]
Lactoferrine- Lysozyme	[303]
extrait de yerba mate	[304]
Catéchine	[305]

## **CHAPITRE IV**

**Etude bibliographique sur les plantes  
aromatiques et médicinales : le romarin,  
le myrte, le thym et le pistachier  
lentisque**

## **I. Le romarin**

### **I.1 Habitat et description**

Récemment, l'importance des plantes aromatiques est envisagée en raison de leurs applications en médecine populaire et de leur potentiel d'exploitation dans le domaine pharmaceutique et cosmétique. Parmi eux, le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), un membre de famille des Lamiaceae, est largement cultivé dans le monde entier comme une plante ornementale et aromatique [306].

Le romarin de Tunisie est un petit arbuste qui pousse spontanément dans le sud et le nord-ouest du pays de 1,5 m de hauteur. Il possède des tiges très feuillées. Les feuilles sont étroites, en forme d'aiguilles, d'un vert sombre à revers gris. La floraison couvre les rameaux de petites fleurs parmes à bleu clair tachetées de violet à l'intérieur (Figure I-1) [307].



**Figure I-1: Le Rosmarinus officinalis L.**

### **I.2 Classification botanique**

**Classe :** Dicotylédones

**Règne :** Végétal

**Embranchement :** SPERMAPHYTES

**Ordre :** Lamiales (Labiales)

**Famille :** *Lamiaceae*

**Genre :** *Rosmarinus*

**Espèce :** *Rosmarinus officinalis* L.

**Origine :** *Bassin méditerranéen*

**Nom vernaculaire :** *Romarin*

**Nom scientifique :** *Rosmarinus officinalis* L [308, 309].

### **I.3 Huile essentielle de romarin**

La distillation du romarin produit une HE avec une note herbacée et puissante. L'HE de romarin avait une couleur jaune pâle et une forte odeur caractéristique [307].

#### **I.3.1 Principaux composition chimique**

Les recherches bibliographiques sur les études effectuées sur cette plante ont montré que la chimie de l'espèce de romarin est largement étudiée en Tunisie et dans le monde entier mentionnant ici quelques études sur la composition de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L.

Zouali et al. (2010), ont identifié 25 composants représentant 93,6-97,5% du total de l'huile de romarin cueillie dans la région de Korbos, dont le 1,8-Cinéole (40 %), Camphre (17.9%),  $\alpha$ -pinène (10.3%), Camphène (6.3%) [310]. Cette analyse de composition est cohérente avec ceux trouvé par d'autre chercheurs sur des échantillons méditerranéens de *Rosmarinus officinalis* L [311,312,313,314,315].

Cependant l'HE de romarin de l'Italie et de la Turquie était riche principalement en  $\alpha$ -pinène puis le camphre, le 1,8-cinéole et le verbanone [312,316]. Alors que le verbanone était le composé majoritaire de l'HE de romarin de Portugal [317].

#### **I.3.2 Propriétés biologiques**

À l'heure actuelle, la demande de romarin augmente en raison de son utilisation dans la médecine traditionnelle, les industries pharmaceutiques, les domaines cosmétiques et l'agro-industrie, pour la qualité de leur HE.

En raison de son activité antioxydante et antimicrobienne, l'HE de romarin est capable de prolonger la durée de conservation des produits alimentaires et de maintenir leur qualité pendant le stockage [310,318,319]. Outre, l'HE de *Rosmarinus officinalis* L possède une activité antibactérienne surtout contre les bactéries alimentaires pathogènes potentielles tels que la *Staphylococcus aureus* et l'*Escherichia coli* [314,320].

En plus d'agir comme un agent antioxydant, l'HE isolée de romarin possède divers avantages pour la santé et des effets thérapeutiques en traitant les problèmes gastriques et les troubles respiratoires [321]. Les expériences menées avec l'HE de romarin ont démontré des effets pharmacologiques notables, tels que les effets antiinflammatoires [322], antidépresseurs [323], améliorent la cognition [324], protecteur d'ADN [325] et anticancéreux [326].

## **I.4 Extrait de romarin**

### **I.4.1 Composition chimique**

Les extraits de romarin (*Rosmarinus officinalis L.*) de la famille des Lamiaceae comportent des principes bioactifs, tels que compris l'acide carnosique, le carnosol et l'acide rosmarinique [327].

### **I.4.2 Propriétés biologiques**

Les extraits de romarin sont largement utilisés comme additifs dans les aliments et les produits pharmaceutiques (comme hépatoprotecteurs, diurétiques, hypocholestérolémiques, antirhumatismaux et antithrombotiques) [313].

Les extraits de romarin a montré une activité antioxydante et antibactérienne contre des pathogènes d'origine alimentaire [328,329]. Les principaux composés responsables de son activité antioxydante sont dans les fractions non volatiles sont l'acide carnosique, le carnosol et l'acide rosmarinique [330]. Ces constituants ont également d'importantes activités biologiques *in vitro* en tant qu'agents antitumoraux, chimiopréventifs et antiinflammatoires [331,332,333,334].

## **II. La Myrte**

### **II.1 Habitat et description**

En Tunisie, le genre myrte est représenté par une seule espèce, *Myrtus communis*, qui pousse à l'état sauvage dans les zones côtières, les collines internes et les zones forestières du nord de la Tunisie [335].

La floraison peut débuter à partir de Mai-Juin et s'étale jusqu'en août sous la forme de fleurs blanches, fortement odorantes. Le fruit, est de couleur noir bleuâtre à maturité, est ovoïde et charnu. La pleine maturité de ces fruits est atteinte au mois de Novembre (Figure II-1) [336].



**Figure II-1:** Le *Myrtus communis*

## **II.2 Classification botanique**

**Classe :** Dicotyledones

**Règne :** Plante

**Embranchement :** Magnoliophyta

**Ordre :** Myrtales

**Famille :** *Myrtaceae*

**Genre :** *Myrtus*

**Espèce :** *Myrtus communis*

**Origine :** *Bassin méditerranéen*

**Nom arabe :** Riḥane

**Nom scientifique :** *Myrtus communis* L. [336]

## **II.3 Huile essentielle de Myrte**

### **II.3.1 Rendement**

Le rendement de l'HE de *Myrtus communis* varie de 0,6% à 1,5% [337].

### **II.3.2 Composition chimique**

L'HE de myrte a été largement étudiée et sa composition est assez variable [338,339,340,341,342,343,344,345,346].

Aidi wannes et al. (2010), ont étudié la composition chimique de l'HE de Myrte (*Myrtus communis*) de différentes parties de la plante (feuille, fleurs et tiges) cueillie de la région de la Houaria (Nord-est de la Tunisie) [344]. Ils ont rapporté que la composition de l'HE extraite des feuilles et des fleurs de myrte était caractérisée par de fortes proportions en  $\alpha$ -pinène de l'ordre

de 58,05%, 17,53%, respectivement. Alors que le 1,8-cinéole (32,84%) était le composé majoritaire de l'HE extraite des tiges. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Gauthier et al.,(1988) [335].

D'autres études ont montré que l'acétate de myrtényle était le principal composant des HEs obtenues à partir de différentes parties de la myrte du Portugal [347] et de la Croatie [348] (Jerkovic et al., 2002) [5].

Akin et al. (2010), ont étudié la composition chimique de l'HE de myrte de la Turquie par GC-MS. Les composants majoritaires identifiés étaient 1,8-cinéole (50.13%), Linalool (12.65%),  $\alpha$ -terpineol (7.57%), limonène (4.26%) [349].

L'HE de *Myrtus communis* de l'Algérie a révélé une teneur de 95.98% de la totalité de l'huile dont le 1,8-cinéole (46.98%) et le Cis-géraniol (25.18%) sont les principaux composants [350].

### II.3.3 Propriétés biologiques

L'HE de myrte a montré une activité antimicrobienne contre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *B.subtilis* et *Serratia marcescens* [351] et contre *Candida albicans* [352]. Akin et al. (2010), ont mentionné que cette activité est due principalement à la présence des composés actifs dans l'huile tels que 1,8-cinéole, Linalool et le  $\alpha$ -terpinéol [349].

Des auteurs ont montré que l'HE de *Myrtus communis* a une activité antifongique importante contre l'*Aspergillus.niger*, dont  $\alpha$ -pinène et le limonène sont parmi les composants majoritaires qui contribuent à cette forte activité [353]. Même aussi ses constituants minoritaires tels que : Myrténol, Linalol, et l'Eugénol peuvent contribuer à cet effet en fonctionnant en synergie [354,355].

## II.4 Extrait de Myrte

### II.4.1 Composition chimique

Dans une étude rapportée par Aidi wannes et al. (2010) sur les extraits méthanoliques des différentes parties de *Myrtus communis* (Feuille, fleurs, tiges) cueillie de la région Nord-est de la Tunisie [335]. Ils ont trouvé que les extraits méthanoliques des feuilles sont les extraits les plus riches en composés phénoliques que ceux des graines. Alors que les extraits méthanoliques des tiges sont caractérisés par les teneurs élevées en flavonoïdes et en tannins dont le catéchine

est le composé majoritaire (36,91%). Ceci est cohérent avec ceux trouvés par d'Amensour et al., (2009) [356], Mrabet et Meniafi., (2015) [337], Akin et al., (2010) [349].

#### II.4.2 Propriétés biologiques

Les extraits de *Myrtus communis* L. sont considérés comme une source naturelle très importante de constituants phytopharmaceutiques utilisés pour éradiquer les radicaux libres responsables de nombreuses pathologies [357]. Les investigations phytochimiques et biologiques ont montré que *Myrtus communis* possède des potentialités antiinflammatoires, antimicrobiennes et antioxydantes [337]. *Myrtus communis* L. est un hypotenseur, anti-génotoxique, antioxydant, anti-hyperglycémique, anti-inflammatoire, antiseptique, utilisé dans le traitement de la candidose, des troubles pulmonaires, dans le traitement des maux d'estomac, de l'hypoglycémie, de la dysbiose, la toux et la constipation [358].

### III. Le thym

#### III.1 Habitat et description

En Tunisie, le genre *Thymus* (Lamiaceae) est principalement représenté par *Thymus capitatus* Hoffmanns. & Link. Un arbuste herbacé pérenne couramment utilisé comme herbe épicee et localement connu sous le nom commun " zaatar " [359]. La floraison débute en Tunisie dès le mois de Mars en affichant des fleurs violettes, pourpres ou roses claires qui sont très riches en nectar (Figure III-1) [360].



**Figure III-1:** Le *Thymus capitatus*

Cette plante aromatique est principalement utilisée (fraîche ou séchée) comme épice, dans certains plats traditionnels de viande tunisiennes, tant pour ses qualités conservatrices que pour son goût savoureux. En médecine traditionnelle tunisienne, les espèces de thymus sont bien connues en tant que plantes médicinales en raison de leurs propriétés biologiques et pharmacologiques, qui comprennent des activités antiasthmatiques, antiseptiques,

antimycosiques, spasmolytiques, antiinflammatoires, antimicrobiennes et antioxydantes [359,361].

### III.2 Classification botaniques

**Classe :** Dicotylédone Magnoliopsida

**Règne :** Plantae

**Embranchement :** Magnoliophyta

**Ordre :** Lamiales

**Famille :** *Lamiaceae*

**Genre :** *Thymus*

**Espèce :** *T. capitatus*

**Origine :** Bassin méditerranéen

**Nom arabe :** Zâateur

**Nom scientifique :** *Thymus capitatus* (L.) [362]

### III.3 Huile essentielle de Thym

#### III.3.1 Rendement

Le rendement de l'HE de *Thymus Capitatus* varie de 1% à 6% (w/w) selon la période de récolte et les différentes locations des plantes utilisées pour l'extraction de l'HEs [359].

#### III.3.2 Composition chimique

L'HE de thym est souvent caractérisé par une teneur élevée en phénols (thymol et carvacrol) et en alcools terpéniques (linalol, terpinéol, géraniol ou myrcénol) [363]. L'HE de *Thymus. capitatus* a été étudiée par de nombreux chercheurs qui ont rapporté la variabilité chimique des HES de cette espèce mentionnant quelques unes [359,364,365,366,367,368,369,370,371].

Bounatirou et al. (2007), ont étudié la composition chimique de l'HE de thym cueillis de trois régions différentes de la Tunisie (Jendouba, Haouria, Tounine) par GC-MS. Les principaux composants des HES étaient le carvacrol (62-83%), le *p*-cymène (5-17%), le  $\gamma$ -terpinène (2-14%) et le  $\beta$ -caryophyllène (1-4%) [359]. Ceci est cohérents avec d'autres études

rapportées par El abed et al. (2014) [372] et Figueiredo et al., 2008 [373]. D'autre part, l'HE de *Thymus Capitatus* de Maroc a montré une richesse en *p*-cymène à une teneur de 18,9% [374].

### III.3.3 Propriétés biologiques

Les HEs de thym avaient montré des activités antimicrobiennes [375,376], dont la plupart sont dû à la présence de thymol et du carvacrol qui se joignent aux groupes amine et hydroxylamine des protéines de la membrane bactérienne altérant leur perméabilité et entraînant la mort de la bactérie [377]. Les HEs sont considérés comme des spasmolytiques et des antioxydants dont l'activité antioxydante est proche de celle de Trolox (antioxydant de référence) [362].

Bel Hadj Salah Fatnassi et al. (2010) ont montré que les HEs de *Thymus Capitatus* cueillies de trois régions différentes de la Tunisie (Kalâa Sghira, Bargou, Sidi Medien), sont doués d'une activité antivirale [362].

L'HE de Thym est caractérisé par un potentiel antibactérien contre *le Bacillus cereus*, *Salmonella sp.*, *Listeria innocua*, et *Staphylococcus aureus* [359], *L. monocytogenes* [372]. Ceci est cohérent avec d'autres travaux rapporté par Bouzouita et al., (2003), Oussalah et al., (2006), Hazzit et al., (2006), Faleiro et al., (2005) [378,379,380,381].

Il a été démontré que l'HE de *Thymus Capitatus* est doté d'effet bioprotecteur et par conséquent, il pourrait être utilisé dans de nombreux domaines biotechnologiques en tant qu'ingrédient de conservation naturel des industries alimentaires et ou pharmaceutiques [372].

## III.4 Extrait de Thym

Les extraits de l'espèce de thym sont largement utilisés dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et de la parfumerie, ainsi que pour l'aromatisation et la conservation de plusieurs produits alimentaires [382].

### III.4.1 Composition chimique

Une étude a montré que les extraits aqueux- éthanoliques de *Thymus Capitatus* cueillie de la région de Zaghouan (Tunisie) est riche en Thymol et en 2,3- dihydroxy-*p*-cymène [363].

Les composés phénoliques les plus présents dans les extraits des parties aériennes de *Thymus Capitatus* sont les flavonoïdes sous forme d'aglycones (lutéoline, apigénine), d'acides phénoliques (acides férulique, isoférulique, chlorogénique, cinnamique et rosmarinique), de flavones et de terpénoïdes phénoliques comme le carvacrol et le thymol [383,384].

Jouadi et al. (2018) ont analysé la composition chimique des extraits méthanolique de *Thymus Capitatus* cueillie de neuf régions différentes de la Tunisie (Korbous, Essanahia, Jendouba, Sers, Gbollat, Siliana, Sousse, Gabes, Toujéne) [385]. Les composées phénoliques qui ont été identifiés sont des acides phénoliques (acide rosmarinique, acide salvianolique A, acide salvianolique E), des flavanones (hespéridine, ériodictyol et naringénine), de flavone apigénine, de flavanol gallocatéchine, de flavanonol taxifoline et de monoterpene phénolique (carvacrol).

### III.4.2 Propriétés biologiques

El Ouariachi et al. (2011), ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle de Thym a une forte activité antioxydante que les extraits de diéthyl éther. Cette activité est relative à la composition en polyphénols et en flavonoïdes des extraits [374]. En outre Tabti est al, (2014), ont trouvé que l'extrait éthanolique de *Thymus Capitatus* est une source potentielle d'antioxydants naturels [386].

Saoudi et al.(2017) ont montré que l'extrait aqueux-éthanolique de *Thymus Capitatus* récolté de la région de Zaghouan est efficace contre les espèces d'*Acanthamoeba* qui sont des amibes libres largement distribuées dans l'environnement et qui causent des infections humaines graves. Cette activité est due à la présence des molécules actives présentes dans l'extrait tel que le thymol et le 2,3- dihydroxy-p-cymène [363].

Kandil et al (1994) ont montré que les extraits aqueux et éthanoliques de *Thymus Capitatus* sont des agents antimicrobiens efficaces et peuvent être utilisés même à des faibles concentrations dans le traitement de l'infection bactérienne des systèmes cutanés, respiratoires, gastro-intestinal et urinaire [387]. Cette sensibilité des bactéries à l'extrait éthanolique de *Thymus Capitaus* concorde avec des travaux antérieurs obtenus par Nimri et al., (1999) [388]. De plus, ces extraits ont montré une activité anthelminthique significative *in vitro* contre le parasite gastro intestinal *Haemonchus contortus* [389].

## IV. Le pistachier lentisque

### IV.1 Habitat et description

En Tunisie, *Pistacia lentiscus L.*, est connue sous le nom de «dharw» [390]. *Pistacia lentiscus L.* est un arbrisseau de 1 à 3 mètres de hauteur, à odeur résineuse forte. Elle se trouve

dans les milieux les plus chauds du climat méditerranéen en association avec l'oléastre (olivier sauvage), la salsepareille et le myrte [336].

Selon Abdechafie (2017), cette espèce est caractérisée par des feuilles persistantes, composées, d'un vert sombre. Le fruit est sous forme d'une baie globuleuse de 2 à 3 mm, d'abord rouge il devient brunâtre à sa maturité en automne (Figure IV-1). Il est caractérisé par un mastic sous forme d'un suc résineux qui provient du fait de l'incision du tronc et l'arbuste. Ainsi, une fois distillé il fournit une essence employée en parfumerie [336].



**Figure IV-1:** La Pistacia Lentiscus

*Pistacia Lentiscus* est largement utilisé en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies (hypertension, ulcère, eczéma, diarrhée et infections de la gorge) ainsi que pour aromatiser et conserver les aliments [391,392]. L'huile comestible extraite des fruits, contenant une quantité considérable d'acides gras insaturés, de caroténoïdes et de tocophérols [393,394,395], est traditionnellement utilisée en Afrique du Nord et les pays du Moyen-Orient traitent la gale, les rhumatismes et la diarrhée [396].

## **IV.2 Classification botanique**

**Classe :** Dicotylédones Vraies Supérieures

**Règne :** Plante

**Embranchement :** Spermatophytes

**Ordre :** Sapindales

**Famille :** *Anacardiaceae*

**Genre :** Pistacia

**Espèce :** *Pistacia lentiscus*

**Origine :** Bassin méditerranéen

**Nom arabe :** Darou

**Nom scientifique :** *Pistacia lentiscus* L [397,398,399].

### **IV.3 Huile essentielle de Pistacia**

#### **IV.3.1 Rendement**

Les rendements en HEs varient significativement de 0,009 à 0,02% de la matière sèche [390].

#### **IV.3.2 Composition chimique**

Les monoterpènes ( $\alpha$ -pinène,  $\alpha$ -terpinéol, myrcène, limonène, *p*-cymène et terpinène-4-ol) et les sesquiterpènes ( $\alpha$ -caryophyllène,  $\beta$ -cadinène, germacrène) sont les composés les plus couramment rencontrés dans les HEs [400].

Bachrouh et al. (2010) ont montré que l'HE de *Pistacia lentiscus* L. récoltés dans Seliana, est caractérisé par la présence de terpinen-4-ol (23,32%),  $\beta$ -caryophyllène (22,62%) et l' $\alpha$ -terpinéol (7,22%) en tant que composés majeurs. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Remila et al. (2015) [401]

Aissi et al. (2016) ont analysé la composition chimique des HEs des feuilles de *Pistacia lentiscus* de 14 populations tunisiennes. Ainsi, ils ont montré que ces HEs sont riches principalement en  $\alpha$ -pinène (9,9%), limonène (8,5%), terpinen-4-ol (5,1%),  $\beta$ -caryophyllène (8,2%), germacrène D (11,9%) et  $\delta$ -cadinène (8,5%) [400]. Cette composition concorde avec les travaux de Douissa et al. (2005) [402] et Gardeli et coll. (2008) [403].

Dans une autre étude élaborée par Ouelhadj et al., où l'HE de *Pistacia lentiscus* L. en provenance d'Algérie est composé principalement de Myrcene (15.18 %) et de 1,8-Cineole (15.02 %) [350].

#### **IV.3.3 Propriétés biologiques**

L'HE extraite des parties aériennes de *Pistacia lentiscus* se caractérise par des activités antibactériennes, antifongiques et insecticides, antiacetylcholinestérase [390,404,405].

En effet, des chercheurs ont suggéré que l'activité insecticide est attribuée principalement au terpinen-4-ol, 1,8-cinéol [406,407],  $\beta$ -caryophyllène [408],  $\alpha$ -terpineol [390,409,410].

L'HE de *Pistacia lentiscus* a montré une activité antimicrobienne contre *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum* [336]. Cette efficacité antimicrobienne est due à un certain nombre des composants fonctionnant en synergie [354].

#### **IV.4 Extrait du pistachier lentisque**

##### **IV.4.1 Composition chimique**

Les extraits éthanoliques sont riches en molécules bioactives tels que les tanins, les saponines et les coumarines qui sont les composés responsables à l'activité antioxydante [401].

Mehenni et al (2016) ont analysé la composition chimique des extraits éthanoliques de *Pistacia lentiscus*. En effet, ils ont identifiés six composés phénoliques tels que l'acide gallique, la catéchine, l'acide syringique, l'acide ellagique, quercétine 3-O-rhamnoside, lutéoline [411].

##### **IV.4.2 Propriétés biologiques**

Les extraits des parties aériennes ont été identifiés comme des antioxydants naturels puissants et des inhibiteurs efficaces de l' $\alpha$ -amylase, de l' $\alpha$ -glucosidase, de la lipase et de l'acétylcholinestérase [391,392,411]. L'extrait éthanolique de *Pistacia lentiscus* a montré un potentiel antioxydant supérieur à celui de l'HE reflétant le contenu phénolique responsable de cette activité [412].

Ainsi, les extraits organiques de *Pistacia lentiscus* exhibent des propriétés antiinflammatoires, anticancéreuses [401], antiulcéreuses [413], et antifongiques contre *Phythium ultimum* et de *Rhizoctania solani* [414].

## Les références

- [1] Robertson, G. L. (2009). Food packaging and shelf life: a practical guide. CRC Press.
- [2] Cyrek, P. (2015). Opakowanie jako źródło informacji o produktach żywnościowych. Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Szczecińskiego. Problemy Zarządzania, Finansów i Marketingu, (Marketing przyszłości. Trendy. Strategie. Instrumenty. Komunikacja marketingowa przedsiębiorstwa z otoczeniem), 39; 9-21.
- [3] Jerzyk E, Kaniewska-Sęba A. Opakowanie i marka jako atrybuty produktu [Packaging and a brand as product attributes], In: Pilarczyk B, Mruk H, editors. Kompendium wiedzy o marketingu [A compendium of knowledge about marketing], Warsaw: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2007, p. 153–167.
- [4] Trinetta, V. (2016). Definition and Function of Food Packaging. Reference Module in Food Science, 1–2.
- [5] Ciechomski, W. (2008). Opakowanie jako instrument promocji. LogForum, 4(4), 1-8.
- [6] <http://kapitalis.com/tunisie/> 20 Aout 2018
- [7] Risch, S. J. (2009). Food packaging history and innovations. Journal of agricultural and food chemistry, 57(18), 8089-8092.
- [8] Cutter, C. N. (2002). Microbial control by packaging: a review. Critical reviews in food science and nutrition, 42(2), 151-161
- [9] Adelphe, Ademe, Cercle national du recyclage, C.S.E.M.P., Eco-Emballages, Ecofut, ECO-PSE, Federation de la plasturgie, federec, Ministère de l'environnement, Recyfilm, S.N.R.M.P., S.P.M.P., Valorplast (1999). Les emballages plastiques de la fabrication à la valorisation.
- [10] Robertson, G.L., 2013. Processing and converting of thermoplastic polymers, Food Packaging: Principles and Practice. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 131\_166.
- [11] Kirwan, M.J., 2011. Paper and paperboard packaging. In: Coles, R., Kirwan, M.J. (Eds.), Food and Beverage Packaging Technology, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Chichester, pp. 13\_250.
- [12] Soroka, W., 2010. Plastic applications, Fundamentals of Packaging Technology. 4th ed. Institute of Packaging Professionals, Naperville, IL, pp. 281\_314.
- [13] Lee, D.S., Yam, K.L., Piergiovanni, L., 2008. Food packaging polymers. Food Packaging Science and Technology. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 141\_176.

- [14] Soroka, W., 2010. Shaping plastics, *Fundamentals of Packaging Technology*. 4th ed. Institute of Packaging Professionals, Naperville, IL, pp. 241\_280.
- [15] Lyijynen, T., Hurme, E., Ahvenainen, R., 2003. Optimizing packaging. In: Ahvenainen, R. (Ed.), *Novel Food Packaging Techniques*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 441\_458.
- [16] Robertson, G.L., 2013g. Shelf-life of foods, *Food Packaging: Principles and Practice*. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 329\_366.
- [17] Lee, D.S., 2010. Packaging and microbial shelf-life of food. In: Robertson, G.L. (Ed.), *Food Packaging and Shelf-life: A Practical Guide*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 55\_80.
- [18] Lee, D.S., Yam, K.L., Piergiovanni, L., 2008. Shelf-life of packaged food products. *Food Packaging Science and Technology*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 479\_542.
- [19] Lee, D.S., Yam, K.L., Piergiovanni, L., 2008. Food products stability and packaging requirements. *Food Packaging Science and Technology*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 543\_594.
- [20] Briston, J.H., 1980. Rigid plastics packaging. In: Palling, S.J. (Ed.), *Developments in Food Packaging*, Vol. 1. Applied Science, London, pp. 27\_53.
- [21] Anonymous. 1993. *Shelf Life of Foods: Guidelines for Its Determination and Prediction*. London, England: Institute of Food Science and Technology, Inc.
- [22] Mercea, P., 2000. Models for diffusion in polymers. In: Piringer, O., Baner, A.L. (Eds.), *Plastic Packaging Materials for Food: Barrier Function, Mass Transport, Quality Assurance, Legislation*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 125\_158.
- [23] Kirwan, M. J., & Strawbridge, J. W. (2003). Plastics in food packaging. *Food packaging technology*, 174-240.
- [24] Bohlmann, G.M.(2004). Biodegradable packaging life-cycle assessment. *Environmental Progress*, 23(4), 342-346.
- [25] Kale, G., Kijchavengkul, T., Auras, R., Rubino, M., Selke, S. E., & Singh, S. P. (2007). Compostability of bioplastic packaging materials: an overview. *Macromolecular bioscience*, 7(3), 255-277
- [26] Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in food science & technology*, 14(3), 71-78.

- [27] Cerqueira, M. A. P. R., Pereira, R. N. C., da Silva Ramos, O. L., Teixeira, J. A. C., & Vicente, A. A. (2016). *Edible Food Packaging: Materials and Processing Technologies*. CRC Press.
- [28] Han, J. H., & Scanlon, M. G. (2014). Mass transfer of gas and solute through packaging materials. In *Innovations in Food Packaging (Second Edition)* (pp. 37-49).
- [29] Yam, K. L., & Lee, D. S. (2012). Emerging food packaging technologies: an overview. In *Emerging Food Packaging Technologies* (pp. 1-9).
- [30] Day, B.P.F., 2008. Modified atmosphere and active packaging of chilled foods. In: Brown, M. (Ed.), *Chilled Foods: A Comprehensive Guide*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 158\_190.
- [31] Avérous, L. (2004). Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: a review. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 44(3), 231-274.
- [32] van Tuil, R., Fowler, P., Lawther, M., Weber, C.J., 2000. Properties of biobased packaging materials. In: Weber, C.J. (Ed.), *Biobased Packaging Materials for the Food Industry \_ Status and Perspectives*, Food Biopack Project, EU Directorate 12, pp. 13\_44
- [33] Garlotta, D. (2001). A literature review of poly (lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 9(2), 63-84.
- [34] Auras, R., Harte, B., & Selke, S. (2004). An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular bioscience*, 4(9), 835-864.
- [35] Mehta, R., Kumar, V., Bhunia, H., & Upadhyay, S. N. (2005). Synthesis of poly (lactic acid): a review. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 45(4), 325-349.
- [36] Södergård, A., & Stolt, M. (2002). Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in polymer science*, 27(6), 1123-1163.
- [37] Hartmann, M. H. (1998). High molecular weight polylactic acid polymers. In *Biopolymers from renewable resources* (pp. 367-411). Springer, Berlin, Heidelberg
- [38] Y. Doi, A. Steinbüchel, *Biopolymers, Applications and Commercial Products e Polyesters III*, Wiley-VCH, Weiheim e Germany, 2002. p. 410.
- [39] HARTMANN, M. H. High molecular weight polylactic acid polymers. En *Biopolymers from renewable resources*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1998. p. 367-411.

- [40] Averous, L. (2013). Synthesis, properties, environmental and biomedical applications of polylactic acid. In *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics* (pp. 171-188).
- [41] Hoogsteen, W., Postema, A. R., Pennings, A. J., Ten Brinke, G., & Zugenmaier, P. (1990). Crystal structure, conformation and morphology of solution-spun poly (L-lactide) fibers. *Macromolecules*, 23(2), 634-642.
- [42] J. Puiggali, Y. Ikada, H. Tsuji, L. Cartier, T. Okihara, B. Lotz, The frustrated structure of poly(L-lactide), *Polymer* 41 (2000) 8921e8930.
- [43] Cartier, L., Okihara, T., Ikada, Y., Tsuji, H., Puiggali, J., & Lotz, B. (2000). Epitaxial crystallization and crystalline polymorphism of polylactides. *Polymer*, 41(25), 8909-8919.
- [44] Tsuji, H., & Ikada, Y. (1995). Properties and morphologies of poly (L-lactide): 1. Annealing condition effects on properties and morphologies of poly (L-lactide). *Polymer*, 36(14), 2709-2716
- [45] Martin, O., & Averous, L. (2001). Poly (lactic acid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems. *Polymer*, 42(14), 6209-6219.
- [46] Cazon, P., Velazquez, G., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. (2017). Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*, 68, 136-148.
- [47] Kolybaba, M., Tabil, L. G., Panigrahi, S., Crerar, W. J., Powell, T., & Wang, B. (2006). Biodegradable polymers: past, present, and future. In *ASABE/CSBE North Central Intersectional Meeting* (p. 1). American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- [48] Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2012). Edible and biodegradable starch films: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2058-2076.
- [49] Molavi, H., Behfar, S., Shariati, M. A., Kaviani, M., & Atarod, S. (2015). A review on biodegradable starch based film. *Journal of Microbiology, Biotechnology & Food Sciences*, 4(5).
- [50] Pérez, S. (2000). Structure et morphologie du grain d'amidon
- [51] Bertuzzi, M. A., Vidaurre, E. C., Armada, M., & Gottifredi, J. C. (2007). Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of food engineering*, 80(3), 972-978.
- [52] Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M., & Chiralt, A. (2013). Properties of wheat starch film-forming dispersions and films as affected by chitosan addition. *Journal of Food Engineering*, 114(3), 303-312.

- [53] Peressini, D., Bravin, B., Lapasin, R., Rizzotti, C., & Sensidoni, A. (2003). Starch–methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions. *Journal of Food Engineering*, 59(1), 25-32.
- [54] Monnet, D. (2008). Etude de l'évolution des propriétés mécaniques de matériaux amyliques par sélection et/ou modifications structurales dirigées (Doctoral dissertation, Reims). <http://ebureau.univ-reims.fr/slide/files/quotas/SCD/theses/exl-doc/GED00000984.pdf> 1 Septembre 2018
- [55] WERTZ, J. L. (2011). L'amidon et le PLA: deux biopolymères sur le marché. Note de Synthèse, Wallonie, Belgique.
- [56] Patterson, J.A., Emes, M.J, Tetlow, I.J. (2017). Starch Synthesis. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (Second Edition), Volume 1, 2017, Pages 570-576
- [57] Lafargue, D. (2007). Etude et élaboration de films à base de polysaccharides pour la fabrication de gélules pharmaceutiques [http://www.inra.fr/les\\_partenariats/collaborations\\_et\\_partenaires/entreprises/en\\_direct\\_des\\_labos/des\\_gelules\\_pharmaceutiques\\_vegetales](http://www.inra.fr/les_partenariats/collaborations_et_partenaires/entreprises/en_direct_des_labos/des_gelules_pharmaceutiques_vegetales) 1 Septembre 2018
- [58] Angellier, H. (2005). Nanocristaux d'amidon de maïs cireux pour applications composites (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).
- [59] Carvalho, A. J. (2008). Starch: major sources, properties and applications as thermoplastic materials. In *Monomers, polymers and composites from renewable resources* (pp. 321-342).
- [60] Jonhed, A., Andersson, C., & Järnström, L. (2008). Effects of film forming and hydrophobic properties of starches on surface sized packaging paper. *Packaging Technology and Science: An International Journal*, 21(3), 123-135.
- [61] Mali, S., Grossmann, M. V. E., García, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2004). Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 56(2), 129-135.
- [62] Curiacos Bertolini, A. (2000). Bases moléculaires et thermomécaniques de la propriété d'expansion du# Polvilho azedo.
- [63] <http://en.wikipedia.org/wiki/Starch>, 15 Aout 2018
- [64] <http://www.gmo-compass.org/eng/database/enzymes/80.amylase.html> 13 Juillet 2018
- [65] <http://en.wikipedia.org/wiki/Amylase> 13 Juillet 2018

- [66] Brody, A. L. (2002). Active and intelligent packaging: the saga continues. *FOOD TECHNOLOGY-CHAMPAIGN THEN CHICAGO-*, 56(12), 65-65
- [67] Lopez-Rubio, A., Almenar, E., Hernandez-Muñoz, P., Lagarón, J. M., Catalá, R., & Gavara, R. (2004). Overview of active polymer-based packaging technologies for food applications. *Food Reviews International*, 20(4), 357-387.
- [68] Solano, A. C. V., & de Rojas Gante, C. (2012). Two different processes to obtain antimicrobial packaging containing natural oils. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2522-2528.
- [69] Dobrucka, R., & Cierpiszewski, R. (2014). Active and intelligent packaging food—research and development—a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(1), 7-15.
- [70] Dainelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Zondervan-van den Beuken, E., & Tobback, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science & Technology*, 19, S103-S112.
- [71] Restuccia, D., Spizzirri, U. G., Parisi, O. I., Cirillo, G., Curcio, M., Iemma, F., & Picci, N. (2010). New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food control*, 21(11), 1425-1435.
- [72] Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 113-126.
- [73] Vanderroost, M., Ragaert, P., Devlieghere, F., & De Meulenaer, B. (2014). Intelligent food packaging: The next generation. *Trends in Food Science & Technology*, 39(1), 47-62.
- [74] Majid, I., Nayik, G. A., Dar, S. M., & Nanda, V. (2016). Novel food packaging technologies: Innovations and future prospective. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.
- [75] Yucel, U. (2015). *Intelligent Packaging*.
- [76] Yam, K. L., Takhistov, P. T., & Miltz, J. (2005). Intelligent packaging: concepts and applications. *Journal of food science*, 70(1), R1-R10.
- [77] Fang, Z., Zhao, Y., Warner, R. D., & Johnson, S. K. (2017). Active and intelligent packaging in meat industry. *Trends in Food Science & Technology*, 61, 60-71
- [78] Floros, J. D., Dock, L. L., & Han, J. H. (1997). Active packaging technologies and applications. *Food Cosmetics and Drug Packaging*, 20(1), 10-17.

- [79] Lopez-Rubio, A., Gavara, R., & Lagaron, J. M. (2006). Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science & Technology*, 17(10), 567-575.
- [80] Fogliano, V., & Vitaglione, P. (2005). Functional foods: planning and development. *Molecular nutrition & food research*, 49(3), 256-262.
- [81] Lagaron, J. M. (2005, July). Biodegradable and sustainable plastics as essential elements in novel bioactive packaging technologies. In First conference on biodegradable polymers for packaging applications. PIRA International Leatherhead (UK).
- [82] Bloch, A., & Thomson, C. A. (1995). Position of the American Dietetic Association. Phytochemicals and Functional Foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 95(4), 493-496.
- [83] Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual review of nutrition*, 16(1), 33-50.
- [84] Shahidi, F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Food/nahrung*, 44(3), 158-163.
- [85] Wettasinghe, M., & Shahidi, F. (1999). Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. *Food chemistry*, 67(4), 399-414.
- [86] Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 173-182.
- [87] Quintavalla, S., & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat science*, 62(3), 373-380.
- [88] Vermeiren, L., Devlieghere, F., van Beest, M., de Kruijf, N., & Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends in food science & technology*, 10(3), 77-86.
- [89] Álvarez, M. F. (2000). Revisión: Envasado activo de los alimentos/Review: Active food packaging. *Food Science and Technology International*, 6(2), 97-108

- [90] Del Nobile, M. A., Conte, A., Buonocore, G. G., Incoronato, A. L., Massaro, A., & Panza, O. (2009). Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. *Journal of Food Engineering*, 93(1), 1-6.
- [91] López-de-Dicastillo, C., Catalá, R., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2011). Food applications of active packaging EVOH films containing cyclodextrins for the preferential scavenging of undesirable compounds. *Journal of Food Engineering*, 104(3), 380-386.
- [92] Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., de Melo, N. R., & Sanches-Silva, A. (2017). Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends in food science & technology*, 61, 132-140.
- [93] Lopez-Rubio, A., Almenar, E., Hernandez-Muñoz, P., Lagarón, J. M., Catalá, R., & Gavara, R. (2004). Overview of active polymer-based packaging technologies for food applications. *Food Reviews International*, 20(4), 357-387.
- [94] Jamshidian, M. (2011). Inclusion et libération de molécules antioxydantes dans un emballage à base d'Acide Poly Lactique en contact alimentaire (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Lorraine).
- [95] Wilson, C. L. (2007). *Intelligent and active packaging for fruits and vegetables*. CRC Press
- [96] Kerry, J.P., O'Grady, M.N., Hogan, S.A., 2006. Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: a review. *Meat Sci.* 74, 113–130.
- [97] Robertson, G. L. (2006). *Modified atmosphere packaging. Food packaging—principles and practice*, Second edition. CRC Press, Florida.
- [98] Jamshidian, M., Tehrany, E. A., Imran, M., Akhtar, M. J., Cleymand, F., & Desobry, S. (2012). Structural, mechanical and barrier properties of active PLA–antioxidant films. *Journal of Food Engineering*, 110(3), 380-389.
- [99] Samsudin, H., Soto-Valdez, H., & Auras, R. (2014). Poly (lactic acid) film incorporated with marigold flower extract (*Tagetes erecta*) intended for fatty-food application. *Food Control*, 46, 55-66.
- [100] Gavara, R., Lagarón, J. M., & Catalá, R. (2004). Materiales poliméricos para en diseño de envases activos. In Paper presented at the Seminario Cyted-Technológico de Monterrey. Monterrey, México.

- [101] Wessling, C., Nielsen, T., Leufvén, A., & Jägerstad, M. (1998). Mobility of  $\alpha$ -tocopherol and BHT in LDPE in contact with fatty food simulants. *Food Additives and Contaminants*, 15(6), 709-715.
- [102] Han, J. H. (2000). Antimicrobial Food Packaging. *Food Technology*, 54(3), 56–65.
- [103] Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 113-126.
- [104] Goldberg, S., Doyle, R. J., & Rosenberg, M. (1990). Mechanism of enhancement of microbial cell hydrophobicity by cationic polymers. *Journal of Bacteriology*, 172(10), 5650-5654.
- [105] Halek, G. W., & GARG, A. (1988). Fungal inhibition by a fungicide coupled to an ionomeric film. *Journal of food safety*, 9(3), 215-222
- [106] Ouattara, B., Simard, R. E., Piette, G., Be'gin, A., & Holley, R. A. (2000b). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 139–148.
- [107] Weng, Y. M., & Chen, M. J. (1997). Sorbic anhydride as antimycotic additive in polyethylene food packaging films. *Food Science & Technology*, 30, 485–487.
- [108] Weng, Y. M., & Hotchkiss, J. H. (1993). Anhydrides as antimycotic agents added to polyethylene films for food packaging. *Packaging Technology & Science*, 6, 123–128.
- [109] Chen, M.-C., Yeh, G. H.-C., & Chiang, B.-H. (1996). Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. *Journal of Food Processing and Preservation*, 20, 379–390.
- [110] Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. (2001). Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein- based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. *Journal of Food Science*, 66(6), 865–870.
- [111] Siragusa, G. R., & Dickinson, J. S. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* on beef tissue by application of organic acids immobilized in a calcium gel. *Journal of Food Science*, 57, 293–296.
- [112] Padgett, T., Han, I. Y., & Dawson, P. L. (2000). Effect of lauric acid addition on the antimicrobial efficacy and water permeability of corn zein films containing nisin. *Journal of Food Processing and Preservation*, 24, 423–432.

- [113] Hoffman, K. L., Han, I. Y., & Dawson, P. L. (2001). Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin, lauric acid and EDTA. *Journal of Food Protection*, 64, 885–889.
- [114] Ouattara, B., Simard, R. E., Piette, G., Be'gin, A., & Holley, R. A. (2000a). Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. *Journal of Food Science*, 65(5), 768–773.
- [115] Vojdani, F., & Torres, J. A. (1990). Potassium sorbate permeability of methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose coatings: effect of fatty acid. *Journal of Food Science*, 55, 841–846.
- [116] RICO-PEÑA, D. C., & TORRES, J. A. (1991). Sorbic acid and potassium sorbate permeability of an edible methylcellulose-palmitic acid film: water activity and pH effects. *Journal of food science*, 56(2), 497-499.
- [117] Baron, J. K., & Sumner, S. S. (1993). Antimicrobial containing edible films as an inhibitory system to control microbial growth on meat products. *Journal of Food Protection*, 56, 916-921.
- [118] Han, J. H. (1996). Modeling the inhibition kinetics and the mass transfer of controlled releasing potassium sorbate to develop an antimicrobial polymer for food packaging.
- [119] Han, J. H., & Floros, J. D. (1997). Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *Journal of Plastic Film & Sheeting*, 13(4), 287-298
- [120] Fortunati, E., Armentano, I., Zhou, Q., Iannoni, A., Saino, E., Visai, L., & Kenny, J. M. (2012). Multifunctional bionanocomposite films of poly (lactic acid), cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, 87(2), 1596-1605.
- [121] Field, C. E., Pivarnik, L. F., Barnett, S. M., & Rand Jr, A. G. (1986). Utilization of glucose oxidase for extending the shelf-life of fish. *Journal of Food Science*, 51(1), 66-70.
- [122] Daeschel, M. A., MCGUIRE, J., & AL-MAKHLAFI, H. A. M. O. O. D. (1992). Antimicrobial activity of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrophobic silicon surfaces. *Journal of Food Protection*, 55(9), 731-735
- [123] Padgett, T., Han, I. Y., & Dawson, P. L. (1998). Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. *Journal of food protection*, 61(10), 1330-1335

- [124] Natrajan, N., & Sheldon, B. W. (2000). Efficacy of nisin-coated polymer films to inactivate *Salmonella typhimurium* on fresh broiler skin. *Journal of Food Protection*, 63(9), 1189-1196.
- [125] COMA, V., Sebti, I., Pardon, P., Deschamps, A., & Pichavant, F. H. (2001). Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*, 64(4), 470-475.
- [126] Ko, S., Janes, M. E., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2001). Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science*, 66(7), 1006-1011.
- [127] MING, X., WEBER, G. H., AYRES, J. W., & SANDINE, W. E. (1997). Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *Journal of Food Science*, 62(2), 413-415.
- [128] Weng, Y. M., & HOTCHKISS, J. H. (1992). Inhibition of surface molds on cheese by polyethylene film containing the antimycotic imazalil. *Journal of Food Protection*, 55(5), 367-369.
- [129] Gómez-Estaca, J., Lopez-de-Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., & Gavara, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1), 42-51.
- [130] Pineros-Hernandez, D., Medina-Jaramillo, C., López-Córdoba, A., & Goyanes, S. (2017). Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 63, 488-495.
- [131] Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T., & Tatematsu, M. (1986). Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 24(10-11), 1071-1082.
- [132] Conner, D. E. (1993). Naturally occurring compounds. *Antimicrobials in foods*, 441-468.
- [133] Nychas, G. J. E. (1995). Natural antimicrobials from plants. In *New methods of food preservation* (pp. 58-89). Springer, Boston, MA.
- [134] Persico, P., Ambrogi, V., Carfagna, C., Cerruti, P., Ferrocino, I., & Mauriello, G. (2009). Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging. *Polymer Engineering & Science*, 49(7), 1447-1455.

- [135] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Quintavalla, S., & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat science*, 62(3), 373-380. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- [136] Quintavalla, S., & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat science*, 62(3), 373-380
- [137] de Dicastillo, C. L., Bustos, F., Guarda, A., & Galotto, M. J. (2016). Cross-linked methyl cellulose films with murta fruit extract for antioxidant and antimicrobial active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 60, 335-344.
- [138] Galotto, M. J., Guarda, A., & Lopez de Dicastillo, C. (2015). Antimicrobial active polymers in food packaging. *Functional Polymers in Food Science*; Cirillo, G., Iemma, F., Gianfranco Spirizzi, U., Eds, 323-353.
- [139] Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., & Guo, Z. (1985). Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the world health organization*, 63(6), 965.
- [140] Bhar, H., & Balouk, A. (2011). Les plantes aromatiques et medecinales, Ces plantes odorantes qui soulagent la douleur. *L'espace marocain*, 68(2), 20-27.
- [141] Bermness L., Larousse, 2005. *Plantes Aromatiques et Médicinales*
- [142] Chevallier A., Larousse 2001. *Encyclopedia of Médicinal Plants (2nd Edition)*
- [143] Agro-services/apia, *La culture des plantes aromatiques et médicinales : Document de synthèse*, 2003, 120-125.
- [144] M. Tabet, Z. Luçon, A. Ziane Cherif, J. Lapujade, L. Ammouche, *Focus sur l'agro-Alimentaire en Tunisie*, EuroMed@Change, 2013, 8-10.
- [145] Abou Sarra, *La filière des plantes aromatiques et médicinales est porteuse*, 2013.
- [146] T. Ben Abdelkader, *Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés terpéniques volatils des lavandes ailées, Lavandula stoechas sensu lato, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique*, Thèse de l'Ecole Normale supérieure, Kouba-Alger, 2012.
- [147] Association Française de Normalisation, *Recueil de normes Françaises "Huiles essentielles"*, AFNOR, Paris. AFNOR N F T 75-006, 1986.

- [148] L.R. Hernandez Ochoa, Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « solvant/actif » d'origine végétale, Thèse de l'Institut Nationale Polytechnique, Toulouse, France, 2005.
- [149] M.J. Népomuscène, Caractérisation des huiles essentielles du bleuet nain, *vaccinium angustifolium aiton*, Thèse Magistrale, Université du Québec à Chicoutimi, Canada, 1995.
- [150] Hassiotis, C. N. (2010). Chemical compounds and essential oil release through decomposition process from *Lavandula stoechas* in Mediterranean region. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(4), 493-501
- [151] Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- [152] K. Nait Achour, Etude de la composition chimique des essences de quatre espèces d'*Eucalyptus* poussant dans la région de Tizi-Ouzou, Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, 2012,18.
- [153] S. Djeddi, Les huiles essentielles « des mystérieux métabolites secondaires », 2012, 33-45.
- [154] Bishop, C. D. (1995). Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (maiden amp; Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. *Journal of Essential Oil Research*, 7(6), 641-644.
- [155] Azzouz, M. A., & Bullerman, L. B. (1982). Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *Journal of Food Protection*, 45(14), 1298-1301.
- [156] Akgül, A., & Kivanc, M. (1988). Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 6(3), 263-268.
- [157] Jayashree, T., & Subramanyam, C. (1999). Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Letters in Applied Microbiology*, 28(3), 179-183.
- [158] Mari, M., Bertolini, P., & Pratella, G. C. (2003). Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 94(5), 761-766

- [159] Pandey, R., Kalra, A., Tandon, S., Mehrotra, N., Singh, H. N., & Kumar, S. (2000). Essential oils as potent source of nematicidal compounds. *Journal of Phytopathology*, 148(7-8), 501-502
- [160] Pessoa, L. M., Morais, S. M., Bevilaqua, C. M. L., & Luciano, J. H. S. (2002). Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 109(1-2), 59-63.
- [161] Konstantopoulou, I., Vassilopoulou, L., Mavragani-Tsipidou, P., & Scouras, Z. G. (1992). Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven Greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. *Experientia*, 48(6), 616-619
- [162] Karpouhtsis, I., Pardali, E., Feggou, E., Kokkini, S., Scouras, Z. G., & Mavragani-Tsipidou, P. (1998). Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1111-1115
- [163] Guenther, E., 1948. *The Essential Oils*. D. Van Nostrand, New York.
- [164] Mahmoud, S. S., & Croteau, R. B. (2002). Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in plant science*, 7(8), 366-373.
- [165] Anderson, R. A., Zhan, Z., Luo, R., Guo, X., Guo, Q., Zhou, J., & Stoecker, B. J. (2016). Cinnamon extract lowers glucose, insulin and cholesterol in people with elevated serum glucose. *Journal of traditional and complementary medicine*, 6(4), 332-336.
- [166] Costa, D. C., Costa, H. S., Albuquerque, T. G., Ramos, F., Castilho, M. C., & Sanches-Silva, A. (2015). Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 336-354.
- [167] Kim, J. E., Son, J. E., Jeong, H., Kim, D. J., Seo, S. K., Lee, E., & Lee, K. W. (2015). A novel cinnamon-related natural product with Pim-1 inhibitory activity inhibits leukemia and skin cancer. *Cancer research*, canres-3655.
- [168] Ribeiro-Santos, R., Carvalho-Costa, D., Cavaleiro, C., Costa, H. S., Albuquerque, T. G., Castilho, M. C., & Sanches-Silva, A. (2015). A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 355-368
- [169] Bajpai, V. K., Baek, K. H., & Kang, S. C. (2012). Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45(2), 722-734

- [170] Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of applied microbiology*, 106(4), 1343-1349.
- [171] Shapira, R., & Mimran, E. (2007). Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants exhibiting altered response to thymol. *Microbial Drug Resistance*, 13(3), 157-165
- [172] Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, 90(6), 2580-2595.
- [173] Shelef, L. A. (1983). Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*, 6, 24-29.
- [174] Chao, S. C., Young, D. G., & Oberg, C. J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of essential oil research*, 12(5), 639-649.
- [175] Grysole, J. (2004). La commercialisation des huiles essentielles. *Manuel pratique des huiles essentielles: de la plante à la commercialisation*, 139-141.
- [176] El Haib, A. (2011). Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- [177] Confédération Suisse, 2009. Les huiles essentielles. Département fédéral de l'intérieur DFI, Office fédéral de la santé publique OFSP, Unité de direction Protection des consommateurs.
- [178] Turgeon M., 2001. Profil des produits forestiers première transformation : huiles essentielles. Ministère des Ressources naturelles, Secteur des forêts, Direction du développement de l'industrie des produits forestiers. Québec
- [179] R. Poirot, *Méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale*, 2007, 8.
- [180] Piochon, M. (2008). Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Université du Québec à Chicoutimi.

- [181] Bruneton, J. (2009). Menthe in: Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., Tec & Doc, Paris (pp. 631-638). ISBN 978-2-7430-1188-8.
- [182] Figueredo, G. (2007). Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II)
- [183] Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(2), 105-113.
- [184] Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of food engineering*, 67(1-2), 21-33.
- [185] Hauthal, W. H. (2001). Advances with supercritical fluids. *Chemosphere*, 43(1), 123-135
- [186] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475
- [187] A.R. Suthar, J.V. Piyush, Essential oils from plants: A Review, *International Journal of Chemtech Applications*, 2013, 2 (1), 129-134
- [188] Choi, S. J., Decker, E. A., Henson, L., Popplewell, L. M., & McClements, D. J. (2009). Stability of citral in oil-in-water emulsions prepared with medium-chain triacylglycerols and triacetin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(23), 11349-11353
- [189] Yayi, E., Gbenou, J. D., Ahoussi, L. A., Moudachirou, M., & Chalchat, J. C. (2004). *Ocimum. gratissimum* L., siège de variations chimiques complexes au cours du développement. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 1013-1018
- [190] Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food chemistry*, 108(3), 986-995
- [191] Khajeh, M., Yamini, Y., Bahramifar, N., Sefidkon, F., & Pirmoradei, M. R. (2005). Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*, 91(4), 639-644.

- [192] Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International journal of food microbiology*, 156(1), 7-17.
- [193] Riahi, L., Chograni, H., Elferchichi, M., Zaouali, Y., Zoghلامي, N., & Mliki, A. (2013). Variations in Tunisian wormwood essential oil profiles and phenolic contents between leaves and flowers and their effects on antioxidant activities. *Industrial crops and products*, 46, 290-296.
- [194] R.P. Adams, *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 4<sup>th</sup> edition, 1995.
- [195] Bouchonnet, S. (2009). *La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse* (p. 194). Tec & Doc Lavoisier.
- [196] Food and Drug Administration (FDA). (2016). Code of federal regulations (CFR). Title 21: Food and drugs. Chapter I e food and drug administration, department of health and human services, subchapter B e food for human consumption (continued), Part 182 e substances generally recognized as safe (GRAS), subpart a e general provisions, subpart 182.20 e essential oils, oleoresins, and natural extractives. Office of the Federal Register, Washington, (Revised April, 2016). Retrieved from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.20>. Access: October 2016. 05 Juin 2018
- [197] Milpied-Homsy, B. (2009). *Progrès en dermato-allergologie: Bordeaux 2009* (Vol. 15). John Libbey Eurotext.
- [198] Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 21(9), 1199-1218.
- [199] Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2010). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate polymers*, 82(2), 277-283
- [200] Demyttenaere JCR, Recent EU: Legislation on flavors and fragrances and its impact on essential oils. In *Handbook of Essential Oils. Science, Technology, and Applications*. Edited by Baser KHC, Buchbauer G. Taylor & Francis Group; 2010: 917-947.

- [201] Ganiari, S., Choulitoudi, E., & Oreopoulou, V. (2017). Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 70-82
- [202] Jatisatienr, C., & Tragoolpua, K. (1996). Effect of the extract from eight species of medicinal plants on growth of selected plant pathogenic molds and dermatophytes. *Beitraege zur Zuechtungsforschung (Germany)*
- [203] Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(1), 41-48
- [204] Gómez-Guillén, M. C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A., & Montero, P. (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1133-1143.
- [205] Wang, S., Marcone, M. F., Barbut, S., & Lim, L. T. (2012). Fortification of dietary biopolymers-based packaging material with bioactive plant extracts. *Food Research International*, 49(1), 80-91.
- [206] P. Iserin, M. Masson, J.P. Restellini, E. Ybert, A. De Laage de Meux, F. Moulard, E. Zha, R. De la Roque, O. De la Roque, P. Vican, T. Deelesalle-Féat, M. Biaujeaud, J. Ringuet, J. Bloth, A. Botrel, Larousse, encyclopédie des plantes médicinales : Identification, préparation, soins, Ed Larousse, 2001, 10-12.
- [207] .B. Pandey, S.I. Rizv, Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2009, 2 (5), 270-278.
- [208] H. Tapiero, G.N. Ba, P. Couvreur, K.D, Tew, Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies, *Biomed. Pharmacother*, 2002, 56 (5), 215-222.
- [209] C.A. Uthurry, D. Hevia, C. Gomez-Cordoves, Role of honey polyphenols in health, *Journal of Api-Product and Api-Medical Science*, 2011, 3, 141-159.
- [210] A. King, G. Young, Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals, *Journal of the American dietetic association*, 1999, 99, 213-218.

- [211] J.Wang, G.Mazza, Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages, *J. Agric. Food Chem*, **2002**, 50, 4183–4189.
- [212] Salafranca, J., Pezo, D., & Nerín, C. (2009). Assessment of specific migration to aqueous simulants of a new active food packaging containing essential oils by means of an automatic multiple dynamic hollow fibre liquid phase microextraction system. *Journal of Chromatography A*, 1216(18), 3731-3739.
- [213] Nerin, C., Tovar, L., & Salafranca, J. (2008). Behaviour of a new antioxidant active film versus oxidizable model compounds. *Journal of food Engineering*, 84(2), 313-320.
- [214] European Commission. (2009). Commission Regulation (EC) No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal of the European Union*, 135, 3-11.
- [215] Ghanbarzadeh, B., & Oromiehi, A. R. (2008). Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: Barrier, mechanical properties and AFM analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(2), 209-215
- [216] Ramos, Ó. L., Reinas, I., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Cerqueira, M. A., Pereira, R. N., & Malcata, F. X. (2013). Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 110-122.
- [217] López, P., Sánchez, C., Batlle, R., & Nerín, C. (2007). Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8814-8824
- [218] Atef, M., Rezaei, M., & Behrooz, R. (2015). Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar-cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil. *Food Hydrocolloids*, 45, 150-157.
- [219] Solano, A. C. V., & de Rojas Gante, C. (2012). Two different processes to obtain antimicrobial packaging containing natural oils. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2522-2528.

- [220] Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of food science*, 68(2), 408-420
- [221] Suppakul, P., Sonneveld, K., Bigger, S. W., & Miltz, J. (2008). Efficacy of polyethylene-based antimicrobial films containing principal constituents of basil. *LWT-Food Science and Technology*, 41(5), 779-788.
- [222] Bashi, D. S., Fazly Bazzaz, B. S., Sahebkar, A., Karimkhani, M. M., & Ahmadi, A. (2012). Investigation of optimal extraction, antioxidant, and antimicrobial activities of *Achillea biebersteinii* and *A. wilhelmsii*. *Pharmaceutical Biology*, 50(9), 1168-1176.
- [223] Muriel-Galet, V., Cran, M. J., Bigger, S. W., Hernández-Muñoz, P., & Gavara, R. (2015). Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of oregano essential oil and green tea extract components. *Journal of Food Engineering*, 149, 9-16.
- [224] Jo, H. J., Park, K. M., Na, J. H., Min, S. C., Park, K. H., Chang, P. S., & Han, J. (2015). Development of anti-insect food packaging film containing a polyvinyl alcohol and cinnamon oil emulsion at a pilot plant scale. *Journal of Stored Products Research*, 61, 114-118.
- [225] Seydim, A. C., & Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food research international*, 39(5), 639-644
- [226] Pranoto, Y., Salokhe, V. M., & Rakshit, S. K. (2005). Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food research international*, 38(3), 267-272.
- [227] Gamage, G. R., Park, H. J., & Kim, K. M. (2009). Effectiveness of antimicrobial coated oriented polypropylene/polyethylene films in sprout packaging. *Food Research International*, 42(7), 832-839.
- [228] Jouki, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Koocheki, A. (2014). Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, 36, 9-19

- [229] BOTREL, D. A., Soares, N. D. F. F., Espitia, P. J. P., de Sousa, S., & Renhe, I. R. T. (2015). Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. *Ceres*, 57(3), 283-291
- [230] Otero, V., Becerril, R., Santos, J. A., Rodríguez-Calleja, J. M., Nerín, C., & García-López, M. L. (2014). Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157:H7 strains in vitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). *Food Control*, 42, 296-302.
- [231] Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., & Garrigós, M. C. (2012). Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal of Food Engineering*, 109(3), 513-519.
- [232] Shavisi, N., Khanjari, A., Basti, A. A., Misaghi, A., & Shahbazi, Y. (2017). Effect of PLA films containing propolis ethanolic extract, cellulose nanoparticle and *Ziziphora clinopodioides* essential oil on chemical, microbial and sensory properties of minced beef. *Meat science*, 124, 95-104.
- [233] Persico, P., Ambrogi, V., Carfagna, C., Cerruti, P., Ferrocino, I., & Mauriello, G. (2009). Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging. *Polymer Engineering & Science*, 49(7), 1447-1455.
- [234] Srinaovaratkul, S. (2009). Efficacy of antimicrobial and antioxidant films containing natural plant extracts for food packaging (Doctoral dissertation, Master Thesis, Bangkok: Kasetsart University).
- [235] Avila-Sosa, R., Palou, E., Munguía, M. T. J., Nevárez-Moorillón, G. V., Cruz, A. R. N., & López-Malo, A. (2012). Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International journal of food microbiology*, 153(1-2), 66-72.
- [236] Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2013). In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control*, 30(2), 386-392.

- [237] Pranoto, Y., Rakshit, S. K., & Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT-Food Science and Technology*, 38(8), 859-865.
- [238] Salmieri, S., & Lacroix, M. (2006). Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 10205-10214.
- [239] Muthukumarasamy, P., Han, J. H., & Holley, R. A. (2003). Bactericidal effects of *Lactobacillus reuteri* and allyl isothiocyanate on *Escherichia coli* O157: H7 in refrigerated ground beef. *Journal of Food Protection*, 66(11), 2038-2044.
- [240] Suppakul P and Dejsuk N (2010), 'Packaging of fresh chicken fillets by using low density polyethylene films coated with antimicrobial cellulose ether solutions', donnés non publié
- [241] Han, J., Castell-Perez, M. E., & Moreira, R. G. (2007). The influence of electron beam irradiation of antimicrobial-coated LDPE/polyamide films on antimicrobial activity and film properties. *LWT-Food Science and Technology*, 40(9), 1545-1554.
- [242] Gutierrez, L., Escudero, A., Batlle, R., & Nerín, C. (2009). Effect of mixed antimicrobial agents and flavors in active packaging films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8564-8571.
- [243] Suppakul, P., Sonneveld, K., Bigger, S. W., & Miltz, J. (2008). Efficacy of polyethylene-based antimicrobial films containing principal constituents of basil. *LWT-Food Science and Technology*, 41(5), 779-788.
- [244] Tippayatum, P., Fuongfuchat, A., Jangchud, K., Jangchud, A., & Chonhenchob, V. (2009). Development of antimicrobial EVA/LDPE films incorporated with thymol and eugenol. *Food Manu Eff*, 2(2), 1-8.
- [245] Oussalah, M., Caillet, S., Salmieri, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Antimicrobial effects of alginate-based films containing essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* present in bologna and ham. *Journal of food protection*, 70(4), 901-908

- [246] Melo, A. A. M. D., Geraldine, R. M., Silveira, M. F. A., Torres, M. C. L., Fernandes, T. H., & Oliveira, A. N. D. (2012). Microbiological quality and other characteristics of refrigerated chicken meat in contact with cellulose acetate-based film incorporated with rosemary essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1419-1427.
- [247] Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2010). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate polymers*, 82(2), 277-283.
- [248] Hafsa, J., ali Smach, M., Khedher, M. R. B., Charfeddine, B., Limem, K., Majdoub, H., & Rouatbi, S. (2016). Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 356-364.
- [249] Gómez-Estaca, J., De Lacey, A. L., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.
- [250] Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2013). Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 74-84.
- [251] Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Ojagh, S. M. & Khaksar, R. (2013). Characterization of antioxidant-antimicrobial  $\kappa$ -carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *International journal of biological macromolecules*, 52, 116-124
- [252] Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2004). Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(18), 5598-5605
- [253] Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K., & Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat science*, 86(2), 283-288.

- [254] Hoque, M. S., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2011). Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1085-1097.
- [255] Park, S. I., & Zhao, Y. (2006). Development and characterization of edible films from cranberry pomace extracts. *Journal of food science*, 71(2), E95-E101.
- [256] Siripatrawan, U., & Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 770-775.
- [257] de Dicastillo, C. L., Bustos, F., Guarda, A., & Galotto, M. J. (2016). Cross-linked methyl cellulose films with murta fruit extract for antioxidant and antimicrobial active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 60, 335-344.
- [258] Gómez-Estaca, J., Bravo, L., Gómez-Guillén, M. C., Alemán, A., & Montero, P. (2009). Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. *Food Chemistry*, 112(1), 18-25.
- [259] Sakamoto, S., Sato, K., Maitani, T., & Yamada, T. (1996). Analysis of components in natural food additive" grapefruit seed extract" by HPLC and LC/MS. *Eisei Shikenjo hokoku. Bulletin of National Institute of Hygienic Sciences*, (114), 38-42
- [260] Wang, L. F., & Rhim, J. W. (2016). Grapefruit seed extract incorporated antimicrobial LDPE and PLA films: effect of type of polymer matrix. *LWT-Food Science and Technology*, 74, 338-345.
- [261] Ha, J. U., Kim, Y. M., & Lee, D. S. (2001). Multilayered antimicrobial polyethylene films applied to the packaging of ground beef. *Packaging Technology and Science: An International Journal*, 14(2), 55-62.
- [262] Sivarooban, T., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41(8), 781-785.
- [263] Lim, G. O., Jang, S. A., & Song, K. B. (2010). Physical and antimicrobial properties of *Gelidium corneum*/nano-clay composite film containing grapefruit seed extract or thymol. *Journal of Food Engineering*, 98(4), 415-420.

- [264] Hong, S. I., Park, J. D., & Kim, D. M. (2000). Antimicrobial and physical properties of food packaging films incorporated with some natural compounds. *Food Science and Biotechnology*, 9(1), 38-42.
- [265] Del Nobile, M. A., Conte, A., Buonocore, G. G., Incoronato, A. L., Massaro, A., & Panza, O. (2009). Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. *Journal of Food Engineering*, 93(1), 1-6.
- [266] An, D. S., Hwang, Y. I., Cho, S. H., & Lee, D. S. (1998). Packaging of fresh curled lettuce and cucumber by using low density polyethylene films impregnated with antimicrobial agents. *Journal-Korean Society of Food Science and Nutrition*, 27, 675-681.
- [267] Chung, S. K., Cho, S. H., & Lee, D. S. (1998). Modified atmosphere packaging of fresh strawberries by antimicrobial plastic films. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 30(5), 1140-1145
- [268] Zhang, C., Guo, K., Ma, Y., Ma, D., Li, X., & Zhao, X. (2010). Incorporations of blueberry extracts into soybean-protein-isolate film preserve qualities of packaged lard. *International journal of food science & technology*, 45(9), 1801-1806.
- [269] Wang, S., Marcone, M., Barbut, S., & Lim, L. T. (2012). The impact of anthocyanin-rich red raspberry extract (ARRE) on the properties of edible soy protein isolate (SPI) films. *Journal of food science*, 77(4), C497-C505.
- [270] Gómez-Estaca, J., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*, 92(1), 78-85.
- [271] André, C., Castanheira, I., Cruz, J. M., Paseiro, P., & Sanches-Silva, A. (2010). Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(5), 229-246
- [272] Cruz, J. M., Silva, A. S., García, R. S., Franz, R., & Losada, P. P. (2008). Studies of mass transport of model chemicals from packaging into and within cheeses. *Journal of Food Engineering*, 87(1), 107-115.
- [273] Silva, A. S., Freire, J. C., Franz, R., & Losada, P. P. (2008). Mass transport studies of model migrants within dry foodstuffs. *Journal of cereal science*, 48(3), 662-669.

- [274] Sendón, R., Sanches-Silva, A., Bustos, J., Martín, P., Martínez, N., & Cirugeda, M. E. (2012). Detection of migration of phthalates from agglomerated cork stoppers using HPLC-MS/MS. *Journal of separation science*, 35(10-11), 1319-1326
- [275] LaCoste, A., Schaich, K. M., Zumbrennen, D., & Yam, K. L. (2005). Advancing controlled release packaging through smart blending. *Packaging Technology and Science: An International Journal*, 18(2), 77-87.
- [276] Rardniyom, C. (2009). Development of multi-layer films containing natural antimicrobial agents (Doctoral dissertation, Victoria University).
- [277] Zinoviadou, K. G., Koutsoumanis, K. P., & Biliaderis, C. G. (2009). Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science*, 82(3), 338-345.
- [278] Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2013). Migration of antimicrobial agents from starch-based films into a food simulant. *LWT-Food Science and Technology*, 50(2), 432-438
- [279] ANVISA. (2010). Dispoee sobre migração em materiais, embalagens e equipamentos plasticos destinados a entrar em contato com alimentos. In *Diario Oficial da Uniao (Vol. Resolução )*.
- [280] Agencia Nacional de Vigil^ancia Sanit\_aria. (2001). Aprova o regulamento t\_ecnico Criterios gerais e classificação de materiais para embalagens e equipamentos em contato com alimento. *Diario Oficial Da Uniao, Resolução*.
- [281] Agencia Nacional de Vigilancia Sanit\_aria. (2008). Resolução no 17, de 17 de março de 2008. *Diario Oficial Da Uniao*.
- [282] Jin, T., & Zhang, H. (2008). Biodegradable polylactic acid polymer with nisin for use in antimicrobial food packaging. *Journal of Food Science*, 73(3), M127-M134.
- [283] Fortunati, E., Armentano, I., Zhou, Q., Iannoni, A., Saino, E., Visai, L. & Kenny, J. M. (2012). Multifunctional bionanocomposite films of poly (lactic acid), cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, 87(2), 1596-1605.

- [284] Byun, Y., Kim, Y. T., & Whiteside, S. (2010). Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with  $\alpha$ -tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder. *Journal of Food Engineering*, 100(2), 239-244.
- [285] Hwang, S. W., Shim, J. K., Selke, S. E., Soto-Valdez, H., Matuana, L., Rubino, M., & Auras, R. (2012). Poly (L-lactic acid) with added  $\alpha$ -tocopherol and resveratrol: optical, physical, thermal and mechanical properties. *Polymer International*, 61(3), 418-425.
- [286] Arrieta, M. P., López, J., Ferrándiz, S., & Peltzer, M. A. (2013). Characterization of PLA-limonene blends for food packaging applications. *Polymer Testing*, 32(4), 760-768
- [287] Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., & Garrigós, M. C. (2014). Development of novel nano-biocomposite antioxidant films based on poly (lactic acid) and thymol for active packaging. *Food chemistry*, 162, 149-155.
- [288] Llana-Ruiz-Cabello, M., Pichardo, S., Baños, A., Núñez, C., Bermúdez, J. M., Guillamón, E. & Cameán, A. M. (2015). Characterisation and evaluation of PLA films containing an extract of *Allium* spp. to be used in the packaging of ready-to-eat salads under controlled atmospheres. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1354-1361.
- [289] Fortunati, E., Luzi, F., Puglia, D., Dominici, F., Santulli, C., Kenny, J. M., & Torre, L. (2014). Investigation of thermo-mechanical, chemical and degradative properties of PLA-limonene films reinforced with cellulose nanocrystals extracted from *Phormium tenax* leaves. *European Polymer Journal*, 56, 77-91.
- [290] Samsudin, H., Soto-Valdez, H., & Auras, R. (2014). Poly (lactic acid) film incorporated with marigold flower extract (*Tagetes erecta*) intended for fatty-food application. *Food Control*, 46, 55-66
- [291] Muller, J., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2017). Poly (lactic) acid (PLA) and starch bilayer films, containing cinnamaldehyde, obtained by compression moulding. *European Polymer Journal*, 95, 56-70
- [292] Pineros-Hernandez, D., Medina-Jaramillo, C., López-Córdoba, A., & Goyanes, S. (2017). Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 63, 488-495.

- [293] Chang-Bravo, L., López-Córdoba, A., & Martino, M. (2014). Biopolymeric matrices made of carrageenan and corn starch for the antioxidant extracts delivery of Cuban red propolis and yerba mate. *Reactive and Functional Polymers*, 85, 11-19.
- [294] Medina Jaramillo, C., Gonzalez Seligra, P., Goyanes, S., Bernal, C., & Famá, L. (2015). Biofilms based on cassava starch containing extract of yerba mate as antioxidant and plasticizer. *Starch-Stärke*, 67(9-10), 780-789.
- [295] Silva-Weiss, A., Bifani, V., Ihl, M., Sobral, P. J. D. A., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract. *Food hydrocolloids*, 31(2), 458-466.
- [296] Wilhelm, H. M., Sierakowski, M. R., Souza, G. P., & Wypych, F. (2003). Starch films reinforced with mineral clay. *Carbohydrate Polymers*, 52(2), 101-110.
- [297] Kechichian, V., Ditchfield, C., Veiga-Santos, P., & Tadini, C. C. (2010). Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. *LWT-Food Science and Technology*, 43(7), 1088-1094.
- [298] Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2013). Physical properties and antioxidant capacity of starch–sodium caseinate films containing lipids. *Journal of Food Engineering*, 116(3), 695-702.
- [299] Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2012). Effect of sodium caseinate on properties and ageing behaviour of corn starch based films. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 265-271.
- [300] Pelissari, F. M., Grossmann, M. V., Yamashita, F., & Pineda, E. A. G. (2009). Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch–chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(16), 7499-7504.
- [301] Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2012). Effect of re-crystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 302-310.

- [302] Ghasemlou, M., Aliheidari, N., Fahmi, R., Shojaee-Aliabadi, S., Keshavarz, B., Cran, M. J., & Khaksar, R. (2013). Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. *Carbohydrate polymers*, 98(1), 1117-1126
- [303] Moreno, O., Atarés, L., & Chiralt, A. (2015). Effect of the incorporation of antimicrobial/antioxidant proteins on the properties of potato starch films. *Carbohydrate polymers*, 133, 353-364.
- [304] Jaramillo, C. M., Gutiérrez, T. J., Goyanes, S., Bernal, C., & Famá, L. (2016). Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films. *Carbohydrate polymers*, 151, 150-159.
- [305] Chen, S., Wu, J. G., & Chuo, B. Y. (2003). Antioxidant and antimicrobial activities in the catechins impregnated PVA-starch film. In 2003 IFT Annual Meeting-Chicago,
- [306] Boussaada, O., Ammar, S., Saidana, D., Chriaa, J., Chraif, I., Daami, M., & Mighri, Z. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from capitula and aerial parts of *Rhaponticum acaule* DC growing wild in Tunisia. *Microbiological Research*, 163(1), 87-95
- [307] Kadri, A., Zarai, Z., Chobba, I. B., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., & Gdoura, R. (2011). Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from the South-Western of Tunisia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(29), 6502-6508.
- [308] Monographie des plantes aromatiques et médicinales du maroc. mrojet pam : Intégration de la biodiversité dans la chaîne de valeurs des plantes aromatiques et médicinales méditerranéennes au Maroc.
- [309] Tela Botanica. *Rosmarinus officinalis* L. Romarin officinal. Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France par Benoît Bock. BDNFF v4.02.
- [310] Zaouali, Y., Bouzaine, T., & Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3144-3152.
- [311] Lawrence, B.M., 1997. Progress in essential oils: rosemary oil. *Perfum Flavor* 22 (5), 71

- [312] Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., & Casanova, J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance journal*, 17(1), 15-19.
- [313] Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Čebović, T., Vukmirović, S., & Mikov, M. (2014). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 225.
- [314] Ayadi, S., Jerribi, C., & Abderrabba, M. (2015). Extraction et étude des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* cueillie dans trois régions différentes de la Tunisie
- [315] Abd El-latif Gharib, F., & A.Teixeira da Silva. J(2012). Composition, total phenolic content and antioxidant activity of the essential oils of four lamiaceae herbs. *Medicinal and Aromatic plants Science and Biotechnology*, 7(1),9-27.
- [316] Celiktas, O. Y., Kocabas, E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., & Baser, K. H. C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100(2), 553-559.
- [317] Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F., & Araújo, M. E. M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food chemistry*, 103(3), 778-786.
- [318] Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., & Jovin, E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(19), 7879-7885.
- [319] Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC complementary and alternative medicine*, 6(1), 39.
- [320] Haida.S, Essadik.F.Z, Kribii.A, Habsaoui.A, Ounine.K, Benmoumen.A and Kribii.a (2015). Study of chemical composition of rosemary essential oil from western morocco and evaluation of antioxidant and antibacterial activity of its extracts, 4(7), 307-323.
- [321] EMA, H. (2010). Community herbal monograph on *Rosmarinus officinalis* L., folium. EMA/HMPC/13633/2009, 15 July.

- [322] Takaki, I., Bersani-Amado, L. E., Vendruscolo, A., Sartoretto, S. M., Diniz, S. P., Bersani-Amado, C. A., & Cuman, R. K. N. (2008). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. *Journal of medicinal food*, 11(4), 741-746.
- [323] Machado, D. G., Cunha, M. P., Neis, V. B., Balen, G. O., Colla, A., Bettio, L. E., & Pizzolatti, M. G. (2013). Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chemistry*, 136(2), 999-1005
- [324] Moss, M., Cook, J., Wesnes, K., & Duckett, P. (2003). Aromas of rosemary and lavender essential oils differentially affect cognition and mood in healthy adults. *International Journal of Neuroscience*, 113(1), 15-38.
- [325] Slameňová, D., Horváthová, E., Kováčiková, Z., Kozics, K., & Hunáková, Ľ. (2011). Essential rosemary oil protects testicular cells against DNA-damaging effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and DMNQ. *Food chemistry*, 129(1), 64-70.
- [326] Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y., & Efferth, T. (2012). Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules*, 17(3).
- [327] Erkan, N., Ayranci, G., & Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110(1), 76-82.
- [328] Vasile, C., Sivertsvik, M., Miteluț, A. C., Brebu, M. A., Stoleru, E., Rosnes, J. T., & Irimia, A. (2017). Comparative Analysis of the Composition and active property evaluation of certain essential oils to assess their potential applications in active food packaging. *Materials*, 10(1), 45.
- [329] FADILI, K., AMALICH, S., N'DEDIANHOUA, S. K., Bouachrine, M., MAHJOUBI, M., EL HILALI, F., & ZAIR, T. (2015). Teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc: *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Satureioides* [Polyphenols content and antioxidant activity of two species from Moroccan High Atlas: *Rosmarinus officinalis* and *Thymus satureioides*].

- [330] Cuvelier, M. E., Berset, C., & Richard, H. (1994). Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and food chemistry*, 42(3), 665-669
- [331] Al-Sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M., & Sena, P. (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials.
- [332] Cheung, S., & Tai, J. (2007). Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncology reports*, 17(6), 1525-1531.
- [333] Danilenko, M., Wang, Q., Wang, X., Levy, J., Sharoni, Y., & Studzinski, G. P. (2003). Carnosic acid potentiates the antioxidant and prodifferentiation effects of  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D3 in leukemia cells but does not promote elevation of basal levels of intracellular calcium. *Cancer research*, 63(6), 1325-1332
- [334] Huang, S. S., & Zheng, R. L. (2006). Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. *Cancer letters*, 239(2), 271-280.
- [335] Wannes, W. A., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M. B., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., & Marzouk, B. (2010). Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and chemical toxicology*, 48(5), 1362-1370.
- [336] BOUAINE, A., (2017) projet de fin d'étude : Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles extraites des deux plantes aromatiques et médicinales: Lentisque et Myrte.
- [337] Mrabet, C., MENAIFI, H., (2015) projet de fin d'étude : Etude phytochimique et évaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire de l'espèce: *Myrtus communis* L.
- [338] Lawrence BM (1990). Progress in essential oils. Myrtle oil. *Perfumer and Flavorist*, 15: 65-66.
- [339] Lawrence BM (1993). Progress in essential oils. Myrtle oil. *Perfumer and Flavorist*, 18: 52-55.
- [340] Lawrence BM (1996). Progress in essential oils. Myrtle oil. *Perfumer and Flavorist*, 21: 57-58.
- [341] Gauthier, R., Gourai, M., Bellakhdar, J., 1988. A propos de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. var. *italica* récolté au Maroc. I. Rendements et compositions durant un cycle végétatif annuel. *Rev. Mar. Pharm.* 4, 97-116.

- [342] Aidi Wannes, W., Mhamdi, B., Marzouk, B., 2007. Essential oil composition of two *Myrtus communis* L. varieties grown in North Tunisia. *Ital. J. Biochem.* 56, 180– 186.
- [343] Aidi Wannes, W., Mhamdi, B., Marzouk, B., 2009. GC comparative analysis of leaf essential oils from two myrtle varieties at different phenological stages. *Chromatographia* 69, 145–150.
- [344] Aidi Wannes, W., Mhamdi, B., Sriti, J., Marzouk, B., 2010. Changes in essential oil composition of Tunisian *Myrtus communis* var. *italica* during its vegetative cycle. *J. Essent. Oil Res.* 22, 13–18.
- [345] Garry, R.P., Chalchat, J.C., 1992. Les huiles essentielles de myrte du pourtour méditerranéen. *Rivista Ital. EPPOS (Numéro spéciale)*, 522–532.
- [346] Bradesi, P., Tomi, F., Casanova, J., Costa, J., & Bernardini, A. F. (1997). Chemical composition of myrtle leaf essential oil from Corsica (France). *Journal of essential oil Research*, 9(3), 283-288.
- [347] Pereira, P.C., Cebola, M.-J., Bernardo-Gil, M.G., 2009. Evolution of the yields and composition of essential oil from Portuguese myrtle (*Myrtus comunis* L.) through the vegetative cycle. *Molecules* 14, 3094–3105.
- [348] Jerkovic, I., Radonic, A., Borcic, I., 2002. Comparative study of leaf, fruit and flower essential oils from Croatian *Myrtus communis* L. during a one-year vegetative cycle. *J. Essent. Oil Res.* 14, 266–270.
- [349] Akin, M., Aktumsek, A., & Nostro, A. (2010). Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. *African Journal of Biotechnology*, 9(4).
- [350] Ouelhadj, A., Kahina, B., & Djenane, D. Chemical composition and Antifungal activity of the *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus* essential oils of Mediterranean regions in laboratory medium and Strawberry fruit.
- [351] Salvagnini, L. E., Oliveira, J. R. S., Santos, L. E. D., Moreira, R. R. D., & Pietro, R. C. L. (2008). Evaluation of the antibacterial activity of *Myrtus communis* L.(Myrtaceae) leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 241-244.
- [352] Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2006). Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, 67(12), 1249-1255.

- [353] Rasooli, I., Moosavi, M. L., Rezaee, M. B., & Jaimand, K. (2010). Susceptibility of microorganisms to *Myrtus communis* L. essential oil and its chemical composition. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 4, 127-133.
- [354] Derwich, E., Manar, A., Benziane, Z., & Boukir, A. (2010). GC/MS analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil isolated from leaf of *Pistacia lentiscus* growing in Morocco. *World Applied Sciences Journal*, 8(10), 1267-1276.
- [355] Randrianarivelo, R., Sarter, S., Odoux, E., Brat, P., Lebrun, M., Romestand, B., & Danthu, P. (2009). Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chemistry*, 114(2), 680-684
- [356] Amensour, M., Sendra, E., Abrini, J., Bouhdid, S., Perez-Alvarez, J. A., & Fernandez-Lopez, J. (2009). Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts. *Natural Product Communications*, 4(6), 819-824.
- [357] Touaibia, M., & Chaouch, F. Z. (2014). Pouvoir antioxydant des extraits de *Myrtus communis* L. obtenus in situ et in vitro. *Nature & Technology*, (10), 3.
- [358] Attia, R., Messaoud, C., Arraki, K., Zedet, A., Demougeot, C., Boussaïd, M., & Girard, C. (2018). Phytochemical screening and arginase inhibitory activity of extracts from several Tunisian medicinal plants. *South African Journal of Botany*
- [359] Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M. G., Faleiro, L., Rejeb, M. N., Neffati, M., & Pedro, L. G. (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food chemistry*, 105(1), 146-155
- [360] Saoud, I., Hamrouni, L., Hanana, M., Bouzid, S., & Khouja, M. L. (2010). Notes ethnobotanique et phytopharmacologique sur *Coridothymus capitatus* (L.) Reichenb. Fil. *Phytothérapie*, 8(6), 370-373.
- [361] Jamali, C. A., El Bouzidi, L., Bekkouche, K., Lahcen, H., Markouk, M., Wohlmuth, H., & Abbad, A. (2012). Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan *Thymus* species. *Chemistry & biodiversity*, 9(6), 1188-1197
- [362] Salah-Fatnassi, K. B. H., Slim-Bannour, A., Harzallah-Skhiri, F., Mahjoub, M. A., Mighri, Z., Chaumont, J. P., & Aouni, M. (2010). Activités antivirale et antioxydante in vitro d'huiles essentielles de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmans. & Link de Tunisie. *Acta Botanica Gallica*, 157(3), 433-444

- [363] Saoudi, S., Sifaoui, I., Chammem, N., Reyes-Batlle, M., López-Arencibia, A., Pacheco-Fernández, I., ... & Pinero, J. E. (2017). Anti-Acanthamoeba activity of Tunisian *Thymus capitatus* essential oil and organic extracts. *Experimental parasitology*, 183, 231-235.
- [364] Akrou, A., El Jani, H., Amouri, S., & Neffati, M. (2010). Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris* L., *Artemisia herba alba* Asso, & *Thymus capitatus* Hoff. et Link. growing wild in the Southern of Tunisia. *Recent Research in Science and Technology*, 2(1).
- [365] Bentes, J., Miguel, M. G., Monteiro, I., Costa, M., Figueired, A. C., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2009). Antioxidant activities of the essential oils and extracts of Portuguese *Thymbra capitata* and *Thymus mastichina*. *Italian Journal of Food Science*, 21(2).
- [366] Biondi, D., Cianci, P., Geraci, C., Ruberto, G., & Piattelli, M. (1993). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. *Flavour and fragrance journal*, 8(6), 331-337.
- [367] Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M., Faleiro, L., Rejeb, M., Neffati, M., & Pedro, L. G. (2010). Thermal stability of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link.: Effect on the chemical composition and the antioxidant and antibacterial activities. *Acta alimentaria*, 39(3), 299-307.
- [368] Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M. L., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in applied microbiology*, 29(2), 130-135.
- [369] Goren, A. C., Bilsel, G., Bilsel, M., Demir, H., & Kocabaş, E. E. (2003). Analysis of essential oil of *Coridothymus capitatus* (L.) and its antibacterial and antifungal activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58(9-10), 687-690.
- [370] Karousou, R., Koureas, D. N., & Kokkini, S. (2005). Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry*, 66(22), 2668-2673.
- [371] Miceli, A., Negro, C., & Tommasi, L. (2006). Essential oil variability in *Thymbra capitata* (L.) Cav. growing wild in Southern Apulia (Italy). *Biochemical systematics and ecology*, 34(6), 528-535.
- [372] El Abed, N., Kaabi, B., Smaali, M. I., Chabbouh, M., Habibi, K., Mejri, M., & Ben Hadj Ahmed, S. (2014). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus*

capitata essential oil with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014.

[373] Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Salgueiro, L., Miguel, M. G., & Faleiro, M. L. (2008). Portuguese *Thymbra* and *Thymus* species volatiles: chemical composition and biological activities. *Current Pharmaceutical Design*, 14(29), 3120-3140.

[374] El Ouariachi, E. M., Paolini, J., Bouyanzer, A., Tomi, P., Hammouti, B., Salghi, R., Majidi, L., & Costa, J. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns and link from Morocco. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(24), 5773-5778

[375] Reddy, M. B., Angers, P., Gosselin, A., & Arul, J. (1998). Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*, 47(8), 1515-1520.

[376] El Ajjouri, M., Satrani, B., Ghanmi, M., Aafi, A., Farah, A., Rahouti, M., & Aberchane, M. (2008). Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 12(4), 345-351.

[377] Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of applied bacteriology*, 76(6), 626-631.

[378] Bouzouita, N., Kachouri, F., Hamdi, M., & Chaabouni, M. M. (2003). Antimicrobial activity of essential oils from Tunisian aromatic plants. *Flavour and fragrance journal*, 18(5), 380-383.

[379] Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat science*, 73(2), 236-244.

[380] Hazzit, M., Baaliouamer, A., Faleiro, M. L., & Miguel, M. G. (2006). Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(17), 6314-6321.

[381] Faleiro, L., Miguel, G., Gomes, S., Costa, L., Venâncio, F., Teixeira, A., & Pedro, L. G. (2005). Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata*

L.(Cav.) and *Origanum vulgare* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8162-8168

[382] Bauer, K., Garbe, D., & Surburg, H. (2008). *Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses*. John Wiley & Sons.

[383] Jabri-Karoui, I., Bettaieb, I., Msaada, K., Hammami, M., & Marzouk, B. (2012). Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*. *Journal of functional foods*, 4(3), 661-669.

[384] Msaada, K., Tammar, S., Salem, N., Bachrouh, O., Sriti, J., Hammami, M., & Limam, F. (2016). Chemical Composition and Antioxidant Activities of Tunisian *Thymus capitatus* L. Methanolic Extract. *International journal of food properties*, 19(6), 1381-1390.

[385] Jaouadi, R., Cardoso, S. M., Silva, A. M., Yahia, I. B. H., Boussaid, M., & Zaouali, Y. (2018). Variation of phenolic constituents of Tunisian *Thymus capitatus* (L.) Hoff. et Link. populations. *Biochemical Systematics and Ecology*, 77, 10-15.

[386] Tabti, L., Dib, M. E. A., Gaouar, N., Samira, B., & Tabti, B. (2014). Antioxidant and antifungal activity of extracts of the aerial parts of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns against four phytopathogenic fungi of *Citrus sinensis*. *Jundishapur journal of natural pharmaceutical products*, 9(1), 49

[387] Kandil, O., Radwan, N. M., Hassan, A. B., Amer, A. M. M., El-Banna, H. A., & Amer, W. M. M. (1994). Extracts and fractions of *Thymus capitatus* exhibit antimicrobial activities. *Journal of ethnopharmacology*, 44(1), 19-24.

[388] Nimri, L. F., Meqdam, M. M., & Alkofahi, A. (1999). Antibacterial activity of Jordanian medicinal plants. *Pharmaceutical biology*, 37(3), 196-201.

[389] Elandalousi, R. B., Akkari, H., B'chir, F., Gharbi, M., Mhadhbi, M., Awadi, S., & Darghouth, M. A. (2013). *Thymus capitatus* from Tunisian arid zone: chemical composition and in vitro anthelmintic effects on *Haemonchus contortus*. *Veterinary parasitology*, 197(1-2), 374-378.

[390] Bachrouh, O., Jemâa, J. M. B., Wissem, A. W., Talou, T., Marzouk, B., & Abderraba, M. (2010). Composition and insecticidal activity of essential oil from *Pistacia lentiscus* L.

against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller and *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Stored Products Research*, 46(4), 242-247.

[391] Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Falé, P. L., Serralheiro, M. L., & Araújo, M. E. M. (2014). Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, 53, 6-15

[392] Foddai, M., Kasabri, V., Afifi, F. U., Azara, E., Petretto, G. L., & Pintore, G. (2015). In vitro inhibitory effects of Sardinian *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia terebinthus* L. on metabolic enzymes: Pancreatic lipase,  $\alpha$ -amylase, and  $\alpha$ -glucosidase. *Starch-Stärke*, 67(1-2), 204-212.

[393] Kıvçak, B., & Akay, S. (2005). Quantitative determination of  $\alpha$ -tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. *chia*, and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia*, 76(1), 62-66.

[394] Mezni, F., Maaroufi, A., Msallem, M., Boussaid, M., Khouja, M. L., & Khaldi, A. (2012). Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial activities of *Pistacia lentiscus* L. fruit oils. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(39), 5266-5271.

[395] Trabelsi, H., Cherif, O. A., Sakouhi, F., Villeneuve, P., Renaud, J., Barouh, N., & Mayer, P. (2012). Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food chemistry*, 131(2), 434-440

[396] Le Floch, E. (1983). Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

[397] Iserin, P., 2007. Larousse des plantes médicinales. Ed: Larousse, p. 250

[398] Guignard, J.L., Dupont, F., 2004. Botanique : Systématique moléculaire, 13eme édition. Paris : Masson.

[399] Pell, S.K., 2004. Molecular systematics of the cashew family (Anacardiaceae). Thèse de Doctorat. St Andrews Presbyterian College, p. 207.

[400] Aissi, O., Boussaid, M., & Messaoud, C. (2016). Essential oil composition in natural populations of *Pistacia lentiscus* L. from Tunisia: Effect of ecological factors and incidence on antioxidant and antiacetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, 91, 56-65.

- [401] Remila, S., Atmani-Kilani, D., Delemasure, S., Connat, J. L., Azib, L., Richard, T., & Atmani, D. (2015). Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *European Journal of Integrative Medicine*, 7(3), 274-286.
- [402] Douissa, F. B., Hayder, N., Chekir-Ghedira, L., Hammami, M., Ghedira, K., Mariotte, A. M., & Dijoux-Franca, M. G. (2005). New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L.(Anacardiaceae) from Tunisia. *Flavour and fragrance journal*, 20(4), 410-414
- [403] Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., & Komaitis, M. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food chemistry*, 107(3), 1120-1130
- [404] Djenane, D., Yangüela, J., Montañés, L., Djerbal, M., & Roncalés, P. (2011). Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food control*, 22(7), 1046-1053.
- [405] Bougherra, H. H., Bedini, S., Flamini, G., Cosci, F., Belhamel, K., & Conti, B. (2015). *Pistacia lentiscus* essential oil has repellent effect against three major insect pests of pasta. *Industrial Crops and Products*, 63, 249-255.
- [406] Amos, T. G., Williams, P., Guesclin, P. D., & Schwarz, M. (1974). Compounds related to juvenile hormone: activity of selected terpenoids on *Tribolium castaneum* and *T. confusum*. *Journal of Economic Entomology*, 67(4), 474-476.
- [407] Kordali, S., Aslan, I., Çalmaşur, O., & Cakir, A. (2006). Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.)(Coleoptera: Curculionidae). *Industrial crops and products*, 23(2), 162-170
- [408] Dharmagadda, V. S. S., Naik, S. N., Mittal, P. K., & Vasudevan, P. (2005). Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technology*, 96(11), 1235-1240.
- [409] Enan, E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(3), 325-337
- [410] Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K., & Kaur, S. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256(12), 2166-2174.

- [411] Mehenni, C., Atmani-Kilani, D., Dumarçay, S., Perrin, D., Gérardin, P., & Atmani, D. (2016). Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(3), 653-669.
- [412] Beghlal, D., El Bairi, K., Marmouzi, I., Haddar, L., & Mohamed, B. (2016). Phytochemical, organoleptic and ferric reducing properties of essential oil and ethanolic extract from *Pistacia lentiscus* (L.). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(4), 305-310.
- [413] Dellai, A., Souissi, H., Borgi, W., Bouraoui, A., & Chouchane, N. (2013). Antiinflammatory and antiulcerogenic activities of *Pistacia lentiscus* L. leaves extracts. *Industrial Crops and Products*, 49, 879-882.
- [414] Kordali, S., Cakir, A., Zengin, H., & Duru, M. E. (2003). Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*, 74(1-2), 164-167.

# **PARTIE II**

## **MATERIELS ET METHODES**

---

Cette partie décrit les méthodes utilisés pour la caractérisation des films actifs fabriqués à base des HEs et des extraits de plantes, les tests de stabilité de la substance active dans l'emballage actif, les analyses phytochimiques et les tests des activités biologiques des plantes étudiés. Elle est subdivisée en deux sous-parties :

1. Une première partie dans laquelle, nous présentons les différentes méthodes d'analyse de la composition chimique des huiles essentielles et des extraits de plantes de rosmarin, de myrte, de thym, et de pistachier lentisque, ainsi que leurs méthodes d'évaluation de leurs activités antioxydantes et antifongiques.
2. Une deuxième partie porte sur les méthodes de fabrication des films actifs à base de PLA et d'amidon incorporés avec les HEs et les extraits de plante, ainsi que leurs techniques de caractérisation optiques, thermiques, mécaniques, physiques. De même pour leur évaluation des activités antioxydantes et antifongiques. Aussi, nous nous intéressons à la stabilité des agents actifs dans le film après sa fabrication et ce en contact avec un simulant alimentaire.

# **CHAPITRE I**

## **Caractérisation phytochimique et évaluation des activités biologiques des HEs et des extraits de plantes**

## **I. Etude des huiles essentielles et des extraits organiques de *romarin*, de *myrte*, de *thym* et de *pistachier lentisque***

### **I.1 Extraction et analyse des HEs et des extraits organiques**

#### **I.1.1 Extraction des HEs**

##### **I.1.1.1 Matériel végétal**

Les plantes du romarin et du pistachier lentisque ont été récoltées au mois de février dans la région de Jbal Mansour- Kef, Tunisie. La plante de myrte a été récoltée au mois de février dans la région de Fernenan-Jendouba, Tunisie.

Les parties aériennes des plantes de romarin, du pistachier lentisque et du myrte sont séchées dans un endroit aéré à l'ombre jusqu'à stabilisation de son poids (environ 10 jours).

##### **I.1.1.2 Extraction des HEs par Hydrodistillation**

L'exploitation du potentiel chimique d'une plante passe dans une première étape par l'extraction de ses substances spécifiques. Ces substances correspondent, généralement à des composés rares et à forte valeur ajoutée, mais présentes à des teneurs centésimales (0,1 à 0,3%). Par conséquent le choix de la technique d'extraction influe directement sur le rendement d'extraction et sur la qualité des substances obtenues.

Dans le présent travail, nous avons étudié l'extraction des substances spécifiques à partir de romarin, pistachier lentisque et de myrte par la technique d'hydrodistillation.

L'hydrodistillation est l'une des techniques conventionnelles d'extraction des HEs. Sa durée varie selon le matériel utilisé et la matière première à traiter. Un chauffage prolongé pourrait engendrer une destruction des molécules « fragiles ».

Les HEs ont été extraites par hydrodistillation à l'aide d'un appareil du type « Clevenger ». Le principe est le suivant : nous immergeons la matière végétale sèche dans l'eau dans un ballon et nous portons l'ensemble à ébullition. Les molécules odorantes et volatiles sont alors entraînées par la vapeur d'eau. Ces vapeurs hétérogènes, au contact du froid, se condensent et deviennent liquide. Le liquide en question est formé d'un mélange d'eau et d'huile parfumée. Celle-ci se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'HE ainsi obtenue est collectée dans un flacon hermétique à 4°C.

Pour chaque expérience, 300g de la matière végétale sèche de romarin, pistacia et de myrte est introduite dans un ballon de 5L contenant 3 L d'eau distillée. L'ensemble a été soumis à l'hydrodistillation pendant 3 heures, la durée d'extraction optimale fixée suite à l'étude de la cinétique du rendement d'extraction en fonction du temps. Les huiles essentielles (HEs) de romarin, pistacia et de myrte ainsi obtenues sont collectées puis séchées sur le sulfate de sodium anhydre et stockées à 4°C. La biomasse utilisée pour l'extraction est composée de tiges et feuilles séchées sous abri et à la température ambiante jusqu'à stabilisation de la masse. Le rendement en HE est exprimé en pourcentage et il est défini comme suit :

**Equation 1:** Rendement en Huile

$$HE (\%) = \frac{M'}{M} \times 100 \quad (1)$$

Avec :

M' : la masse d'HE obtenue après l'extraction

M : la masse de la matière végétale utilisée

Les HEs de romarin, pistachier lentisque et de myrte sont désignées comme RN, Pist et MN, respectivement. Ainsi, RC1 et RC2 présentées les HEs de romarin commerciale et pharmaceutique, respectivement. De même, MC et TC indiquées les HEs de myrte et de thym commerciales, respectivement.

### I.1.2 Extraction des extraits Organiques

#### I.1.2.1 Matières végétales

Les parties aériennes des plantes de romarin, de myrte, thym et de pistachier lentisque ont récoltées durant le mois de février dans la région montagneuse Sidi Mansour (Kef-Tunisie). Par ailleurs, le romarin, le thym, le pistachier lentisque et myrte de la région Fernena (Jendouba – Tunisie) pour le Myrte.

La matière végétale récoltée, a été séchée dans un endroit aéré à l'ombre jusqu'à stabilisation de son poids (environ 10 jours).

#### I.1.2.2 Préparation des extraits par des solvants organiques

Les extraits sont obtenus par macération à froid avec des solvants organiques (acétate d'éthyle, et éthanol). Pour se faire, une quantité de 10g de poudre de la partie aérienne de romarin, de myrte, de thym et de pistachier lentisque subi une macération dans 100 mL du

solvant sous agitation à l'obscurité pendant 24 heures et à température ambiante. Après filtration, l'extrait est concentré sous vide à 35°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le rendement d'extraction, est exprimé en pourcentage et il désigne la masse de l'extrait obtenu après évaporation du solvant, par rapport à la masse de la matière végétale utilisée.

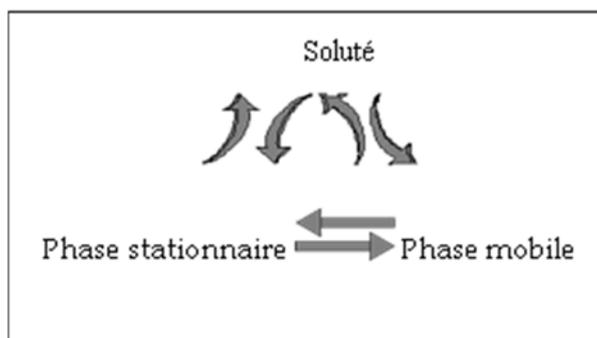
Les extraits éthanoliques de romarin, de myrte et de thym sont désignés par R\_EtOH, M\_EtOH et T\_EtOH, respectivement. Les extraits d'acétate d'éthyle de myrte, de pistachier lentisque et de thym sont désignés M\_EtA, Pist\_EtA et T\_EtA, respectivement.

### **I.1.3 Analyse des HEs par chromatographie en phase gazeuse**

Les analyses qualitatives et quantitatives des HEs de RN, RC1, RC2, MN, MC, TC, Pist ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse couplée et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse (CPG-MS).

#### **I.1.3.1 Principe**

La chromatographie en phase gazeuse, connue le plus souvent avec l'abréviation française CPG, est l'une des branches de la chromatographie. Ainsi, cette technique séparative est appliquée pour des composés volatils ou susceptibles de l'être sans décomposition. La séparation est fondée sur la différence de distribution ou de partage des solutés entre deux phases, l'une stationnaire (liquide ou solide) et l'autre mobile (un gaz vecteur) (Figure I.1).



**Figure I-1 : Différentes interactions en chromatographie gazeuse**

Selon leurs caractéristiques (polarité, solubilité, affinité, etc.), les constituants de produit analysé se répartissent différemment entre les deux phases ce qui entraîne des différences d'entraînement et de migration à l'origine de leur séparation.

#### **I.1.3.2 Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à Spectrométrie de Masse (CPG-SM)**

##### *c. Mode opératoire*

L'analyse des HES de RN, RC1, RC2, MN, MC, TC, Pist a été effectuée à l'aide d'un chromatographe type Agilent (Agilent Technologies Inc., USA). Le couplage CPG-MS a été réalisé sur un appareil type (GC 6890A / MS5975C MSD). Les spectres de masses ont été enregistrés en mode impact électronique (IE) avec une énergie d'ionisation de 70 eV.

Les conditions analytiques sont les suivantes :

- ✓ Une colonne capillaire HP-5MS (5% phénylméthylpolysiloxane ; 60m × 0,25mm ; épaisseur du film =0,25 µm) ;
- ✓ Température de l'injecteur 200°C ;
- ✓ Température du détecteur 270°C ;

La programmation de la température consiste en :

- ✓ une élévation de 60 à 260°C, à 5°C/mn ; un palier de 45 mn à 260°C ; une élévation de 260°C à 340°C, à 40°C/min ;
- ✓ Gaz vecteur : Hélium (pureté 99,99%) avec un débit de 1mL/min ;
- ✓ Injecteur mode split : 1/10 ; volume d'injection 1µl ;
- ✓ Durée totale de l'analyse : 57 min

### **I.1.4 Analyse des extraits organiques par LC-UV/ESI-MS**

L'analyse LC-UV a été effectuée sur un système UPLC (Waters) avec un détecteur de matrice de diodes à rayons UV (PDA) couplé à un spectromètre de masse. Les spectres UV ont été enregistrés entre 200 et 500 nm et une détection spécifique à 280 nm (maximum d'absorption). Une colonne Acquace C18 (100 x 2,1 mm, c'est-à-dire 1,7 mm) à 40 °C a été utilisée pour la séparation par chromatographique. La phase mobile était constituée de deux solvants : eau-acide formique (0,1%, A) et le méthanol (B), et l'élution avait le profil suivant : 0-0,5 min 95% A, 0,5-27,5 min 1% A et 27,5 -30 min 5% A à un débit de 300 mL / min. Les extraits ont été préparés dans le méthanol : de l'eau (1: 1) à une concentration de 200 mg / mL et un volume de 10 mL et ont été injectées pour analyse. Les spectres de masse ont été acquis en utilisant un LCT Premier XE (Waters) équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI) fonctionnant en mode positif. Les paramètres expérimentaux ont été définis comme suit : la tension capillaire était de 500 V, la tension du cône était de 100 V et les ions ont été enregistrés dans la plage de 100-1000 m / z.

### **I.1.5 Analyse des HEs et des extraits organiques par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)**

L'analyse IR est utilisée pour caractériser les groupes fonctionnels de composés bioactifs présents dans les HEs de RN, RC1, RC2, MN, MC, TC, Pist et dans les extraits organiques de R\_EtOH, M\_EtOH, M\_EtA et T\_EtOH, T\_EtA et Pist\_EtA.

L'analyse IR est effectuée avec un spectromètre PerkinElmer Spectrum Two FT-IR équipé d'un accessoire universel de réflectance avec lentille de cristal à diamant de réflexion interne. Au total, 8 scans ont été accumulés en mode transmission avec une résolution de 4 cm<sup>-1</sup>. Le spectre a été obtenu dans une gamme de 4000 à 650 cm<sup>-1</sup>.

### **I.1.6 Screening chimique des HEs et des extraits organiques**

Les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes, contenues dans les HEs de RN, RC1, RC2, MN, MC, TC, Pist et dans les extraits organiques de R\_EtOH, M\_EtOH, M\_EtA et T\_EtOH, T\_EtA et Pist\_EtA ont été évaluées par des méthodes spectroscopiques. Il est nécessaire de préparer différentes solutions de dilution des extraits et des HEs, et pour ce faire il faut optimiser le solvant de dilution particulier. Pour réaliser ces tests, on a préparé des différentes solutions des extraits dilués dans le DMSO de même pour les HEs de TC, MC, RC1 et Pist dilué dans le même solvant et des solutions des HEs de RN, RC2 dilués dans le MeOH.

#### **I.1.6.1 Dosage des polyphénols totaux**

La teneur en polyphénols totaux des HEs et des extraits organiques est estimée par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu [1]. Ce réactif est un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). Il est réduit, en milieu alcalin par les phénols en un complexe d'oxyde bleu de tungstène (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) et de molybdène (Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>).

Une quantité de 100 µL de chaque solution diluée d'extrait et d'HEs est mélangée avec 500 µL du réactif de Folin-Ciocalteu (0.2N, dilué 10 fois dans l'eau). L'ensemble est incubé 5 min à l'ombre et à température ambiante. Ensuite, 400 µL d'une solution de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 75 g/L) sont ajoutés. La lecture de l'absorbance est effectuée à 765 nm contre un blanc après 15 min d'incubation à 25 °C à l'aide d'un spectrophotomètre thermo Fisher

ScientificMultiskan GO (Jasco V-630 instrument). Le total phénolique a été évalué en utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0-30 mg / L), comme un témoin positif.

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAG/g MS). Chaque mesure est répétée trois fois dans le cadre d'une approche statistique.

### I.1.6.2 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux des HEs et des extraits organiques est estimée par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) [2]. Cette méthode est basée sur la capacité du chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à réagir avec les groupements hydroxydes OH des phénols aboutissant à la formation d'un complexe jaune très stable. L'apparition de ce complexe coloré est suivie en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 510 nm.

250 µL de chaque solution diluée d'extrait et d'HE est mélangée avec 1 mL d'eau distillée et 75µL de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>, 15%). L'ensemble est incubé 6 min à l'ombre et à température ambiante. Ensuite 75µL de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>, 10%) et 1 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH, 4%) sont ajoutés. Après 15 minutes d'incubation, l'absorbance du mélange est mesurée à 510 nm contre un blanc de référence formé par sans extrait. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalents de quercitrine par gramme de matière végétale sèche (mg EQ/g MS). Chaque mesure est répétée trois fois.

### I.1.7 Évaluation de l'activité antioxydante des HEs et des extraits organiques

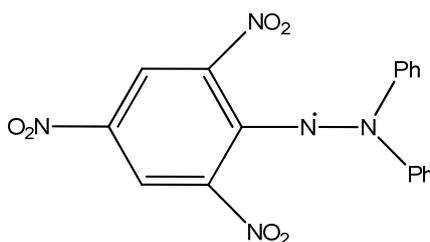
Pour que l'étude de l'activité antioxydante soit complète et fiable, il est vivement recommandé d'utiliser au minimum deux méthodes [3]. Dans notre étude, nous avons utilisé deux tests à savoir : le test au radical DPPH<sup>•</sup> et le test à l'ABTS.

L'activité anti-oxydante des HEs de RN, RC1, RC2, MN, MC, Pist est des extraits organiques de R\_EtOH, M\_EtOH, M\_EtA et T\_EtOH, T\_EtA et Pist\_EtA est évaluée en se basant sur les travaux de Gazouani et al., 2016 avec quelques modifications [4]. Chaque solution d'extrait et d'HE est diluée dans un solvant spécifique : les extraits organiques et les HEs de TC, MC, RC1, Pist ont été dilués dans le DMSO et les HEs RN et RC2 ont été dilués dans le MeOH.

#### I.1.7.1 Test de DPPH

##### a. Principe

Le radical DPPH<sup>\*</sup> ou le 1,1-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical organique stable, de coloration violette présentant un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 1-2). Il présente un maximum d'adsorption à  $\lambda = 520$  nm dans le méthanol ou l'éthanol. Les antioxydants agissent comme agents de terminaison en bloquant la phase de propagation. Ils réduisent ce radical, par transfert d'un atome d'hydrogène, en un composé jaune : le DPPH-H ou encore la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (**1**).



**Figure I-2: Structure du radical libre de DPPH**

b. *Mode Opératoire*

1800  $\mu$ L d'une solution méthanolique de DPPH (0,1 mM) sont mélangés avec 200  $\mu$ L des différentes dilutions des solutions des HEs. L'ensemble est incubé 30 min à l'ombre et à température ambiante. L'absorbance de la solution de DPPH et des échantillons ( $A_{\text{échantillon}}$ ) est déterminée à 520 nm. Un essai à blanc est également réalisé en appliquant la même procédure pour une solution mais sans additifs et l'absorbance est enregistré en tant que  $A$  (blanc).

L'activité anti-oxydante des extraits est déduite de leurs capacité à inhiber le radical DPPH<sup>\*</sup>, elle est ainsi déterminée en mesurant le pourcentage d'inhibition de l'absorbance du radical DPPH<sup>\*</sup> à 520 nm :

**Equation 2:** Pourcentage d'inhibition radicalaire

$$\text{Pourcentage d'inhibition(\%)} = \frac{A(\text{blanc}) - A(\text{échantillon})}{A(\text{blanc})} \times 100$$

L'activité antioxydante des HEs actifs et des extraits organiques est exprimée en  $CI_{50}$  ((mg/L), la concentration efficace d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% du DPPH initial. La méthode est standardisée par rapport à la vitamine C et chaque mesure est répétée trois fois.

**I.1.7.2 Test à l'ABTS**

a. *Principe*

Le radical cation  $ABTS^{\bullet+}$ , de couleur bleu à verte, est généré chimiquement par arrachement d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) en présence de persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ). Ce radical présente une bande d'absorption importante entre 600 et 750 nm et en présence d'un antioxydant, le sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-(éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) piège un  $H^{\bullet}$ , et se transforme en un composé incolore : le  $ABTSH^+$ .

### a. Mode Opératoire

#### ✓ Préparation de la solution de $ABTS^{\bullet+}$

Le radical  $ABTS^{\bullet+}$  est directement produit par le mélange d'ABTS (7 mM) à pH 7,4 (5mM  $NaH_2PO_4$ , 5 mM  $Na_2HPO_4$  et 154 mM de  $NaCl$ ) avec le  $K_2S_2O_8$  (2,5 mM). Le mélange est agité une nuit, à l'obscurité et à température ambiante. Avant utilisation, ce mélange est dilué dans de l'éthanol jusqu'à obtention d'une absorbance de  $0,70 \pm 0,02$  à 734 nm.

#### ✓ Test sur les HEs

100  $\mu$ L des différentes dilutions des HEs et des extraits organiques sont mélangés avec 900  $\mu$ L d'une solution d' $ABTS^{\bullet+}$  fraîchement préparée. Après 6 min d'incubation, l'absorbance du mélange est mesurée à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre thermo Fisher Scientific Multiskan GO (Jasco V-630 instrument). L'activité anti-oxydante de chaque HEs et des extraits est exprimée en  $CI_{50}$  (mg/L). La méthode est standardisée par rapport à la vitamine C. La  $CI_{50}$  est déterminée à l'aide de la même équation précédemment utilisée pour la méthode avec le radical DPPH $\bullet$ . Chaque mesure est répétée trois fois.

### I.1.8 Évaluation de l'activité antifongique des HEs et des extraits

Les infections provoquées par les champignons alimentaires sont devenues un problème réel de santé publique. Elles sont de plus en plus difficiles à les inactiver et leurs fréquences sont en très forte progression. L'apparition de souches résistantes aux antibiotiques usuels, le changement dans le spectre clinique des pathogènes, l'émergence d'un pouvoir pathogène chez des souches habituellement saprophytes de notre environnement sont les principaux facteurs de cette forte recrudescence. L'*Aspergillus niger* est un champignon qui appartient aux principaux genres de contaminants responsables de l'altération des denrées alimentaires.

L'*Aspergillus niger*, l'aspergille noir, est un champignon filamenteux ascomycète de l'ordre des Eurotiales. C'est une des espèces les plus communes du genre *Aspergillus* qui apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et légumes (Figure I-3). Aucune forme sexuée (téléomorphe) n'est connue [5].



**Figure I-3: Aspect de l'*Aspergillus niger* dans un milieu de culture (Agar)**

Les HEs de RN, RC1, RC2, MN, MC, Pist et les extraits organiques de R\_EtOH, M\_EtOH, M\_EtA et T\_EtOH, T\_EtA et Pist\_EtA ont été testés contre une souche fongique d'*Aspergillus.niger* responsable à l'altération des produits alimentaires.

### **I.1.8.1 Souches fongiques étudiées**

Pour la détermination de l'activité antimicrobienne des HEs et des extraits, la moisissure *Aspergillus niger*, a été choisie. L'*Aspergillus niger* (Tiegh MB284309 CB, S-KNAW, Holland), est une moisissure toxique et pathogène. C'est un agent de pourriture fréquent des denrées alimentaires et des fruits et peuvent être toxiques pour l'Homme et les animaux. Cette moisissure appartient à la collection de la mycothèque du laboratoire de Procédés de Bioraffinerie, San-Sebastian, Espagne. Elles sont cultivées par repiquage sur le milieu nutritif PDA (Potato Dextrose Agar) pendant 7j à l'obscurité à 25 °C.

### **I.1.8.2 Préparation des échantillons des HEs et des extraits**

Pour l'évaluation de l'activité antifongique contre *A. Niger*. Les HEs de RN, RC1, RC2, MC, TC ont été dilués pour obtenir des solutions de concentrations de 1%, 2,5%, 5%, 7,5% et 10%. Aussi, les extraits de R\_EtOH, M\_EtOH, M\_EtA, T\_EtOH et T\_EtA ont été dilués pour obtenir des solutions de concentrations de 2%, 4% et 10%.

L'HE du pistachier lentisque a été dilué pour obtenir les mêmes concentrations (2%, 4%, 10%) que son extrait (Pist\_EtA), pour évaluer la variation de l'activité antifongique en fonction

de la concentration de la partie aérienne de la plante du pistachier lentisque sous forme d'HE et d'extrait.

### **I.1.8.3 Procédure microbiologique**

Les pastilles de cellulose ( $\varnothing = 10$  mm) sont imbibées avec 40  $\mu$ L de chaque solution d'HE et d'extrait et placées dans des boîtes de Pétri avec PDA (10 ml) et 0,4% de Streptomycine est ajoutée à la souche fongique dans le PDA. Chaque plat PDA inoculé avec des spores fongiques d'*A.niger* est incubé pendant 7 jours (chambre climatique Selecta Medlow) à  $27 \pm 1,5$  ° C. Par la suite, les pastilles sont retirées des boîtes de Pétri et lavées avec une solution de Ringer stérile (Sigma-Aldrich-96724). Ensuite, la solution fongique colorée (Bleu de Lactophénol) est homogénéisée pour compter la concentration de spores sur les pastilles avec un compteur de cellule automatisé Cellometer® Mini (Nexcelom Bioscience LLC, Texas) en mettant 20  $\mu$ L de chaque solution de spores dans les chambres de comptage et en utilisant Cellometer® Mini logiciel pour l'analyse. L'inhibition de la croissance des champignons (%FGI) a été calculée à partir de la concentration de spores par ml selon l'équation suivante :

#### **Equation 3: Pourcentage d'inhibition fongique**

$$\text{Pourcentage d'inhibition fongique (\%)} = \frac{Cg - Tg}{Cg} \times 100$$

Où,  $Cg$  est la concentration moyenne de film du témoin (sans additifs) et  $Tg$  est la concentration moyenne des films contenant les HEs /extraits [6].

## **CHAPITRE II**

# **Caractérisation physicochimique et biologique des films actifs**

## **II. Etude des biofilms à base des huiles essentielles et des extraits organiques**

### **II.1 Produits**

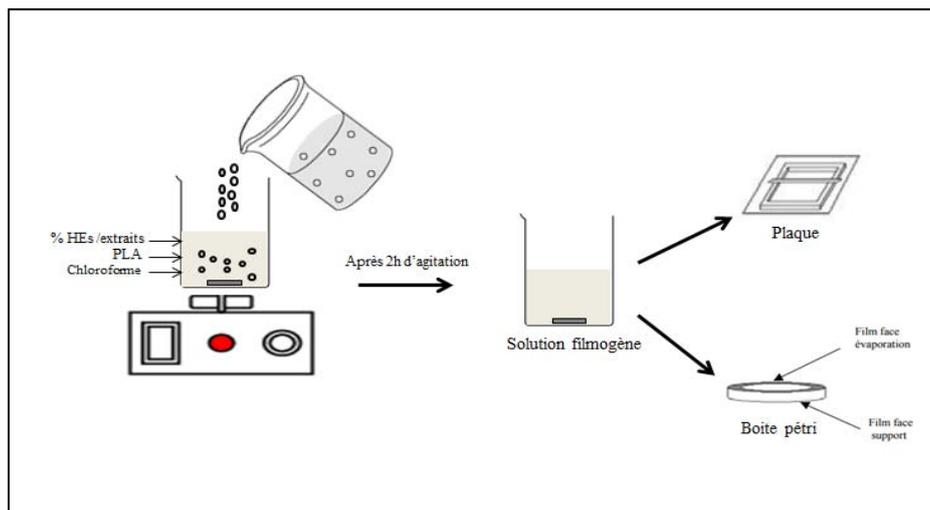
- ✓ Acide polylactique (PLA) (Nature works ® PLA polymer 3051D Glass transition temperature fusion 55-65°C)
- ✓ Les HEs de RN, RC1, RC2, MN, MC, TC, Pist a des concentrations de 0.5, 1.5, 2, 5%
- ✓ Les extraits organiques R\_EtOH, M\_EtOH, M\_EtA, T\_EtOH, T\_EtA, Pist\_EtA a des concentrations de 0.5, 1.5, 2, 5%
- ✓ Amidon de maïs (S, 27% amylase, Sigma-Aldrich)
- ✓ glycerol (99.5%, Sigma-Aldrich)
- ✓ Tween 80 (Sigma)

### **II.2 Fabrication des films par casting**

#### **II.2.1 Films à base de PLA incorporés avec les HEs et les extraits organiques**

Les films sont fabriqués selon la procédure décrite par Kamper et Fennema., (1985) [7] optimisée au sein du laboratoire de Procédé de Bioraffinerie. Différentes concentrations (0,5 ; 1,5 ; 2 ; 5%) des HEs et des extraits ont été mélangées avec une solution de PLA dans 20 mL de Chloroforme sous agitation magnétique pendant 2 h. Les solutions filmogènes ainsi obtenues sont ensuite coulées en boîtes de Pétri ou sur plaque de verre munies de cales et séchées pendant 24h et à une température ambiante (Figure II-1). Les films sont démoulés puis stockés dans un dessiccateur à  $23 \pm 1$  °C et  $50 \pm 5$  % en HR.

Un film de control (sans extrait) a été élaboré et considéré comme un échantillon témoin.



**Figure II-1:** Procédé de fabrication de film à base de PLA

### **II.2.2 Films à base d'amidon et HEs**

Tout d'abord, l'amidon de maïs a été plastifié en mettant en suspension des granules d'amidon dans de l'eau distillée (3% w/w) à une température de  $95 \pm 2$  °C pendant 30 minutes sous agitation vigoureuse. Ensuite, après avoir maintenue la température à 60°C, 30% w/w de glycérol sont ajoutés et dispersés pendant 10 minutes dans la suspension d'amidon. Différentes concentrations des films d'amidon ont été préparées, contenant 0,5, 1,5, 2 et 5% w/w d'HE. Les quantités de glycérol et des HEs dans le mélange sont considérées par rapport au poids massique de l'amidon sec.

Le Tween 80 est ajouté comme émulsifiant en quantités proportionnelles aux HEs (0,05%, 0,15%, 0,2% et 0,5% v / v). Les solutions de film ont été homogénéisées à 13500 rpm / min pendant 1 min et à 20500 rpm / min pendant 5 minutes dans un homogénéisateur Ultra-Turrax T-25 (Heidolph, Allemagne). Après l'homogénéisation, les suspensions sont dégazées sous vide pour éliminer l'air piégé.

Enfin, les solutions filmogènes sont coulées dans des plaques en plastique et placées dans un incubateur pendant 24h, maintenus une température de  $30^{\circ}\text{C} \pm 2$  °C. Des films élaborés par le même procédé décrit mais sans l'ajout des HEs, sont considérés comme des échantillons témoins.

### **III. Caractérisations des biofilms à base d'amidon et de PLA incorporés par des Huiles essentielles et des extraits organiques**

La caractérisation des biofilms consiste à apprécier les propriétés essentielles des films qui peuvent être appliqués dans le domaine des emballages alimentaires. Parmi ces propriétés, on cite particulièrement les propriétés mécaniques, physiques et thermiques.

Pour ce faire nous avons testé ces propriétés pour les films à base de PLA incorporés avec les HES de R N, RC1, RC2, MN, MC, Pist et les extraits organiques de R\_EtOH, M\_EtOH, M\_EtA et T\_EtOH, T\_EtA et Pist\_EtA et les films à base d'amidon incorporés avec les HES déjà élaborés.

#### **III.1 Caractérisation optique**

Les modifications de couleur des biofilms à base de PLA et d'amidon causés par l'addition des HES et des extraits ont été mesurées par un colorimètre Konika Minolta CM-2600d et exprimées à l'aide d'un système CIE-Lab (HunterLab, USA). Les films ont été placés sur une plaque blanche standard ( $L^*$ : 93.4,  $a^*$ : -0.3133,  $b^*$ : 0.3194) et les paramètres chromatiques  $L^*$  (luminescence),  $a^*$  (rouge-vert) et  $b^*$  (jaune-bleu) ont été mesurés à cinq positions différentes à la surface du film et la valeur moyenne a été calculée (Figure III.1).

La différence de couleur ( $\Delta E$ ), l'indice de blancheur (WI), Chroma ( $C^*_{ab}$ ) et la teinte ( $h^*_{ab}$ ) ont été calculés en utilisant les équations suivantes :

**Equation 4: Différence de couleur entre de les films de control et les films actif**

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2}$$

**Equation 5: Indice de blancheur**

$$W_i = 100 - \sqrt{(100 - L)^2 + a^2 + b^2}$$

**Equation 6: Chromaticité**

$$C^*_{ab} = \sqrt{a^2 + b^2}$$

**Equation 7: Ténacité**

$$h^*_{ab} = 180 + \arctg(b/a); a < 0$$

Où  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$ ,  $\Delta L^*$  sont la différence de coordonnées entre le contrôle (PLA et amidon) et les échantillons.

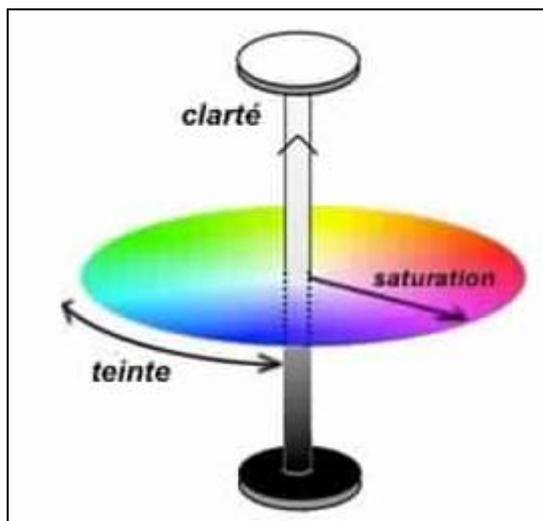


Figure III-1: Caractérisation des couleurs selon trois paramètres : teinte, saturation, clarté

## III.2 Caractérisation thermique

### III.2.1 Analyse thermogravimétrique

#### III.2.1.1 Principe

L'analyse thermogravimétrique (ATG) est une technique d'analyse thermique qui consiste à mesurer la variation de masse d'un échantillon en fonction du temps, à une température ou un profil de température déterminé (Figure III-2).

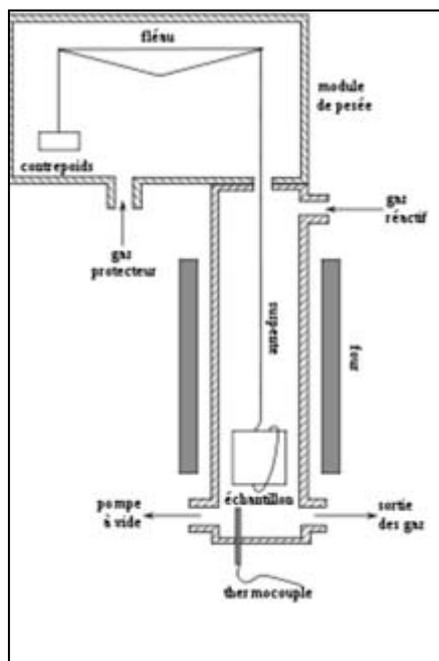


Figure III-2: Représentation schématique d'une ATG

### **III.2.1.2 Description de la méthode**

Les analyses thermogravimétriques ont été effectuées avec une TGA / SDTA 851 METTLER TOLEDO (Figure III-3). La stabilité thermique de Film de control de PLA et des films contenant 0,5 et 5% d'HE de TC et 0.5% d'extrait de T\_EtOH a été analysée. Les échantillons environ 5 à 10 mg ont été testés sous atmosphère d'azote à une vitesse de chauffage de 10 °C / min avec un profil de températures de 25 °C à 600 °C. De même pour l'HE de TC et l'extrait brute de T\_EtOH ont également été analysée pour déterminer leurs stabilités thermique.



**Figure III-3:** Appareil d'ATG

### **III.2.2 Analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC)**

#### **III.2.2.1 Principe**

La DSC est une technique d'analyse thermique. Elle mesure les différences des échanges de chaleur entre un échantillon à analyser et une référence.

Elle permet de déterminer les transitions de phase :

- ✓ La température de transition vitreuse( $T_g$ ) des polymères, des verres métalliques et des liquides ioniques ;
- ✓ Les températures de fusion et de cristallisation ;
- ✓ Les enthalpies de réaction, pour connaître les taux de réticulation de certains polymères.

Les analyses sont réalisées sous balayage d'un gaz inerte (par exemple, l'azote ou l'argon) pour éviter toute réaction du matériau à étudier avec l'atmosphère du four.

### **III.2.2.2 Méthode**

L'effet de différentes HEs (à une concentration de 5%) sur le comportement de cristallisation du PLA a été également étudié en utilisant METTLER TOLEDO DSC 822 (Figure III-4).

Dans l'étude de DSC, 3mg des échantillons de films ont été chauffés à 5 °C / min de la température ambiante jusqu'à 200 ° C pendant 3 min, puis la température a été réduite à la température ambiante et réchauffé à 200 ° C.

Le degré absolu de cristallinité ( $X_c$ ) du film de PLA contenant les additifs a été calculé par:

#### **Equation 8: Degré de cristallinité**

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H^{\circ}m} \times \frac{100}{w}$$

Où  $\Delta H_m$  est l'enthalpie de l'échantillon,  $\Delta H^{\circ}m$  est l'enthalpie de fusion à 100% du PLA cristallin (93 J / g),  $w$  est la masse de la fraction du PLA dans le mélange [8].



**Figure III-4: Appareil de DSC**

## **III.3 Caractérisation Mécanique**

### **III.3.1 Mesure de l'épaisseur**

L'épaisseur des biofilms à base de PLA et d'amidon été mesurée par un micromètre numérique manuel avec une sensibilité de 0,01 mm, à 3 positions aléatoires pour chaque film. La valeur moyenne a été utilisée dans les calculs des paramètres mécaniques et de perméabilité à la vapeur d'eau.

### III.3.2 Propriétés mécaniques

Le stress à la rupture (MPa), le module de Young (MPa) et l'allongement à la rupture (E %) des films à base de PLA et d'amidon à différentes concentrations (0,5-1,5-2 et 5%) des huiles essentielles et des extraits de plantes ont été évalués par MTS (Systems Corporation, USA) fourni par des pinces pneumatiques (Advantage Pneumatic Grips) et avec une cellule de charge de 250 N. Les échantillons ont été préparés selon la norme ASTM D-1708. Les épaisseurs d'échantillons de longueur de 6 cm de largeur de 2,5cm. Les films fixés entre les deux pinces (l'une fixe, l'autre mobile), sont étirés de façon uniaxiale à une vitesse constante de 5 mm / min (Figure III-5). La distance de départ entre les pinces était de 22,9 mm. Les valeurs citées sont la moyenne de six mesures.

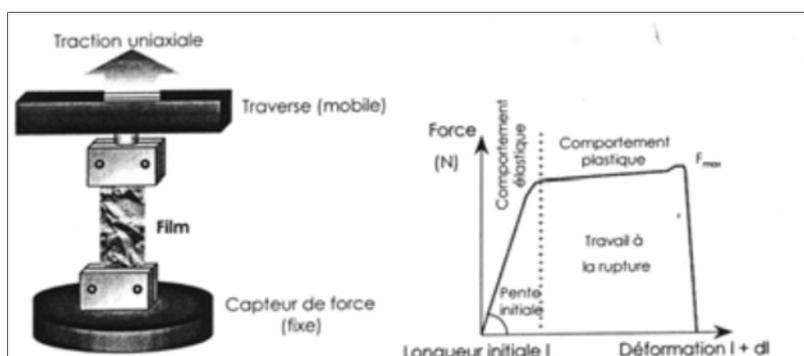


Figure III-5 : Dispositif de traction [9]

Les courbes obtenues donnent l'évolution de la force résultante en fonction de la déformation et permettent de calculer le module d'élasticité ou module de Young, exprimé en MPa, et égal à :

**Equation 9: Module de Young**

$$\text{Module de Young} = \frac{\text{Pente de la courbe}}{\text{Section}}$$

Avec la section qui est égale au produit de l'épaisseur du film par sa largeur, ainsi que la force à la rupture, exprimée en MPa, égale à :

**Equation 10: Stress à la rupture**

$$\text{Stress à la rupture} = \frac{\text{Force maximale}}{\text{Section}}$$

et le pourcentage d'élongation ou allongement E, exprimé en %, et égal à :

**Equation 11: Allongement à la rupture**

$$E(\%) = \frac{dl}{l} * 100$$

**III.4 Etude des propriétés barrières à la vapeur d'eau**

Étant donné que l'une des principales fonctions des films pour l'emballage alimentaire consiste à diminuer le transfert d'humidité entre les aliments et l'atmosphère environnante, la perméabilité à la vapeur d'eau est un paramètre physique important. La haute perméabilité à la vapeur d'eau des films limite considérablement leur utilisation comme matériau potentiel pour l'emballage alimentaire [10].

La perméabilité à la vapeur d'eau des films d'amidon contenant 5% des HEs, les films de PLA contenant les HEs à différentes concentrations de 0,5% RC1, 2%MC, 0,5-5% Pist et 0,5% TC, et les films de PLA contenant les extraits organique à différentes concentration de 0,5-5% de R\_EtOH, 0,5-1,5% M\_EtOH, 0,5-2% M\_EtA, 0,5% T\_EtA et 1,5-5% de Pist\_EtA ont été évalué. Le choix des films et des concentrations est basé sur les résultats des propriétés mécaniques.

Le WVP des films a été déterminé selon la norme ASTM E96-00 (Mocon, États-Unis) (Figure III-6) [11]. Les échantillons de film ont été coupés dans un cercle de 7,40 cm de diamètre et la zone d'essai était de 33 cm<sup>2</sup>. La configuration a été soumise à une température de 38 °C et une humidité relative de 90%. Le taux de perméabilité à la vapeur d'eau (WVTR) a été calculé comme suit :

**Equation 12: Taux à la permeabilité à la vapeur d' eau**

$$WVTR = G / (t \times A)$$

Où, G est le changement de poids (g), t est le temps (h) et A est l'air (m<sup>2</sup>). WVP a été calculé comme suit:

**Equation 13: Permeabilité à la vapeur d'eau**

$$WVP = (WVTP \times T) / \Delta P$$

Où T est l'épaisseur de film (mm) et ΔP est la différence de pression partielle de la vapeur d'eau à travers le film. On a calculé et signalé la WVP de trois films pour chaque échantillon.



**Figure III-6:** Testeur de débit de transmission de vapeur d'eau à travers le film

### **III.5 Evaluation de l'activité antifongique des biofilms films à base des HEs et des extraits organiques**

#### **III.5.1 Objectif**

L'objectif principal des tests antifongiques était d'évaluer l'utilisation potentielle des HEs et des extraits organiques dans les films de PLA et d'amidon comme inhibiteurs des champignons pour l'utilisation comme préservatif alimentaire dans le domaine des emballages alimentaires.

En tenant compte du fait que *A. niger* est bien connu comme un contaminant des fruits, des légumes et des aliments, cette dernière a été choisie pour évaluer l'activité antifongique des films à différentes concentrations (0,5, 1,5, 2, 5%) d'amidon incorporés avec les HEs de R N, RC1, RC2, MN, MC, Pist et des films de PLA contenant les HEs et les extraits organiques de R\_EtOH, M\_EtOH, M\_EtA et T\_EtOH, T\_EtA et Pist\_Et.

#### **III.5.2 Produits**

- ✓ *A.niger*, Tiegh MB284309 CB, S-KNAW, Holland
- ✓ Streptomycine, Sigma Aldrich, Spain
- ✓ PDA, Merck, Spain
- ✓ Ringer's solution, Sigma-Aldrich-96724

#### **III.5.3 Procédure microbiologique**

L'*A. niger* est cultivé dans un substrat solide de PDA en aérobie à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 72 h dans des boîtes de Petri bien scellées. Puis, les suspensions *A. niger* sont préparées en diluant

100 µL de cette culture 100 fois dans la solution de Ringer. Ensuite, pour chaque expérience, 100µL de la suspension diluée sont inoculés par voie aseptique à la surface de plaque d'agar PDA en présence de petit morceau des biofilms (échantillons carrés avec  $1 \times 1 \text{ cm}^2$ ). Cette méthodologie était effectuée selon la norme ISO 7954 [12].

Après 7 jours d'incubation à  $25 \pm 2 \text{ °C}$ , le nombre de spores a été compté à l'aide d'un microscope comme une unité colonie par millilitre (CFU mL<sup>-1</sup>). En outre, l'inhibition de la croissance de champignon (FGI) a été calculé à partir de l'équation suivante:

### Equation 14: Pourcentage d'inhibition fongique

$$\% FGI = \frac{Cg - Tg}{Cg} \times 100$$

Où Cg est la concentration moyenne de film du témoin (PLA) et Tg est la concentration moyenne des biofilms, les deux sont exprimées en CFU mL<sup>-1</sup>[12]. Les valeurs obtenues pour la concentration de chaque échantillon correspondent à la moyenne des expériences indépendantes (Quatre répétitions pour chaque expérience).

## III.6 Quantification des HEs et des extraits organiques dans les biofilms

### III.6.1 Principe

Après avoir incorporés l'HE et ou les extraits organiques dans la solution de film et laisser sous agitation pendant deux heures. La solution filmogène a été séchée à température ambiante pendant 24h. Certain de ces additifs peuvent subir une évaporation après le séchage à cause de la volatilité des composés qui les composent.

### III.6.2 Objectif

Le test de quantification vise à estimer la quantité des HEs et des extraits retenus dans le film après le processus de séchage.

### III.6.3 Méthode

La teneur final d'HE et d'extrait dans le film a été déterminé par extraction du film au méthanol et par quantification spectrophotométrique. Des échantillons de film contenant 5% d'HE de RN et de TC dans la matrice de PLA et d'amidon et des films contenant 5% des extraits de R\_EtOH et T\_EtOH dans la matrice de PLA, ont été immergés dans 100mL de MeOH et maintenus sous agitation pendant 24h à une température de 20°C. Ensuite, l'absorbance de la

solution a été mesurée à 318 nm, 325 nm, 341 nm et 340 nm (maximum d'absorption des RN, TC, R\_EtOH et T\_EtOH dans le MeOH, respectivement), en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (instrument Jasco V-630, Japon). Le film de contrôle de PLA et d'amidon (sans additifs) a été utilisé comme blanc dans chaque cas.

La mesure de la concentration de l'HE et de l'extrait retenus dans le film et les pourcentages de pertes ont été déterminés à partir de la courbe d'étalonnage des HEs et des extraits. Ces courbes d'étalonnage sont obtenues à partir des mesures d'absorbance d'une gamme de concentration de la solution standard d'HE (RN, TC) et d'extrait (R\_EtOH, T\_EtOH) aux longueurs d'onde spécifiques.

### **III.7 Activité antioxydante des films à base de PLA incorporés avec les extraits organique**

Les portions des films contenant 0,5 et 5% des extraits de R\_EtOH, M\_EtOH, M\_EtA, T\_EtOH, T\_EtA, Pist\_EtA ont été pesées (0,5 g) et recouvertes de 10 ml de MeOH, puis scellés et mis sous agitation pendant 48 h à 25 °C. Ensuite, les solutions ont été filtrées et le surnageant a été utilisé pour tester les capacités antioxydantes des films. Cette méthode a été décrite par Llana-Ruiz-Cabello et al., (2015) [13].

L'activité antiradicalaire est mesurée en utilisant deux radicaux différents, DPPH et l'ABTS. Les tests DPPH et ABTS sont basés sur la capacité de la substance testée à éliminer les cations radicaux.

### **III.8 Test de migration dans un simulateur alimentaire**

#### **III.8.1 Principe**

La migration est la quantité de matière, principalement des additifs, qui peuvent être transférés aux denrées alimentaires lorsqu'ils sont en contact. Au cours des dernières années, la migration a été considérée comme un problème négatif puisque les substances risquent de constituer un danger pour la santé humaine et / ou de modifier la composition des denrées alimentaires de façon inacceptable. Cependant, une nouvelle tendance à l'emballage actif est basée sur la migration comme un problème positif en raison de l'effet bénéfique de certains additifs matériels (principalement les antioxydants et / ou les antimicrobiens) dans les denrées alimentaires [14,15,16]. L'éthanol à 50% est recommandé par la Commission européenne comme simulant pour certains produits laitiers [17].

### **III.8.2 Objectif**

L'objectif de ce test d'étudier et de contrôler la libération des agents actifs des films de PLA et d'amidon dans l'éthanol 50%, considéré comme un simulant alimentaire pour les produits laitiers selon le règlement européen, à 40°C.

### **III.8.3 Méthode**

La libération des composants actifs de RN, TC, R\_EtOH et T\_EtOH des films de PLA et d'amidon vers l'ETOH 50% est effectuée à une température de 4 °C. Les échantillons sont placés à la surface des erlenmeyers de 100 ml d'ETOH 50% maintenus à une agitation de 200 rpm / min. A des différents temps d'exposition durant 5 jours, 3 ml de la solution sont extraites pour une analyse UV.

La concentration et le taux de migration d'HE et d'extrait migrants dans le simulant alimentaire est déterminée par la méthode spectrophotométrique aux absorbances caractéristiques de chaque HE et extrait en calculant à chaque fois de DO réel de la solution pour s'assurer que PLA n'intervient pas dans la migration.

Le DO réel est calculé comme suit

**Equation 15:** Absorbance optique réel des films

$$DO_{\text{réel}} = DO(\text{biofilm}) - DO(\text{control})$$

## Les références

- [1] Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of biological chemistry*, 73(2), 627-650.
- [2] Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal de pharmacie de Belgique*, 49(6), 462-468
- [3] Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free radical research*, 36(2), 177-187.
- [4] Ghazouani, N., Abderrabba, M., & Bouajila, J. (2016). *Teucrium ramosissimum* (Lamiaceae): volatile composition, seasonal variation, and pharmaceutical activity. *Analytical Letters*, 49(8), 1258-1271.
- [5] Ouelhadj, A., Kahina, B., & Djenane, D. Chemical composition and Antifungal activity of the *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus* essential oils of Mediterranean regions in laboratory medium and Strawberry fruit.
- [6] Robles, E., Salaberria, A. M., Herrera, R., Fernandes, S. C., & Labidi, J. (2016). Self-bonded composite films based on cellulose nanofibers and chitin nanocrystals as antifungal materials. *Carbohydrate polymers*, 144, 41-49.
- [7] Kamper, S. L., & Fennema, O. (1985). Use of an edible film to maintain water vapor gradients in foods. *Journal of Food Science*, 50(2), 382-384.
- [8] Gordobil, O., Egüés, I., Llano-Ponte, R., & Labidi, J. (2014). Physicochemical properties of PLA lignin blends. *Polymer Degradation and Stability*, 108, 330-338.
- [9] Quezada Gallo, J. A. (1999). Influence de la structure et de la composition de reseaux macromoleculaires sur les transferts de molecules volatiles (eau et aromes) application aux emballages comestibles et plastiques (Doctoral dissertation, Dijon).
- [10] Morillon, V., Debeaufort, F., Capelle, M., Blond, G., & Voilley, A. (2000). Influence of the physical state of water on the barrier properties of hydrophilic and hydrophobic films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(1), 11-16.
- [11] Rhim, J. W., Hong, S. I., & Ha, C. S. (2009). Tensile, water vapor barrier and antimicrobial properties of PLA/nanoclay composite films. *LWT-Food Science and Technology*, 42(2), 612-617.

- [12] Salaberria, A. M., Diaz, R. H., Labidi, J., & Fernandes, S. C. (2015). Preparing valuable renewable nanocomposite films based exclusively on oceanic biomass—Chitin nanofillers and chitosan. *Reactive and Functional Polymers*, 89, 31-39.
- [13] Llana-Ruiz-Cabello, M., Pichardo, S., Baños, A., Núñez, C., Bermúdez, J. M., Guillamón, E., ... & Cameán, A. M. (2015). Characterisation and evaluation of PLA films containing an extract of *Allium* spp. to be used in the packaging of ready-to-eat salads under controlled atmospheres. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1354-1361
- [14] Villa-Rodriguez, J. A., Palafox-Carlos, H., Yahia, E. M., Ayala-Zavala, J. F., & Gonzalez-Aguilar, G. A. (2015). Maintaining antioxidant potential of fresh fruits and vegetables after harvest. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(6), 806-822
- [15] Suppakul, P. (2011). Natural extracts in plastic food packaging. In *Multifunctional and nanoreinforced polymers for food packaging* (pp. 421-459)
- [16] Carrizo, D., Gullo, G., Bosetti, O., & Nerín, C. (2014). Development of an active food packaging system with antioxidant properties based on green tea extract. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(3), 364-373.
- [17] Jamshidian, M., Tehrany, E. A., & Desobry, S. (2012). Release of synthetic phenolic antioxidants from extruded poly lactic acid (PLA) film. *Food Control*, 28(2), 445-455.

## **PARTIE III**

# **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

---

Cette partie présente les résultats expérimentaux obtenus lors des travaux de recherche objet de cette thèse. Elle se subdivise en trois chapitres :

1. Dans le premier chapitre, nous nous intéressons dans un premier temps à l'analyse de la composition chimique des HEs et d'extraits des plantes de rosmarin, de myrte, de thym, et de pistachier lentisque. Dans un deuxième temps, l'étude des activités antioxydantes et antifongique des différentes plantes objet de ce travail a été réalisée.
2. Le deuxième chapitre est consacré à la caractérisation, optique, thermique, mécanique, physique, et l'étude des activités biologiques des films actifs à base de PLA et d'amidon incorporant les HEs et les extraits organiques.
3. Le troisième chapitre porte sur l'étude de la stabilité des agents actifs dans le film après leur fabrication dans lequel on va s'intéresser à la quantification de ces substances dans le film et leurs interactions vis-à-vis d'un simulant alimentaire.

## **CHAPITRE I**

**Etude des Huiles essentielles et des  
extraits de plantes de romarin, de myrte,  
de thym et du pistachier lentisque**

## I. Extraction et analyse des HEs

### I.1 Etude de la cinétique d'extraction et de rendement en HEs

La durée d'extraction est un facteur très significatif dans le processus d'extraction, qui dépend principalement de la tension de vapeur des composés aromatiques [1]. Afin de pouvoir fixer la durée d'extraction optimale, le suivi de la cinétique du rendement d'extraction par hydrodistillation des HEs de romarin, de myrte, et de pistachier lentisque en fonction du temps est réalisée et les résultats sont représentés dans la figure I-1.

Les résultats relatifs aux rendements d'extraction des HEs de la partie aérienne de romarin (RN), de myrte (MN), et de pistachier lentisque (Pist) sont présentés dans le tableau I.1. Les HEs obtenues sont de couleur jaunes-pâles et d'odeur fortement herbacée.

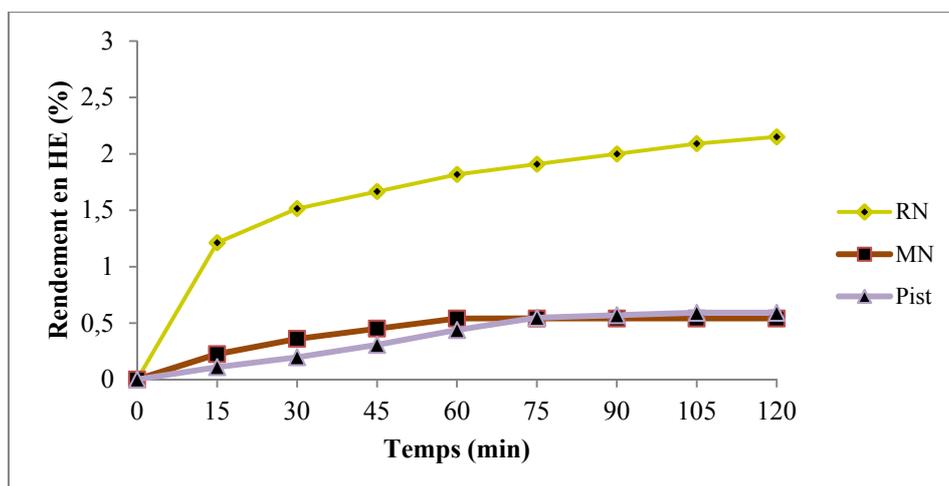


Figure I-1: Courbe du rendement des HEs en fonction du temps d'extraction

Le rendement en HE est exprimé en pourcentage massique (%), il est le rapport entre la masse d'huile obtenue et la masse de matière végétale sèche [2].

Selon l'allure de la courbe, nous notons que l'extraction passe par trois étapes :

- ✓ Une première étape d'extraction (0-45 min), correspondant à une étape d'extraction rapide de la matrice végétale. L'extraction commence lorsque l'eau atteint le point d'ébullition.
- ✓ Une deuxième étape d'extraction, qui correspond à l'épuisement de la matrice végétale (45-75).

- ✓ Une troisième étape, qui se traduit par un palier de stabilité et qui correspond au rendement maximum possible.

Les résultats enregistrés montrent que le rendement d'extraction atteint son maximum après deux heures du début d'ébullition de l'eau à des pourcentages de 2,15, 0,54 et 0,59% des HEs de RN, MN et Pist, respectivement (Tableau I-1). Ce qui correspond à l'épuisement total de la matière première et à la fin de la réaction. L'étude de Conde-Hernandez, et al., (2017) a montré que la cinétique d'extraction de l'HE de *Rosmarinus officinalis L* par la méthode d'hydrodistillation de Clevenger se fait également en trois étapes et que le rendement en huile est similaire à celui trouvé dans notre étude est de l'ordre de 2.3% [3]. Tandis d'autres travaux rapportent des rendements en HE de romarin plus faible et de l'ordre de 0,44% [4] et de 1% [5].

**Tableau I-1:** Variation du rendement d'extraction des HEs

HEs	Rendementt (%)
RN	2,15
MN	0,54
Pist	0,59

Paula Pereira, et al., (2016) et Ariana Bampouli, et al., (2014) ont étudié l'extraction de myrte et de pistchier lentisque par différents méthodes d'extraction [6,7]. Ils ont trouvé que le rendement de l'extraction varie significativement en fonction de la méthode utilisée. Ainsi, il apparait que la technique influe sur le rendement d'extraction des HEs. Quant à nos résultats, une variabilité importante de la teneur en HEs a été observée. Cette variabilité est due probablement à la variation de la période de la récolte, des conditions de séchage, du mode de distillation et/ou d'extraction.

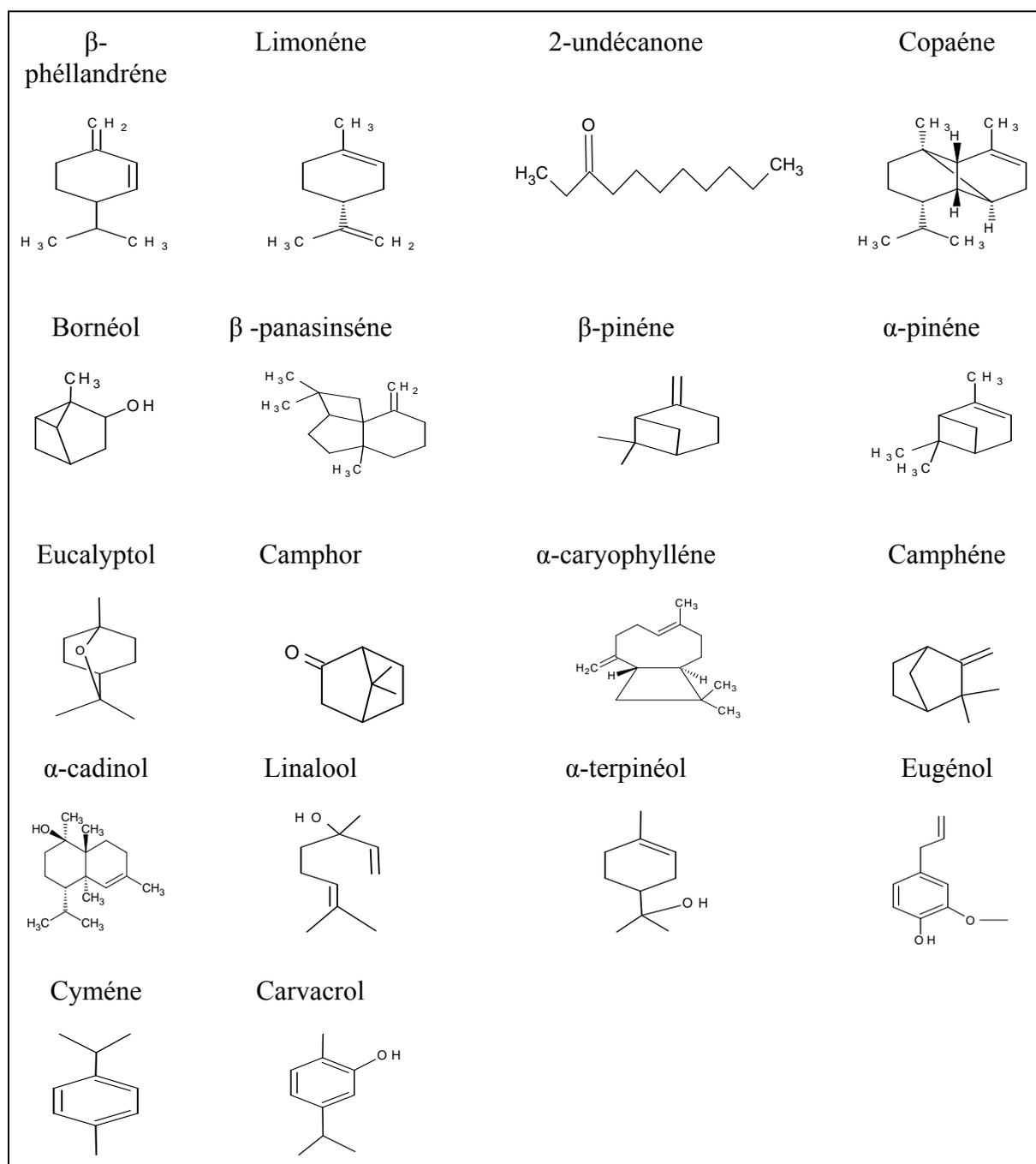
#### **I.2 Analyse des HEs par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de Masse (CPG-MS)**

L'analyse CPG-SM des HEs de RN, RC1, RC2, MN, MC, TC et Pist a permis d'identifier 17, 33, 28, 66, 23, 33, 100 composés contenus dans ces agents actifs, respectivement. Parmi ceux-ci, il s'est identifié des composés terpéniques et phénoliques qui sont les composés les plus importants dans les HEs qui fournissent des propriétés antimicrobiennes et

antibactériennes. La figure I-2 montre la structure des principaux composés phénoliques et terpéniques présents dans les HEs étudiées. La composition chimique des HEs obtenus dans cette étude est résumée dans le tableau I-2.

Ce dernier regroupe les résultats expérimentaux suivants :

- ✓ Le temps de rétention,
- ✓ Le nom du composé identifié,
- ✓ Le pourcentage du composé identifié par rapport à la totalité de l'HE étudiée.



**Figure I-2:** Les structures chimiques des composés majoritaires présents dans les HEs étudiées

**Tableau I-2:** La teneur en composés bioactifs présents dans HEs

<b>HEs</b>	<b>T<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Identification</b>	<b>% de total</b>
RN	5.02	$\alpha$ -pinene	12,1
	6.46	Eucalyptol	32,9
	8.31	Camphre	21,1
	8.69	Borneol	13,3
	5.24	Camphene	5,5
	5.63	$\beta$ -pinene	6,4
RC1	5.02	$\alpha$ -pinene	9,2
	6.40	Eucalyptol	42,9
	8.25	Camphre	7,0
RC2	5.09-6.01	$\alpha$ -pinene	16,8
	5.29	Camphene	10,5
	5.66-5.77	$\beta$ -pinene	9,4
	6.51	Eucalyptol	28,0
	8.37	Camphre	16,4
	8.709	Borneol	4,1
	8.70-9.17	$\alpha$ -terpineol	3,2
MN	5.10	$\alpha$ -pinene	19,6
	7.45	Linalool	14,3
	8.28	Camphre	0,1
	9.19	$\alpha$ -terpineol	6,5
	14.79	Eugenol	2,9

### *Partie III : Résultats et discussions*

MC	5.02	$\alpha$ -pinene	10,4
	6.40	Eucalyptol	1,4
TC	5.02	$\alpha$ -pinene	2,0
	6.29	<i>p</i> -Cymene	22,3
	12.22	Carvacrol	64,5
	6.41	Eucalyptol	0,3
Pist	5.12	$\alpha$ -pinene	4,1
	5.34	Camphène	2,1
	5.74	$\beta$ -pinene	1,4
	5.86	$\beta$ -phéllandréne	9,6
	6.47	Limonène	1,2
	12.33	2-Undecanone	3,0
	14.62	Copaéne	1,9
	16.31	$\alpha$ -Caryophylléne	1,0
17.40	$\beta$ -panasinséne	2,16	
19.50	$\alpha$ -cadinol	5,8	

La variation des pourcentages relatifs aux fractions terpéniques identifiées dans les HES est résumée dans le tableau I-3. Les HES de RN, RC1, RC2, MN et TC sont caractérisées par la prédominance en monoterpènes oxygénés. L'Eucalyptol, le Camphor, le Bornéol, l' $\alpha$ -terpinéol, le Linalool, L'Eugénol et le Carvacrol sont les constituants principaux de cette fraction. Les monoterpènes hydrocarbonés dominés par l' $\alpha$ -pinène, le Camphène, le  $\beta$ -pinène, le *p*-cymène, le Limonène, et le  $\alpha$ -phéllandréne sont moins présents. Quant à la fraction de sesquiterpéniques caractérisée par la présence de Copaéne, le  $\alpha$ -caryophylléne et le  $\beta$ -panasinséne dans l'huile essentielle de pistachier lentisque.

**Tableau I-3:** Nature et composition chimique des composés bioactifs identifiés dans les HEs

HEs	Hydrocarbures monoterpeniques (%)	Monoterpenes oxygénés (%)	Sesquiterpenes (%)	Total des Composés bioactifs identifiés (%)	Nombre des composés bioactifs
RN	24	67,3	-	91,3	6
RC1	9.2	49,9	-	59,1	3
RC2	36.7	51,7	-	88,4	7
MN	19.6	23,8	-	43,4	5
MC	10.4	1,4	-	11,8	2
TC	24.3	64,8	-	89,1	4
Pist	18.4	8,8	5.06	32,26	10

L'Eucalyptol est le composé le plus abondant dans les HEs de romarin (RN, RC1, RC2) suivie par le Camphre (21,1%),  $\alpha$ -pinène (9,2%) et  $\beta$ -pinène (9,4%). Une étude ancienne réalisée par Rašković et al., (2014) sur l'identification des composés majoritaires de l'HE de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), montre la présence d'Eucalyptol (43,7%) comme un composé abondant suivie par l'  $\alpha$ -pinène (11,5%) [8]. D'autre part, Wannes, et al., (2010) ont également étudié la composition chimique de l'HE de myrte de la Tunisie (*Myrtus communis* L.), l' $\alpha$ -pinène (58,8%) et l'Eucalyptol (21,6%) constituent la fraction majoritaire de cette huile [9].

La richesse de TC en Carvacrol est prouvée par El Abed et al., (2014) où ils ont montré que le Carvacrol (88.9%) est le composé dominant [10]. Bachroch et al., (2010) ont étudié la composition chimique de l'HE de pistacia lentiscus de la Tunisie, et ils ont montré que le Limonène (19,11%) et l'  $\alpha$ -pinène (9,48 %) sont les composés majoritaires [11]. Ce résultat ne concorde pas avec nos résultats, où le composé majoritaire identifié est le  $\beta$ -phéllandréne (Tableau I-4).

En comparant avec la composition chimique des HEs étudiés dans notre étude, on constate que les constituants abondants sont similaires à ceux identifiés dans ces travaux. Sauf

pour l'HE du pistachier lentisque qui a montré une composition chimique différente par rapport à des travaux antérieurs.

**Tableau I-4:** Les composés les plus abondants identifiés dans les HEs étudiés

<b>HEs</b>	<b>Composé</b>	<b>(%)</b>
RN	Eucalyptol	32,9
RC1	Eucalyptol	42,9
RC2	Eucalyptol	28,0
MN	$\alpha$ -pinéne	19,6
MC	$\alpha$ -pinéne	10,4
TC	Carvacrol	64,5
Pist	$\beta$ -phéllandrène	9,6

### **I.3 Analyse des HEs par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)**

Les spectres IR à transformée de Fourier et les identifications de bandes importantes de différentes HEs de RN, RC1, RC2, MN, MC et TC sont représentés sur la figure I-3.

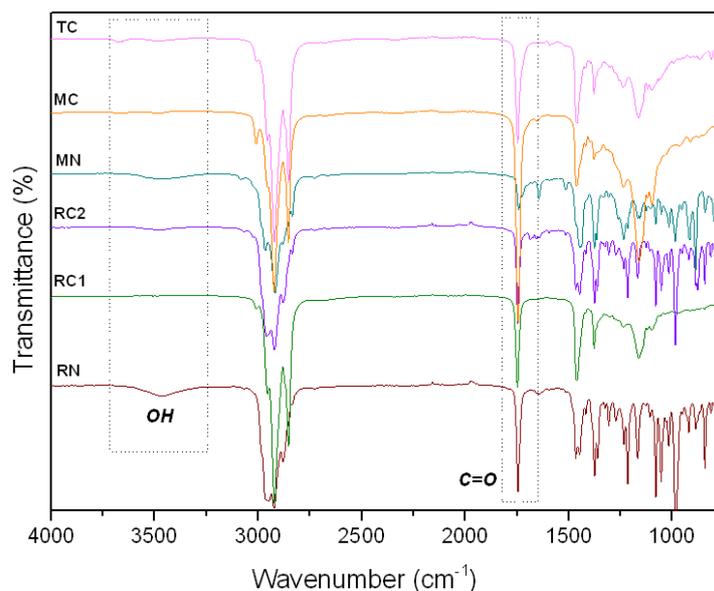
Les spectres de RN, RC2, MN, TC ont montré une large bande d'absorption vers 3400  $\text{cm}^{-1}$  qui est associé à la vibration d'élongation de la fonction d'alcool (-OH). Cette bande est attribué aux composés phénoliques présentent dans ces HEs tels que le Bornéol présent dans RN et RC2, le  $\alpha$ -terpinéol présent dans RC2 et MN et le Carvacrol présent dans TC.

Cette bande est très fine, ce qui est accordée à la teneur en composés phénoliques dans la composition de ces HEs. D'autre part, cette bande n'a pas apparue dans le spectre IR de RC1 et MC, ce qui est en corrélation avec l'absence des composés phénoliques dans la composition de ces deux HEs.

En outre, comme il est montré dans la figure I-3, il y a présence d'une bande vers 1745  $\text{cm}^{-1}$  caractéristique du groupe carbonyle (C=O). Cette bande est attribuée au composé Camphre qui est présent dans les HEs de RN, RC1, RC2, MN.

Les spectres de RN, RC1, RC2 et MC ont montré un signal vers  $1079\text{ cm}^{-1}$ ,  $1098\text{ cm}^{-1}$ ,  $1079\text{ cm}^{-1}$ ,  $1096\text{ cm}^{-1}$ , respectivement caractéristique du vibreur d'éther (C-O) indiquant la présence de composé Eucalyptol.

La spectroscopie IR a réussi à identifier les composés bioactifs contenus dans les HEs de RN, RC1, RC2, MN, MC, TC ce qui est probable pour les l'HE du pistachier lentisque.



**Figure I-3:** Les spectres Infrarouges des HEs

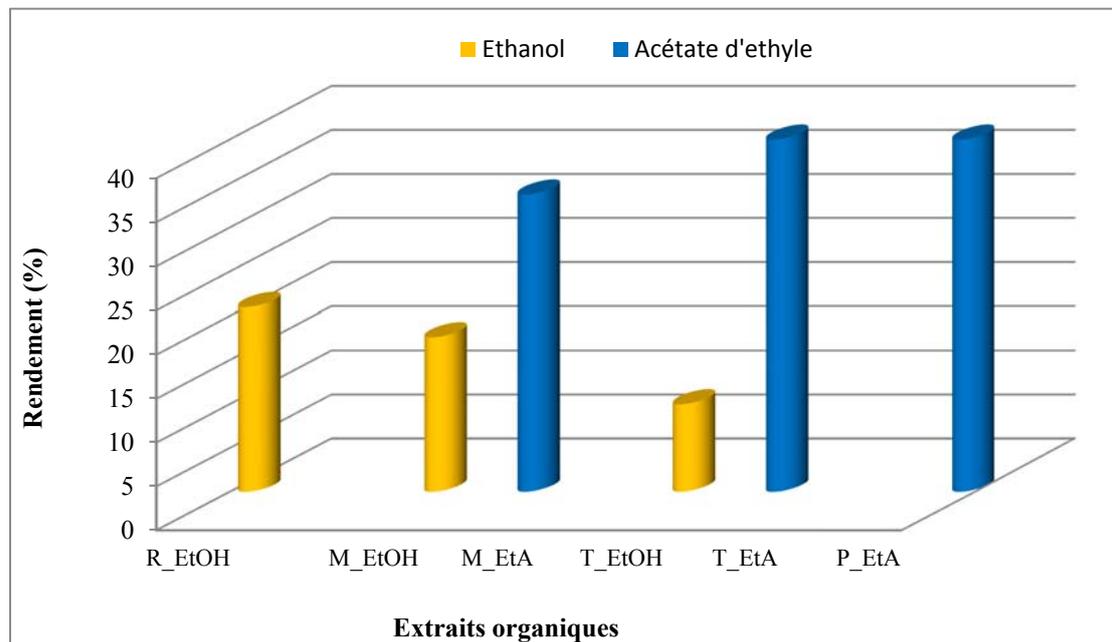
## **II. Préparation des extraits organiques à partir de la partie aérienne de romarin, myrte, thym, et pistachier lentisque**

### **II.1 Préparation des extraits et calcul du rendement**

La préparation des extraits à partir de romarin, de myrte, de thym et de pistachier lentisque est réalisée par macération à froid, une opération d'extraction qui consiste à placer en contact la partie aérienne et le solvant à une température ambiante afin de récupérer les molécules actives de la plante. La partie aérienne cueillie, séchée puis broyée est soumise à des macérations successives avec des solvants organiques à polarité croissante (acétate d'éthyle, éthanol). Les extraits éthanoliques de romarin, de myrte et de thym sont désignés par R\_EtOH, M\_EtOH et T\_EtOH, respectivement. Les extraits d'acétate d'éthyle de myrte, du pistachier lentisque et de thym sont désignés M\_EtA, Pist\_EtA et T\_EtA, respectivement.

C'est une approche d'extraction séquentielle qui vise à fractionner grossièrement les métabolites actifs des extraits de la plante selon leur degré de solubilité. Les résultats obtenus,

exprimés en pourcentage de la masse de la fraction obtenus par rapport à la masse de la matière végétale utilisée, sont regroupés dans la figure II-1.



**Figure II-1: Rendements en extraits obtenus en fonction de la nature du solvant d'extraction**

D'après ces résultats, on note que les rendements d'extraction de la partie aérienne des plantes de romarin, de myrte, de thym et du pistachier lentisque obtenus varient entre 10% et 47%. Les meilleurs rendements obtenus sont ceux des extraits d'acétate d'éthyle avec un taux de 47% suivie par 43,5% et 33,75% pour les extraits du pistachier lentisque, de thym et de myrte. Les plus faibles rendements sont observés pour les extraits éthanoliques de Thym, Myrte et de Romarin avec un taux de rendement de l'ordre de 10%, 17,6% et 21 % respectivement. Ces variations des rendements d'extraction pourraient être attribuées à la différence entre l'abondance des composés polaires et non polaires.

## **II.2 Analyse des extraits organiques par LC-UV/ESI-MS**

Les extraits de romarin, de myrte, de thym et du pistachier lentisque ont été analysés par un système d'UPLC avec un détecteur UV-visible couplé à un spectromètre de masse à ionisation positive et négative pour une caractérisation complète des composés bioactifs. L'identification des pics a été réalisée sur la base de leurs temps de rétention, leurs spectres d'absorption dans la région UV-visible, leurs spectres de masse et en se basant sur les informations précédemment rapportées dans la littérature. La figure située dans l'annexe 6 montre principalement le profil des spectres de masse des composés les plus abondants qui ont été détectés dans les extraits analysés.

Les profils LC-UV / ESI-MS des extraits de romarin, de myrte et de thym analysés ont montré plusieurs pics correspondant à différents composés de polyphénoliques, parmi lesquels 25 composés ont été caractérisés. Ces composés sont rapportés dans le tableau situé dans l'annexe 5, avec leur temps de rétention, absorbance maximale, masse moléculaire,  $m/z$  expérimentaux, les principaux fragments secondaires, la classe et la sous-classe chimique du composé proposé.

Cette analyse a été efficace pour identifier à peu près les composés les plus abondants présents dans les extraits de R\_EtOH, M\_EtOH, M\_EtA, T\_EtOH, T\_EtA. Parmi les structures identifiées dans les chromatogrammes LC-UV / ESI-MS (Annexe 6), on trouve principalement des glucosides flavonoïdes dérivés de Myricétine, Kaempférol, Lutéoline, Apigénine, Isorhamnétine, et des flavonoïdes méthylés comme la Cirsimaritine, le Carnosol, l'Hispiduline dont la structure est présentée dans la figure située dans l'annexe 7. En outre, l'acide phénolique dérivé de l'acide rosmarinique a été identifié parmi la composition chimique de R\_ETOH et T\_ETOH.

Les principaux composés antioxydants identifiés dans l'extrait de R\_EtOH appartiennent à différentes familles: diterpènes phénoliques (acide carnosique, rosmadial, carnosol et son isomère), flavonoïdes (genkwanin, acacetin et cirsimaritin), glucosides flavonoïdes (Isorhamnetin-3-O-glucoside et Lutéoline). 7-glucuronide) et d'autres types de composés phénoliques tels que l'acide rosmarinique. Plusieurs recherches ont été rapportées sur l'analyse de la composition de l'extrait de romarin par différentes techniques, et il s'est avéré que le profil identifié dans R\_EtOH est similaire à ces travaux [12,13,14,15,16].

Les polyphénols détectés dans les extraits d'acétate d'éthyle de myrte et de thym (M\_EtA, T\_EtA) contenaient deux flavonoïdes glycosides abondants dérivés de la myricétine qui sont myricétin-3-O-galactoside et myricétin-3-O-rhamnoside. Contrairement à l'apigénine-7-O-glucuronide qui a été identifiée dans la composition chimique de T\_EtA. Cette composition conforme avec des travaux précédemment rapportés sur l'extrait de myrte [6,9] et l'extrait de thym [17,18,19]. L'acétate d'éthyle est un solvant moins polaire, qui concentre les composés phénoliques, et présente la polarité la plus appropriée pour la solubilisation des monoglucosides les moins polaires. D'autre part, le M\_EtOH montre la possibilité de la présence d'une faible concentration de flavonoïdes glycosides dans sa composition.

De plus, l'analyse réalisée dans l'extrait de T\_EtOH a montré la présence d'autres composés phénoliques parmi lesquels les flavonoïdes méthylés, les flavanes, l'acide

phénolique. Ces composés ont déjà été rapportés dans plusieurs études sur l'espèce de thym [20,21].

Les pics 3-14-15-18-21-22-23-25-31-32-35 n'ont pas été identifiés par la technique LC-MS. En tenant compte de leur spectre UV et leurs données MW, ces pics pourraient se référer à des substances de faible poids moléculaire telles que le polyalcool ou les acides phénoliques.

La technique de LC-UV / ESI-MS n'a pas pu identifier les composés possibles de l'extrait du pistachier lentisque, ce problème est dû peut être à une faible solubilisation de l'extrait dans le solvant d'analyse, ou il pourrait être très utile si nous utiliserons des techniques analytiques complémentaires qui peuvent vous donner des informations structurelles supplémentaires, telles que la RMN ou MS / MS.

### **II.3 Analyse des extraits organiques par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)**

## **III. Screening chimique des HEs et des extraits organiques**

Les tests de caractérisation des familles chimiques sont nécessaires pour révéler les principaux composants photochimiques actifs contenus dans la plante. Parmi ces précieuses molécules on retrouve, les polyphénols, les flavonoïdes [22].

L'examen photochimique des HEs de RN, RC1, RC2, MN, MC, TC et Pist et des extraits organiques de R\_EtOH, M\_EtOH, M\_EtA et T\_EtOH, T\_EtA et Pist\_EtA tels que les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes ont été évalué par des méthodes spectroscopiques. Les résultats sont regroupés dans le tableau III-1

### **III.1 Dosage des polyphénols totaux**

Les polyphénols totaux sont dosés selon la méthode spectroscopique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. L'acide Gallique, à différentes concentrations, est utilisé comme référence pour tracer la courbe d'étalonnage (Annexe1). Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg.EAG/g.MS).

Les résultats enregistrés pour les HEs montrent que TC est l'HE le plus riche en polyphénols ( $20,0 \pm 0,12$ ) suivie par Pist ( $17,73 \pm 0,13$  mg.EAG/g.MS) puis RC2 ( $16,84 \pm 0,06$  mg.EAG/g.MS) et RN ( $13,86 \pm 0,13$  mg.EAG/g.MS). Cependant, MC et RC1 sont les HEs les plus pauvres en ces métabolites ( $13,86 \pm 0,13$  mg.EAG/g.MS et  $1,02 \pm 0,03$  mg.EAG/g.MS,

### Partie III : Résultats et discussions

respectivement). Ces résultats sont liés à la composition chimique des HEs qui a été profondément analysée dans la section ci-dessous. Le contenu phénolique dans TC est associé à sa teneur élevée en Carvacrol (64,5%) qui présente le composé abondant dans sa composition. De plus, l' $\alpha$ -cadinol est considéré comme le deuxième composé majoritaire (5,8%) de l'HE de Pistachier lentisque.

**Tableau III-1:** Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des HEs et des extraits

Echantillons	Teneurs en Polyphénols (mg.EAG/g.MS) <sup>1</sup>	Teneurs en Flavonoïdes (mg.EQ/g.MS) <sup>2</sup>	Statistique significative <sup>3</sup>
RN	13,86 ± 0,13	-	***
RC1	0,40 ± 0,42	-	***
RC2	16,84 ± 0,06	-	***
HEs MC	1,02 ± 0,03	-	***
TC	20,0 ± 0,12	-	***
Pist	17,73 ± 1,54	25 ± 4.40	***
R_EtOH	108,5 ± 3,2	502,4 ± 0,93	***
M_EtOH	263,9 ± 7,2	197,4 ± 8,40	***
Extraits M_EtA	197,3 ± 13,8	759,9 ± 58,56	***
T_EtOH	275,0 ± 5,6	706,9 ± 3,86	***
T_EtA	208,4 ± 6,2	571,6 ± 17,27	***
Pist_EtA	175,1 ± 10,3	592,1 ± 15,25	***

<sup>1</sup>mg.GAE/g.MS(mg d'équivalent d'acide gallique par g de la masse sèche). <sup>2</sup>mg.EQ/g.MS (mg d'équivalent de Quercétine par g de la masse sèche). <sup>3</sup> une manière ANOVA: la moyenne de la population est significativement différente niveau 0.001(\*\*\*)

D'autres auteurs ont déterminé que la teneur en polyphénols totaux de *Romarin Officinalis* est de l'ordre de 23,32 mg.GAE / g.dw [23]. Les HEs peuvent avoir une composition chimique

différente selon l'origine, les conditions géographiques et la technique d'extraction [10]. De plus, les activités antimicrobiennes sont strictement associées à la présence des composés bioactifs dans les HEs [24].

Les résultats enregistrés pour les extraits, montre que les extraits éthanoliques sont les plus riches en polyphénols. Au vu des résultats, on note que l'extrait éthanolique de thym (T\_EtOH) est l'extrait le plus riche en polyphénols ( $275,0 \pm 5,6$  mg.EAG/g.MS) suivi par l'extrait de myrte dans l'éthanol (M\_EtOH)  $263,9 \pm 7,2$  mg.EAG/g.MS, puis les extraits d'acétate d'éthyle de thym (T\_EtA), de myrte (M\_EtA) et de pistachier lentisque (P\_EtA) avec des teneurs de l'ordre de  $208,4 \pm 6,2$ ,  $197,3 \pm 13,8$  et  $175,1 \pm 10,3$  mg.EAG/g.MS, respectivement. L'extrait de romarin (R\_EtOH) présente l'extrait le moins riche en composés polyphénoliques ( $108,5 \pm 3,2$  mg.EAG/g.MS).

Ainsi, il apparaît clairement que la quantité des polyphénols totaux varie très significativement (\*\*\*) selon la nature du solvant d'extraction utilisé. En effet, l'éthanol possède une grande affinité vis-à-vis des polyphénols que l'acétate d'éthyle. Il solubilise plus facilement ces molécules ce qui favorise leur extraction. Conséquemment, on peut conclure que les polyphénols sont des métabolites à caractère polaire.

Une étude élaborée par El Ouariachi et al., (2011) ont indiqué que l'extrait Thym dans l'acétate d'éthyle présente une teneur en polyphénols presque similaire à celle trouvé dans notre étude [25]. Cependant, Saadaoui et al., (2007) ont montré que l'extrait méthanolique de *Thym* présente une faible teneur en polyphénols de l'ordre de  $1,68$  mg.GAE / g.MS [26].

Une étude portée sur l'extrait de *Myrte* a montré que le contenu en polyphénols est très faible et de l'ordre de  $25,25$  mg.EAG/g.MS [27].

Cependant, une autre étude réalisée par Moreno et al., (2006) ont montré une teneur en polyphénols de l'extrait de Romarin dans différents solvants d'extraction (Acétone, MeOH, eau) variant entre 3 à  $19$  g.EAG/100g.MS [28].

Hendel et al., (2016) ont suggéré que le total phénolique des extraits organiques dépend de plusieurs facteurs, tels que le solvant d'extraction, les conditions expérimentales et la méthode d'extraction [29].

Comparant à la teneur en polyphénols des HEs, les extraits organiques montre une composition importante en polyphénols.

### **III.2 Dosage des flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes est réalisé par la méthode du trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ). Nous avons estimé la teneur en flavonoïdes contenus dans les HEs à partir d'une courbe d'étalonnage tracée avec la Quercétrine (Annexe2).

Les résultats ont révélé que les HEs contiennent une quantité très négligeable en flavonoïdes, sauf pour l'HE de pistachier lentisque qui présente une teneur en flavonoïdes modéré ( $25 \pm 4,40 \text{ mg.EQ/g.MS}$ ) (Tableau III-1).

En revanche, les extraits organiques montrent une teneur en flavonoïdes importante. On note que l'extrait d'acétate d'éthyle de myrte (M\_EtA) présente l'extrait le plus riche en flavonoïdes ( $759,9 \pm 58,56 \text{ mg.EQ/g.MS}$ ) comparé à celui dans l'éthanol (M\_EtOH) ( $197,4 \pm 8,40 \text{ mg.EQ/g.MS}$ ). Nous pouvons déduire que les flavonoïdes de l'extrait de myrte sont beaucoup plus apolaires que polaires. Contrairement à l'extrait de T\_EtOH, où les flavonoïdes sont plus polaires qu'apolaires, ce qui montre la teneur élevée en flavonoïde de l'extrait éthanolique de thym (T\_EtOH) ( $706,9 \pm 3,86 \text{ mg.EQ/g.MS}$ ) par rapport à l'extrait d'acétate d'éthyle (T\_EtA) ( $571,6 \pm 17,27 \text{ mg.EQ/g.MS}$ ).

La teneur en flavonoïdes des extraits de R\_EtOH ( $502,4 \pm 0,93 \text{ mg.EAG/g.MS}$ ) et de Pist\_EtA ( $592,1 \pm 15,25 \text{ mg.EAG/g.MS}$ ) sont plus élevés à ceux trouvés dans autres travaux. A savoir, la composition en flavonoïdes a été révélé de l'ordre de 38,01 et de 19,68 mg.EAG/g.MS pour les extraits d'acétate d'éthyle de romarin et de pistachier lentisque, respectivement [29,30].

## **IV. Etude des activités biologiques des HEs et des extraits organiques**

Pour chaque espèce végétale, chaque famille ou genre de plante, la nature des métabolites secondaires est à l'origine de leurs activités biologiques. Ces activités sont aussi apparentées à la teneur du composé ou l'ensemble des composés biologiquement actifs. Ainsi l'évaluation des activités biologiques des plantes constitue un champ de recherche très attractive qui nous permet de sélectionner les médicaments à base de plante en fonction de leur activité.

A cet égard, on s'est intéressé dans le présent travail à l'évaluation des propriétés antioxydantes, et antifongiques des HEs (RN, RC1, RC2, MC, TC, Pist) et des extraits éthanolique (R\_EtOH, M\_EtOH, T\_EtOH) et d'acétate d'éthyle (M\_EtA, T\_EtA, Pist\_EtA) du romarin, myrte, thym et pistachier lentisque.

#### IV.1 Evaluation de l'activité antioxydante

La teneur en polyphénol des HEs et des extraits organiques a généralement une influence significative sur l'activité antioxydante. L'évaluation de cette activité est réalisée par deux méthodes, la première est par DPPH et la deuxième est par ABTS. L'acide ascorbique (Vit C) est utilisé comme un antioxydant de référence et ses valeurs de la  $CI_{50}$  dans les deux méthodes (DPPH et ABTS) sont calculés à partir de sa courbe d'étalonnage (Annexe 3 et 4). Un screening chimique est effectué pour les HEs et les extraits pour déterminer le pourcentage d'inhibition de chacun, puis les meilleurs sont formulés en termes de  $CI_{50}$  (mg/L).

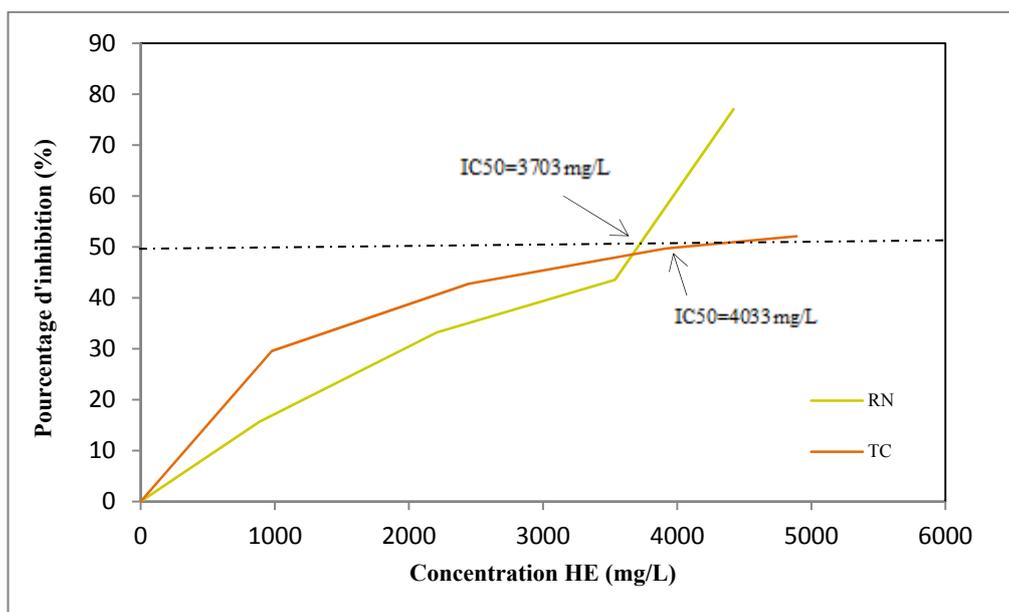


Figure IV-1: Détermination de l' $IC_{50}$  des HEs de RN et TC par DPPH

##### IV.1.1 Test de DPPH

Le principe consiste à mesurer, indirectement, la capacité de l'extrait à inhiber la génération des radicaux par donation d'un atome d'hydrogène. Le radical stable 1,1-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH $^{\bullet}$ ) possède une couleur violette foncée, qui devient jaunâtre lorsqu'il est réduit par un antioxydant (AH) selon l'équation suivante:



Le suivi de la décroissance de la coloration est réalisé par spectrophotométrie à 520 nm, et les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition et en  $CI_{50}$  (mg/L), définit comme étant la concentration d'HE /ou d'extrait requise pour réduire 50% de la quantité initiale de DPPH.

Les résultats obtenus pour l'étude de pouvoir antioxydant des HEs par la méthode de DPPH sont illustrés dans le tableau IV-1. Au vue de ces résultats, on note que RN et TC ont une capacité à inhiber les radicaux libres la plus élevée. Cependant, le pouvoir d'inhibition des HEs de RC1, RC2, MC et Pist est faible.

Si on comparons les teneurs en composés phénoliques des HEs, il apparait que les HEs qui sont riche en composés phénoliques ont la capacité inhibitrice des radicaux la plus élevée.

La détermination de la  $CI_{50}$  de TC, RN a été réalisé en calculant le pourcentage d'inhibition des différentes concentrations d'HE. Le pourcentage d'inhibition augmente avec la concentration des HEs (Figure IV-1). La  $CI_{50}$  de RN et de TC sont de l'ordre de  $3703 \pm 609,21$  mg/L et  $4033 \pm 30,06$  mg/L, respectivement. Nous remarquons que la capacité antioxydante est très faible si nous la comparons au vit C.

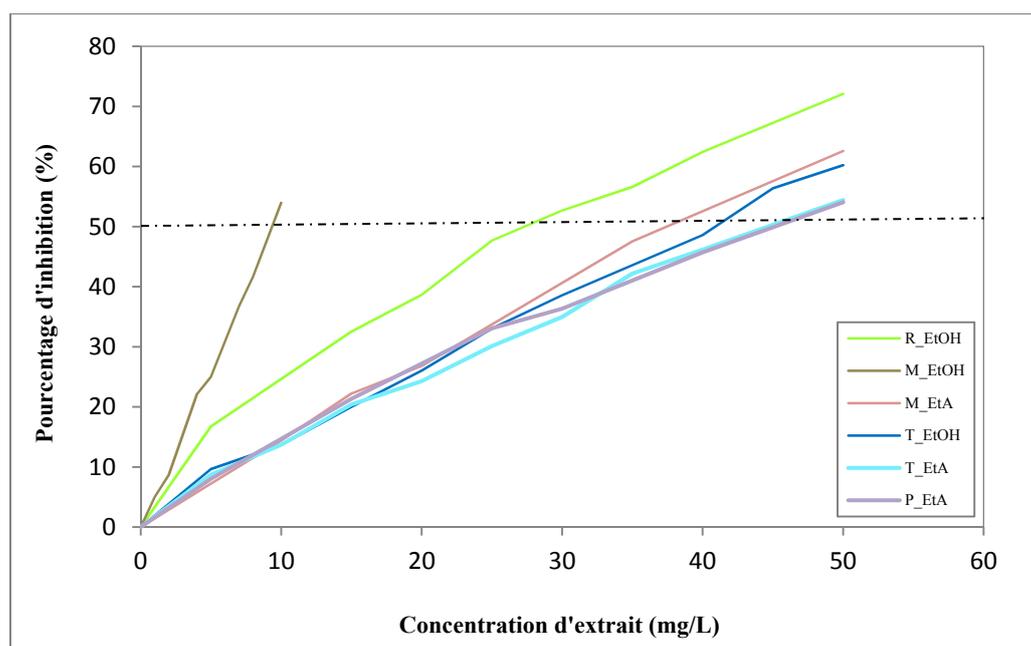
Selon la littérature, le Carvacrol (le composé majoritaire dans TC) a une  $CI_{50}$  de l'ordre de 0,4 mg / L [24,31], donc il est bien connu comme une molécule antioxydante. D'autre part, dans des travaux réalisés par Lado, et al., (2004) et par Lee et Shibamoto., (2001), il apparait que l' $\alpha$ -pinène et le *p*-cymène ( qui sont présents dans la composition de TC) n'ont pas montré une activité [32,33]. En outre, l'Eucalyptol le composé abondant dans les HEs de RN, RC1, RC2 a montré une faible activité antioxydante (100  $\mu$ g / mL) [34]. D'après el Abed et al, les groupes fonctionnels présents dans les composés bioactifs des HEs affectent leurs capacité à réagir avec les différents radicaux [10]. Ces résultats montrent que la faible activité antioxydante est liée à la composition en polyphénols contenus dans les substances testées.

Les résultats obtenus de l'étude du pouvoir antioxydant des extraits par la méthode de DPPH sont illustrés dans le tableau IV-1 et la figure IV-2. D'après ces résultats, nous notons que l'extrait éthanolique de myrte génère un pouvoir antioxydant le plus fort d'où la  $CI_{50}$  est de l'ordre de 9,42 mg/L.

Une activité modéré a été enregistré dans les extraits éthanolique de romarin (R\_EtOH) et de thym (T\_EtOH), et dans les extraits d'acétate d'éthyle de myrte (M\_EtA), thym (T\_EtA) et pistachier lentisque (P\_EtA) où leurs  $CI_{50}$  est de l'ordre de  $30,20 \pm 0,26$ ,  $40,60 \pm 0,41$ ,  $38,50 \pm 0,87$ ,  $43,83 \pm 2,29$  et  $43,75 \pm 0,15$  mg/L, respectivement. Si nous comparons les teneurs des composés phénoliques des extraits, nous remarquons que les extraits ayant une composition en polyphénols importante sont les extraits les plus actifs. Cette constatation confirme l'hypothèse de Bentabet et al., (2014) selon laquelle le fort pouvoir antioxydant des extraits végétaux des racines de *Fredolia aretioides* est souvent attribué à la présence des polyphénols entre autres

groupes de composés polaires [35]. En effet, Kang et al., (2003) ont attribué l'augmentation de l'effet antioxydant des extraits de plantes à la présence des composés polaires [36]. De plus, Gardeli et al., (2008) ont suggéré que la forte activité antioxydante des extraits méthanoliques du *Pistacia lentiscus L* et de *Myrtus communis L* est attribuée à la présence des flavonoïdes [37]. Ainsi une étude portée par Ghazouani et al., (2016) sur la corrélation entre les teneurs des polyphénols totaux, des flavonoïdes et l'activité antioxydante des extraits de *T. ramosissimum* [38]. Selon cette étude, l'activité antioxydante des extraits se corrèle avec les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes, où les coefficients de corrélation ( $R^2$ ) sont de 0,664 et 0,701, respectivement.

Nos constatations montrent que le pouvoir antioxydant des extraits (R\_EtOH, M\_EtOH, M\_EtA T\_EtOH, T\_EtA, Pist\_EtA) est proportionnel à leur contenu en polyphénols et en flavonoïdes. Nos résultats concordent aussi avec ceux trouvés par Riahi et al., (2013). En effet, ils ont montré que la capacité antioxydante des extraits méthanoliques d'*Artemisia absinthium L* est liée à leur teneur en polyphénols et en flavonoïdes [39].



**Figure IV-2: Détermination de l'IC<sub>50</sub> des extraits par DPPH**

#### **IV.1.2 Tests d'ABTS**

Le sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS<sup>•+</sup>) est un radical cationique de couleur bleue à verte. Après réaction avec un antioxydant (AH), ce radical est réduit et se transforme en un composé incolore : le ABTSH<sup>+</sup>. Le suivi de la réaction se fait par spectrophotométrie UV visible par mesure de l'intensité de la couleur à 734

nm. Les résultats sont exprimés en  $CI_{50}$  (mg/L), concentration nécessaire qui cause la perte de 50% de l'activité du radical  $ABTS^{*\cdot}$ . L'acide ascorbique est utilisé en tant qu'antioxydant de référence.

Les résultats obtenus de l'étude du pouvoir antioxydant des HEs (RN, RC1, RC2, MC, TC, Pist) des extraits organiques de romarin (R\_EtOH), de myrte (M\_EtOH, M\_EtA), de thym (T\_EtOH, T\_EtA) et du pistachier lentisque (Pist\_EtA) par la méthode ABTS sont illustrés dans le tableau IV-1.

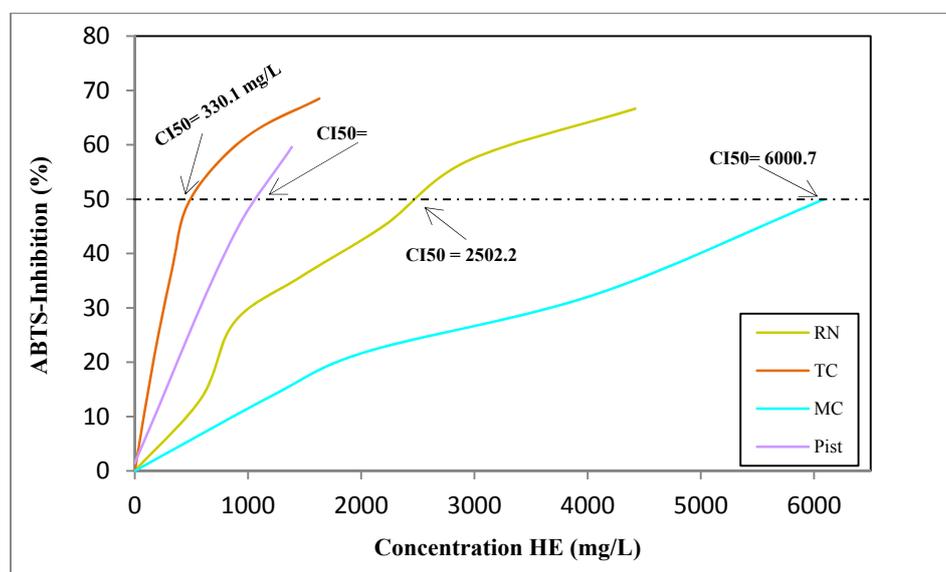
Les résultats enregistrés pour les HEs de RN, MC, TC et Pist ont montré une capacité inhibitrice ( $70,7 \pm 1,87\%$ ,  $52,9 \pm 10,24\%$ ,  $87,2 \pm 1,91\%$  et  $76 \pm 2,22\%$ , respectivement) meilleur que par la méthode de DPPH. La capacité de piégeage de ces HEs reste inférieure (Figure IV-3) à celle de l'acide ascorbique dont la  $CI_{50} = 1,27 \pm 0,02$  mg/L. Au vu de ces résultats, on note que l'activité antioxydante des différentes HEs trouvés par le radical d'ABTS suit à peu près la même tendance que le DPPH.

Les résultats enregistrés pour les extraits organiques montrent que les extraits d'éthanol et d'acétate d'éthyle de myrte (M\_EtOH, M\_EtA) sont les plus actifs suivi par les extraits éthanolique de thym (T\_EtOH) et de romarin (R\_EtOH) avec des valeurs de  $CI_{50}$  de  $4,20 \pm 0,14$ ,  $7,20 \pm 0,38$ ,  $12,0 \pm 0,12$ ,  $13,20 \pm 0,27$  mg/L, respectivement (Figure IV-4).

Au vu de ces résultats, nous notons que l'activité antioxydante des différents extraits évalués par le radical ABTS suit à peu près la même tendance de DPPH. De plus, la capacité de piégeage des radicaux est supérieure que celle révélée par le radical DPPH. Ce résultat est en accord avec de nombreuses études antérieures. En effet, Bekir et al., (2013) ont trouvé des résultats similaires en mesurant le pouvoir antioxydant des extraits de grenade (*Punica granatum*) par ces deux méthodes [40]. De même Ben Hassine et al ont montré dans une étude réalisée sur des extraits d'*Eucalyptus gillii* que l'activité antioxydante obtenue par le test ABTS est plus importante que celle trouvée par le test DPPH [41]. Une telle différence peut être expliquée par le fait que les constituants phytochimiques des extraits répondent différemment aux méthodes de mesure utilisées. Ils réagissent mieux avec le radical ABTS qu'avec celui de DPPH. Cette différence peut être également expliquée par les mécanismes réactionnels mis en jeu. La méthode ABTS est basée sur un transfert d'électrons, la réaction est relativement beaucoup plus rapide que celle de la méthode DPPH.

Reitzer, et al., (2018) ont rapporté que les polyphénols ont des propriétés antioxydantes qui présentent un grand intérêt en thérapeutique. Le métabolisme cellulaire produit plusieurs

espèces réactives de l'oxygène (ROS). Si les cellules eucaryotes présentent des mécanismes de balayage pour ces ROS, il a été démontrée qu'avec le vieillissement, la quantité de ROS augmente et peut produire des dommages à l'ADN pouvant conduire à une sénescence cellulaire. Les polyphénols jouent un rôle protecteur dans de tels phénomènes [42].



**Figure IV-3:**Détermination de l'IC<sub>50</sub> des HEs de RN et TC par la méthode d'ABTS

**Tableau IV-1:** Activité antioxydante des HEs et des extraits organiques par DPPH et ABTS

Echantillons	Inhibition DPPH (%)	Inhibition ABTS (%)	IC <sub>50</sub> (DPPH) (mg/L)	IC <sub>50</sub> (ABTS) (mg/L)
RN	55,3 ± 2,30	70,7 ± 1,87	3703 ± 609,21	2502,2 ± 168,19
RC1	31,6 ± 1,31	6,4 ± 9,26	-	-
RC2	0 ± 0,26	4,0 ± 0,41	-	-
MC	2 ± 17,41	52,9 ± 10,24	-	6000,7 ± 240,24
TC	81,7 ± 0,68	87,2 ± 1,91	4033 ± 30,06	330,1 ± 50
Pist	13,50 ± 1,23	76 ± 2,22	-	1116,8 ± 23,88
R_EtOH	86,72 ± 0,46	87,16 ± 0,64	30,20 ± 0,26	13,20 ± 0,27
M_EtOH	83,50 ± 2,56	89,25 ± 2,57	9,42 ± 0,22	4,20 ± 0,14

Extraits	M_EtA	89,60 ± 0,71	88,73 ± 0,15	38,50 ± 0,87	7,20 ± 0,38
	T_EtOH	76,80 ± 1.45	83,34 ± 0,59	40,60 ± 0,41	12,0 ± 0,12
	T_EtA	83,14 ± 0,90	88,28 ± 1,36	43,83 ± 2,29	23,11 ± 10,7
	Pist_EtA	77,07 ± 0,92	88,26 ± 0,94	43,75 ± 0,15	14,70 ± 0,38
Vit C			2,28 ± 0,02	1,27 ± 0,02	

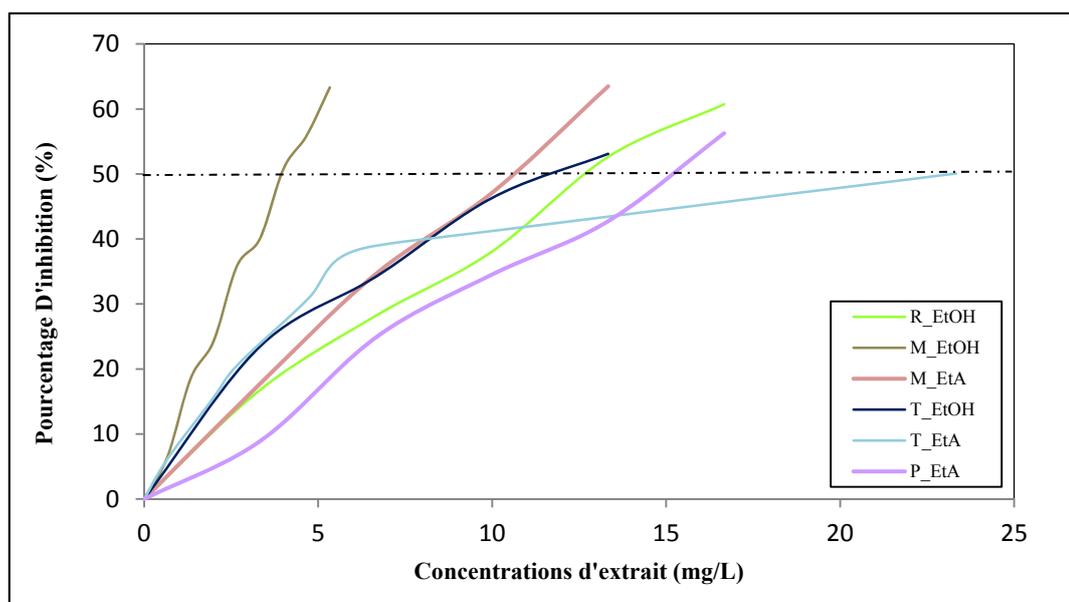


Figure IV-4: Détermination de l'IC50 des extraits par ABTS

## IV.2 Evaluation de l'activité antifongique

L'objectif principal des tests antifongiques est d'évaluer l'utilisation potentielle des HEs et des extraits organiques comme inhibiteurs de champignons pour leurs utilisation dans les emballages alimentaires, en tenant compte du fait que *A.niger* est bien connu comme un contaminant des fruits, des légumes et des aliments [43].

A cet égard, on a choisit d'apprécier l'activité antifongique des différentes concentrations des HEs (1, 2,5, 5, 7,5 et 10%) et des extraits organiques (2, 4 et 10%).

### IV.2.1 Activité antifongique des HEs

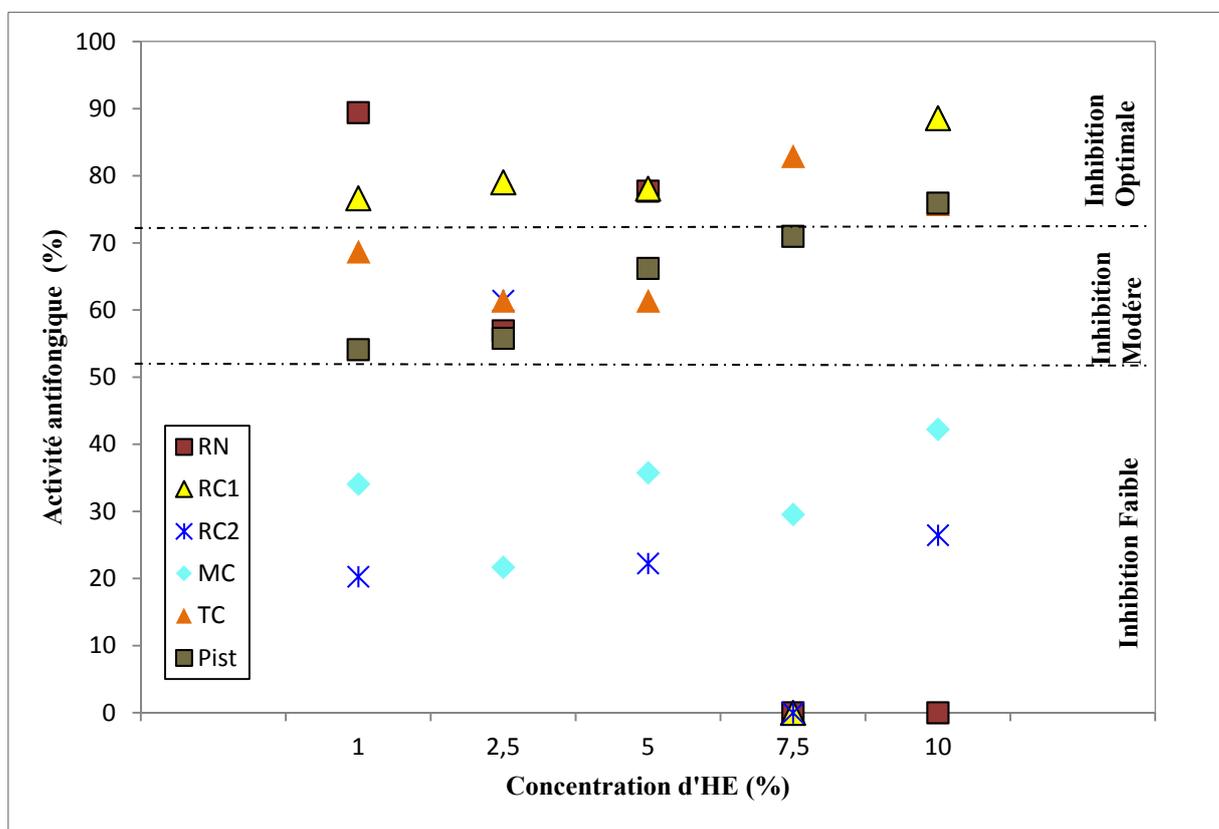
Les résultats de l'activité antifongique des HEs sont illustrés dans la figure IV-6 et exprimés en :

- ✓ Pourcentage d'inhibition supérieurs à 70%, définit comme étant une inhibition optimale,

- ✓ Pourcentage d'inhibition entre 50 et 70%, définit comme étant une inhibition modérée,
- ✓ Pourcentage d'inhibition inférieurs à 50%, définit comme étant une inhibition faible

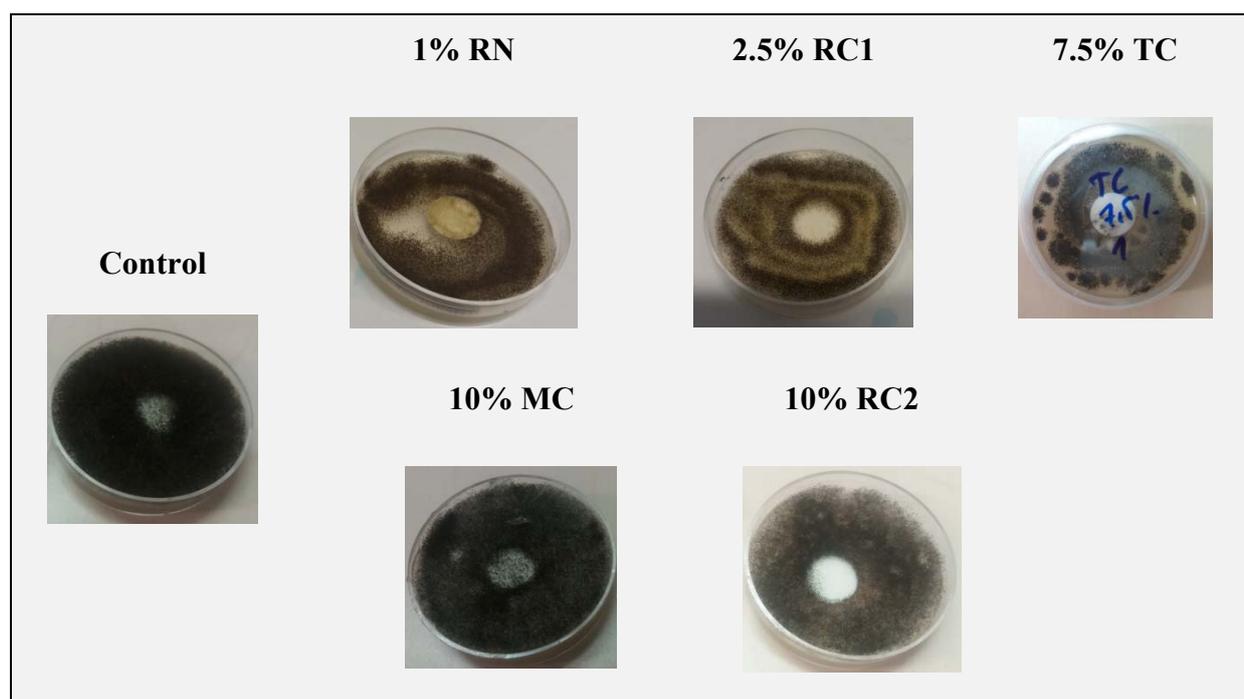
la figure IV-7 montre visuellement l'action de quelques HEs contre la croissance fongicide après 7 jours d'incubation. Les résultats de la croissance fongicide en présence des HEs est exprimés dans la figure IV-8.

La figure IV-7 montre l'inhibition des HEs contre la croissance fongique de l'*A.niger* (FGI%). Les HEs de RN, RC1, TC et Pist ont une activité inhibitrice importante contre le champignon alimentaire et dans la plupart des cas elle augmente avec la quantité d'HE incorporée. Ainsi, les HEs de RN, RC1 ont inhibé la croissance fongique à des faible concentrations (1 et 2,5%). Quant à TC et Pist, ces HEs ont montré un effet d'inhibition optimal à des concentrations élevées (Figure IV-6).



**Figure IV-5: Activité antifongique des HEs**

Au vue de ces résultats, 5% de RN, RC1, TC et Pist été suffisants pour stopper la croissance d'*A.niger* (Figure IV-6). Tous les résultats ont été significativement différents statistiquement 0,001 (One Way ANOVA).



**Figure IV-7:** La croissance fongique de *A.niger* en contact avec la pastille de cellulose contenant l'HEs après 7 jours d'incubation

Nos résultats peuvent être reliés au profil chimique de ces HEs. L'Eucalyptol est le composé majoritaire de RN et RC1 (32,9-42,9%, respectivement) et le Carvacrol est le composé abondant de TC (64%). Ces composés sont mis en évidence en tant qu'inhibiteurs de champignons, en particulier le terpène phénol (le Carvacrol) qui présente un large éventail d'activité antimicrobienne [44,45,46] et le monoterpène oxygéné 1,8-cinéole (Eucalyptol) qui est connu comme un composé antimicrobien [47,48].

Une étude a montré que les propriétés antifongiques des huiles essentielles sont généralement attribués à la présence des composés monoterpéniques hydrocarbonés or, le chémotype défini par l'huile essentielle du pistachier lentisque est particulièrement riche en monoterpènes hydrocarbonés et en sesquiterpènes [49]. Par ailleurs, Chang et al., (2008) ont montré que l'activité antifongique des sesquiterpènes est supérieure à celle des monoterpènes, or, la teneur en sesquiterpènes de l'huile essentielles du pistachier lentisque est inférieure aux monoterpènes hydrocarbonés, expliquant ainsi le fait qu'on n'ait pas obtenu une inhibition totale de croissance des champignons [50]. Nous concluons alors que l'activité antifongique de l'huile essentielle du pistachier lentisque est due à la présence à la fois de sesquiterpènes et de monoterpènes et à la synergie entre ses composés.

D'autre part, les HEs de MC et RC2 présente une faible inhibition contre *A. niger*. Ces résultats pourraient être liés à la composition chimique de ces HEs, dans lesquels l' $\alpha$ -pinène est l'un des principaux composés de RC2 et MC (16,8%, 10,4%, respectivement), et des études ont prouvé que l' $\alpha$ -pinène est un composé actif contre les genres de Basidiomycota, mais pas sur Ascomycota [51].

Le mécanisme possible de toxicité contre les champignons est basé sur l'inactivation des enzymes fongiques contenant des groupes SH dans leur site actif [45], ainsi que les changements morphologiques causés par l'Eucalyptol et le Carvacrol, comme le manque de sporulation, perte de pigmentation, développement aberrant de conidiospores et distorsion des hyphes [52]. L'Eucalyptol et le Carvacrol pourraient également agir en se liant aux groupes amines et à l'hydroxylamine des protéines membranaires microbiennes, provoquant une altération de la perméabilité et une fuite de composants intracellulaires [53,54]. Giordani et al., (2006), ont mentionné que les groupes fonctionnels de composés terpéniques dans les HEs (phénols et aldéhydes) réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent ainsi la membrane plasmique provoquant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la reprise fongique [55].

Concernant le mode d'action des monoterpènes hydrocarbonés qui sont des composés apolaires doués d'un grand pouvoir pénétrant ont donc la possibilité de traverser les membranes cellulaires en établissant des pores, altérant ainsi l'intégrité et la fluidité membranaire par l'insertion des monoterpènes entre les acides gras de la bicouche lipidique membranaire, perturbant par conséquent les fonctions cellulaires [56]. Il semblerait que les terpènes exercent un dysfonctionnement des pompes à protons ATPase pouvant conduire à la mort cellulaire [57,58,59].

Un effet particulier a été trouvé à 7,5% des HEs, à l'exception de TC, où la croissance des champignons marque une augmentation remarquable. On peut considérer ceci comme un effet lent des HEs contre la croissance fongicide comme il a rapporté Banci, (1997). D'où il a rapporté que les raisons de l'effet lent des HEs à certaines concentrations pourraient être attribuées à la production de laccase et d'autres enzymes extracellulaires qui pourraient catalyser l'oxydation des composés bioactifs contenus dans ces HEs, perdant ainsi leur activité antimicrobienne et entraînant une inactivation ou une faible activité contre les champignons [60].

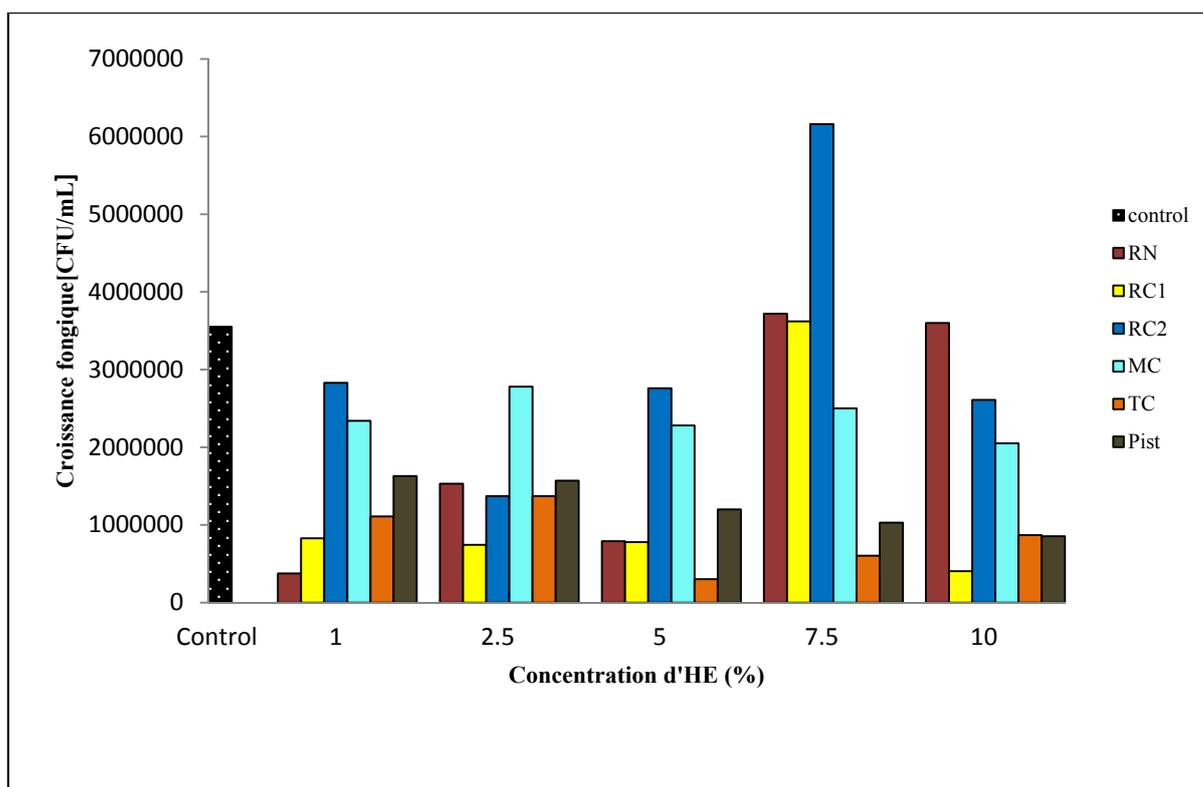


Figure IV-8: La croissance fongique des HEs

#### IV.2.2 Activité antifongique des extraits organiques

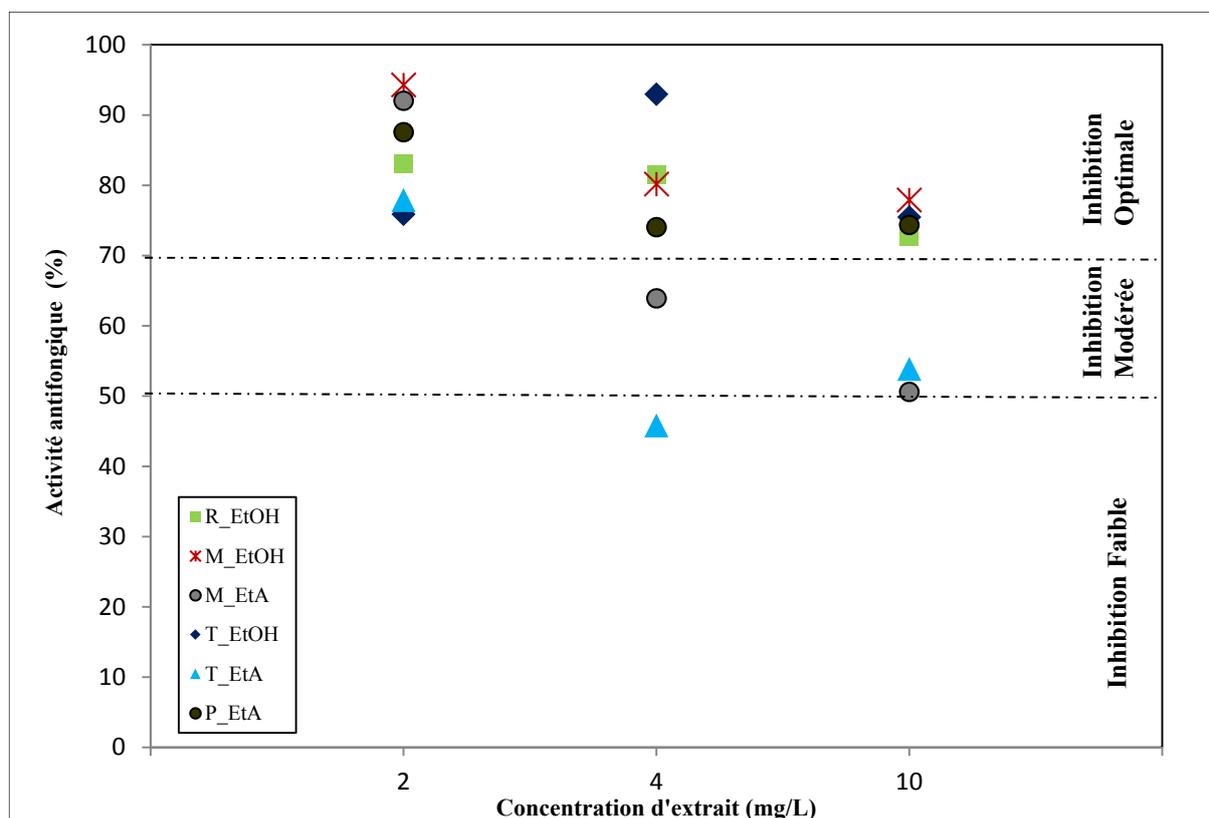
La Figure IV-9 montre l'inhibition des extraits organiques des plantes contre la croissance fongique de l'*A.niger* (FGI%) après 7 jours d'incubation. La croissance fongicide de l'*A.niger* en présence des extraits à différents pourcentages sont montrés dans la figure IV-10.

Constatons des résultats, l'activité antifongique varie en fonction de la concentration d'extrait incorporée et le solvant d'extraction. En effet, les extraits éthaolique de myrte, de romarin et de thym ont montré une excellente activité antifongique par rapport aux extraits d'acétate d'éthyle. Ces derniers ont montré une inhibition modérée et faible à des concentrations de 4% et 10% (Figure IV-9). L'excellente activité fongicide observée chez les extraits éthanoliques est peut-être reliée à la teneur en polyphénols importante détectée pour ces extraits. Cette suggestion a été confirmé par une étude antérieur réalisé par Parashar et al., (2010) où ils ont reporté que l'action de l'extrait de plante contre les champignons fongicides est relatifs à la présence des métabolites secondaires notamment les composés polyphénoliques. Cette action consiste à une rupture cellulaire du champignon entraînant ainsi la mort de la cellule [61]. Ce mécanisme d'action est en accord avec une étude reporté par Helal et al., (2006), où ils ont indiqué qu'une diminution de la taille, des parois cellulaires irrégulières, des membranes cellulaires rompues, une rupture de la barrière de perméabilité de la membrane cellulaire, un

périplasme peu clair et un cytoplasme dense sans caractéristiques différenciées ont été observé lors de contact des extraits de plante avec le champignon fongicide [62].

De même, l'activité antifongique diminue avec la concentration de l'extrait incorporée. Les extraits organiques de romarin, de myrte, de thym et du pistachier lentisque ont montré une excellente activité antifongique à une concentration de 2% et elle diminue avec la concentration d'extraits incorporés. Contrairement à l'extrait éthanolique de thym qui atteint son maximum d'inhibition à 4%.

Au vue de ces résultats, 2% des extraits organiques des plantes étudiées a été suffisant pour stopper la croissance d'*A.niger*. Les extraits éthanoliques ont montré une activité antifongique bien prometteuse grâce à leurs richesse en polyphénols qui ont interagit avec les cellules par plusieurs mécanismes.



**Figure IV-9: Activité antifongique des extraits**

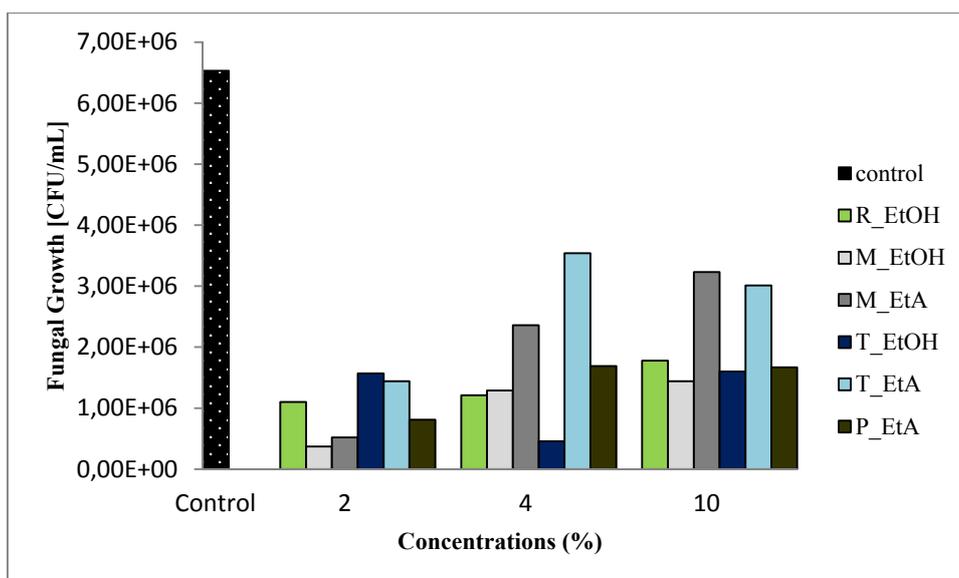


Figure IV-10: La croissance fongique des extraits organiques

## **CHAPITRE II**

# **Etude et caractérisation des biofilms à base des huiles essentielles et des extraits de plantes**

## **I. Caractérisation optique**

Les matériaux d'emballage des produits alimentaires doivent avant tout être translucides pour permettre au consommateur de pouvoir voir le produit acheté. La translucidité des matériaux a été analysée par mesure de la couleur. Celle-ci, est mesurée par le colorimètre Minolta, qui varie selon les formulations.

Les propriétés de couleur des films pour les matériaux d'emballage peuvent affecter directement l'apparence alimentaire et l'acceptation par le consommateur [63].

Les films d'emballage à base de PLA et d'amidon incorporant différentes concentrations (0,5, 1,5, 2, 5 %) des HEs (RN, RC1, RC2, MC, TC et Pist) et des extraits organique (R\_EtOH, M\_EtOH, M\_EtA, T\_EtOH, T\_EtA et P\_EtA) qui sont destinés à être mise en marché ont été mesurés à travers leurs paramètres de couleurs.

L'incorporation des HEs dans la matrice de PLA ou d'amidon n'a pas affecté l'apparence des films visuellement, par contre l'incorporation des extraits organiques dans la matrice de PLA change significativement la couleur initiale de film (Figure I-1 et Figure I-2).

### **I.1 Les films à base de PLA contenant des HEs**

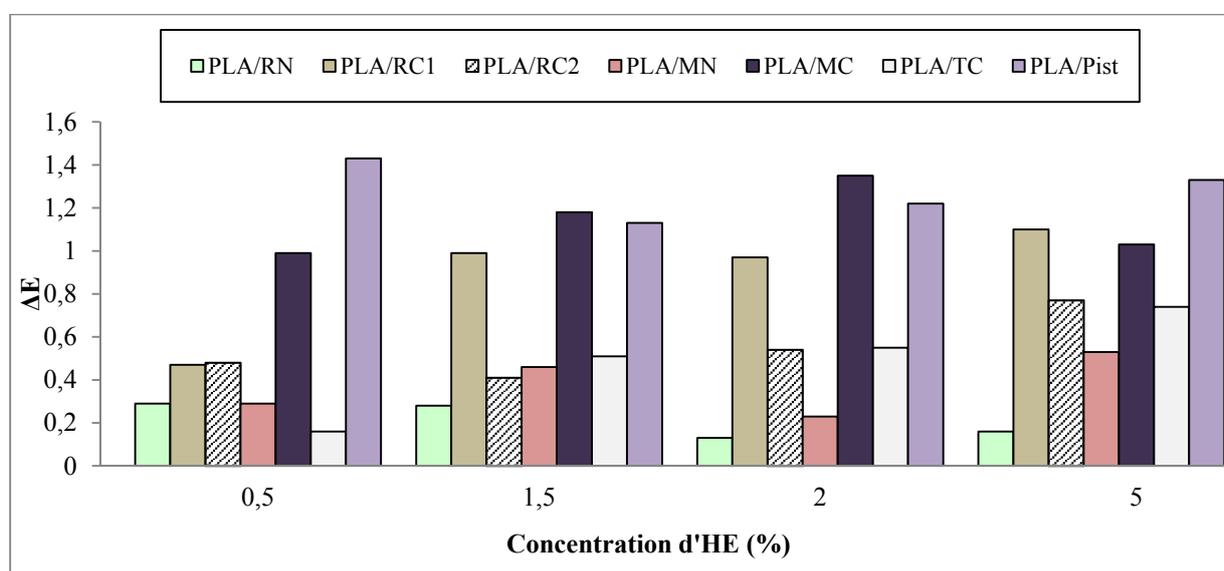
Pour mieux comprendre la performance des films contenant des HEs, les paramètres de couleur tels que la différence de couleur totale ( $\Delta E$ ) entre les films incorporés des différentes concentrations (0.5, 1.5, 2, 5%) des HEs dans la matrice de PLA et le film de control (sans agent actif) est mesuré et illustré dans la figure I-2.

Au vue de ces résultats, nous notons un changement de couleur très faible causé par l'ajout des HEs aux films PLA, sauf pour les films contenant l'HE du pistachier lentisque où la couleur change significativement à une concentration de 0,5%. En général, la couleur des films marque un changement en augmentant la concentration des HEs de RC1, RC2, MN et TC dans le film.

La valeur de chroma ( $C^*$ ) et l'indice de blancheur ( $W_i$ ) sont pratiquement constante pour tous les films, sauf pour les films contenant les HEs de myrte commerciale (MC) et du pistachier lentisque (Pist). La chroma des films de MC augmente progressivement par rapport au control (2,13) et elle varie entre 2,64 à 3,39. Alors que les films contenant l'HE de Pist montrent une chroma plus bas que le film de control et elle varie entre 0,80 et 1,08. L'indice de blancheur montre une diminution de 95,9 (control) à une valeur de 91,9 pour les films contenant 2% MC.

Le même effet obtenu pour les films contenant l'HE de *Zataria multiflora* Boiss dans la matrice de polysaccharides [64].

L'augmentation du paramètre  $a^*$  et la diminution de l'angle de teinte  $h^*$  ont été reflétées dans tous les films incorporés avec les HEs, montrant une tendance à déplacer légèrement la matrice de la couleur rouge à la couleur verte. Contrairement pour les films contenant 0.5% de Pistachier lentisque qui exerce une diminution excessive de paramètre  $a^*$  (-0,25) et une augmentation de la teinte  $h^*$  (181) par rapport au film de control ( $a^*= 0,84$ ,  $h^*= 180$ ), montrant une légère nuance vers la couleur rouge. Ces changements de couleurs sont probablement dus par l'HE lui-même mais l'apparence des films est acceptable par les consommateurs puisque la transparence reste dans les normes exigeantes.



**Figure I-1:** Le changement de couleur des films de PLA avec l'addition des HEs

## **I.2 Les films à base de PLA contenant des extraits organiques**

Visuellement les films sont colorés naturellement en raison de la couleur des extraits contenus dans le film (Figure I-4). Comme le montre la figure ci-dessous (Figure I-2), le changement de couleur varie d'un film à un autre en fonction de la nature de l'extrait contenu et augmente avec la concentration d'additifs incorporés.

Les films contenant M\_EtA montrent une modification de couleur très remarquable par rapport aux autres films (Figure I-2). La valeur du paramètre  $b^*$  enregistre une augmentation excessive pour les films contenant 0,5 à 5% M\_EtA qui varie entre 7,15 à 41,32 par rapport au film de contrôle (1,09). Ceci explique le changement de couleur significatif de ces films qui ont montré une nuance de couleur vers le bleu.

L'augmentation de Chroma ( $C^*$ ) et la diminution de  $a^*$  de 0,92 (control) à -1,29 pour les films de 5% M\_EtA, montre que ces films sont devenus de plus en plus brillant et ont une tendance à une légère coloration rouge.

L'angle de teinte ( $h^*$ ), l'indice de blancheur (WI) et la luminescence (L) ont diminué pour tous les films par rapport au film control ( $h^* = 180.87$ ; WI = 88.00;  $L^* = 90.58$ ) particulièrement pour les films avec 5 % M\_EtA ( $h^* = 178$ ; WI = 55,54;  $L^* = 68,77$  L \*).

Les films de PLA avec les extraits de plantes obtenus, ont une couleur différente de contrôle ce qui pourrait faire leurs distinction des autres films d'emballages qui existent dans le marché.

Wang et al. (2012) ont constaté que l'addition de divers extraits de plantes altère la couleur originale des films à base de biopolymères [65]. Siripatrawan et Harte., (2010) ont montré que l'ajout de l'extrait de thé vert dans des films de chitosane a significativement réduit leur légèreté et augmenté les rougeurs et les jaunissements lorsque les concentrations de GTE augmentaient de 0 à 20% [66]. Une autre étude a montré qu'aucune différence significative de  $b^*$  entre les films de SPI (Isolat de protéine de soja) avec et sans extrait de pépins de raisin [67]. Cependant, l'ajout d'extrait de framboise a augmenté la valeur  $b^*$  des films de SPI [65]. Wang et al., (2012) ont proposés que cette variation est due à la variation de polyphénols dans différents extraits de plantes, comme par exemple les anthocyanines contribuent à une couleur particulière de la matrice dans laquelle ils se trouvent [65]. Dans l'ensemble, les pigments phénoliques dans les extraits de plantes sont probablement les contributeurs aux différentes couleurs observées dans ces biopolymères films [67,68].

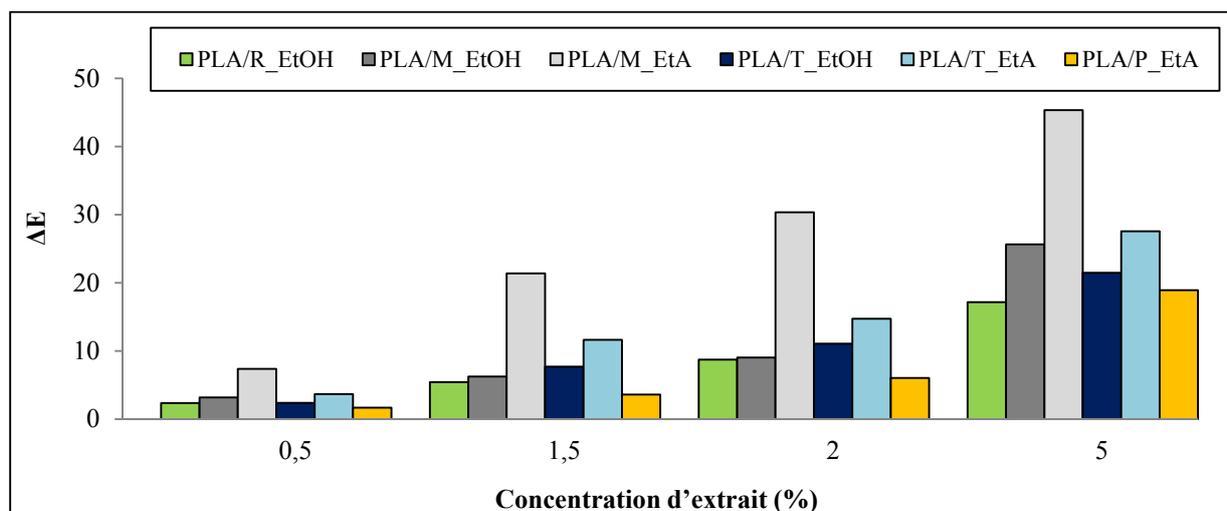


Figure I-2: Le changement de couleur des films de PLA avec l'addition des extraits

### I.3 Les films à base d'amidon incorporé avec les HEs

Les films élaborés ont présenté une modification de couleur qui varie selon l'HE et la concentration incorporés comme le montre la figure I-3.

Cependant, l'augmentation de la teinte  $h^*$  a été remarquée pour les films contenant les 0,5% RN. Ce films entraîne une légère diminution de chroma ( $C^*$ ) par rapport au control (2,34) à une valeur de 2.16.

L'indice de blancheur ( $W_i$ ) a diminué de façon remarquable d'une valeur de 96,58 (control) à une valeur de 90,36 pour les films de 5% MC, en contrepartie la chroma de ce film augmente à une valeur de 2,68. Le même effet de cette HE a été observé dans la matrice de PLA.

La mesure des paramètres  $L^*$ ,  $W_i$ ,  $a^*$  et  $b^*$  montre des valeurs ressemblante au film de control. Au vue de ces résultats on peut dire que les films sont transparents comme le film du control et la modification de couleur obtenu est expliquée dans le travail de Shojaee-Aliabadi et al., (2013). En effet, il a montré que l'effet opaque ou la modification de couleur qui est rapporté non d'une couleur survenus, est probablement dû à l'augmentation de la réflectance diffusé induite par la diffusion de la lumière dans les gouttelettes lipidiques qui abaisse l'intensité de l'éclatement des rayons lumineux [69]. Nos résultats concordent avec ceux rapporté avec Salabarshi et al., (2014) pour les films incorporés avec des HEs de *Zataria multiflora* et *Mentha Pulegium* [64].

Dans la présente étude, les films d'amidon incorporés avec des différentes concentrations des HEs ont la même apparence et leur transparence convenait à l'emballage alimentaire.

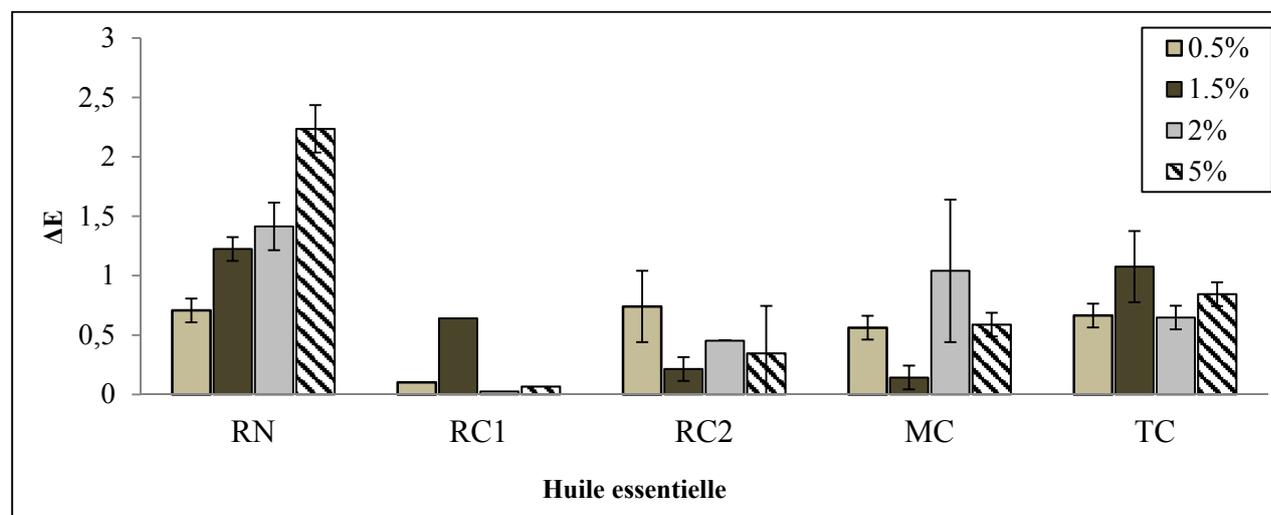


Figure I-3: Le changement de couleur des films d'amidon avec l'addition des HEs

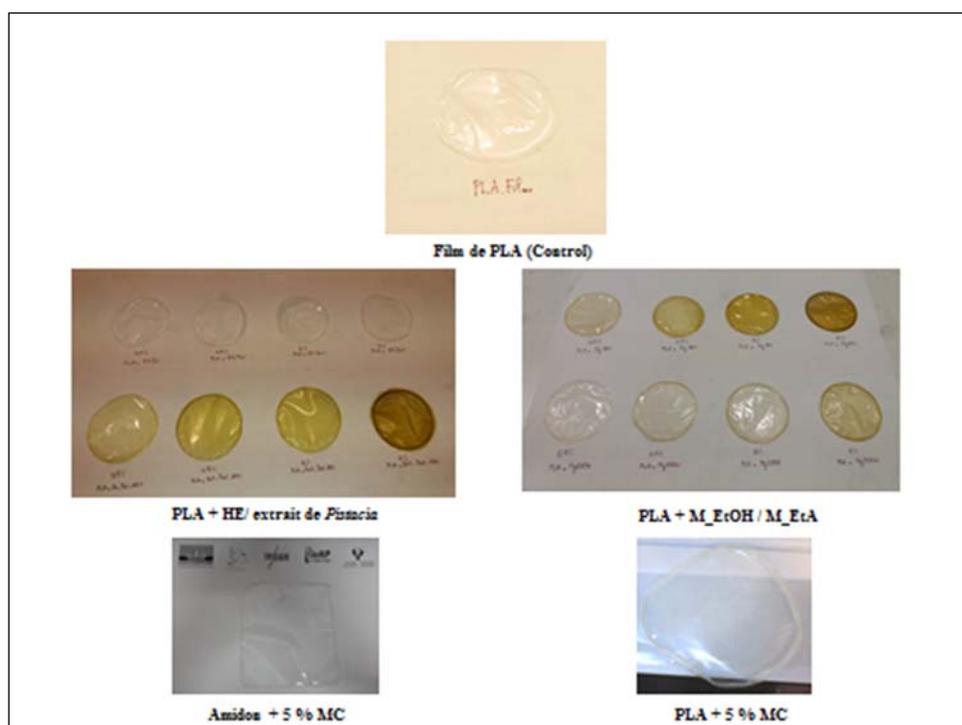


Figure I-4: Aspect des biofilms de PLA et d'Amidon après le séchage

## II. Caractérisation thermique

### II.1 Les films à base de PLA incorporés avec des HEs

Les films de PLA incorporant 0,5 et 5% de TC ont été choisis pour évaluer l'effet de l'ajout de l'HE de TC sur le profil de dégradation de la matrice de PLA.

Les courbes thermogravimétriques (TG) et de dérivation thermogravimétrique (DTG) obtenues pour l'HE de TC, les films contenant 0,5 et 5% de TC et le film de control PLA sous atmosphère d'azote sont présentées dans la figure II-1.

La température de dégradation initiale qui correspond à 10% perte de poids, la température qui correspond à la perte de poids maximale et le pourcentage de résidus de charbon à 600°C sont rapportés dans le tableau II-1.

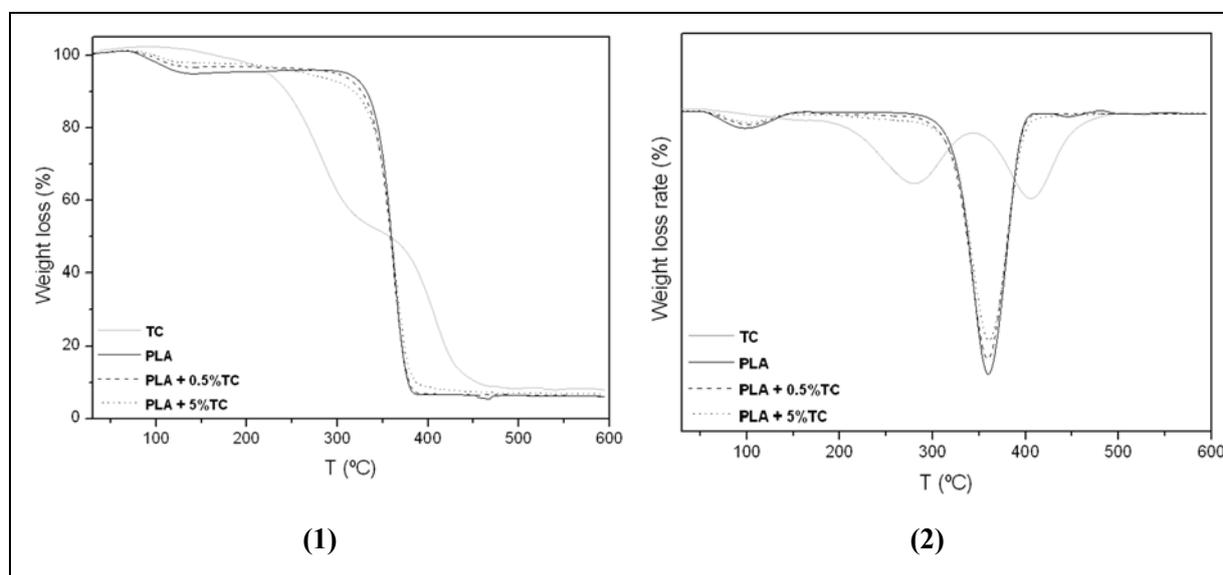
L'analyse de TC montre deux pics principaux de dégradation, le premier pic est observé à 280,2 °C, qui correspond à la dégradation de l'HE de TC comme indiqué dans une étude rapportée par Kim et Sharma., (2011) [70]. Le deuxième pic est d'environ 408 °C et pourrait être associée à la dégradation de Carvacrol, le composé majoritaire de TC comme il a rapporté Ramos et al., (2012) dans ses travaux avec les films à base polypropylène (PP) incorporé avec

le Carvacrol et le Thymol [71]. Le profil de dégradation thermique des HEs est relatif à la composition chimique.

La matrice de polymère contient 0,5% et 5% TC a abouti à un processus de dégradation en deux étapes, où la première étape de dégradation, entre 80-180 ° C, correspond à la dégradation ou à la vaporisation de certains composés de poids moléculaire présents dans le polymère comme il a rapporté Muller et al., (2017) [72]. Tandis que la deuxième étape est vers 360 °C qui correspond à la dégradation du polymère de PLA comme il est rapporté par Martino et al., (2006) [73].

L'addition de TC diminue la température de dégradation initiale du PLA, et cette diminution est remarquable à la concentration de 5%. Cependant, la température de dégradation principale n'était pas affectée. De plus, l'incorporation de TC n'a pas eu d'effet significatif sur le pourcentage de résidus de charbon à 600°C.

Ces résultats montrent que l'addition de TC n'a pas d'impact significatif sur le profil de dégradation thermique du PLA. Néanmoins, TC a permis de diminuer la dégradation initiale de PLA. Un comportement similaire a été observé par Martino et al., (2006) lorsque PLA a été plastifié avec des adipates commerciaux [73], et par Arrieta et al., (2013) , lorsque le Limonène a été incorporé au PLA [74].



**Figure II-1:** Les courbes de TG (1) et DGT (2) de l'HE de TC et des films élaborés

**Tableau II-1:** Les Températures et le pourcentages de résidu de charbon caractéristique de l'HE de TC, film de contrôle (PLA) et des films actifs.

Echantillons	T <sub>10%</sub> (°C)	T <sub>max</sub> (°C)	Résidu à 600 °C (%)
--------------	-----------------------	-----------------------	---------------------

### *Partie III : Résultats et discussions*

---

TC	243,2	280,2	408,5	7,7
PLA	332,1	359,9		5,7
PLA + 0.5% TC	326,4	359,3		6,5
PLA + 5% TC	318,9	360,6		6,7

---

L'effet des HEs de RN, RC1, RC2, MC, TC à une concentration de 5% sur le comportement de cristallisation et de fusion des films à base de PLA a été étudié par une analyse par DSC non isothermes.

La fusion a été effectuée à 200 °C pendant 3 min. La température de fusion ( $T_m$ ), la température de cristallisation ( $T_c$ ), l'enthalpie endothermique de fusion ( $\Delta H_m$ ), l'enthalpie exothermique de cristallisation ( $\Delta H_c$ ) et le degré de cristallinité ( $X_c$ ) des films de PLA contenant les 5% des HEs sont illustrés dans le tableau II-2.

Le film de control de PLA présente une température de fusion ( $T_m$ ) de 175,9 °C, sa cristallinité est de l'ordre de 59,9% et la température de cristallisation ( $T_c$ ) est d'environ 106,4 °C.

Aucun changement significatif des températures de fusion ( $T_m$ ) des films de PLA incorporant les HEs. Cependant, une légère réduction de température de cristallisation ( $T_c$ ) et une augmentation de la cristallinité est observée pour films contenant 5% des HEs de RN, RC1, RC2 et MN. Cela suggère qu'une tendance à se cristalliser à froid pour ces films ce qui est probable pour les films à faible concentrations tout en montrant une cristallinité plus élevée. Des auteurs suggèrent que la composition et la structure moléculaire des HEs ont un effet sur la mobilité globale de la chaîne dans les films PLA [64]. Ceci concorde avec nos résultats puisque les HEs ont une composition différente où les composés abondants dans RN, RC1, RC2 et MN sont l' $\alpha$ -pinène et l'Eucalyptol. Tandis que dans les HEs de MC et TC, d'autres composés sont prédominants tels que Carvacrol et une faible proportion en  $\alpha$ -pinène. Le film contenant 5% de MC augmente la température de cristallisation ( $T_c$ ), ce qui peut augmenter la rigidité du film. La faible interaction entre la chaîne polymère et le groupe fonctionnel des composants présents dans les HEs pourrait provoquer cet effet. D'autres études portées sur des films à base d'éthylène vinyle alcool (EVOH) incorporant l'extrait de thé vert ont montré le même effet, les auteurs suggèrent que cet effet peut être lié à la faible interaction entre les groupes OH de la

chaîne polymère avec les fonctions OH, CO ou COOH des composants d'extrait via une liaison hydrogène [75].

L'enthalpie endothermique de fusion ( $\Delta H_m$ ) des films sont semblables au film de contrôle sauf pour le film incorporant 5% MC. Ce dernier révèle une diminution de  $\Delta H_m$  et de la cristallinité, ce qui permet à réduire la capacité de la chaîne polymère à se cristalliser. Il convient de noter que les profils endothermiques des films actifs est plus larges que le film de PLA, indiquant une structure cristalline plus irrégulière probablement due à l'interruption de la cristallisation par la présence de substances non polymères. Le même comportement a été trouvé par Muriel-Galet et al., (2015) dans ses films à base d'éthylène vinyle alcool (EVOH) incorporant l'HE d'origan et l'extrait de thé vert [75].

**Tableau II-2:** Analyse thermique par DSC de TC et des films élaborés

Films	T <sub>c</sub> (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	T <sub>m</sub> (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	X <sub>c</sub>
PLA	106,4	37,2	175,9	52,9	59,9
PLA+5%RN	106,3	37,4	176,8	56,2	63,6
PLA+5%RC1	104,7	25,4	175,4	53,8	60,9
PLA+5%RC2	104,7	28,7	175,8	57,2	64,7
PLA+5%MN	100,7	22,8	175,4	57,8	65,4
PLA+5%MC	107,5	14,1	175,2	45,8	51,8
PLA+5%TC	106,8	37,2	175,3	51,1	57,9

## **II.2 Analyse thermogravimétrique des films de PLA incorporés avec des extraits de plante**

La figure II-2 montre les courbes TG et DGT d'extrait éthanolique de thym (T\_EtOH), films de contrôle (PLA) et films actifs (PLA+0,5 T\_EtOH).

Des études thermogravimétriques ont montré que la stabilité de plusieurs antioxydants diminue avec l'augmentation de la température [76]. Les courbes TG / DTG de l'extrait éthanolique de thym obtenu dans la présente étude (Figure II.4a) ont montré qu'il peut être un

antioxydant thermostable, car il a montré une perte de masse de 10% jusqu'à une température de 115,14°C (tableau II-3). Une telle perte est probablement imputable à la présence d'humidité, de traces d'éthanol (le solvant utilisé pour obtenir l'extrait) et de composés phénoliques volatils.

La deuxième étape, de 115,15 °C à 346,31 °C, a présenté une perte de masse de 45,7%. Cette perte peut également être attribuée à la volatilisation ou à la décomposition de constituants bioactifs, éventuellement de diterpènes phénoliques, tels que l'acide rosmarinique. Enfin, la troisième étape, allant de 346,31 à 600°C, correspond à une perte de masse de 17,51%. Cette perte pourrait être attribuée à la dégradation des composés inorganiques.

Ceci concorde avec l'analyse thermogravimétrique de l'extrait de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) réalisé par Cordeiro et al., (2013) [77].

La dégradation thermique des films de contrôle (PLA) (Figure II.4b) a suivi le modèle décrit dans la littérature typique des films de PLA analysé par Martino et al., (2006) [73], par Arrieta et al., (2013) [74] et par Yahyaoui et al., (2016) [78].

Dans les films portant du 0,5 % de T\_EtOH, la température de dégradation maximale de PLA a diminué d'une valeur de 386,16°C (film de contrôle) à 380,91°C. De plus, une légère diminution dans la température de dégradation initiale de PLA d'une valeur de 345,39°C (film de contrôle) à une valeur de 331,82 °C (film PLA 0,5%EtOH).

Ces résultats montrent que l'addition de 0,5% de T\_EtOH a impacté le profil de dégradation thermique de PLA. Ce comportement est probable de l'avoir avec les autres extraits avec des concentrations plus élevées.

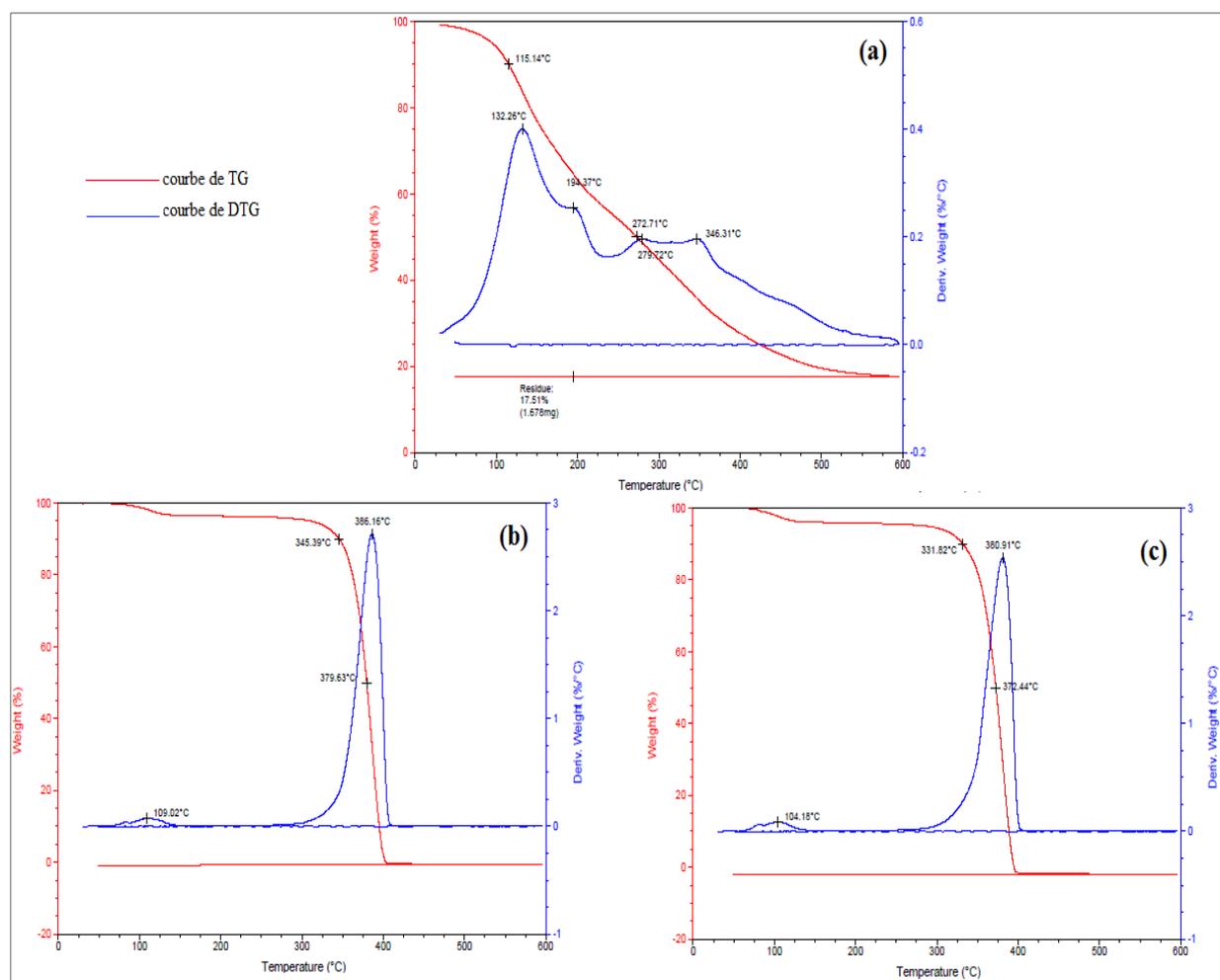


Figure II-2 : Les courbes de TG et DGT de l'extrait de T\_EtOH (a), film de contrôle (b) et de film actif

Tableau II-3 : Les Temperatures et le pourcentage de résidus de charbon caracteristique de l'extrait T\_EtOH, film de contrôle (PLA) et de film actif.

Echantillons	T <sub>10%</sub> (°C)	T <sub>max</sub> (°C)	Residue à 600 °C (%)
T_EtOH	115,14	132,26 194,37 272,71 346,31	17,51
PLA	345,39	386,16	0
PLA+0,5T_EtOH	331,82	380,91	0

### III. Caractérisation mécanique

Les films à base des HEs et des extraits organiques ont un avenir sur le marché si elles possèdent au moins les mêmes propriétés mécaniques que le matériau conventionnel (PLA-amidon). Les constituants (HEs et extrait organiques), leur microstructure et la résistance de

l'interface d'adhésion additifs/matrice ont un rôle décisif sur les propriétés mécaniques. De plus, les propriétés de biocompatibilité des matrices de type PLA et des bioadditifs donnent une valeur ajoutée par rapport aux polymères classiques (PE, PP, PS) utilisés dans le domaine des emballages.

Les caractéristiques de traction des biofilms sont importantes pour connaître la résistance des films lors du transport et son rôle d'emballage protecteur. La déformation ou l'allongement à la rupture est la grandeur qui caractérise la déformation du matériau qu'elle soit élastique ou plastique. Le module de Young permet d'évaluer l'élasticité de film. Enfin, le stress ou la contrainte à la rupture représente la contrainte à exercer avant la rupture du matériau.

### **III.1 Les Biofilms à base de PLA**

Le PLA est un polymère fragile et rigide, ce sont les inconvénients majeurs de PLA, qui limite son application dans le domaine des emballages alimentaires rigides [79,80]. Cette fragilité est due à la faible aptitude à la déformation plastique ( $\approx 3\%$ ). Par conséquent, une exigence importante pour les matériaux d'emballage tels que les films doivent avoir une flexibilité élevée à température ambiante. Des tests de traction ont été effectués pour étudier l'effet d'incorporer des HEs et des extraits sur les propriétés mécaniques du film de PLA. L'allongement à la rupture, le module de Young et la force à la rupture des films contenant différentes concentration des HEs et des extraits sont représentés sur les figures III-1 et figures III-2. Au vue de ces résultats, le film de control de PLA (sans additifs) a montré un très faible allongement à la rupture (environ 3%), ce qui indique un comportement fragile.

#### **III.1.1 Les biofilms à base de PLA contenant les HEs**

La figure III-1 montre la variation des paramètres de traction en fonction des différentes concentrations (0,5, 1,5, 2, 5%) des HEs de RN, RC1, RC2, MN, MC, TC et Pist incorporées dans les films de PLA.

L'incorporation des HEs dans les films a montré un comportement différent sur les propriétés mécaniques du PLA. En effet, l'allongement à la rupture (E%) a significativement affecté par l'ajout des HEs, en particulier pour les HEs commerciales (RC1, RC2, MC, TC).

L'allongement à la rupture (la déformation) augmente de façon marqué pour les films contenant 0,5 % de RC1 et TC d'une valeur de 3% (control) à des valeurs de 40 et 45% (RC1 et TC, respectivement) et elle diminue de 20% en augmentant la concentration de ces HEs. Cependant, la contrainte à la rupture de ces films reste semblable au film de control.

L'addition de 2% des HEs de MC et 5% de RC2 fait améliorer l'allongement à la rupture à des valeurs de 45,1% et 20,4%, respectivement.

Le module de Young indique la rigidité du film. Plus le module de Young est élevé, plus le matériau est rigide. Aucune différence significative n'a été observée dans le module de Young entre le film de contrôle et les films aux HEs. Sauf que les huiles essentielles commerciales RC1, MC, TC et pharmaceutique RC2 ont permis d'obtenir des films beaucoup moins rigides et fragiles que le film de PLA à des concentration élevés.

Au vue de ces résultats nous notons que les HEs commerciales agissent comme des plastifiants, entraînant une augmentation de la ductilité et de la flexibilité des chaînes polymères. La présence des HEs dans les films peut conduire à la formation d'une structure de réseau faible, ce qui entraînerait également des changements dans la cristallinité matérielle. Une tendance similaire a été rapportée par Persico et al., (2009) pour le polyéthylène (LDPE) revêtu de Carvacrol [44]. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par Ramos et al., (2012) En effet, ils ont montré que l'ajout de Carvacrol et de Thymol dans la matrice de polypropylène (PP) exerce un effet plastifiant, en diminuant le module de Young et fournissant des propriétés ductiles au film [71].

En contrepartie, pas d'amélioration observé pour les films contenant les HEs naturelles de pistachier lentisque, de romarin et de myrte. Le même effet a été observé pour les films comestibles incorporant les HEs de citronnelle et de cannelle. Les auteurs ont suggérés que la différence entre des films avec des HEs naturelles et des films avec des HEs commerciales est due à la différence de polarité entre la matrice polymère et les composés ajoutés [81].

On peut conclure que les HEs commerciales permettent d'améliorer les propriétés de traction des films destinés à être mise en marché dans le domaine des emballages plastiques.

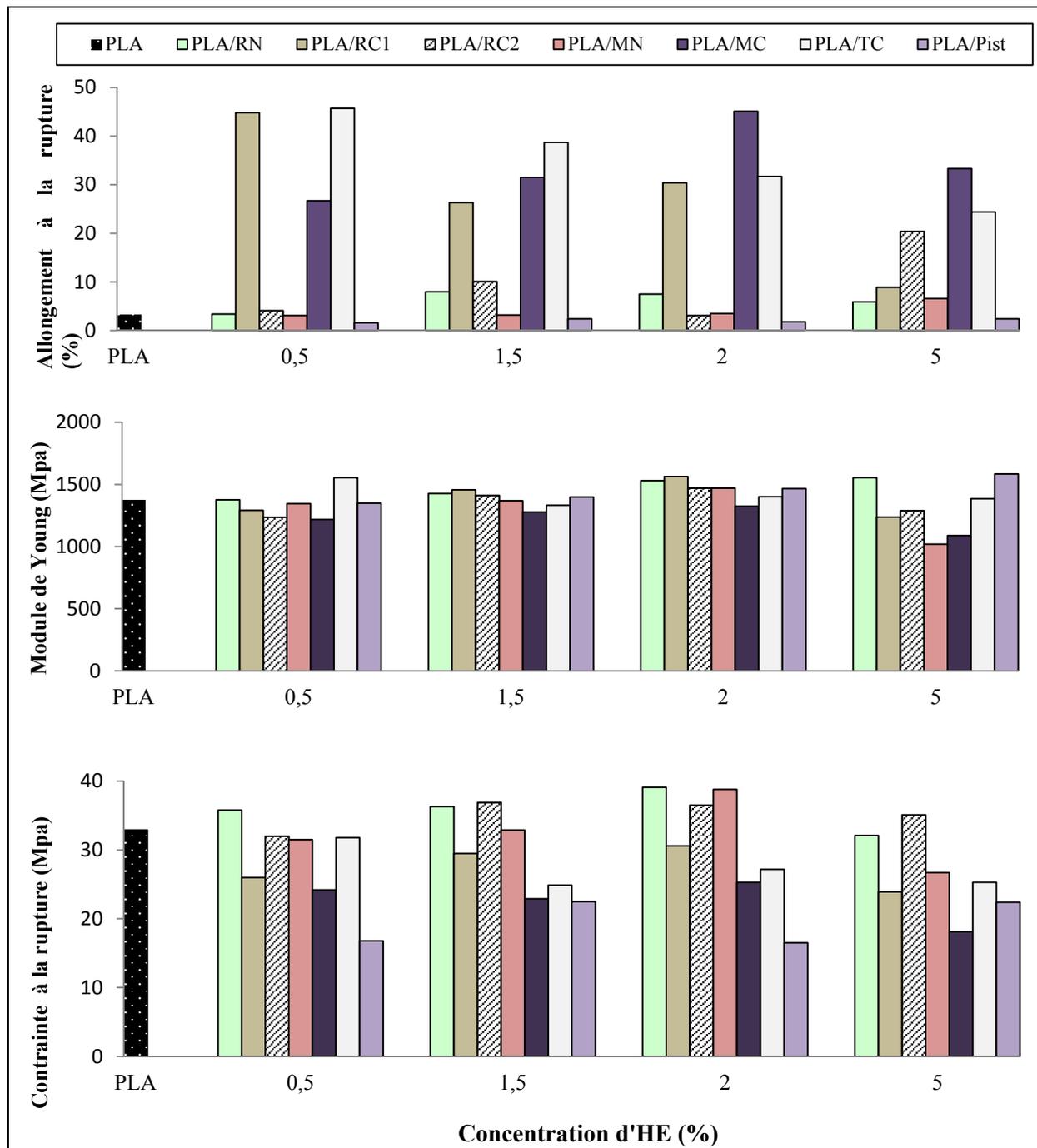


Figure III-1: Les propriétés mécaniques des films de PLA avec les HEs

### III.1.2 Les films à base de PLA incorporé avec les extraits organiques

La figure III-2 montre la variation des paramètres de traction en fonction des différentes concentrations (0,5, 1,5, 2, 5%) des extraits organiques de R\_EtOH, M\_EtOH, M\_EtA, T\_EtOH, T\_EtA et P\_EtA incorporées dans les films de PLA.

Comme il est montré, une légère amélioration dans l'allongement à la rupture pour les films contenant 2% de M\_EtA (3%), 0,5% de T\_EtA (2,9%) et 1,5% P\_EtA (2,7%).

L'allongement à la rupture (E%) augmente pour les films contenant M\_EtA avec l'augmentation de la concentration et atteint son maximum à 2%. Contrairement pour les films contenant M\_EtOH d'où l'allongement atteint son maximum à des faibles concentrations. Une légère augmentation d'E% pour les films contenant 0,5% de T\_EtA, contrairement pour les films avec T\_EtOH où l'allongement montre une réduction par rapport au film de control.

En général, l'allongement à la rupture diminue avec l'augmentation de la concentration des extraits T\_EtOH, T\_EtA, M\_EtOH et R\_EtOH. De même pour le module de Young qui n'a pas montré une différence significative pour ces films par rapport au control. Sauf pour les films contenant T\_EtA et M\_OH qui ont montré une légère diminution dans le module de Young. Cela signifie que les films de PLA deviennent moins rigides et moins fragiles que le film de PLA. Un effet semblable a été observé pour le film de PLA incorporé avec 20% de Limonène [82].

Une réduction de l'allongement et du module d'élasticité a été observée à une teneur maximale en protéines de Proallium sur la matrice PLA [83]. Des auteurs suggèrent que l'allongement à la rupture est affecté par la fraction volumique de l'agent ajouté, la dispersion dans la matrice et l'interaction entre l'agent actifs et la matrice [84].

Un allongement à la rupture similaire au film de control a été obtenu pour le film avec 5% de R\_EtOH, tandis que cette concentration a pu augmenter le module de Young. Ceci permet de garantir des films plus rigides.

Une réduction significative de contrainte à la rupture pour les films avec les extraits étudiés sauf pour l'extrait de R\_EtOH. On a apporté dans la section ci-dessus que l'addition d'additifs phénoliques à la matrice polymère avait un effet plastifiant diminuant le module de Young et fournissant des propriétés ductiles au film, et l'extrait R\_EtOH a révélé l'extrait le plus faible en teneurs phénoliques ce qui confirme le résultat obtenus. Le film avec l'extrait T\_EtA (l'extrait le plus riche en composé phénoliques) réduit la contrainte à la rupture plus que le film avec T\_EtOH.

D'autres auteurs ont indiqué que l'incorporation de Cinemaldehyde dans PLA diminue l'allongement à la rupture, la rigidité et la résistance à la rupture. Ceci est attribué à l'effet d'épuisement de la matrice de polymère associée aux interactions de Cinemaldehyde avec les chaînes de PLA qui limite les forces inter-chaînes [72].

Ces résultats ont mis en évidence que les films de PLA ont une réponse positive dans la région élastique et plastique avec les extraits de M\_EtA à 2% et avec T\_EtA à 0,5%, ce qui

peut suggérer leur applicabilité prospective comme film d'emballage alimentaire. Nous notons bien que les résultats obtenus avec les films des extraits organiques n'ont rien à voir avec les films contenant les HEs qui ont permis d'améliorer 40 fois les propriétés mécaniques.

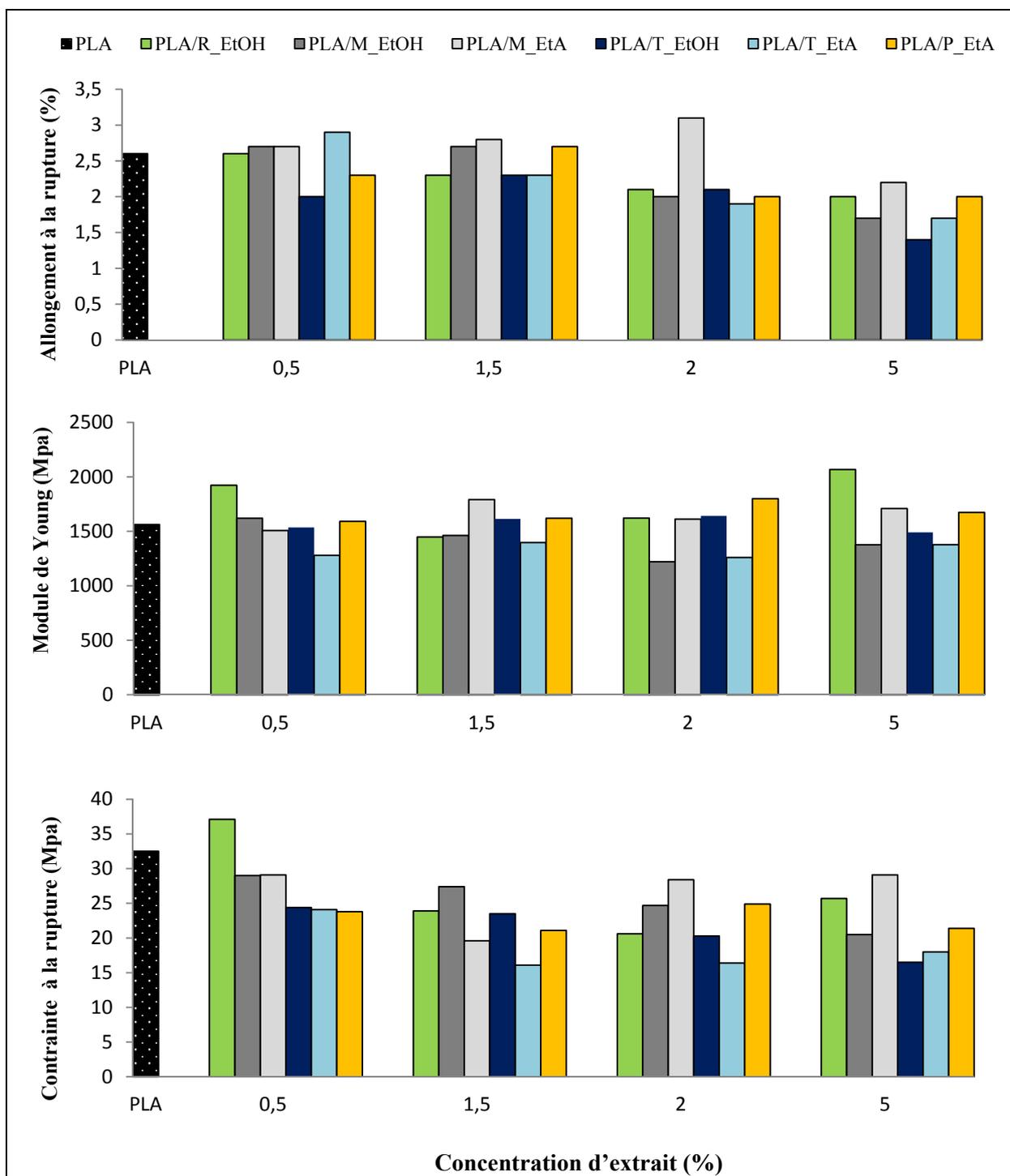


Figure III-2: les propriétés mécaniques des films de PLA avec les extraits

### **III.2 Les films à base d'amidon incorporés avec les HEs**

Les applications technologiques de l'amidon révèlent plusieurs inconvénients en raison de leurs mauvaises propriétés mécaniques par rapport aux polymères synthétiques classiques. Ceci le rend inadéquat pour certaines applications telles que l'emballage, bien que certains de ces problèmes puissent être résolus avec l'ajout de certains agents actifs en tant que plastifiants.

L'effet de différents HEs sur les propriétés mécaniques du film a été étudié, et les résultats sont présentés à la figure III-3, y compris l'analyse de la variance des valeurs expérimentales (la moyenne de la population était significativement différente à 0,001 niveau \*\*\* au niveau de 0,01 (\*\*)) ou à 0,05 (\*).

Au vue de ces résultats, nous notons que l'allongement à la rupture (E%) de film de contrôle (sans additifs) est d'environ 57%. Ainsi, indiquant un comportement moins fragile par rapport à d'autres travaux où l'allongement varie de 21 à 18% [85,86].

L'incorporation des différentes concentrations des HEs (0,5, 1,5, 2, 5%) dans la solution filmogène montre un comportement différent sur les propriétés mécaniques de l'amidon.

L'allongement à la rupture (E%) et le module de Young de l'amidon ont été significativement affectés par l'incorporation des HEs, en particulier pour les RN, RC1, RC2 et TC. L'allongement à la rupture indique la flexibilité et la capacité d'allongement des films. Ce paramètre a été amélioré en particulier à une concentration de 5% pour les films contenant RC1, MC et TC avec des valeurs de 78,5, 71,7 et 67% respectivement. Ainsi que les films contenant 0,5 % RC2 a montré une élongation importante. Avila Sosa et al., (2012) ont suggéré que l'allongement élevé peut être attribuée à des structures complexes formées entre l'agent actif et la matrice polymérique, ce qui réduit la cohésion des forces de réseau d'amidon diminuant ensuite la résistance des films à la rupture [87]. De même Ghasemlou et al. (2013) ont rapporté que la présence de l'HE dans le film peut entraîner la formation d'une structure en réseau faible, ce qui entraînerait également des modifications de la cristallinité du matériau polymérique [88]. Ceci est cohérent avec les travaux de Pelissari et al., (2009), d'où ils ont trouvé que la déformation à la rupture a augmenté significativement en incorporant 1% d'HE d'origan [85].

De plus, l'ajout de RN à des concentrations élevée (2 et 5%) a permis d'augmenter l'allongement à la rupture de la matrice d'amidon pour ces films. Yahyaoui et al., (2016) ont rapporté dans son étude sur les films actifs à base de PLA contenant des additifs naturels, que les HEs commerciales agissent comme des plastifiants sur la matrice polymérique en entraînant une augmentation de la ductilité et de la flexibilité des chaînes [78].

L'ajout des HEs à une concentration de 5% a entraîné une réduction significative du module de Young entraînant ainsi des films moins rigides que le film de contrôle. Contrairement aux films contenant 0,5 et 1,5% de TC qui ont montré une rigidité assez importante par rapport au film de contrôle.

La contrainte à la rupture des films actifs actent proportionnellement avec les résultats du Module de Young et d'allongement à la rupture. Pranoto et al., (2005) a conclu dans son étude porté sur les films à base d'alginate et de huile de l'ail que l'incorporation d'additifs actifs abaisse généralement les valeurs de résistance à la rupture [89].

En général, l'ajout d'huiles essentielles (RN, RC1, RC2, MC, TC) à une concentration élevée a permis d'améliorer les propriétés mécaniques de l'amidon en améliorant la flexibilité et l'étirement du film.

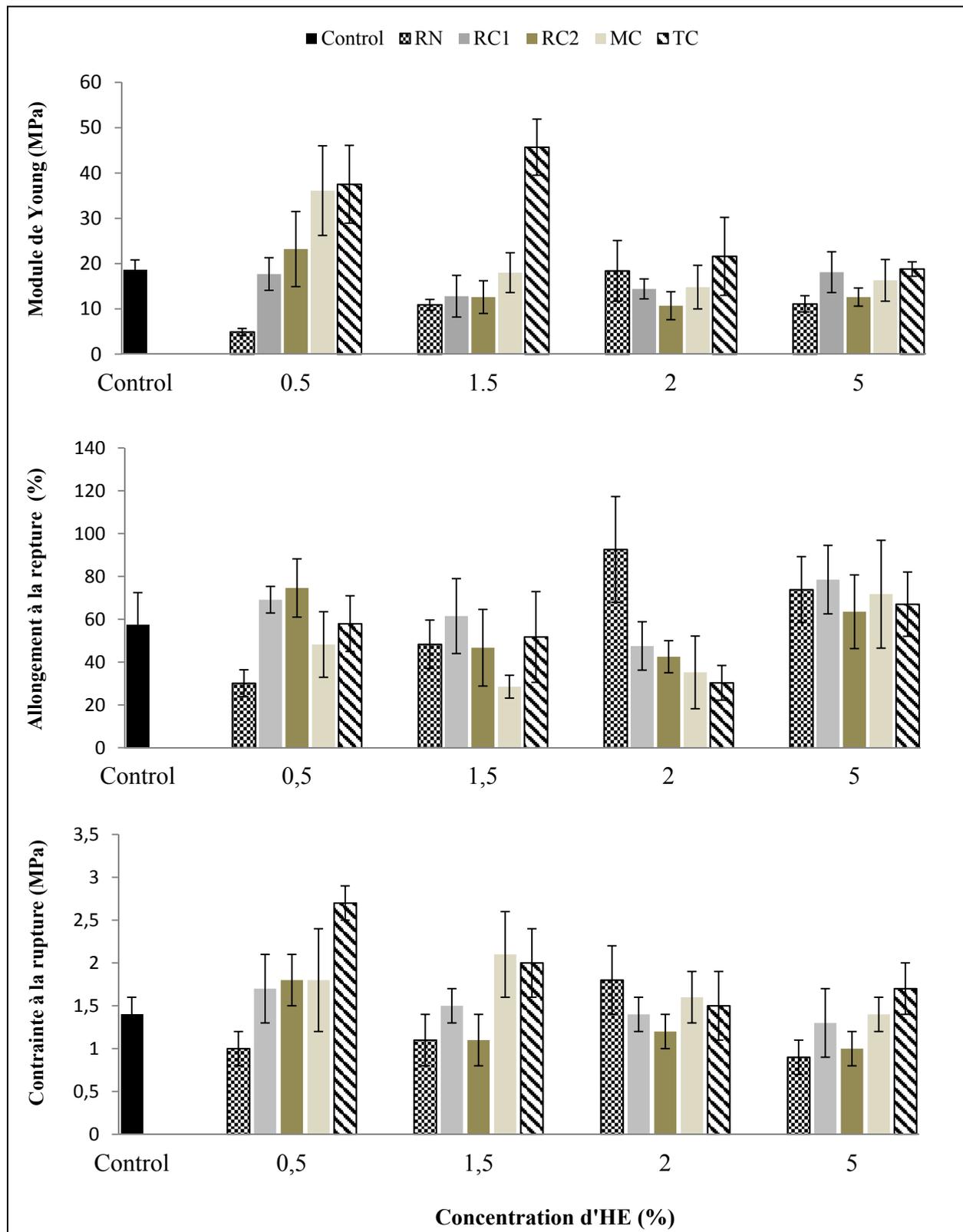


Figure III-3: Les propriétés mécaniques des films d'amidon avec les HEs

#### **IV. Etude de la perméabilité des biofilms à la vapeur d'eau**

La perméabilité à la vapeur d'eau (WVP) est l'une des propriétés les plus importantes dans les emballages alimentaires principalement en raison du rôle important de l'eau dans les réactions de détérioration et aussi la croissance microbienne. L'eau agit comme un solvant ou un transporteur, cause une dégradation de la texture et fournit des réactions chimiques et enzymatiques [90].

Étant donné que l'une des principales fonctions des films pour l'emballage alimentaire consiste à diminuer le transfert d'humidité entre les aliments et l'atmosphère environnant. La haute perméabilité à la vapeur d'eau des films limite considérablement leur utilisation comme matériau potentiel pour l'emballage alimentaire [91].

Les effets de transfert de vapeur d'eau sur les matrices de PLA et d'amidon en présence des HEs et des extraits organiques sont préalablement déterminées à une température de 38 °C et à une humidité relative de 90%. Ces conditions expérimentales, sont des conditions plus proches des applications courantes en agroalimentaire, permettent de simuler le comportement du film dans des conditions rencontrées couramment en conservation des aliments.

En se basant sur les résultats des propriétés mécaniques, nous nous sommes intéressés aux films qui ont montré des propriétés mécaniques améliorées.

##### **IV.1 Films à base de PLA et des HEs**

Le film de contrôle de PLA (sans HEs), présente des propriétés de barrières à la vapeur d'eau faible dont la valeur de WVP est de l'ordre de  $130,0 \pm 22,78$  g.cm/cm<sup>2</sup>sPa. Ce coefficient élevé de WVP est dû aux interactions multiples entre la vapeur d'eau et la chaîne amorphe de PLA (Tableau IV-1).

Les résultats ont montré que films de PLA contenant les HEs commerciales de RC1 (0,5%), de MC (2%) et de TC (0,5%) ont amélioré les propriétés de barrières de PLA. Où, les valeurs de WVP ont diminué significativement à des valeurs de  $84,0 \pm 2,67$  g.cm/cm<sup>2</sup>sPa pour les films de 0,5%RC1 et de  $87,57 \pm 14,17$  g.cm/cm<sup>2</sup>sPa pour les films de 0,5%TC. Contrairement aux films incorporant 0,5 et 5% d'HE de pistachier lentisque qui ont montré des valeurs plus élevés que celle de contrôle.

D'après des travaux ultérieurs, les chercheurs ont trouvé que la WVT des films dépend essentiellement de la nature hydrophiles-hydrophobes des substances incorporés dans la matrice des films [92, 93, 94, 95]. En effet, les HEs commerciales de romarin (RC1), de myrte

(MC) et de thym (TC) sont abondant en composés terpéniques hydrophobes tels que l'Eucalyptol, l' $\alpha$ -pinène et le Carvacrol, respectivement. Alors que l'HE du pistachier lentisque est abondant en  $\beta$ -phéllandrène à une faible teneur de 9,6%. En outre, nous avons trouvé que la teneur en polyphénols et en flavonoïdes (composés polaires hydrophiles) est plus élevée chez l'HE du pistachier lentisque que chez les HEs de RC1 et de MC. Les résultats ont montré que l'incorporation des composants hydrophobes dans la matrice de PLA n'a pas contribué à la capacité de sorption d'eau.

Ceci est cohérent avec ceux rapporté par Bravin, et al., (2004), où ils ont mentionné que les propriétés de barrière à la vapeur d'eau des films sont améliorées par la présence d'obstacles physiques de type hydrophobe, qui ont empêché le transfert de molécules d'eau à l'intérieur du film [92]. Cette explication est confirmée par Acosta et al., (2016). En effet, ils ont trouvé que les films à base d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) contenant l'HE de citrus présentent une réduction significative de WVP par rapport aux films contenant l'HE de thé. Les auteurs suggèrent que cet effet dépend de la nature hydrophobe des principaux composants (Limonène) d'HE de citrus par rapport à l'HE de thé (Eugénol) [93]. Une autre étude sur les films de PLA incorporant différents types d'argile, les auteurs ont montré que le Cloisite 20A (un composé hydrophobe compatible avec PLA) a été la plus efficace pour améliorer la propriété de la barrière contre la vapeur d'eau [94].

Le processus d'action des composants hydrophobes dans le transfert de la vapeur d'eau a été expliqué par Bravin et al., (2004). En effet, ils ont suggéré que les molécules d'eau devraient se diffuser principalement à travers la phase polymérique continue, où la présence de gouttelettes lipidiques des HEs représente des discontinuités de cette phase qui provoquent une augmentation efficace du facteur de tortuosité pour le transfert d'eau dans la matrice [92].

**Tableau IV-1:** Perméabilité à la vapeur d'eau des films de PLA et d'amidon contenant les HEs

		<b>WVP (g.cm/cm<sup>2</sup>sPa) <sup>1</sup></b>					
		<b>CONTROL</b>	<b>0,5%RC1</b>	<b>2%MC</b>	<b>0,5%TC</b>	<b>0,5%Pist</b>	<b>5%Pist</b>
<b>Fims</b>							
<b>PLA /HEs</b>		130,0±22,78	84,0±2,67	106,83±17,24	87,57± 14,17	158,90±1,75	155,70±2,00

<sup>1</sup>Au niveau de 0,001, la population signifie significativement différente selon ANOVA One Way et à la correction Bonferroni

#### **IV.2 Films à base de PLA et des extraits organiques**

Les résultats de la perméabilité à la vapeur d'eau des films de PLA contenant les extraits organiques de R\_EtOH(0,5%), M\_EtOH(0,5-1,5%), M\_EtA (0,5- 2%), T\_EtA( 0,5%) et P\_EtA (1,5-5%) sont présentés dans la figure IV-1.

L'addition des extraits n'a pas affecté significativement les propriétés de barrières de PLA. Les résultats révèlent que 0,5%M\_EtA, 0,5%T\_EtA et 5% R\_EtOH ont permis de diminuer la WVP de PLA. Une augmentation excessive de WVP a été observé chez les films contenant 1,5% M\_EtOH, 2% M\_EtA et 5% P\_EtA.

Comme il est rapporté dans la section ci-dessus, la WVP dépend de la nature hydrophobe-hydrophile des additifs incorporés dans la matrice polymérique. En effet, l'étude de la composition phytochimique des extraits testés a révélé que ces derniers sont riches en polyphénols et en flavonoïdes en particulier l'extrait d'acétate d'éthyle de pistachier lentisque. Cette composition fatale en composé hydrophiles garanti la sensibilisation des films de PLA contre la vapeur d'eau.

Wong et al., (1992), qui ont rapporté que l'utilisation des composés hydrophiles entraîne une variation de la microstructure du film, incluant ainsi une diminution de la densité et une formation de pores et des bulles d'airs, qui peuvent être l'origine de la diminution des propriétés de barrière des films [96].

Samsudin et al., (2014), ont trouvé une réduction de la WVP des films de PLA contenant 2% d'extrait de marigold. Les auteurs suggèrent qu'il pourrait être attribué par la présence d'Astaxanthine dans l'extrait qui possède une chaîne latérale hydrophobe plus longue [97].

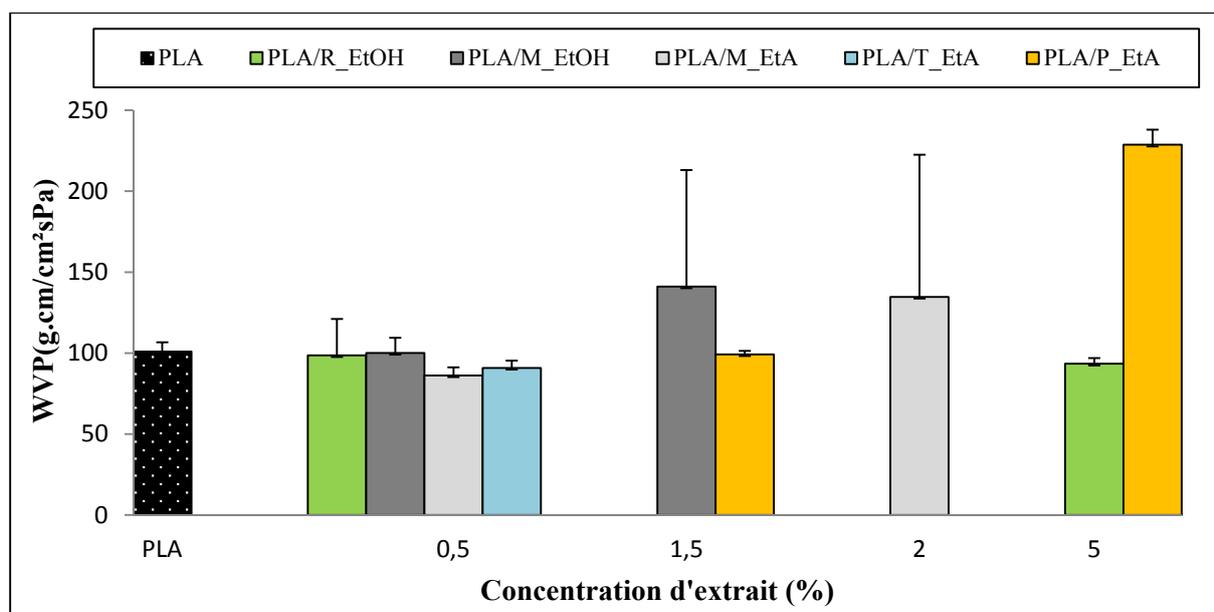


Figure IV-1: La perméabilité à la vapeur d'eau des films de PLA avec des extraits organiques

### IV.3 Films à base d'amidon et des HEs

Du fait du caractère hydrophile de l'amidon, riche en groupements hydroxyles libres, pouvant interagir avec les molécules d'eau, l'influence de l'incorporation de différents composés hydrophobes tels que les HEs (RN, RC1, RC2, MC et TC) sur le coefficients de transfert à la vapeur d'eau (WVP) a été évaluée et les résultats sont illustrés dans le tableau IV-2.

Le film de contrôle de l'amidon a révélé une valeur de WVP important, de l'ordre de  $3,50 \pm 0,58$  g.cm/cm<sup>2</sup>sPa. Ce coefficient est dû aux interactions multiples entre les molécules d'eau et la chaîne hydrophile de l'amidon et de glycérol ajouté lors du processus de fabrication.

L'ajout des HEs de RN, RC1, RC2, MC à une concentration de 5% à la matrice d'amidon a entraîné une augmentation de WVP par rapport au film de contrôle. Cependant, l'huile essentielle commerciale de thym à 5% a permis de diminuer la WVP de l'amidon à une valeur  $2,10 \pm 0,01$  g.cm/cm<sup>2</sup>sPa.

Acosta et al., (2016) ont suggéré que la WVP dépend de différents facteurs structuraux, tels que le type de matrice, la composition du film, la quantité d'additifs ajoutée et les interactions avec la matrice [93].

Le Tween 80 utilisé comme émulsifiant dans le processus de fabrication des films d'amidon a affecté significativement la WVP des films. Des auteurs ont rapporté que l'émulsifiant devrait stabiliser les gouttelettes lipidiques dispersées, les empêchant de flocculer

ou de coalescer pendant la préparation et le séchage du film. Des chercheurs ont rapporté que, les propriétés de barrière contre la vapeur d'eau dépendent principalement de la distribution des globules lipidiques dans la matrice d'amidon. Une répartition homogène des lipides entraînant des globules de petite taille diminuant ainsi le transfert de vapeur d'eau à travers des films émulsifiés [98,99,100].

En outre, Sapru et Labuza (1994) et Landamn et al., (1960) ont signalé que la formation de grandes cristallites lipidiques pendant et après le séchage du film dans la d'amidon peut donner lieu à des structures hétérogènes, à travers lesquels la vapeur d'eau peut passer [101,102] ce qui est probable pour les films contenant 5% de RN, RC1, RC2, MC .

D'autres auteurs ont rapporté que l'effet le plus significatif des émulsifiants était d'augmenter la polarité de la phase lipidique, favorisant ainsi la sorption des molécules d'eau et la mobilité de la vapeur d'eau [103,104,105,106].

Dans notre étude, les films à 5% de RN, RC1, RC2, MC préparés avec le Tween 80 ont présenté une structure compacte dont les gouttes lipidiques des HEs n'ont pas été répartie de manière homogène ce qui a favorisé la WVP élevée.

Comme il est rapporté, la perméabilité à la vapeur d'eau dépend du rapport hydrophile-hydrophobe des constituants du film, et l'augmentation de l'hydrophobicité du film réduira l'absorption d'eau. Ceci explique la réduction de la valeur de WVP chez les films contenant 5%TC. Ainsi, TC a révélé une teneur en composés terpéniques la plus élevée, entraînant ainsi une hydrophobicité plus importante ce qui provoque des propriétés de barrières plus améliorés.

On a pu remarquer que les propriétés de barrière à la vapeur d'eau des films d'amidon incorporant 5% RN, RC1, RC2, MC contenant un émulsifiant été inférieures au de film de control (amidon pure). Ceci est causé par la réaction de tensioactif qui augmente la polarité des lipides d'une part et d'autre part affecte la distribution des lipides dans les films en formant des grandes globules ce qui favorise la faible perméabilité des film à la vapeur d'eau. A cet effet, il est important de déterminer l'effet des lipides sur microstructure du film et ou d'assurer une meilleurs homogénéisation des constituants dans le film d'amidon pour éviter la formations des pores endommageant les propriétés de la barrière contre la vapeur d'eau.

**Tableau IV-2:** Pérmméabilité à la vapeur d'eau des films d'amidon contenant les HEs

WVP (g.cm/cm <sup>2</sup> sPa) <sup>1</sup>						
Films	CONTROL	5%RN	5%RC1	5%RC2	5%MC	5%TC
Amidon/HEs	3,50±0,58	4,50±0,01	3,70±0,02	6,40±0,01	9,30±0,02	2,10±0,01

<sup>1</sup>Au niveau de 0,001, la population signifie significativement différente selon ANOVA One Way et à la correction Bonferroni

## V. Evaluation de l'activité antifongique des biofilms

### V.1 Films à base de PLA incorporés avec des HEs

Le but principal des tests antifongiques est d'évaluer l'utilisation potentielle des HEs dans les films de PLA comme inhibiteurs de champignons pour l'utilisation dans les emballages alimentaires.

Le test est réalisée avec les films contenant les HEs de RN, RC1, RC2, MN, MC, TC et Pist à des concentrations de 0,5-1,5-2-5%, dans le but d'observer la variation de l'activité antifongique en fonction de la concentration des HEs dans les films. La figure V-1 montre l'inhibition de la croissance fongique (FGI %), et la figure V-2 montre la concentration fongicide en croissance en présence des films contenant les HEs. Ces deux grandeurs sont calculées après 7 jours d'incubation à 25 °C.

Les résultats révèlent que l'inhibition de la croissance de l'*A. niger* (%) dépend de la nature et de la concentration des HEs incorporés dans le film.

Les films qui contiennent RN, RC1, RC2, TC, et Pist révèlent une inhibition optimale contre *A.niger* à 0,5 % et 1,5%. Généralement, l'inhibition fongique des HEs de RC1, RC2 augmente avec leurs concentrations dans le film. Contrairement à l'huile essentielle de Pist qui ont montré une faible efficacité d'inhibition fongique à des concentrations élevées (2 et 5%). De même, l'huile essentielle commerciale de thym, a montré une inhibition modérée à des concentrations de 2 et 5%. Banci (1997) a signalé que l'effet lent des certains HEs pourraient être attribué à la production de laccase et d'autres enzymes extracellulaires qui pourraient catalyser l'oxydation les composés bioactifs présents dans les HEs, entraînant ainsi une inactivation des sites actives contre les champignons [60].

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus avec les HEs, où RN, RC1, TC et Pist ont révélé une activité antifongique importante à des faibles concentrations.

Les résultats de l'activité antifongique des films actifs élaborés sont liés au profil chimique des composés bioactifs contenus dans les HEs qui ont été libérés des films dans l'espace fermé de la boîte pétri pendant la période d'incubation [75,107]. Nous avons rapporté que l'Eucalyptol est le composé majoritaire de RN, de RC1 et de RC2 (32.9, 42.9 et 28%, respectivement) et le Carvacrol est le composé abondant de TC (64%). Ces composés ont montré un pouvoir inhibiteur contre un large spectre des champignons. L'efficacité antifongique de l'HE de pistachier lentisque est due principalement à des composés terpéniques actifs, qui sont présents en quantité appréciables dans cette huile fonctionnant en synergie [108].

Le mécanisme possible de toxicité contre les champignons est basé sur l'inactivation des enzymes fongiques contenant des groupes SH dans leur site actif [45], ainsi que les changements morphologiques causés par les composés bioactifs, comme le manque de sporulation, perte de pigmentation, développement aberrant de conidiospores et distorsion des hyphes dans *Aspergillus niger* [52]. Les composés bioactifs pourraient également agir en se liant aux groupes amines et à l'hydroxylamine des protéines membranaires microbiennes, provoquant une altération de la perméabilité et une fuite de composants intracellulaires [53,54]. Giordani et al., (2006), a mentionné que les groupes fonctionnels de composés terpéniques dans les HEs (phénols et aldéhydes) réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique provoquant une fuite du contenu cytoplasmique et donc l'effet antifongique [55].

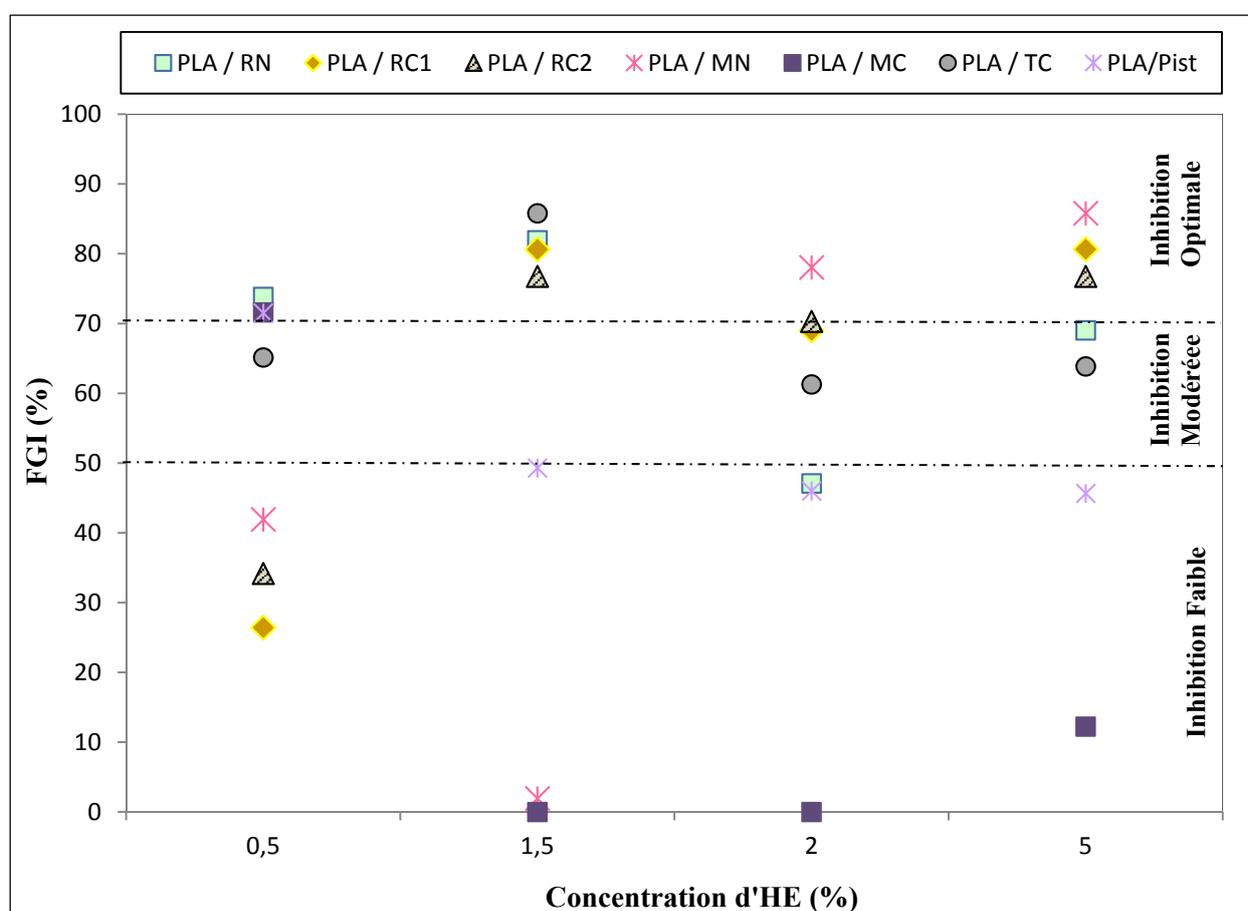
Des expériences antérieures réalisées avec les HEs de romarin et de thym ont montré que ces HEs ont une activité antifongique en retardant la croissance du mycélium. Ainsi, les chercheurs ont suggéré que l'activité anti-*Aspergillus* de certaines HEs est due à la diminution du cytoplasme dans les hyphes causant des dégâts dans la paroi cellulaire du champignon et, finalement, l'affaiblissement du mycélium [109].

Nous avons constaté que les composants volatiles lipophiles sont absorbés par les champignons. En effet, des travaux ont démontré que les HEs ont été fortement absorbées par le mycélium fongique dans un court temps d'exposition. L'absorption prédominante de ces huiles au mycélium fongique par rapport au milieu agar est due à la nature hautement lipophile du mycélium couplée à une large surface relative aux dimensions fongiques [110].

D'autre part, les résultats montrent que la croissance fongique est plus élevée pour les films contenant MC et 1,5% MN, ce qui peut être lié à l' $\alpha$ -pinène (le composé majoritaire de ces huiles essentielles). En effet, l' $\alpha$ -pinène s'est avéré un composant antifongique contre les

genres de Basidiomycota mais pas sur Ascomycota [51]. Cependant, une inhibition optimale est obtenue pour le film à 5% MN, cela est expliqué par le profil chimique de cette huile. En effet, des composés terpéniques sont présents en proportions importantes dans MN, tels que le Linalool, le Camphre, le  $\alpha$ -terpineol, l'Eugénol, suggérant un effet antifongique fonctionnant en synergie plus efficace que lorsqu'ils sont isolés [93].

Les films contenant des faibles concentrations des HEs de RN, RC1, RC2, MC et Pist ont montré une activité antifongique importante. De même, l'effet de synergie des composés contenus dans l'HE de MN a contribué une activité antifongique importante des films de PLA à 5% de MN.



**Figure V-1:** Inhibition fongique des films de PLA contenant les HEs

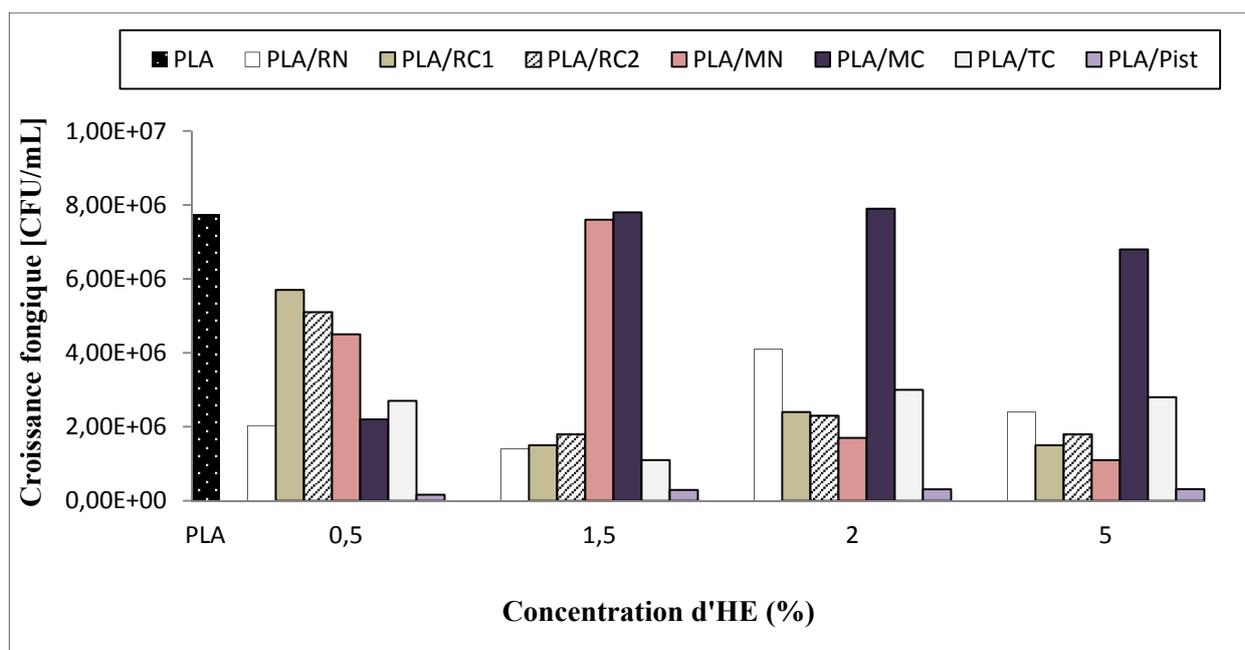


Figure V-2: Effet des films de PLA contenant les HEs contre la croissance fongicide

## V.2 Les films à base de PLA incorporés avec des extraits organiques

Le film de contrôle (PLA et les films actifs (PLA+ % Extraits) ont été évalués pour leur activité antifongique contre le champignon d'*Aspergillus.niger*. La figure V-3 montre l'inhibition de la croissance fongique (FGI %) après 7 jours d'incubation à 25°C, et la figure V-4 montre la concentration fongicide en présence des films contenant 0,5-1,5-2-5% d'extraits de plante.

L'activité antifongique montre une variation significative avec la concentration et la nature de l'extrait contenue dans le film de PLA.

Les films contenant les extraits éthanoliques de myrte (M\_EtOH), de thym ( T\_EtOH) et les extraits d'acétate d'éthyle de thym (T\_EtA ) et du pistachier lentisque (P\_EtA) ont été efficaces pour inhiber la croissance fongique de l'*A.niger*. En effet, les films actifs incorporant M\_EtOH (0,5- 1,5%), de T\_EtOH (0,5-1,5-2%), de T\_EtA (2%) et de P\_EtA (2-5%) ont montré une activité antifongique modérée.

L'effet inhibiteur sur la croissance fongique est dû à l'activité antifongique des agents actifs contenus dans les films qui sont considérés comme des barrières protectrices des films contre les champignons. Ajoutant, les extraits contenus dans les films de PLA sont riches en polyphénols, ces constituants ont montré des activités antimicrobiennes importantes [61,62].

Les extraits de R\_EtOH et de M\_EtA contenus dans les films de PLA ont éteint leurs maximums d'inhibition à une concentration de 1,5%, quoique leurs pourcentages d'inhibitions

soient de l'ordre de 42,36% et 34,54%, respectivement. Nos résultats sont considérés prometteurs par rapport à ceux trouvés par Llana-Ruiz-Cabello et al., (2015), où les films de PLA contenant différentes concentrations d'extrait d'allium ont révélé une activité antifongique faible [83]. De même, An et al., (1998) ont montré que les films en LDPE contenant 1% des extraits de *R.palmatum* et *C. chimensis* n'ont pas présenté une activité antimicrobienne [111].

Les auteurs suggèrent que ces résultats peuvent être attribués à une perte des agents actifs lors du procédé de fabrication [112, 113].

Ces résultats de l'activité antifongiques des films actifs obtenus ne correspondaient pas seulement aux propriétés antifongique des extraits contenus dans la matrices, mais aux d'autres paramètres suggérés par Boonruang et al., (2017). En effet, ils ont rapporté qu'il existe certaines interactions entre les composés antifongiques, les isolats fongiques et les matrices PLA affectant les mécanismes de libération des composés antifongiques [113].

Ces résultats ont montré que les films de PLA contenant des extraits éthanoliques de myrte et de thym à des faibles concentrations. Ainsi, les extraits d'acétate d'éthyle de thym et du pistachier lentisque à 2% sont efficaces contre la détérioration microbienne. Ce qui leurs permettre de les appliquer dans le domaine des emballages alimentaires actifs.

Cependant, Patrignani et al., (2015) ont signalé que l'application des extraits naturels directement dans l'aliment est encore limitée probablement en raison de leur fort impact et des changements qu'ils entraînent dans les produits alimentaires [114].

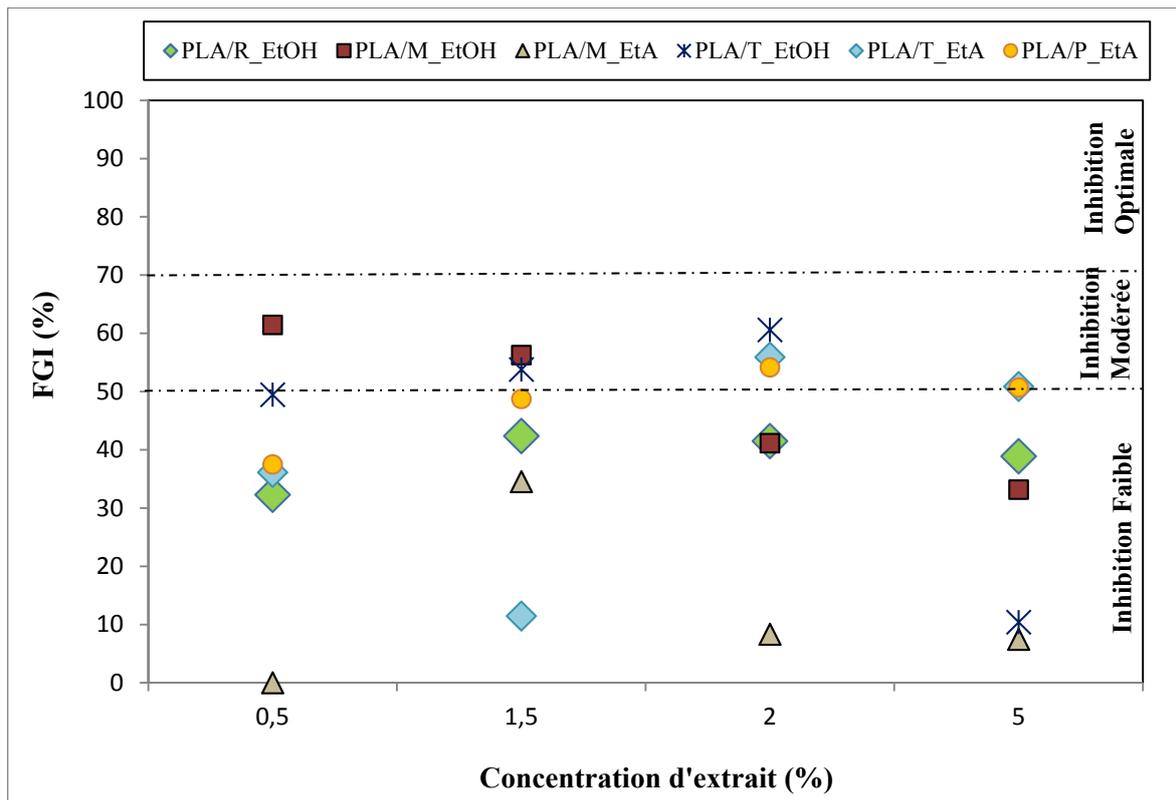


Figure V-3: Inhibition fongique des film de PLA contenant différentes concentrations des extraits

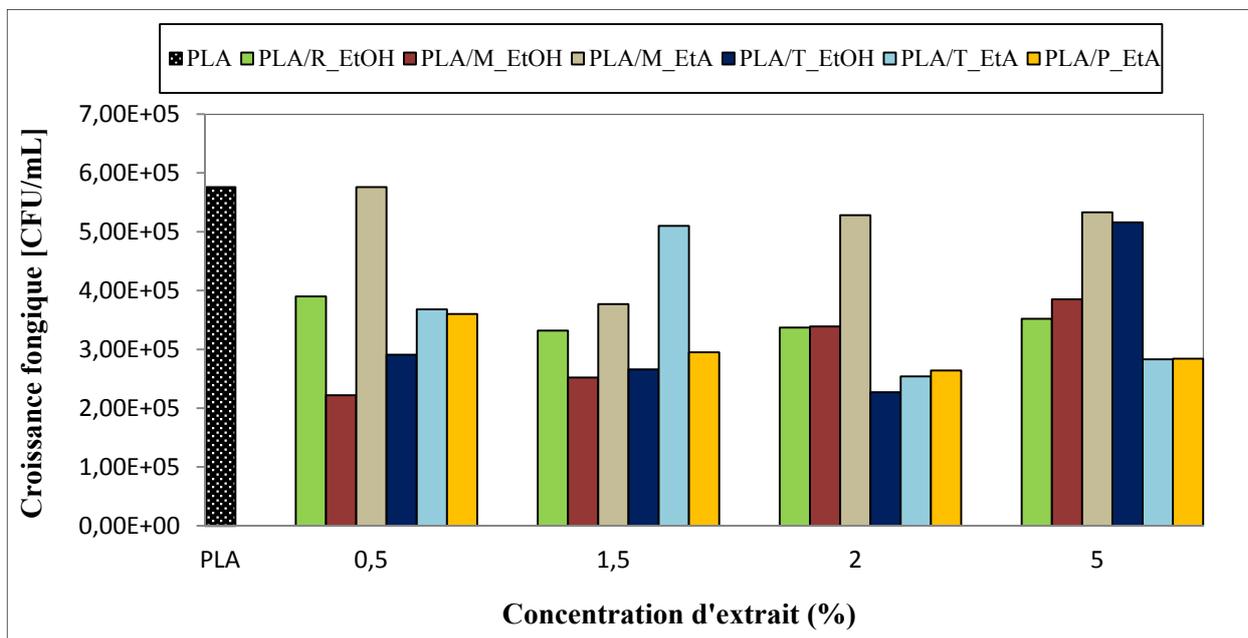


Figure V-4: Activités antifongiques des films contenant différents concentrations des extraits

### **V.3 Les films à base d'amidon incorporés avec des HEs**

Le milieu de culture préparé à partir de la Gélose dextrosé à la pomme de terre (Abrégé PDA), représente le milieu le plus sélectif pour le champignon de l'*Apergillus.niger*. Le PDA est un réactif purement naturel est un aliment riche en polysaccharide.

Les films d'amidon recouvert sur ce milieu pour tester l'effet de l'ajout des HEs sur l'activité antifongique, n'ont pas pu résister dans ce milieu. En effet, après 7 jours d'incubation, le film s'est totalement immergé dans le milieu de culture d'agar et s'est dégradé. Cet effet est attendu, étant donné que l'amidon est un glucide sous forme d'un polysaccharide complexe de même caractère hydrophile que le milieu où il a été fixé ce qui provoque ainsi une interaction permanente entre la matrice et l'agar, ce qu'on appelle l'interaction de Keesom.

D'autre part, l'*A.niger* entraîne une détérioration de l'amidon par une réaction d'amylase permettant l'hydrolyse de l'amidon en sucre soluble, ce qui favorise l'augmentation de la croissance fongicide de ce champignon [115].

Avila-sosa et al., (2012) ont trouvé une activité antifongique importante des films à base d'amidon incorporant les HEs d'origan et de cannelle. En effet, ils ont procédé pour l'évaluation de l'activité antifongique contre l'*A.niger* la technique de diffusion de vapeur des agents antimicrobiens des films actifs placé dans le couvercle de la boîte de pétri [116].

## **CHAPITRE III**

# **Stabilité des composés bioactifs dans les films**

## **I. Quantification des HEs et des extraits organiques dans les films de PLA et d'amidon**

La quantification des agents actifs à partir des films de PLA et d'amidon a été réalisée dans le MeOH à 20°C pendant 24h. Les pourcentages de pertes et les concentrations des substances actives retenues dans les films sont exprimés dans le tableau I-1.

Le test de quantification a montré des pertes des HEs et des extraits de plantes ont lieu pendant la préparation des films et en particulier durant le processus de séchage, comme il a été signalé dans des travaux antérieurs [44,117,118].

Les films d'amidon et de PLA ont subi des pertes importantes des HEs de RN et de TC, ces pertes varient entre 50% et 65%. Il est à noter, que les huiles essentielles sont riches en composés hydrophobes aromatiques volatils conduisant ainsi à des pertes modérés.

Les films de PLA contenant les extraits de R\_EtOH et de T\_EtOH ont subi des pertes moins importantes que les films de PLA contenant les huiles essentielles. Ces pertes sont de l'ordre de  $28,57 \pm 8,57\%$  (R\_EtOH) et de  $41,70 \pm 6,52\%$  (T\_EtOH). Eventuellement, certains composés volatils contenus dans ces extraits peuvent également être perdus pendant le processus de séchage.

Il est clair que la stabilité des additifs (HEs et extraits) contenus dans les films dépend de plusieurs facteurs tels que le procédé de fabrication des films, le poids moléculaire, et l'interaction chimique entre les substances actives et la matrice du film [112,119]. En effet, le processus de séchage des films permet d'affecter la dégradation et la stabilité des extraits et des HEs contenus dans le film. En outre, les résultats de traction mécaniques montrent que les HEs de RN et TC ont permis d'améliorer la flexibilité des films de PLA et d'amidon. Cependant, l'ajout des extraits de R\_EtOH et T\_EtOH ont permis d'avoir des films de PLA plus fragiles et plus rigides. De ceci, nous avons noté que les forces interchaines entre les HEs et la matrice de polymère est plus robuste que celles entre le PLA et les extraits.

Bien que les films de PLA contenant 5% des HEs et des extraits de plantes présentent des pertes remarquables des agents actifs, ces pertes n'ont pas affecté l'activité antifongique et antioxydante des films.

**Tableau I-1:** La perte et la concentration des HEs et des extraits organiques restante dans le film après la fabrication des films de PLA et d'amidon

<b>Films</b>	<b>% Perte</b>	<b>g d'additifs/ g de film</b>
<b>PLA/RN</b>	50,39±7,87	0,02±0,00
<b>PLA/TC</b>	55,74±5,07	0,02±0,00
<b>PLA/R_EtOH</b>	28,57±8,57	0,03±0,00
<b>PLA/T_EtOH</b>	41,70±6,52	0,02±0,00
<b>Amidon/RN</b>	59,02±3,38	0,03±0,00
<b>Amidon/TC</b>	64,84±1,62	0,03±0,00

## **II. Activité antioxydante des films contenant des extraits organiques**

La nouvelle génération des procédés d'emballages alimentaires est spécialement conçue pour augmenter leurs fonctionnalités en incorporant des composés bioactifs naturels tels que les antioxydants, les antimicrobiens, les probiotiques et les arômes. Ces approches peuvent être utiles pour prolonger la durée de vie et préserver la sécurité alimentaire de la détérioration microbienne. En outre, des effets bénéfiques pour la santé pourraient être fournis aux consommateurs si le potentiel antioxydant / contenu dans les produits frais est amélioré ou maintenu [120].

On a choisit d'évaluer l'activité antioxydante des films contenant 0,5% et à 5% des extraits organiques de R\_EtOH, M\_EtOH, M\_EtA, T\_EtOH, T\_EtA et P\_EtA. L'activité antioxydante des films développés est mesurée par les méthodes de DPPH et d'ABTS. Les résultats sont exprimés en termes de pourcentage d'inhibition dans la figure II-1.

Les résultats ont montré que les films de PLA contenant les extraits organiques exhibent une activité antioxydante importante, et cette activité est marquée dans le test d'ABTS. Le test de DPPH, a montré que les films contenant 0,5% d'extraits ont une activité modérée par rapport aux films testé par ABTS. Ceci est cohérent avec ce que nous avons révélé dans la section de l'activité antioxydante des extraits.

L'activité antioxydante de films de PLA contenant des extraits de plantes, provient principalement de l'abondance de ces agents actifs en composés polyphénoliques. Ces derniers,

ont montré dans la littérature une activité antimicrobienne importante. Les résultats confirment que les composés bioactifs restants dans le film après leur séchage ont joué leur rôle antioxydant. Selon Ayala-Zavala et al., (2008) les systèmes d'emballage actifs antioxydants peuvent être divisés en quatre groupes selon le mécanisme d'action du composé antioxydant : (i) l'antioxydant est libéré dans l'espace libre du paquet afin d'interagir avec le produit alimentaire, (ii) le composé antioxydant est inclus dans le matériau d'emballage et libéré au produit par un processus de migration, (iii) le composé antioxydant est immobilisé dans la surface de l'emballage [121].

Dans une étude portée par Llana et al., (2015), les films de PLA incorporant le Proallium n'ont montré aucune activité antioxydante dans les deux tests d'ABTS et DPPH, en tenant compte que le pourcentage d'inhibition est inférieurs à 5% dans les deux essais [83].

Au vu des résultats, le film de contrôle de PLA a subit une faible activité antioxydante dans les tests de DPPH et de DPPH, avec une inhibition radicalaire de l'ordre de  $5,23 \% \pm 1,27$  et  $15,56\% \pm 5,00$ , respectivement. Permettant de conclure que l'acide Polylactique a subit une réaction de transfert d'un électron e- à travers un site actif vers l'atome d'azote de DPPH et d'ABTS qui donne lieu à un radical phénoxy (Figure II-2). Ceci concorde avec les travaux de Shojaee-Aliabadi et al., (2013), où ils rapporté que cet effet est probablement due à la présence des polyphénols dans la matrice polymérique [69].

La figure II-3 montre une relation linéaire entre la capacité antioxydante et la concentration des extraits contenus dans le film de PLA. De ceci, on peut affirmer que plus la concentration des extraits est élevée dans les films, plus l'activité antioxydante est importante. Jouki et al., (2014) ont trouvé une approche similaire lors de l'évaluation de l'activité antioxydante dans les films mucilages [122]. Ils ont remarqué que cette activité augmente en ajoutant des concentrations plus importantes des HEs. Gómez-Estaca et al., (2009) ont également signalé que le potentiel antioxydant de films biodégradables est proportionnel à la quantité d'antioxydants additifs [123].

Les films à base des extraits organiques montrent des résultats positifs et prometteurs pour protéger les denrées alimentaires de l'oxydation des lipides en assurant un potentiel antioxydant améliorés des produits alimentaires.

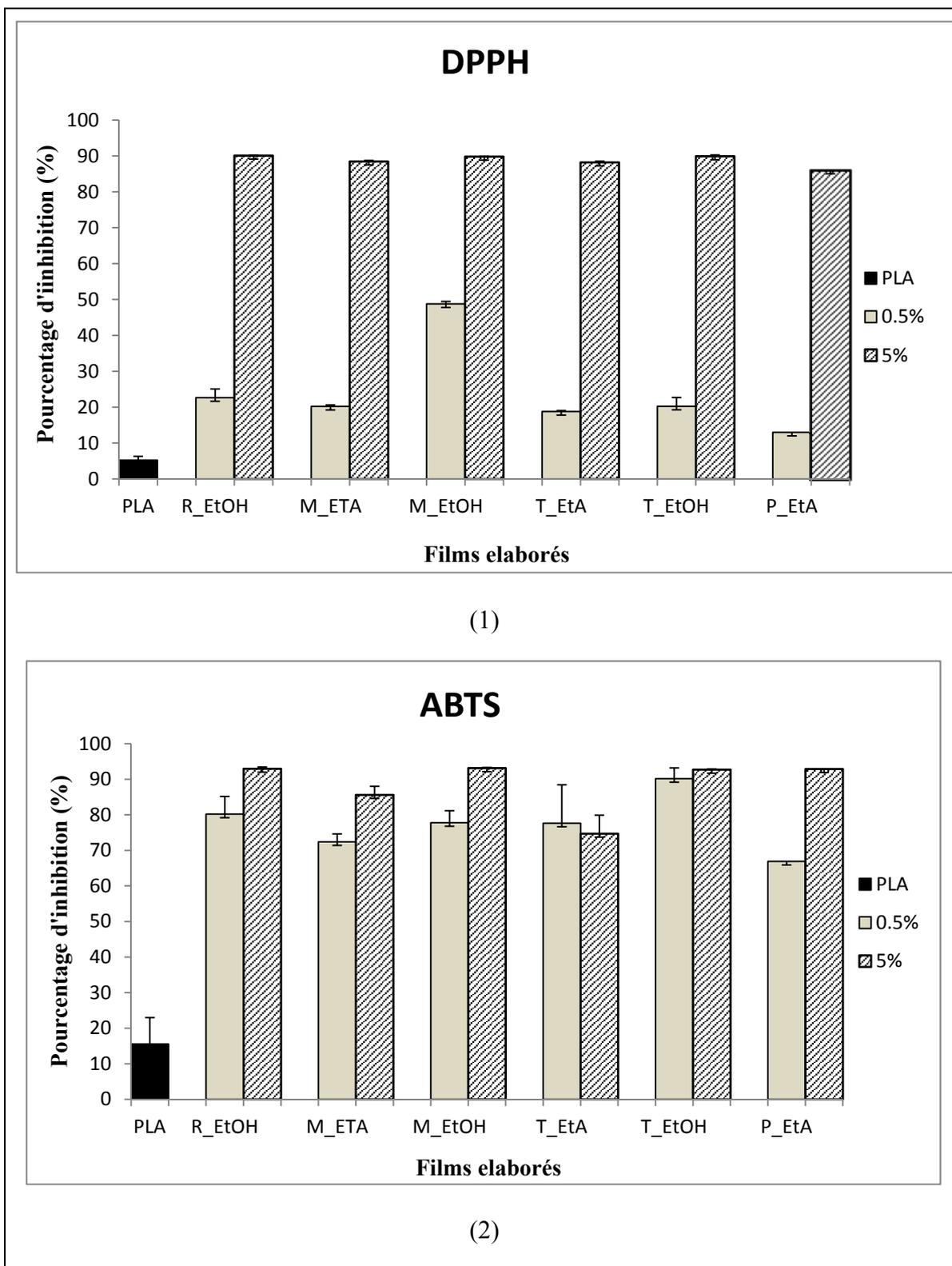


Figure II-1: Activité antioxydante des films de PLA contenant les extraits organiques par DPPH (1) et par ABTS (2)

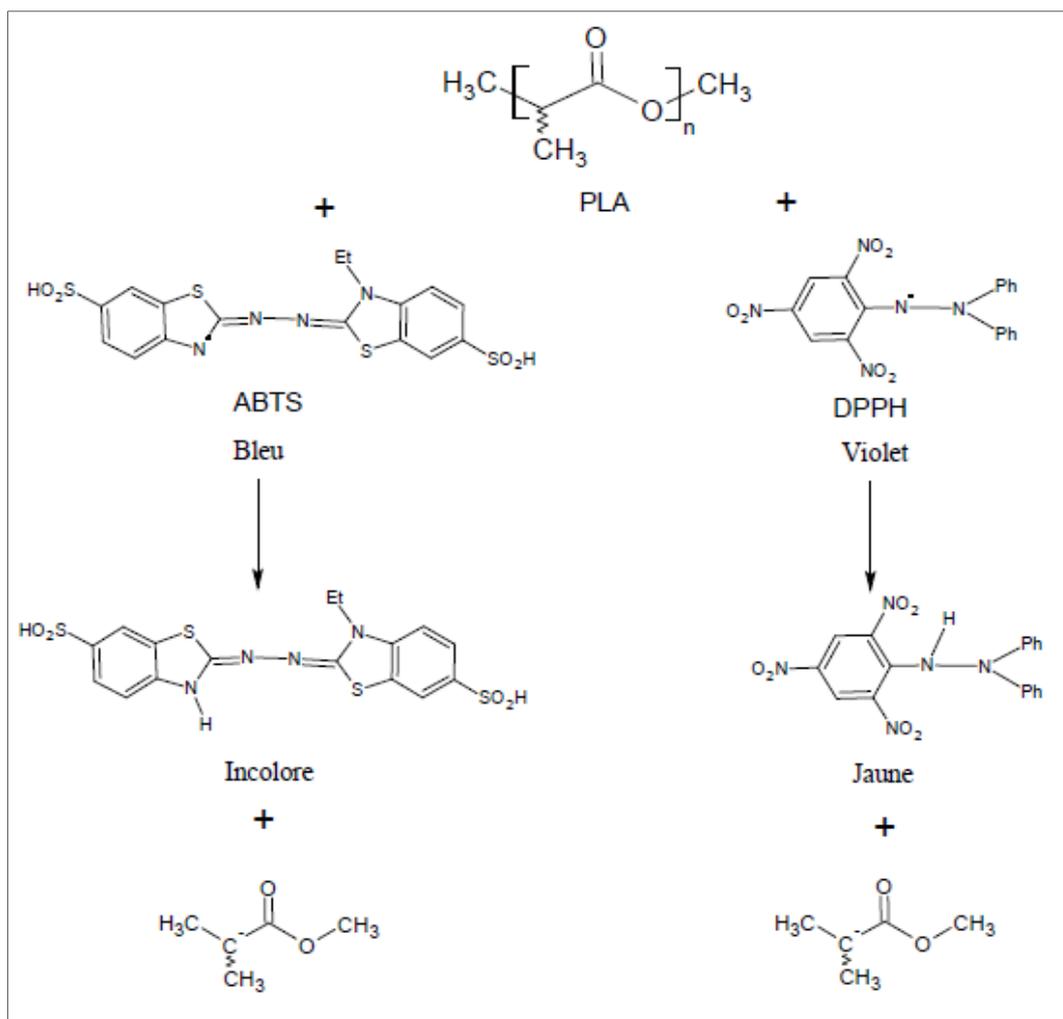


Figure II-2: Réaction chimique possible entre PLA et les radicaux DPPH et ABTS

### III. Test de migration

Les emballages actifs antioxydants montrent des résultats positifs et prometteurs pour protéger la stabilité des produits alimentaires et assurer le potentiel antimicrobien des aliments.

Récemment, la migration a été considérée comme un problème négatif, car les substances sont susceptibles de constituer un danger pour la santé humaine et / ou d'altérer la composition des denrées alimentaires d'une manière inacceptable. Cependant, une nouvelle tendance à l'emballage actif est basée sur la migration comme un problème positif causé par l'effet bénéfique de certains additifs (principalement des antioxydants et / ou des antimicrobiens) dans les denrées alimentaires [112,120,124].

A cet égard, nous nous sommes intéressés à évaluer la migration des extraits éthanoliques (R\_EtOH, T\_EtOH) contenus dans les films de PLA et des HEs (RN, TC) contenus dans les films de PLA et d'amidon à une concentration de 5% pendant une durée de 5 jours. Pour tester

la libération des agents actifs de la matrice de polymère contenus dans le film vers le produit alimentaire, la commission européenne (UE) a recommandé d'utiliser des solvants comme des simulateurs alimentaires tels que, l'éthanol 10% pour les produits alimentaires aqueux, l'éthanol 95% pour les produits alimentaire gras et l'acide acétique 3% pour les produits alimentaires acides. Parmi ces simulateurs on a distingué l'éthanol 50% un simulant pour les produits laitiers [125].

Nous avons exprimé la concentration des agents actifs (HE/ extrait) migrants des films de PLA et d'amidon vers le simulateur alimentaire durant les cinq jours de test en g de substance active par un kilogramme de simulant (g (migrant)/ kg (simulant)) (Figure III-1). Le taux de migration total ( $Mt/M_0$ ) est calculé à partir de la masse migrante de substance active migrante à un temps  $t$  par la masse initialement incorporés dans la solution filmogène (Figure III-2).

Au vu des résultats, on remarque que la libération des extraits éthanolique de romarin et de thym des films est importante par rapport à la libération des huile essentielles de romarin et de thym. D'ailleurs, les concentrations évalués de  $T\_EtOH$  et de  $R\_EtOH$  migrés des films de PLA dans le simulant alimentaire sont de l'ordre de 0,12 g/Kg et 0,1 g/Kg, respectivement. Ce qui correspond à un taux de libération de 0,44 et 0,37 pour  $T\_EtOH$  et  $R\_EtOH$ , respectivement. Un effet contraire a été observé chez les films de PLA contenant les huiles essentielles de RN et de TC. Où la libération de RN a éteint son maximum de libération au deuxième jour du test avec un taux de libération de 0,081. De même pour la libération de TC de PLA qui a éteint son maximum de libération au cinquième jour du test avec un taux de libération de l'ordre de 0,072. Ceci concorde avec les films d'amidon contenant les huiles essentielles de RN et TC, où l'huile essentielle de RN a éteint son maximum de libération au deuxième jour du test avec un taux de libération de 0,57. Pareil pour les films d'amidon contenant TC qui a éteint son maximum de libération au cinquième jour avec un taux de libération de l'ordre de 0,018. Nous avons remarqué que la libération de l'huile essentielle de TC est très négligeable par rapport à la libération de RN. Après le cinquième jour de test, la libération des huiles essentielles et des extraits de plantes testés pourrait être continue au fils des jours. Les résultats montrent qu'il s'agit des films d'emballages alimentaires à libération contrôlée.

La différence de migration trouvée entre les extraits de plantes et les huiles essentielles est peut-être dû au profil chimique de ces deux substances. En effet, les extraits des plantes sont riches en polyphénols, et des études ont montré que ces derniers sont liés à la matrice polymérique par des liaisons non covalentes en utilisant des liaisons hydrogènes et des interactions électrostatiques. Les auteurs ont rapporté que la libération des polyphénols

proviennent de la nature réversible des liaisons hydrogènes que par un stimulus externe ces liaisons sont affaiblies conduisant ainsi à la libération des polyphénols. [126,127,128].

De même, nous avons montré que les huiles essentielles subissent une perte importante après le processus de séchage par rapport aux extraits qui sont plus stables ce qui explique la faible concentration des huiles essentielles trouvée dans le simulant alimentaire.

La libération des substances actives dans l'éthanol pourrait être due à la modification structurelle de la matrice de PLA sous sorption d'éthanol. En effet, des auteurs ont rapporté que l'éthanol jouerait le rôle d'un plastifiant pour le PLA en augmentant le segment de mobilité des chaînes et ouvrirait la structure polymérique créant ainsi des espaces vides favorisant la migration des polyphénols dans le simulant alimentaire [129,130,131]. Aussi, une étude a indiqué que l'éthanol est considéré comme un solvant «très pauvre» pour le PLA. De même, il a été démontré qu'une interaction pourrait se produire entre l'éthanol et la matrice de PLA [129].

Des auteurs ont rapporté que le taux de libération des substances actives après une durée d'exposition dépend de l'affinité entre l'agent actif et le simulant alimentaire [112,132]. En effet, plus les substances actives sont solubles dans le simulant, plus leur libération est élevée [132]. L'éthanol à 50% est solvant polaire de degré de polarité de 10,8, il a plus d'affinité pour les composés hydrophiles et donc plus d'affinité avec les extraits organiques testés.

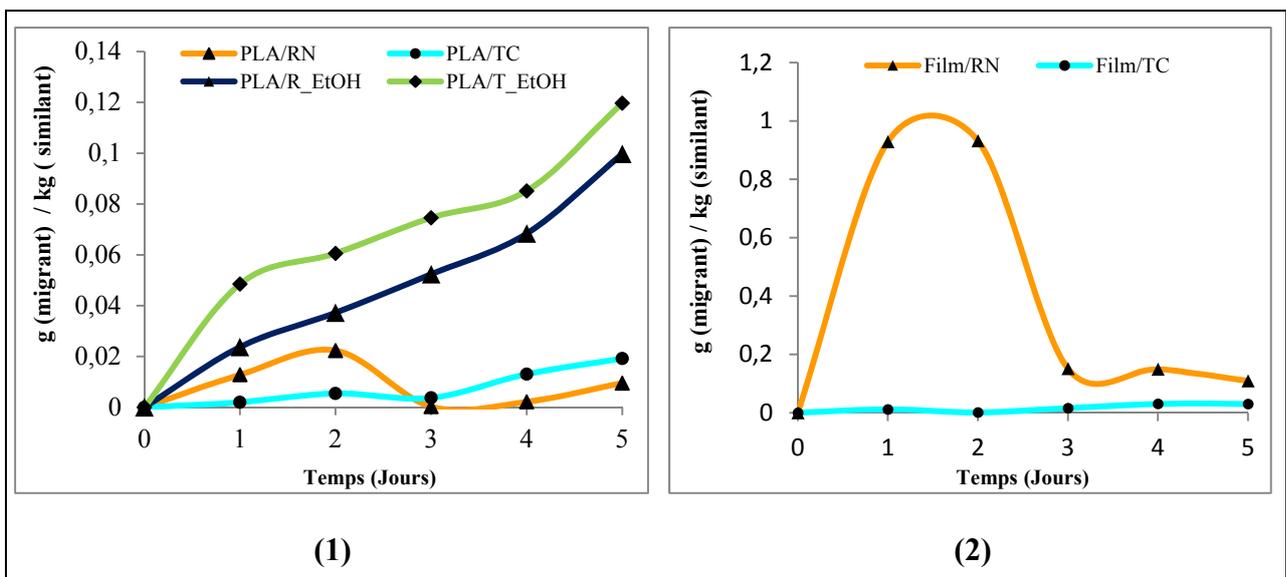
Des auteurs ont étudié la migration des agents actifs à travers un emballage actif vers un aliment, et ils ont mis l'hypothèse que l'humidité interne absorbée par les aliments à la surface de polymère peut être la force motrice qui amorce la libération des composés antimicrobiens du complexe [133]. Ayala-Zavala et al., (2008) ont apporté que lorsqu'un complexe moléculaire intervient entre une matrice de polymère et un composé antimicrobien, les interactions complexes sont affaiblies et le composé actif est libéré dans son environnement [121].

D'autre part, des chercheurs ont signalé que la libération des agents actifs synthétiques des films d'emballages vers les produits alimentaires emballés favorise la détérioration microbienne de l'aliment [120]. Cela est fortement improbable dans notre travail, car notre approche est basée sur les plantes aromatiques et médicinales qui sont riches en composés bioactifs et qui ont montré des effets bénéfiques pour la santé humaine. Ces substances actives sont utilisées dans la cuisine traditionnelle et sont appliquées dans divers domaines grâce à leurs propriétés biologiques importantes [112,134].

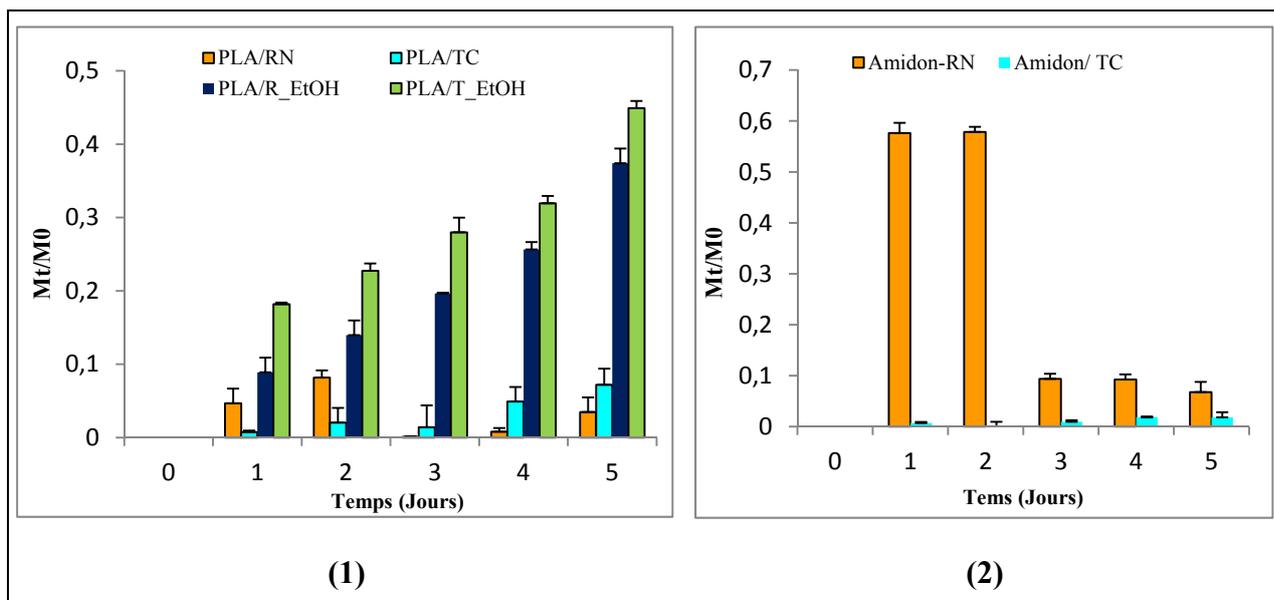
Ainsi, Jamshidian et al., (2012) ont apporté que l'emballage alimentaire à une libération contrôlée fournit une stabilité alimentaire longue à la détérioration de l'aliment par une libération graduelle et continue des substances actives particulièrement à la surface de nourriture [125].

Les propriétés biologiques importantes des HEs et des extraits de plantes ont mené recherches vers des études supplémentaires, pour optimiser des capsules des HEs ou d'extraits des plantes utilisés comme des agents multifonctionnels dans les aliments dans le but de prévenir ou traiter et les maladies humaines [134].

De ce fait, la libération contrôlée des agents actifs des films d'emballages alimentaires vers l'aliment emballé est un mécanisme utilisé pour générer la protection des aliments et améliorer le potentiel nutritionnel des denrées alimentaires. Il s'agit donc d'une nouvelle génération d'emballages alimentaires actifs qui permettent de bénéficier d'une santé saine.



**Figure III-1:** Concentration d'additifs migrant des films de PLA contenant 5% d'HEs et d'extraits (1) et des films d'amidon contenant 5% des HEs de RN et TC (2) dans le simulateur alimentaire



**Figure III-2:** Taux de migration des films de PLA contenant 5% HEs et d'extraits organiques (1) et des films d'amidon contenant 5% des HEs de RN et TC (2) dans le simulateur alimentaire

## Les références

- [1] Lagunez Rivera, L. (2006). Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe (Doctoral dissertation), 24.
- [2] Akrouf, A., Chemli, R., Chreif, I., & Hammami, M. (2004). Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie). *Cahiers Options Méditerranéennes*, 62, 289-292.
- [3] Conde-Hernández, L. A., Espinosa-Victoria, J. R., Trejo, A., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2017). CO<sub>2</sub>-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Journal of Food Engineering*, 200, 81-86.
- [4] Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R., & Bessiere, J. M. (2003). Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(6), 481-484
- [5] Rasooli, I., Fakoor, M. H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., & Rezaei, M. B. (2008). Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum coticum* L. essential oils. *International journal of food microbiology*, 122(1-2), 135-139.
- [6] Pereira, P., Cebola, M. J., Oliveira, M. C., & Bernardo-Gil, M. G. (2016). Supercritical fluid extraction vs conventional extraction of myrtle leaves and berries: comparison of antioxidant activity and identification of bioactive compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 113, 1-9.
- [7] Bampouli, A., Kyriakopoulou, K., Papaefstathiou, G., Louli, V., Krokida, M., & Magoulas, K. (2014). Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 1(3), 81-91.
- [8] Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Čebović, T., Vukmirović, S., & Mikov, M. (2014). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 225.
- [9] Wannes, W. A., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M. B., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., . & Marzouk, B. (2010). Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and chemical toxicology*, 48(5), 1362-1370.

- [10] El Abed, N., Kaabi, B., Smaali, M. I., Chabbouh, M., Habibi, K., Mejri, M., ... & Ben Hadj Ahmed, S. (2014). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus capitata* essential oil with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014
- [11] Bachrouch, O., Jemâa, J. M. B., Wissem, A. W., Talou, T., Marzouk, B., & Abderraba, M. (2010). Composition and insecticidal activity of essential oil from *Pistacia lentiscus* L. against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller and *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Stored Products Research*, 46(4), 242-247.
- [12] Ivanović, J., Đilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Babović, N., Petrović, S., & Žižović, I. (2009). Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74(7), 717-732.
- [13] Linares, I. B., Arráez-Román, D., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7682-7690.
- [14] Babovic, N., Djilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Ivanovic, J., Petrovic, S., & Zizovic, I. (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 98-107.
- [15] Plazonić, A., Bucar, F., Maleš, Ž., Mornar, A., Nigović, B., & Kujundžić, N. (2009). Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, 14(7), 2466-2490.
- [16] Rossi, F. (2014). Vers une valorisation industrielle d'un remède traditionnel pour le traitement des intoxications ciguatériques (Doctoral dissertation, Université de la Polynésie Française).
- [17] Nagy, T. O., Solar, S., Sontag, G., & Koenig, J. (2011). Identification of phenolic components in dried spices and influence of irradiation. *Food chemistry*, 128(2), 530-534.

- [18] Vallverdú-Queralt, A., Regueiro, J., Martínez-Huélamo, M., Alvarenga, J. F. R., Leal, L. N., & Lamuela-Raventos, R. M. (2014). A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chemistry*, 154, 299-307.
- [19] Ertas, A., Boga, M., Yilmaz, M. A., Yesil, Y., Tel, G., Temel, H., & Ugurlu, P. (2015). A detailed study on the chemical and biological profiles of essential oil and methanol extract of *Thymus nummularius* (Anzer tea): Rosmarinic acid. *Industrial Crops and Products*, 67, 336-345.
- [20] Jaouadi, R., Cardoso, S. M., Silva, A. M., Yahia, I. B. H., Boussaid, M., & Zaouali, Y. (2018). Variation of phenolic constituents of Tunisian *Thymus capitatus* (L.) Hoff. et Link. populations. *Biochemical Systematics and Ecology*, 77, 10-15.
- [21] Elandalousi, R. B., Akkari, H., B'chir, F., Gharbi, M., Mhadhbi, M., Awadi, S., & Darghouth, M. A. (2013). *Thymus capitatus* from Tunisian arid zone: chemical composition and in vitro anthelmintic effects on *Haemonchus contortus*. *Veterinary parasitology*, 197(1-2), 374-378.
- [22] Bahorun, T. (1998). Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. In *Second Annual Meeting of Agricultural Scientists*, 83-94
- [23] Malayoğlu, H. B., Aktaş, B., & Çelikleş, Ö. Y. (2011). Total phenolic contents and antioxidant activities of the essential oils from some plant species. *Journal of Ege University Faculty of Agriculture (Turkey)*, 48, 211-215.
- [24] Babili, F. E., Bouajila, J., Souchard, J. P., Bertrand, C., Bellvert, F., Fouraste, I., ... & Valentin, A. (2011). Oregano: chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities. *Journal of food science*, 76(3), C512-C518.
- [25] El Ouariachi, E.M., Paolini, J., Bouyanzer, A., Tomi, P., Hammouti, B., Salghi, R., Majidi, L., & Costa, J. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns and link from Morocco. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(24), 5773-5778.
- [26] Saadaoui, B., Bekir, J., Akrouf, J., Ammar, S., Mahjoub, A., & Mars, M. (2007). Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride tunisien. *Revue des régions arides*, 87-92.

- [27] Wannas, W. A., & Marzouk, B. (2016). Characterization of myrtle seed (*Myrtus communis* var. *baetica*) as a source of lipids, phenolics, and antioxidant activities. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(2), 316-323.
- [28] Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., & Vojnov, A. A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40(2), 223-231.
- [29] Hendel, N., Larous, L., & Belbey, L. (2016). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its in vitro inhibitory effect on *Penicillium digitatum*. *International Food Research Journal*, 23(4), 1725-1732.
- [30] Ziane, N. (2014). Contribution à l'étude de l'activité hypoglycémisante des extraits de *Pistacia Atlantica* dans la réserve nationale (Doctoral dissertation, Université Ferhat Abbas de Sétif 1).
- [31] Avlessi, F., Dangou, J., Wotto, V. D., Alitonou, G. A., Sohounhloue, D. K., & Menut, C. (2004). Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Wild) Hook. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 1057-1061.
- [32] Lado, C., Then, M., Varga, I., Szöke, É., & Szentmihályid, K. (2004). Antioxidant property of volatile oils determined by the ferric reducing ability. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(5-6), 354-358.
- [33] Lee, K. G., & Shibamoto, T. (2001). Antioxidant activities of volatile components isolated from *Eucalyptus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(15), 1573-1579.
- [34] Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., & Akpulat, H. A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of ethnopharmacology*, 87(2-3), 215-220.
- [35] Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 12(6), 364-371.
- [36] Kang, D. G., Keun Yun, C., & Lee, H. S. (2003). Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of ethnopharmacology*, 87(2-3), 231-236.

- [37] Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., & Komaitis, M. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food chemistry*, 107(3), 1120-1130.
- [38] Ghazouani, N., Abderrabba, M., & Bouajila, J. (2016). *Teucrium ramosissimum* (Lamiaceae): volatile composition, seasonal variation, and pharmaceutical activity. *Analytical Letters*, 49(8), 1258-1271.
- [39] Riahi, L., Chograni, H., Elferchichi, M., Zaouali, Y., Zoghلامي, N., & Mliki, A. (2013). Variations in Tunisian wormwood essential oil profiles and phenolic contents between leaves and flowers and their effects on antioxidant activities. *Industrial crops and products*, 46, 290-296.
- [40] Bekir, J., Mars, M., Souchard, J. P., & Bouajila, J. (2013). Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. *Food and chemical toxicology*, 55, 470-475.
- [41] Ben Hassine, D., Abderrabba, M., Yvon, Y., Lebrihi, A., Mathieu, F., Couderc, F., & Bouajila, J. (2012). Chemical composition and in vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of *Eucalyptus gillii* essential oil and extracts. *Molecules*, 17(8), 9540-9558.
- [42] Reitzer, F., Allais, M., Ball, V., & Meyer, F. (2018). Polyphenols at interfaces. *Advances in colloid and interface science*.
- [43] Ouelhadj, A., Kahina, B., & Djenane, D. Chemical composition and Antifungal activity of the *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus* essential oils of Mediterranean regions in laboratory medium and Strawberry fruit.
- [44] Persico, P., Ambrogi, V., Carfagna, C., Cerruti, P., Ferrocino, I., & Mauriello, G. (2009). Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging. *Polymer Engineering & Science*, 49(7), 1447-1455.
- [45] El Ajjouri, M., Satrani, B., Ghanmi, M., Aafi, A., Farah, A., Rahouti, M., ... & Aberchane, M. (2008). Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 12(4), 345-351.
- [46], R., Singh, P., Prakash, B., & Dubey, N. K. (2012). Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major

component 1, 8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Control*, 25(1), 27-33.

[47] Bencheqroun, H. K., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., & Chaouch, A. (2012). Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia atlantica*, plante endémique du Maroc. *Bulletin de la société Royale des sciences de Liège*, 81, 4-21.

[48] Satrani, B., Farah, A., & Talbi, M. (2006). Effet de la distillation fractionnée sur la composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du Myrte (*Myrtus communis* L.) du Maroc. *Acta Botanica Gallica*, 153(2), 235-242.

[49] Amri, I., Hamrouni, L., Hanana, M., Gargouri, S., & Jamoussi, B. (2014). Propriétés antifongiques des huiles essentielles de *Biota orientalis* L. *Phytotherapie*, 12(3), 170-174.

[50] Chang, H. T., Cheng, Y. H., Wu, C. L., Chang, S. T., Chang, T. T., & Su, Y. C. (2008). Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresource technology*, 99(14), 6266-6270.

[51] Ramezani, H., Singh, H. P., Batish, D. R., & Kohli, R. K. (2002). Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. *Fitoterapia*, 73(3), 261-262.

[52] Mares, D., Tosi, B., Poli, F., Andreotti, E., & Romagnoli, C. (2004). Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiological Research*, 159(3), 295-304.

[53] Ultee, A., Kets, E. P. W., & Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4606-4610.

[54] Knowles, J. R., Roller, S., Murray, D. B., & Naidu, A. S. (2005). Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 797-803.

[55] Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., & Portugal, H. (2006). Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by essential oil from *Cinnamomum cassia*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(1), 58-61.

- [56] Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological research*, 163(3), 337-344.
- [57] Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, D., & Trombetta, D. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6300-6308.
- [58] Lucini, E. I., Zunino, M. P., López, M. L., & Zygadlo, J. A. (2006). Effect of Monoterpenes on Lipid Composition and Sclerotial Development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Journal of Phytopathology*, 154(7-8), 441-446.
- [59] Tatsadjieu, N. L., Dongmo, P. J., Ngassoum, M. B., Etoa, F. X., & Mbofung, C. M. F. (2009). Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. *Food control*, 20(2), 161-166.
- [60] Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *Journal of biotechnology*, 53(2-3), 253-263.
- [61] Subramanion, J., Zakaria, Z., & Sreenivasan, S. (2010). Antimicrobial activity and toxicity of methanol extract of *Cassia fistula* seeds. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 1(4), 391-398.
- [62] Helal, G. A., Sarhan, M. M., Abu Shahla, A. N. K., & Abou El-Khair, E. K. (2006). Effect of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on growth and morphogenesis of *Saccharomyces cerevisiae* ML2-strain. *Journal of basic microbiology*, 46(5), 375-386.
- [63] Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., & Garrigós, M. C. (2014). Development of novel nano-biocomposite antioxidant films based on poly (lactic acid) and thymol for active packaging. *Food chemistry*, 162, 149-155.
- [64] Salarbashi, D., Tajik, S., Shojae-Aliabadi, S., Ghasemlou, M., Moayyed, H., Khaksar, R., & Noghabi, M. S. (2014). Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporated *Zataria multiflora* Boiss and *Mentha pulegium* essential oils. *Food chemistry*, 146, 614-622.
- [65] Wang, S., Marcone, M. F., Barbut, S., & Lim, L. T. (2012). Fortification of dietary biopolymers-based packaging material with bioactive plant extracts. *Food Research International*, 49(1), 80-91.

- [66] Siripatrawan, U., & Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 770-775.
- [67] Sivarooban, T., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41(8), 781-785
- [68] Hoque, M. S., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2011). Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1085-1097
- [69] Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Ojagh, S. M., ... & Khaksar, R. (2013). Characterization of antioxidant-antimicrobial  $\kappa$ -carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *International journal of biological macromolecules*, 52, 116-124.
- [70] Kim, J. R., & Sharma, S. (2011). Acaricidal activities of clove bud oil and red thyme oil using microencapsulation against HDMs. *Journal of microencapsulation*, 28(1), 82-91.
- [71] Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., & Garrigós, M. C. (2012). Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal of Food Engineering*, 109(3), 513-519.
- [72] Muller, J., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2017). Poly (lactic) acid (PLA) and starch bilayer films, containing cinnamaldehyde, obtained by compression moulding. *European Polymer Journal*, 95, 56-70.
- [73] Martino, V., Ruseckaite, R., & Jiménez, A. (2006). Thermal and mechanical characterization of plasticized poly (L-lactide-co-D, L-lactide) films for food packaging. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 86(3), 707-712.
- [74] Arrieta, M. P., López, J., Ferrándiz, S., & Peltzer, M. A. (2013). Characterization of PLA-limonene blends for food packaging applications. *Polymer Testing*, 32(4), 760-768.
- [75] Muriel-Galet, V., Cran, M. J., Bigger, S. W., Hernández-Muñoz, P., & Gavara, R. (2015). Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of oregano essential oil and green tea extract components. *Journal of Food Engineering*, 149, 9-16.

- [76] Santos, N. A., Cordeiro, A. M., Damasceno, S. S., Aguiar, R. T., Rosenhaim, R., Carvalho Filho, J. R., ... & Souza, A. G. (2012). Commercial antioxidants and thermal stability evaluations. *Fuel*, 97, 638-643.
- [77] Cordeiro, A. M. T. M., Medeiros, M. L., Santos, N. A., Soledade, L. E. B., Pontes, L. F. B. L., Souza, A. L., ... & Souza, A. G. (2013). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *Journal of Thermal Analysis and calorimetry*, 113(2), 889-895.
- [78] Yahyaoui, M., Gordobil, O., Díaz, R. H., Abderrabba, M., & Labidi, J. (2016). Development of novel antimicrobial films based on poly (lactic acid) and essential oils. *Reactive and Functional Polymers*, 109, 1-8.
- [79] Drumright, R. E., Gruber, P. R., & Henton, D. E. (2000). Polylactic acid technology. *Advanced materials*, 12(23), 1841-1846.
- [80] Fortunati, E., Peltzer, M., Armentano, I., Jiménez, A., & Kenny, J. M. (2013). Combined effects of cellulose nanocrystals and silver nanoparticles on the barrier and migration properties of PLA nano-biocomposites. *Journal of Food Engineering*, 118(1), 117-124.
- [81] Campos, C. A., Gerschenson, L. N., & Flores, S. K. (2011). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and bioprocess technology*, 4(6), 849-875.
- [82] Fortunati, E., Luzi, F., Puglia, D., Dominici, F., Santulli, C., Kenny, J. M., & Torre, L. (2014). Investigation of thermo-mechanical, chemical and degradative properties of PLA-limonene films reinforced with cellulose nanocrystals extracted from *Phormium tenax* leaves. *European Polymer Journal*, 56, 77-91.
- [83] Llana-Ruiz-Cabello, M., Pichardo, S., Baños, A., Núñez, C., Bermúdez, J. M., Guillamón, E., ... & Cameán, A. M. (2015). Characterisation and evaluation of PLA films containing an extract of *Allium* spp. to be used in the packaging of ready-to-eat salads under controlled atmospheres. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1354-1361.
- [84] Colom, X., Carrasco, F., Pages, P., & Canavate, J. (2003). Effects of different treatments on the interface of HDPE/lignocellulosic fiber composites. *Composites Science and technology*, 63(2), 161-169.
- [85] Pelissari, F. M., Grossmann, M. V., Yamashita, F., & Pineda, E. A. G. (2009). Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch– chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(16), 7499-7504.

- [86] Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2013). Physical properties and antioxidant capacity of starch–sodium caseinate films containing lipids. *Journal of Food Engineering*, 116(3), 695-702.
- [87] Avila-Sosa, R., Palou, E., Munguía, M. T. J., Nevárez-Moorillón, G. V., Cruz, A. R. N., & López-Malo, A. (2012). Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International journal of food microbiology*, 153(1-2), 66-72.
- [88] Ghasemlou, M., Aliheidari, N., Fahmi, R., Shojaee-Aliabadi, S., Keshavarz, B., Cran, M. J., & Khaksar, R. (2013). Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. *Carbohydrate polymers*, 98(1), 1117-112.
- [89] Pranoto, Y., Rakshit, S. K., & Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT-Food Science and Technology*, 38(8), 859-865.
- [90] Jamshidian, M., Tehrany, E. A., Cleymand, F., Leconte, S., Falher, T., & Desobry, S. (2012). Effects of synthetic phenolic antioxidants on physical, structural, mechanical and barrier properties of poly lactic acid film. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1763-1773.
- [91] Morillon, V., Debeaufort, F., Capelle, M., Blond, G., & Voilley, A. (2000). Influence of the physical state of water on the barrier properties of hydrophilic and hydrophobic films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(1), 11-16.
- [92] Bravin, B., Peressini, D., & Sensidoni, A. (2004). Influence of emulsifier type and content on functional properties of polysaccharide lipid-based edible films. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(21), 6448-6455.
- [93] Acosta, S., Chiralt, A., Santamarina, P., Rosello, J., González-Martínez, C., & Cháfer, M. (2016). Antifungal films based on starch-gelatin blend, containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, 61, 233-240.
- [94] Rhim, J. W., Hong, S. I., & Ha, C. S. (2009). Tensile, water vapor barrier and antimicrobial properties of PLA/nanoclay composite films. *LWT-Food Science and Technology*, 42(2), 612-617.
- [95] Tsuji, H., Okino, R., Daimon, H., & Fujie, K. (2006). Water vapor permeability of poly (lactide) s: Effects of molecular characteristics and crystallinity. *Journal of applied polymer science*, 99(5), 2245-2252.

- [96] Wong, D. W., Gastineau, F. A., Gregorski, K. S., Tillin, S. J., & Pavlath, A. E. (1992). Chitosan-lipid films: microstructure and surface energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(4), 540-544
- [97] Samsudin, H., Soto-Valdez, H., & Auras, R. (2014). Poly (lactic acid) film incorporated with marigold flower extract (*Tagetes erecta*) intended for fatty-food application. *Food Control*, 46, 55-66.
- [98] McHUGH, T. H., & Krochta, J. M. (1994). Dispersed phase particle size effects on water vapor permeability of whey protein-beeswax edible emulsion films. *Journal of Food Processing and Preservation*, 18(3), 173-188.
- [99] Debeaufort, F., & Voilley, A. (1995). Effect of surfactants and drying rate on barrier properties of emulsified edible films. *International journal of food science & technology*, 30(2), 183-190.
- [100] Phan The, D., Peroval, C., Debeaufort, F., Despre, D., Courthaudon, J. L., & Voilley, A. (2002). Arabinoxylan-lipids-based edible films and coatings. 2. Influence of sucroester nature on the emulsion structure and film properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(2), 266-272.
- [101] Sapru, V., & Labuza, T. P. (1994). Dispersed phase concentration effect on water vapor permeability in composite methyl cellulose-stearic acid edible films. *Journal of Food Processing and Preservation*, 18(5), 359-368.
- [102] Landmann, W., Lovegren, N. V., & Feuge, R. O. (1960). Permeability of some fat products to moisture. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 37(1), 1-4
- [103] Kester, J. J., & Fennema, O. R. (1986). Edible films and coatings: a review. *Food technology (USA)*.
- [104] Gontard, N., Duchez, C., CUQ, J. L., & Guilbert, S. (1994). Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. *International journal of food science & technology*, 29(1), 39-50.
- [105] Callegarin, F., Quezada Gallo, J. A., Debeaufort, F., & Voilley, A. (1997). Lipids and biopackaging. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(10), 1183-1192.
- [106] Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., & Voilley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 42(1), 67-89.

- [107] Atef, M., Rezaei, M., & Behrooz, R. (2015). Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar-cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil. *Food Hydrocolloids*, 45, 150-157.
- [108] Derwich, E., Manar, A., Benziane, Z., & Boukir, A. (2010). GC/MS analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil isolated from leaf of *Pistacia lentiscus* growing in Morocco. *World Applied Sciences Journal*, 8(10), 1267-1276.
- [109] Marin, S., Guynot, M. E., Sanchis, V., Arbonés, J., & Ramos, A. J. (2002). *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, and *Penicillium corylophilum* spoilage prevention of bakery products by means of weak-acid preservatives. *Journal of food science*, 67(6), 2271-2277
- [110] Inouye, S., Tsuruoka, T., Watanabe, M., Takeo, K., Akao, M., Nishiyama, Y., & Yamaguchi, H. (2000). Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses*, 43(1-2), 17-23.
- [111] An, D. S., Hwang, Y. I., Cho, S. H., & Lee, D. S. (1998). Packaging of fresh curled lettuce and cucumber by using low density polyethylene films impregnated with antimicrobial agents. *Journal-Korean Society of Food Science and Nutrition*, 27, 675-681
- [112] Suppakul, P. (2011). Natural extracts in plastic food packaging. In *Multifunctional and nanoreinforced polymers for food packaging* (pp. 421-459).
- [113] Boonruang, K., Kerddonfag, N., Chinsirikul, W., Mitcham, E. J., & Chonhenchob, V. (2017). Antifungal effect of poly (lactic acid) films containing thymol and R(-)-carvone against anthracnose pathogens isolated from avocado and citrus. *Food Control*, 78, 85-93.
- [114] Patrignani, F., Siroli, L., Serrazanetti, D. I., Gardini, F., & Lanciotti, R. (2015). Innovative strategies based on the use of essential oils and their components to improve safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 46(2), 311-319.
- [115] Thivend, P., Mercier, C., & Guilbot, A. (1965). Dosage de l'amidon dans les milieux complexes. In *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* (Vol. 5, No. 4, pp. 513-526). EDP Sciences.
- [116] Avila-Sosa, R., Palou, E., Munguía, M. T. J., Nevárez-Moorillón, G. V., Cruz, A. R. N., & López-Malo, A. (2012). Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International journal of food microbiology*, 153(1-2), 66-72

- [117] Sanchez-Garcia, M. D., Ocio, M. J., Gimenez, E., & Lagaron, J. M. (2008). Novel polycaprolactone nanocomposites containing thymol of interest in antimicrobial film and coating applications. *Journal of Plastic Film & Sheeting*, 24(3-4), 239-251.
- [118] Del Nobile, M. A., Conte, A., Buonocore, G. G., Incoronato, A. L., Massaro, A., & Panza, O. (2009). Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. *Journal of Food Engineering*, 93(1), 1-6.
- [119] Ganiari, S., Choulitoudi, E., & Oreopoulou, V. (2017). Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. *Trends in food science & technology*, 68, 70-82.
- [120] Villa-Rodriguez, J. A., Palafox-Carlos, H., Yahia, E. M., Ayala-Zavala, J. F., & Gonzalez-Aguilar, G. A. (2015). Maintaining antioxidant potential of fresh fruits and vegetables after harvest. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(6), 806-822.
- [121] Ayala-Zavala, J. F., del Toro-Sánchez, L., Alvarez-Parrilla, E., Soto-Valdez, H., Martín-Belloso, O., Ruiz-Cruz, S., & González-Aguilar, G. A. (2008). Natural antimicrobial agents incorporated in active packaging to preserve the quality of fresh fruits and vegetables. *Stewart Postharvest Rev*, 4(3), 1-9.
- [122] Jouki, M., Mortazavi, S. A., Yazdi, F. T., & Koocheki, A. (2014). Characterization of antioxidant–antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil. *Carbohydrate polymers*, 99, 537-546
- [123] Gómez-Estaca, J., Bravo, L., Gómez-Guillén, M. C., Alemán, A., & Montero, P. (2009). Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. *Food Chemistry*, 112(1), 18-25.
- [124] Carrizo, D., Gullo, G., Bosetti, O., & Nerín, C. (2014). Development of an active food packaging system with antioxidant properties based on green tea extract. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(3), 364-373.
- [125] Jamshidian, M., Tehrany, E. A., & Desobry, S. (2012). Release of synthetic phenolic antioxidants from extruded poly lactic acid (PLA) film. *Food Control*, 28(2), 445-455.
- [126] Zhuk, I., Jariwala, F., Attygalle, A. B., Wu, Y., Libera, M. R., & Sukhishvili, S. A. (2014). Self-defensive layer-by-layer films with bacteria-triggered antibiotic release. *ACS nano*, 8(8), 7733-7745.

- [127] Ren, P. F., Yang, H. C., Liang, H. Q., Xu, X. L., Wan, L. S., & Xu, Z. K. (2015). Highly stable, protein-resistant surfaces via the layer-by-layer assembly of poly (sulfobetaine methacrylate) and tannic acid. *Langmuir*, 31(21), 5851-5858.
- [128] Zhou, L., Chen, M., Tian, L., Guan, Y., & Zhang, Y. (2013). Release of polyphenolic drugs from dynamically bonded layer-by-layer films. *ACS applied materials & interfaces*, 5(9), 3541-3548.
- [129] Mascheroni, E., Guillard, V., Nalin, F., Mora, L., & Piergiovanni, L. (2010). Diffusivity of propolis compounds in Polylactic acid polymer for the development of anti-microbial packaging films. *Journal of Food Engineering*, 98(3), 294-301
- [130] Peltonen, L., Koistinen, P., Karjalainen, M., Häkkinen, A., & Hirvonen, J. (2002). The effect of cosolvents on the formulation of nanoparticles from low-molecular-weight poly (I) lactide. *Aaps Pharmscitech*, 3(4), 52.
- [131] Lassalle, V., & Ferreira, M. L. (2007). PLA nano-and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation. *Macromolecular bioscience*, 7(6), 767-783.
- [132] Wang, L. F., & Rhim, J. W. (2016). Grapefruit seed extract incorporated antimicrobial LDPE and PLA films: effect of type of polymer matrix. *LWT-Food Science and Technology*, 74, 338-345
- [133] Fortunati, E., Peltzer, M., Armentano, I., Jiménez, A., & Kenny, J. M. (2013). Combined effects of cellulose nanocrystals and silver nanoparticles on the barrier and migration properties of PLA nano-biocomposites. *Journal of Food Engineering*, 118(1), 117-12466
- [134] Friedman, M. (2014). Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(31), 7652-7670.

## **Conclusion et perspectives**

Le PLA et l'amidon offrent de grandes possibilités dans une large gamme d'applications de produits d'emballage alimentaire et rivalise avec le polystyrène et le polyéthylène. Ainsi, l'objectif principal de cette étude était de développer un emballage biodégradable actif pour la libération des agents antimicrobiens afin de contrôler en permanence le processus de détérioration dans les aliments. Le PLA et l'amidon en tant que des polymères biodégradables industriellement produit et les agents bioactifs naturels autorisés tels que les huiles essentielles et les extraits organiques des plantes de romarin, de myrte, de thym et du pistachier lentisque ont été choisis en raison de leurs activités antimicrobiennes et antibactériennes connues permettant leurs applications dans les industries alimentaires et pharmaceutiques.

L'objectif de cette thèse est en premier lieu de valoriser les agents actifs en vue de les incorporer de point de vue chimique et biologique. En second lieu d'approfondir les connaissances sur le mode d'incorporation des agents actifs dans les matrices de PLA et d'amidon, de caractériser ces systèmes d'un point de vu multiéchelles et enfin, d'identifier les phénomènes de quantification des agents actifs dans le film et leurs migration dans un simulant alimentaire afin de pouvoir prévoir les cinétiques de libération contrôlée.

Nous avons montré que le profil chimique des HEs varie qualitativement et quantitativement. Cette variation dépend de la nature de l'huile essentielle et de la méthode d'extraction. Nous avons démontré que les huiles essentielles sont riches en composés bioactifs, dont 91%, 59,1%, 88,4%, 43,4%, 11,8%, 89,1% et 32,26% fournit la compositions en composés actifs de la composition totale des huiles essentielles de RN, de RC1, de RC2, de MN, de MC, de TC et de Pist, respectivement.

Les fractions de RN, RC1, RC2, MN, TC ont montré une prédominance en monoterpènes oxygénés dont L'Eucalyptol, le Camphre, le Bornéol, l' $\alpha$ -terpinéol, le Linalool, L'Eugénol et le Carvacrol sont composés majoritaires. Alors que MC et Pist sont riche en Hydrocarbures monoterpéniques, dont l' $\alpha$ -pinène (10,4%) et la  $\beta$ -phéllandrène (9,6%) sont les composés majoritaires.

Les résultats enregistrés pour la teneur en polyphénols totaux des HEs montrent que TC est l'HE le plus riche en polyphénols suivie par Pist puis RC2 et RN. Cependant, MC et RC1 sont les HEs les plus pauvres en ces métabolites. En revanche, la teneur en flavonoïdes de ces HEs été très négligeable sauf pour l'HE de pistacia qui a montré une quantité modéré de flavonoïdes.

L'examen de l'activité antioxydante des HEs moyennant les deux méthodes spectroscopiques : le test au radical DPPH• (le 1,1'-diphényl-2-picrylhydrazyl) et le test au radical cationique ABTS•+ (le 2,2'-azinobis-(acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) a révélé que les HEs de RN, TC et Pist ont un pouvoir antioxydant le plus important.

Le screening de l'activité antifongique des HEs contre l'*A.niger*, les résultats exprimés en pourcentage d'inhibition, montre que les HEs de RN, RC1, TC et Pist ont une activité inhibitrice importante contre le champignon alimentaire. Cette activité augmente avec la quantité d'HE de 1% allant jusqu'à 10%. Notons que 5% de ces HE est suffisants pour stopper la croissance d'*A.niger*. D'autre part, les HEs de MC et RC2 présente une faible inhibition contre *A. niger*. Nous avons montré que cette différence d'inhibition entre les HEs est liée principalement au profil chimique de celles-ci.

De même nous avons procédé à un examen phytochimique des extraits de romarin, myrte, thym et du pistachier lentisque préparé à partir de la partie aérienne par macération à froid successive avec des solvants à polarité croissante (acétate d'éthyle et éthanol) par une analyse de la composition par LC-UV / ESI-MS. Ainsi les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes ont été analysées. Les activités antioxydante et antifongique de ces extraits ont été également évaluées.

L'analyse LC-UV / ESI-MS a été efficace pour identifier à peu près les composés les plus abondants présents dans les extraits de R\_EtOH, M\_EtOH, M\_EtA, T\_EtOH, T\_EtA. Les principaux composés actifs identifiés dans l'extrait de R\_EtOH sont l'acide carnosique, rosmadial, carnosol, genkwanin, acacétin, cirsimaritin, Isorhamnetin-3-O-glucoside, Lutéoline-7-glucuronide, et l'acide rosmarinique. La myricétin-3-O-galactoside et la myricétin-3-O-rhamnoside ont été identifiés dans la composition de M\_EtA et T\_EtA. De plus, l'apigénine-7-O-glucuronide a été identifié dans la composition de T\_EtA. Le M\_EtOH a montré une composition en flavocommelin et en Tricin. De plus, l'analyse réalisée dans l'extrait de T\_EtOH a montré la présence d'autres composés phénoliques parmi lesquels les flavonoïdes méthylés, les flavanes, l'acide phénolique.

Le screening phytochimique a révélé des taux notables et variables en composés phénoliques et en flavonoïdes selon la nature du solvant d'extraction. Pour le thym et la myrte, leurs extraits éthanoliques sont les extraits les plus riches en polyphénols, d'où T\_EtOH est l'extrait est le plus riche en polyphénols ( $275,0 \pm 5,6$  mg.EAG/g.MS) suivi par M\_EtOH  $263,9 \pm 7,2$  mg.EAG/g.MS, puis T\_EtA, M\_EtA et P\_EtA avec des teneurs de l'ordre de  $208.4 \pm 6.2$ ,  $197.3$

$\pm 13.8$  et  $175.1 \pm 10.3$  mg.EAG/g.MS, respectivement. R\_EtOH présente l'extrait le moins riche en composés polyphénols ( $108.5 \pm 3.2$  mg.EAG/g.MS). Les extraits étudiés ont montré une teneur en flavonoïdes bien importante qui s'est rencontré principalement aux extraits de M\_EtA ( $759.9 \pm 58.56$  mg.EQ/g.MS) et de T\_EtOH ( $706.9 \pm 3.86$  mg.EQ/g.MS).

L'activité antioxydante des extraits par DPPH et ABTS ont révélé des pourcentages d'inhibition radicalaire importants. Il apparait que les extraits éthanolique de myrte et de thym sont plus actifs que les extraits d'acétate d'éthyle.

Pour ce qui est de l'activité antifongique contre l'*A.niger*, les extraits éthanolique ont montré une activité antifongique bien prometteuse grâce à leurs richesse en polyphénols qui ont interagit avec les cellules par plusieurs mécanismes. A une concentration de 2% des extraits des plantes ont montré une inhibition fongique optimale (au-delà de 70%).

Dans la deuxième partie de ce travail, les films de PLA contenant des HEs et les extraits des plantes de romarin, de myrte, de thym et du pistachier lentisque ainsi que les films d'amidon contenant des HEs ont été fabriqués afin d'étudier leurs caractéristiques optiques, physico-chimiques et mécaniques. Il a été démontré que l'ajout des HEs de MC et de Pist ont changé significativement la couleur des films de PLA. Ces changements de couleurs sont probablement dus à l'HE lui-même mais l'apparence des films est acceptable au vue des consommateurs puisque la transparence reste dans les normes exigées. Contrairement aux films de PLA contenant les extraits des plantes, les films actifs montrent un changement de couleur significatif par rapport au control. Cette différence est remarquable chez les films de PLA contenant l'extrait de M\_EtA. Les différentes couleurs observées ont été généralement attribués aux pigments phénoliques des extraits. Les films d'amidon contenant différentes concentrations d'HEs obtenus sont transparents et leurs transparence convenait à l'emballage alimentaire.

L'incorporation de l'HE de TC n'a pas impacté significativement le profil de dégradation de PLA néanmoins elle a diminué la dégradation initiale de PLA. cet effet reste probable pour les autres films contenant les HEs.

Une augmentation de la cristallinité est observée pour les films de PLA contenant 5% des HEs de RN, RC1, RC2 et MN. Cela suggère qu'une tendance à se cristalliser à froid pour ces films ce qui est probable pour les films à faible concentrations tout en montrant une cristallinité plus élevée. Cependant les films contenant 5% de MC augmentent la température de cristallisation ( $T_c$ ), ce qui peut augmenter la rigidité du film.

L'incorporation de 0.5% de T\_EtOH a impacté le profil de dégradation thermique de PLA, d'où la température de dégradation initiale de PLA a diminué d'une valeur de 345,39°C à une valeur de 331,82°C pour les films à 0,5% T\_EtOH. De même pour la température de dégradation maximale qui a diminué d'une valeur de 386,16°C à 380,91°C pour les films à 0,5% T\_EtOH.

L'allongement à la rupture (E%) a significativement affecté par l'ajout des HES commerciales notamment RC1, RC2, MC et TC à la matrice de PLA. En effet, elle a augmenté significativement à 0,5% de RC1 et TC à une valeur de 40 et 45%, respectivement. De même à 2 % de MC et à 5% de RC2 l'allongement à la rupture de PLA montre une amélioration remarquable d'où il s'est augmenté à 45,1% et 20,4% dans ces films respectivement. Aucune différence significative n'a été observée dans le module de Young et la contrainte à la rupture entre le film de contrôle et les films aux HES. Sauf les films contenant TC, où ils ont montré une légère diminution de la rigidité, à une concentration de 0,5%. Cependant, l'incorporation des extraits a affecté légèrement les propriétés mécaniques de PLA. En effet, une légère augmentation de l'allongement à la rupture à 3%, 2,9% et 2,7% des films contenant 2%M\_EtA, 0,5% T\_EtA et 1,5% P\_EtA, respectivement. Selon nos résultats, l'allongement à la rupture diminue avec l'augmentation de la concentration des extraits de T\_EtOH, T\_EtA, M\_EtOH et R\_EtOH dans les films de PLA. De même pour le module de Young qui n'a pas montré une différence significative pour ces films par rapport au control sauf pour les films contenant 5% P\_EtA qui ont montré une diminution de rigidité.

L'incorporation des différentes concentrations des HES de RN, RC1, RC2, MC et TC à 0,5, 1,5, 2, 5% dans la solution filmogène montre un comportement différent sur les propriétés mécaniques d'amidon. D'où l'allongement à la rupture (E%) et le module de Young ont été significativement affectés par l'incorporation des HES, en particulier pour les RN, RC1, RC2 et TC. L'allongement à la rupture de l'amidon a été amélioré en particulier à une concentration de 5% pour les films contenant RC1, MC et TC avec des valeurs de 78,5, 71,7 et 67% respectivement. L'ajout des HES à une concentration de 5% a entraîné une réduction significative du module de Young entraînant ainsi des films moins rigides que le film de contrôle. Contrairement aux films contenant 0,5 et 1,5% de TC qui ont montré une rigidité assez importante par rapport au film de contrôle. Le stress à la rupture des films varie proportionnellement avec les résultats du Module de Young et d'allongement à la rupture.

Les films de PLA incorporant les HES commerciales tels que RC1, MC et TC à des concentrations de 0,5, 2 et 0,5%, respectivement ont montré une meilleure perméabilité à la

vapeur d'eau. Cependant la perméabilité à la vapeur d'eau des films de PLA n'a pas été modifiée par l'ajout des extraits des plantes. Néanmoins, une légère diminution a été observée chez les films contenant 0,5%M\_EtA, 0,5%T\_EtA et 5% R\_EtOH. D'autre part, les films d'amidon contenant 5% de TC ont montré une meilleure perméabilité à la vapeur d'eau.

L'activité antifongique des films de PLA et d'amidon contenant les agents actifs ont été étudiée. Les résultats ont montré que l'inhibition fongique contre l'*A.niger* dépend de la nature et de la concentration des agents actifs incorporés. Les films de PLA contenant RN, RC1, RC2, TC, et Pist révèlent une inhibition optimale contre l'*A.niger* à une concentration faible particulièrement à 1,5% sauf pour l'HE de Pist qui entraîne une inhibition importante à une concentration de 0,5%. L'inhibition fongique des HEs de RC1 et de RC2 augmente avec leurs concentrations dans le film, mais à 2% elle diminue pour avoir une inhibition modérée et elle augmente de nouveau au niveau optimal à la concentration de 5%. La même tendance obtenue pour les HEs de RN et de RC2. Contrairement aux HEs de TC et de Pist qui ont montré une faible efficacité d'inhibition à des concentrations élevés. Une croissance fongique importante a été détecté pour les films contenant MC et 1,5% MN.

Les films de PLA contenant M\_EtOH, T\_EtOH, T\_EtA et P\_EtA ont été efficaces pour inhiber la croissance fongique. En effet, les films actifs incorporant 0,5 et 1,5 d'extrait de M\_EtOH et 0,5-1,5-2% de T\_EtOH ont montré une activité antifongique importante où leur inhibition fongicide a atteint les 60% à 0,5% et 2% des films contenant M\_EtOH et T\_EtOH, respectivement. Les films incorporant 2% de T\_EtA et 2-5% de P\_EtA ont montré une inhibition fongicide de 55 %. Les films contenant R\_EtOH et de M\_EtA ont montré une inhibition faible.

L'évaluation de l'activité antifongique des films d'amidon n'a pas pu avoir lieu grâce à la faible résistance des films d'amidon au milieu de culture d'une part, et d'autre part à la sensibilité de la matrice d'amidon au champignon *A.niger* qui par sa réaction d'amylase permet sa détérioration.

Enfin, la stabilité des agents actifs dans les films de PLA et d'amidon après leurs fabrication, leurs activités antioxydantes et leurs migration des films de PLA et d'amidon à une température de 4°C via un simulant alimentaire a été traité. Le test de quantification a montré une perte des HEs et des extraits pendant la préparation du film et en particulier durant le processus de séchage. Il convient de noter que ces substances actives possèdent un degré de stabilité conduisant à des taux de perte différents. Les films d'amidon et de PLA contenant les HEs de

RN et de TC ont les plus grandes pertes arrivant jusqu'à 60% de perte en raison de composés hydrophobes aromatiques (odoriférants) volatils que constitue les HEs RN et TC. Les pertes des extraits organiques des films de PLA sont de l'ordre de  $28,57 \pm 8,57\%$  pour R\_EtOH et de  $41,70 \pm 6,52\%$  pour T\_EtOH. Certains des composés actifs volatils contenus dans ces extraits peuvent également être perdus pendant le processus de séchage.

Puisque les HEs n'ont pas montré une activité antioxydante importante, nous n'avons pas procédé à l'évaluation de l'activité antioxydante des films de PLA et d'amidon contenant les HEs.

L'examen de l'activité antioxydante des films de PLA contenant 0.5% et 5% des extraits de plante moyennant les deux méthodes spectroscopiques DPPH et ABTS a révélé que les films ont montré pouvoir antioxydant important par le test d'ABTS. Ce pouvoir est contribué aux extraits contenus dans les films qui sont riches en polyphénols et en flavonoïdes.

La libération de RN, TC, R\_EtOH et T\_EtOH des films de PLA et RN et TC des films d'amidon obtenus par la méthode de casting vers le simulant alimentaire à 40°C et durant 5 jours a été étudiée.

D'après les résultats obtenus, on remarque que les extraits de R\_EtOH et T\_EtOH ont migré des films de PLA d'une façon plus rapide et excessive que l'HEs de RN et TC. Alors que la libération de RN du film d'amidon est importante par rapport à sa libération du film de PLA. En effet, Le taux de migration maximale de R\_EtOH et de T\_EtOH des films de PLA durant la période de test est atteint au cinquième jour avec un taux de migration de l'ordre de  $0,38 \pm 0,025$  et de  $0,45 \pm 0,012$ , respectivement. D'où la concentration finale de T\_EtOH et R\_EtOH est de l'ordre de  $0,11 \pm 0,0010$  g/kg de simulateur et  $0,20 \pm 0,021$  g/kg de simulateur, respectivement. Contrairement pour RN et TC qu'ils ont abouti à leurs maximal de migration des films de PLA au deuxième jour de test avec un taux de migration négligeable, et une concentration ne dépasse pas le 0.02 g/kg de simulateur. La libération de l'HE de RN à partir de film d'amidon est remarquable, il atteint son maximum de libération durant les deux premiers jours avec un taux de migration de l'ordre de  $0,6 \pm 0,024$ , alors que la libération de TC reste négligeable.

La différence de migration obtenue entre les HEs et les extraits organiques est liée à la quantification de ses substances actives dans les films de PLA et d'amidon après la fabrication des films en particulier après le processus de séchage. En général, les principaux facteurs affectant la libération des antioxydants dans le simulant éthylique incluent: les interactions du

polymère avec le simulant, l'affinité des agents actifs avec le simulant, polarité du simulant, solubilité des agents actifs.

Il a été démontré que l'humidité peut contribuer à la libération des agents bioactifs dans l'aliment via son absorption à la surface polymérique du film. Cela démontre que les films ayant une faible perméabilité à la vapeur d'eau ne seront pas rejetés car la diffusion des molécules d'eau à travers la matrice favorise la libération des agents actifs en excitant leurs activités antimicrobiennes. Ainsi, l'emballage de libération des agents actifs contrôlé pourrait montrer une stabilité alimentaire longue à la détérioration de l'aliment par une libération graduelle et continue des substances actives particulièrement dans la surface de nourriture. De même ces systèmes de libération des agents actifs seront permis non seulement de protéger les aliments mais aussi d'augmenter le potentiel nutritionnel des denrées alimentaires.

### **Perspectives**

L'oxydation des lipides insaturés est une cause majeure de détérioration de la qualité des aliments, donnant lieu à l'apparition de mauvais goût et à une perte de valeur nutritionnelle des produits alimentaires. Les préoccupations sociétales concernant la santé et les antioxydants utilisés dans les aliments et les médicaments sont en augmentation permanente. Afin de minimiser la quantité des antioxydants directement ajoutés dans les aliments, les emballages actifs contenant des antioxydants sont des solutions prometteuses. La pertinence de l'utilisation du PLA, polymère industriel biocompostable, pour créer un emballage antioxydants actifs a été étudiée dans ce projet. Pour envisager une réelle application industrielle certains aspects doivent encore être étudiés :

- L'incorporation d'autres additifs alimentaires autorisés dans le PLA pourrait être intéressante; leurs migrations probables vers des produits alimentaires ne menacera pas la sécurité des produits emballés.
- La libération rapide et totale des agents bioactifs dans l'éthanol 50% à 40°C montre la nécessité d'études complémentaires pour maîtriser leur libération progressive pour assurer un contrôle continu et durable de l'oxydation.
- Comme nous avons étudié la libération des agents actifs dans les aliments simulés, des études complémentaires à l'aide d'aliments réels au contact de films de PLA-agents bioactifs sont nécessaires pour réaliser ce projet en conditions réelles. Les aliments

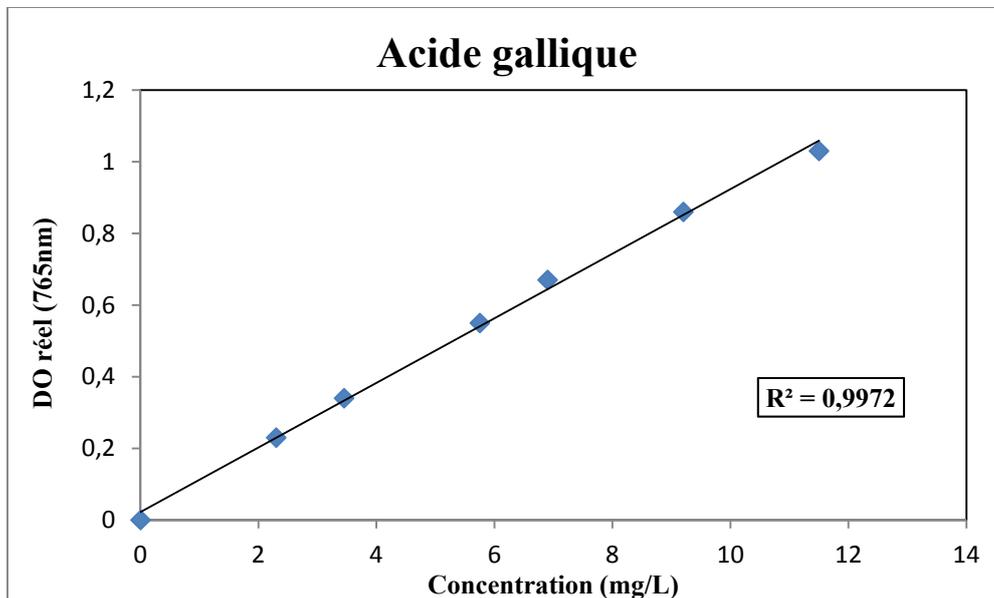
solides ou pâteux présenteront des comportements diffusionnels différents intéressants à étudier.

D'autres biomatériaux peuvent également être envisagés :

- Des mélanges de PLA avec d'autres biopolymères tels que l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), l'acétate de cellulose, le PGA, ou le chitosan peuvent être développés pour fournir un emballage actif avec une libération contrôlée des antioxydants ou en combinaison avec d'autres polylymères ayant des propriétés antimicrobiennes tel que la nisine.
- Une extension du modèle développé à d'autres antioxydants ou agents actifs ainsi qu'à d'autres polymères semblables au PLA peuvent améliorer les applications pour assurer une meilleure sécurité des produits alimentaires.

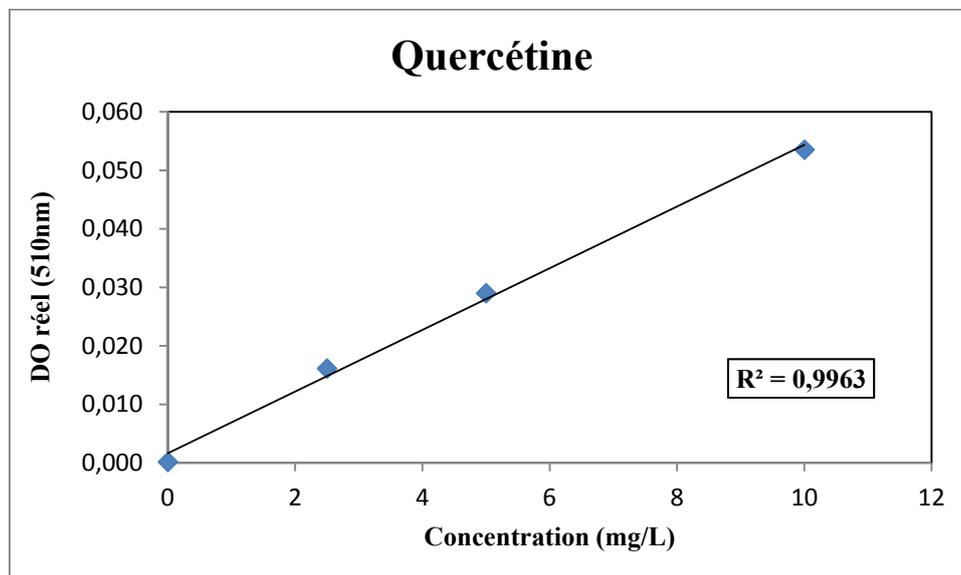
## **Les Annexes**

## Annexe 1



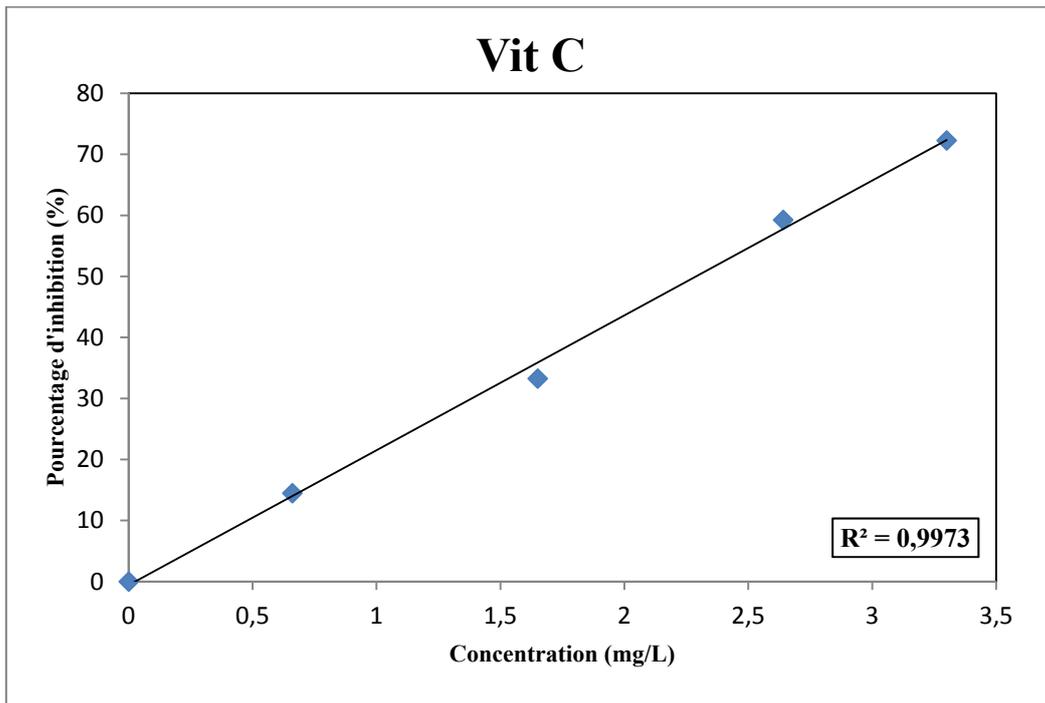
Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne  $\pm$  SD de trois essais)

## Annexe 2



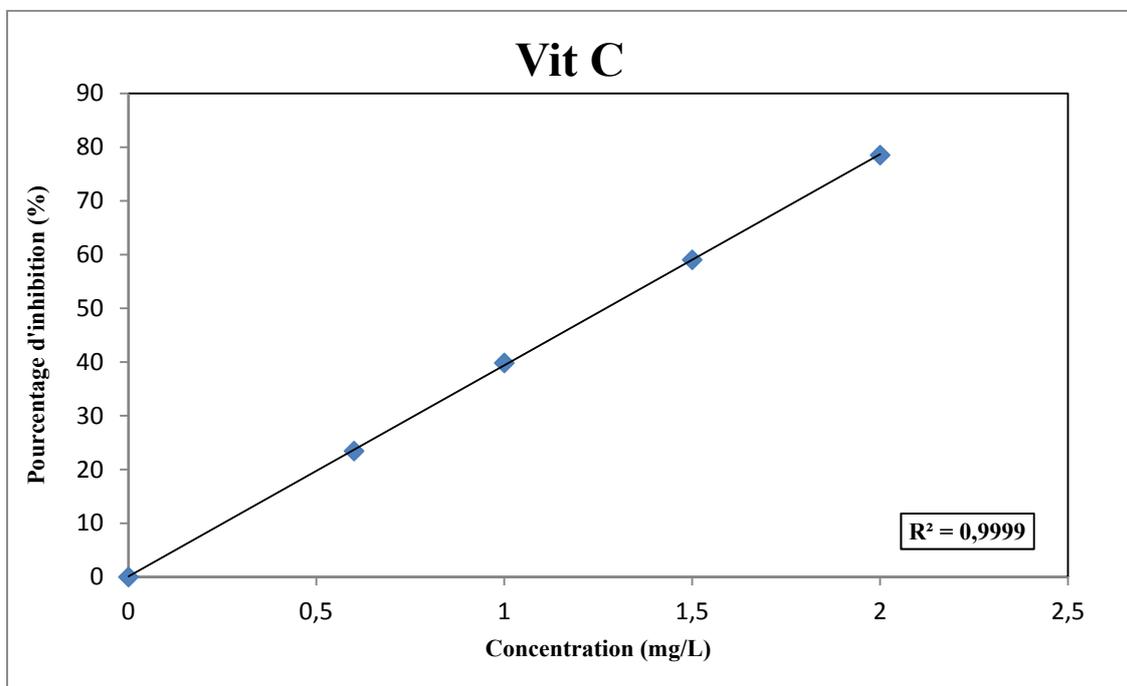
Courbe d'étalonnage de la Quercétine (moyenne  $\pm$  SD de trois essais)

### Annexe 3



Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique dans le DPPH

### Annexe 4



Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique dans l'ABTS

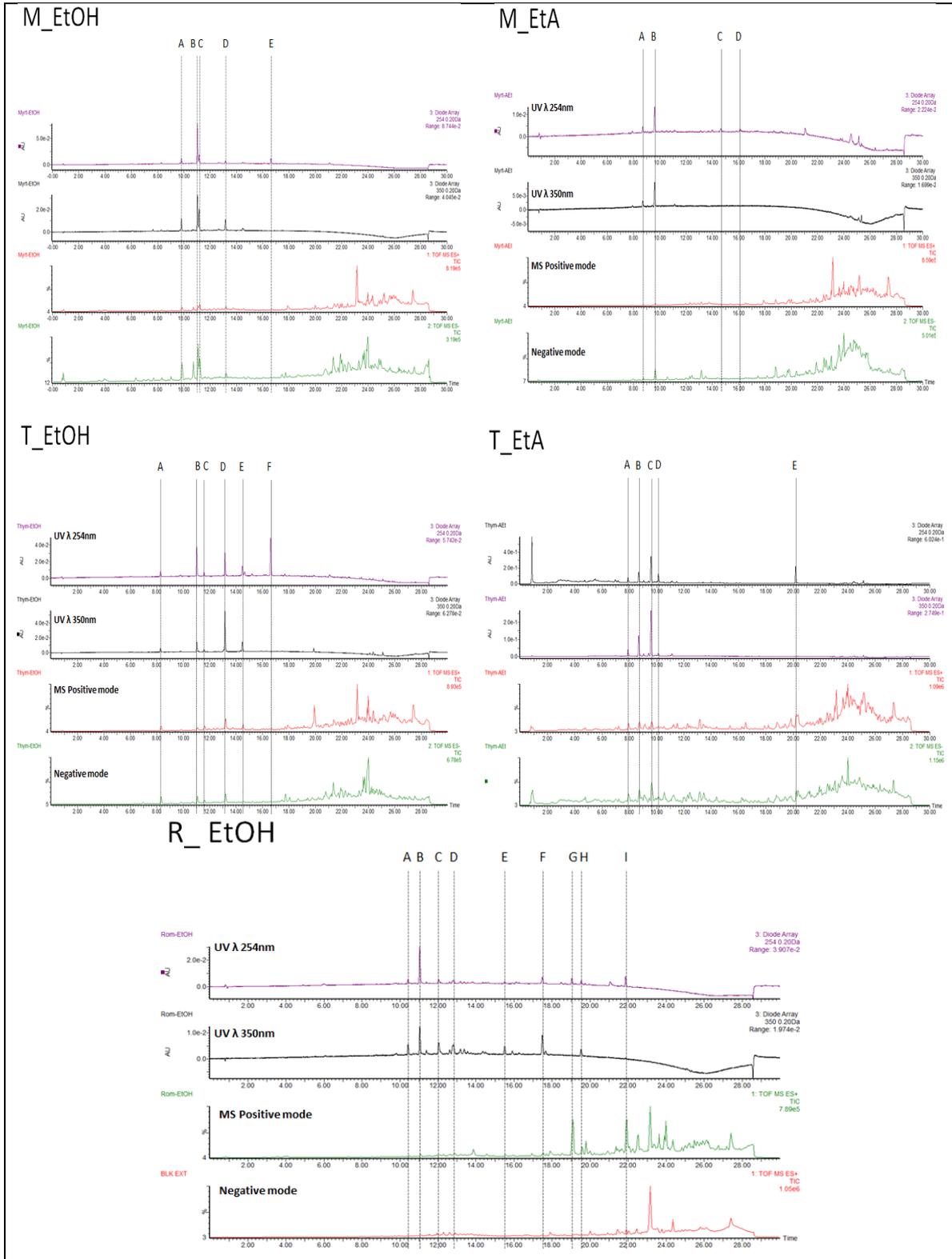
## Annexe 5

La composition préliminaires en composés bioactifs extraits éthanoliques de romarin, de myrte et de thym et des extraits d'acétate d'éthyle de myrte et de thym obtenus par LC-UV-ESI / MS

Nbr	Extraits	Pic	Composé probable	t <sub>R</sub>	λ <sub>max</sub> (nm)	MW	[M+H] <sup>+</sup> m/z	[M+Na] <sup>+</sup> m/z	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Fragments principales	Chemical classes	Chemical subclasses
1	R_EtOH	A	Isorhamnetin-3-O-glucoside	10.2	239	478.40	479	501	477	<b>317</b> (+), 421, 399	Flavonoids	Flavonoid glycosides
2		B	Acide rosmarinique	11.1	254	360.31	-	382	359	-	Acide phénolique	Acide hydroxycinnamique
3		B*	Non identifié			-	-	380	357	-	-	-
4		C	Luteolin-7-glucuronide	12	276	462.36	463	-	461	<b>285</b> (-)	Flavonoids	Flavonoid glycosides
5		D	6-Caffeoylsucrose	12.8	294	504.44	505	-	503	<b>399</b> (-), 285	Phenolic acid	Cinnamic acid
6		E	Cirsimaritin	15.6	355	314.29	315	-	313	<b>283</b> (-), 299	Flavonoids	O-methylated flavonoids
7		F	Genkwanin	17.8	401	284.26	285	-	283	<b>268</b> (-), 236, 221	Flavonoids	O-methylated flavonoids
8		G	Acacetin	19.1	436	284.26	285	-	-	<b>267</b>	Flavonoids	O-methylated flavonoids
9		G*	Carnosol	-	-	330.42	331	353	329	<b>285</b> (-)	Phenol simple	Diterpene phénolique
10		H	Rosmadiol	21.5	447	344.40	-	367	343	<b>299</b> (+), 327, 271	Diterpene phénolique	-
11		I	Acide carnosique	21.9	501	332.40	-	355	331	<b>287</b> (-)	Phenol simple	Diterpene phénolique
12		I*	Carnosol isomère	-	-	330.18	-	353	-	<b>285</b>	Phenol simple	Diterpene phénolique
13	M_EtOH	A	Kaempferol-3-O-rutinoside	8	225	594.52	595	-	593	<b>449</b> (+), 449	Flavonoids	Flavonoid glycosides
14		B	Non identifié	11	253	-	-	378	-	-	-	-
15		B*	Non identifié			-	-	380	359	-	-	-
16		C	Flavocommelin	11.2	256	608.54	609	-	607	<b>631</b> (+)	Flavonoids	Flavonoid glycosides
17		D	Tricin	13.2	302-301	-	331	-	329	<b>314</b> (-), 299, 285	Flavonoids	O-methylated flavonoids
18	E	Non identifié	16.6	381-379	-	-	-	-	-	-	-	
19	M_EtA	A	Myricetin-3-O-galactoside	8.7	200	480.37	-	503	479	<b>319</b> (+)	Flavonoids	Flavonoid glycosides
20		B	Myricetin-3-O-rhamnoside	9.6	221-220	367.37	-	487	463	<b>319</b> (+)	Flavonoids	Flavonoid glycosides
21		C	Non identifié	14.6	335-337	-	-	491	467	-	-	-
22			Non identifié			-	-	508	-	-	-	-
23	D	Non identifié	16.1	367	-	-	-	-	-	-	-	

24	T_EtOH	A	Taxifolin	8.5	191-190	304.25	305		303	<b>285(-)</b>	Flavonoids	Flavans
25		B	Non identifié	10	253	-	-	378	357	-	-	-
26		B*	Acide rosmarinique			360.31	-	382	359	-	Acide phénolique	Acide hydroxycinnamique
27		C	Fustin ou 3',4',7,8- tetrahydroxyflavanone	11.6	266-265	288.25	289	-	287	<b>285(-)</b>	Flavonoids	Flavans
28		D	3,4,3',4'-tetrahydroxy-5,5'- diisopropyl-2,2'- dimethylbiphenyl	13.1	302-301	330.41	331	-	329	<b>314(+), 285</b>	Biphenols	
29		E	Hispidulin	14.5	332	300.26	301	-	299	<b>284(-)</b>	Flavonoids	O-methylated flavonoids
30			Eupatilin ou Nevadensin			344.31	345	-	343	<b>328(-)</b>	Flavonoids	O-methylated flavonoids
31		F	Non identifié	16.6	381-380	-	-	-	-	-	-	-
32	T_EtA	A	Non identifié	7.9	182-181	-	633		631	-	-	-
33		B	Myricetin-3-O-galactoside	8.8	200-199	480.37	481	503	479	<b>319(+)</b>	Flavonoids	Flavonoid glycosides
34		C	Myricetin-3-O-rhamnoside	9.6	220	464.37	465	487	463	<b>316(-), 928</b>	Flavonoids	Flavonoid glycosides
35		D	Non identifié	10.1	232	-	-	-	-	-	-	-
36		E	Apigenin-7-O-glucuronide	20.2	462-461	446.36	447	-	445	-	Flavonoids	Flavonoid glycosides

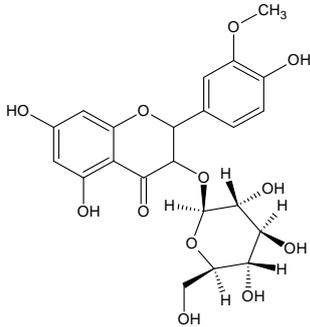
# Annexe 6



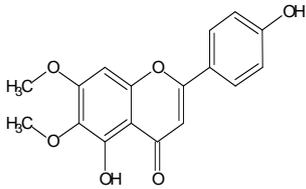
Chromatogrammes obtenus par LC-UV / PAD des extraits de romarin, myrte, thym en modes d'ionisation positive et négative.

## Annexe 7

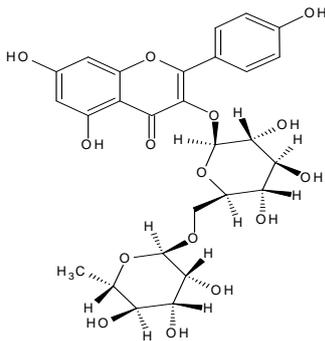
Isorhamnetin-3-O-glucoside



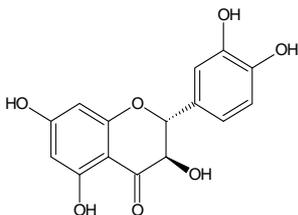
Cirsimaritin



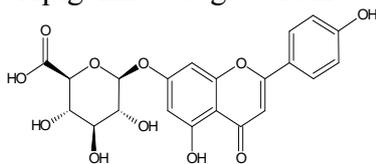
Kaempferol-3-O-rutinoside



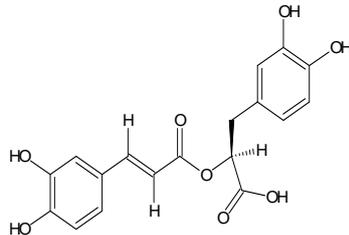
Taxifolin



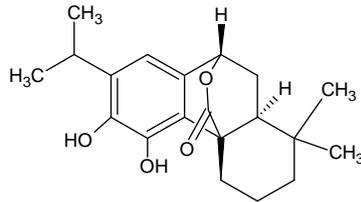
Apigenin-7-O-glucuronide



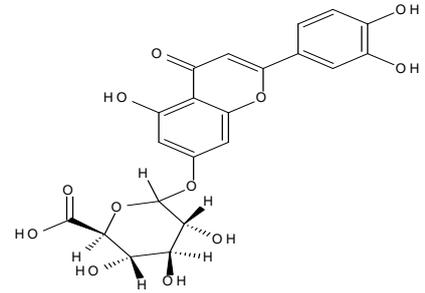
Acide rosmarinique



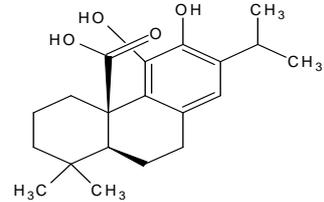
Carnosol



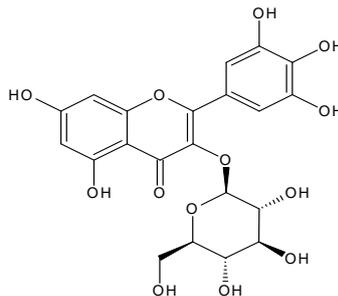
Luteolin-7-glucuronide



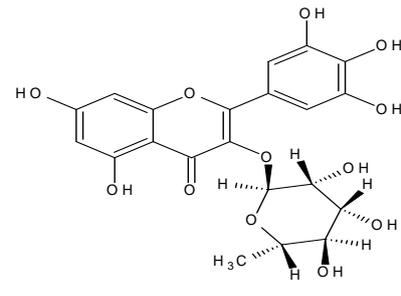
Acide carnosique



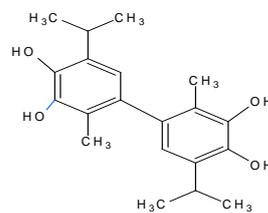
Myricetin-3-O-galactoside



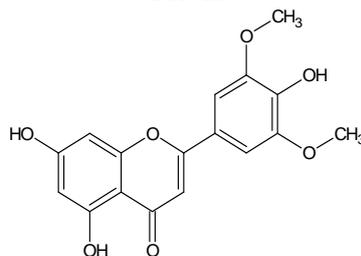
Myricetin-3-O-rhamnoside



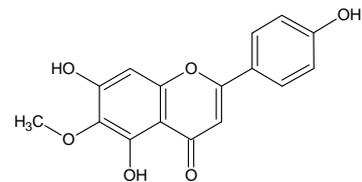
3,4,3',4'-tetrahydroxy-5,5'-  
diisopropyl-2,2'-  
dimethylbiphenyl



Tricin



Hispidulin



Les structures chimiques des composés révélés dans la composition des extraits de romarin, de myrte et de thym.

